



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**NATÁLIA ARAGÃO DIAS**

**CONDIÇÕES DE ELUIÇÃO PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS  
POLICLONAIS DE COELHO POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE**

**FORTALEZA**

**2021**

NATÁLIA ARAGÃO DIAS

CONDIÇÕES DE ELUIÇÃO PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIIS  
DE COELHO POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Bioquímicos/Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior  
Co-orientador: Prof. Dr. Diego Romão Gondim

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D533c Dias, Natália Aragão.  
CONDIÇÕES DE ELUIÇÃO PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS DE  
COELHO POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE / Natália Aragão Dias. – 2021.  
52 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,  
Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da  
Silva Júnior. Coorientação: Prof. Dr.  
Diego Romão Gondim.

1. Anticorpos policlonais. 2. Purificação. 3. Cromatografia de afinidade. I. Título.

CDD 660

---

NATÁLIA ARAGÃO DIAS

CONDIÇÕES DE ELUIÇÃO PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIIS  
DE COELHO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Bioquímicos/Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Diego Romão Gondim

Aprovada em: 28/01/2021.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Raquel Petrilli Eloy  
Universidade de Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Aos meus pais, Aloisio e Vera.

À minha irmã, Camila.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, meu pai Aloisio, minha mãe Vera, minha irmã Camila, meu namorado Thiago, pelo apoio imenso aos meus estudos.

Agradeço ao meu orientador professor Ivanildo, meu coorientador professor Diego, meus companheiros de trabalho Tiago, Larissa, Iza, Luiz Bruno, Darlysson, Karina, que foram fundamentais no apoio ao trabalho de pesquisa.

Agradeço à professora Denise Hissa e ao meu colega e amigo de trabalho Jonathan que dispuseram seu tempo para me dar apoio em seu laboratório.

Agradeço aos meus colegas de mestrado que passaram esses anos na luta comigo! Agradeço aos meus amigos do Animais Universitários: Lara, Taíse, Rosana, Tainah, Mayara, Luzara, Juh, Paulo, Mari, por todo apoio emocional incrível que me deram ao longo de 2020.

Agradeço à CAPES e ao CNPQ pela bolsa de mestrado e pelas bolsas de iniciação científica ao longo dos anos que possibilitaram meus estudos e minhas pesquisas. Também agradeço ao Grupo GPSA pela oportunidade do trabalho com pesquisa.

“We keep moving forward, opening new doors,  
and doing new things, because we’re curious and  
curiosity keeps leading us down new paths.”  
(Walt Disney)

## RESUMO

Anticorpos policlonais podem ser utilizados para aplicações em medicina diagnóstica em doenças infecciosas e imunológicas. Os coelhos têm uma forte resposta imune contra organismos estranhos devido à sua alta produção de diferentes anticorpos. Os anticorpos do soro de coelho têm algumas vantagens sobre outros os de mamíferos: estrutura mais simples de IgG, maior afinidade por ligantes e ciclo reprodutivo mais rápido. Além de possuir mais tipos diferentes de anticorpos. Este trabalho tem como objetivo estudar as melhores condições de eluição para purificar anticorpos policlonais do soro de coelho usando a cromatografia de afinidade em uma coluna de proteína A. Através da pesquisa bibliográfica, foram estabelecidas condições iniciais para operar os ensaios cromatográficos, que foram: 2,5 mg mL<sup>-1</sup> de concentração da amostra nos testes iniciais; Fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 como tampão escolhido nas etapas de carregamento, lavagem e regeneração; tampão Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3 e tampão Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 como tampões de eluição. Como resultados, os cromatogramas apresentaram perfil satisfatório: formaram picos bem definidos na eluição, que foram analisados através das amostras coletadas. A eletroforese em poliacrilamida e o Dot Blot foram realizados para identificar as proteínas nas amostras coletadas. No final da etapa de lavagem foi observado a presença de albumina do soro do coelho praticamente isolada. Já na etapa de eluição, foi observado a presença de IgG de coelho mais pura que o padrão utilizado. Os testes posteriormente realizados foram feitos usando diferentes concentrações da amostra: 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram que a concentração do soro não teve influência na porcentagem de proteína retida da amostra inicial. Também foram realizadas corridas cromatográficas com diferentes molaridades do tampão (50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM e 1000 mM) . Os melhores resultados foram coletados, cuja etapa de eluição consistiu em tampão Glicina-HCl 100 mM, pH 2,8, com 2,5 mg mL<sup>-1</sup> de carga de amostra. O Dot Blot permitiu detectar a presença da IgG de Coelho purificada nas corridas cromatográficas realizadas. Dessa forma, conclui-se que o tampão Glicina-HCl pH 2,8 e Citrato de Sódio pH 3,3 foram eficazes no processo de purificação da imunoglobulina G a partir do soro do coelho diluído.

**Palavras-chave:** anticorpos policlonais, purificação, cromatografia de afinidade, Proteína A.



## ABSTRACT

Polyclonal antibodies can be used for diagnostic medicine applications in infectious and immunological diseases. Rabbits have a strong immune response against foreign organisms due to their mechanism regarding the production of different antibodies. Antibodies from rabbit serum have some advantages over other mammalian antibodies: simpler structure of IgG, higher ligand affinity and faster reproductive cycle. In addition, they produce more different types of antibodies. Protein A (*Staphylococcus aureus*) has been widely used to purify antibodies. This work aims to study the best elution conditions to purify polyclonal antibodies from rabbit serum using affinity chromatography technology in a Protein A column. Through literature research, it was possible to establish initial conditions to operate the chromatographic runs. They consisted in 4 steps: Loading, Wash, Elution and Regeneration. The sample concentration in the initial tests was  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . The buffer chosen in Loading, Wash and Regeneration steps was Sodium Phosphate buffer 25mM pH 7.0. Chromatographic runs were performed using Sodium Citrate buffer 100mM pH 3.3 and Glycine-HCl buffer 100mM pH 2.8. Both had satisfactory results, but Glycine-HCl showed a higher specificity to the protein. SDS-PAGE Electrophoresis was performed to identify the proteins in the collected samples. The chromatograms presented a satisfactory profile: they formed well defined peaks in the elution, which were analyzed through the collected samples. Electrophoresis was performed to identify proteins in the collected samples. At the end of the washing step the presence of practically isolated rabbit serum albumin was observed. In the elution stage, the presence of rabbit IgG purer than the standard was observed. The subsequent tests carried out using different sample concentrations:  $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$  and  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . The results showed that the serum concentration did not have influence in the percentage of retained protein from the initial sample. Chromatographic runs with different buffer molarities were also performed (50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM e 1000 mM). The best results were collected from the run which elution step consisted of Glycine-HCl buffer 100mM pH 2.8 with  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$  of sample loading. Dot Blot Technique detected the presence of rabbit IgG purified from all chromatographic runs. Thus, it is concluded that the buffer Glicina-HCl pH 2.8 and Sodium Citrate pH 3.3 were effective in the process of purification of immunoglobulin G from the diluted rabbit serum.

**Keywords:** polyclonal antibodies, purification, affinity chromatography, Protein A.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anticorpos Monoclonais e Policlonais .....	17
Figura 2 – Estrutura da Imunoglobulina G .....	18
Figura 3 – Processo de Cromatografia de Afinidade.....	22
Figura 4 – Estrutura do complexo entre o domínio Fb da proteína A e o fragmento Fc da imunoglobulina G .....	24
Figura 5 – Coluna HiTrap® Protein A acoplada no ÄKTA Start Protein Purification System .....	27
Figura 6 – Fluxograma referente à ordem dos ensaios .....	29
Figura 7 – ÄKTA Start: Sistema de Purificação de Proteína .....	29
Figura 8 – (A) Amostra: Soro de Coelho, concentração = 2,5 mg mL <sup>-1</sup> . Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Tampão Eluição: Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3 (B) Amostra: Soro de Coelho, concentração = 2,5 mg mL <sup>-1</sup> . Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Tampão Eluição: Glicina-HCl 100 mM pH 2,8.....	32
Figura 9 – Estrutura molecular de Glicina-HCl.....	33
Figura 10 – Estrutura molecular de Citrato de Sódio .....	33
Figura 11 – (A) Eletroforese da corrida com Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3 como tampão de eluição (B) Eletroforese da corrida com Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 como tampão de eluição. Em que: P é o padrão de proteína, A é a amostra inicial a ser carregada, E é a amostra da eluição. A IgG padrão utilizada é humana comercial (Sigma). Amostra: Soro de Coelho, concentração = 2,5 mg mL <sup>-1</sup> . Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Para a faixa de eluição: o círculo vermelho é referente à IgG obtida na eluição. Para a faixa de lavagem: o círculo vermelho é referente à albumina de Coelho (RSA) obtida na lavagem. ....	34
Figura 12 – (A) Amostra: Soro de Coelho, concentração = 1,0 mg mL <sup>-1</sup> . Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Tampão Eluição: Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 (B) Amostra: Soro de Coelho, concentração = 5,0 mg mL <sup>-1</sup> . Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Tampão Eluição: Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 .....	35
Figura 13 – (A) Eletroforese da corrida cromatográfica utilizando Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 como tampão eluição. Concentração da amostra carregada: 1,0 mg mL <sup>-1</sup> (B) Eletroforese da corrida cromatográfica utilizando Glicina-HCl 100 mM pH 2,8	

como tampão eluição. Concentração da amostra carregada: 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Em que: P é o padrão de proteína, A é a amostra inicial a ser carregada, E é a amostra da eluição. Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0..... 36

Figura 14 – Corrida cromatográfica utilizando Glicina-HCl pH 2,8 como tampão eluição em diferentes molaridades. Amostra: Soro de Coelho, concentração = 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0..... 37

Figura 15 – Eletroforese das corridas cromatográficas utilizando Glicina-HCl pH 2,8 como tampão eluição em diferentes concentrações: A) 50 mM B) 100 mM C) 200 mM D) 500 mM E) 1000 mM. Em que: P é o padrão de proteína, A é a amostra inicial a ser carregada, E é a amostra da eluição. .... 39

Figura 16 – Procedimento Dot Blot das amostras de eluição das corridas cromatográficas: C+ = Controle Positivo; C- = Controle Negativo; A = Amostra Inicial (soro de coelho); C = Corrida com eluição de Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GC1 = Corrida com eluição de Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GC2 = Corrida com eluição de Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; GC3 = Corrida com eluição de Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 5,0 mg mL<sup>-1</sup>; GM1 e GM1' (duplicatas) = Corrida com eluição de Glicina-HCl 50 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GM2 e GM2' = Corrida com eluição de Glicina-HCl 200 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GM3 e GM3' = Corrida com eluição de Glicina-HCl 500 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GM4 = Corrida com eluição de Glicina-HCl 1000 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. .... 41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo de cada etapa no AKTA .....	30
Tabela 2 – Proteína Total Retida: Comparação entre diferentes molaridades do tampão eluição .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amostra
E	Eluição
IgG	Imunoglobulina G
KD	Constante de Dissociação
MAb	Anticorpos Monoclonais
P	Proteína
PAb	Anticorpos Policlonais
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
pH	Potencial de Hidrogênio
pI	Ponto Isoelétrico
RSA	Albumina de Soro do Coelho
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPA	Native staphylococcal protein A
Tris	Trizima
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
<i>Pretida</i>	Proteína Retida
<i>Pcarregamento</i>	Proteína relativa ao carregamento
<i>Peluição</i>	Proteína relativa à eluição
<i>Ptotal</i>	Proteína total

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Anticorpos</b> .....	<b>16</b>
<i>2.1.1</i>	<i>Anticorpos monoclonais e policlonais</i> .....	<i>16</i>
<i>2.1.2</i>	<i>Imunoglobulina G</i> .....	<i>17</i>
<i>2.1.3</i>	<i>Imunoglobulina G do Coelho</i> .....	<i>18</i>
<i>2.1.4</i>	<i>Albumina do soro do coelho</i> .....	<i>20</i>
<b>2.2</b>	<b>Cromatografia</b> .....	<b>21</b>
<i>2.2.1</i>	<i>Cromatografia de Afinidade</i> .....	<i>21</i>
<i>2.2.2</i>	<i>Proteína A</i> .....	<i>23</i>
<b>2.3</b>	<b>Condições de Eluição</b> .....	<b>25</b>
<i>2.3.1</i>	<i>Eluição com uma coluna de Proteína A</i> .....	<i>25</i>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>28</b>
<i>3.2.1</i>	<i>Corridas Cromatográficas no ÄKTA</i> .....	<i>28</i>
<i>3.2.2</i>	<i>Análise Qualitativa das proteínas: Eletroforese SDS-PAGE</i> .....	<i>30</i>
<i>3.2.3</i>	<i>Dot Blot</i> .....	<i>31</i>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Corridas Iniciais – Comparação entre Tampões Citrato e Glicina-HCl</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Corridas variando a concentração da amostra carregada</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Corridas variando a molaridade do tampão eluição</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Anticorpos representam uma classe de moléculas que se ligam a uma ampla gama de alvos em aplicações terapêuticas, diagnósticas e em pesquisa. Uma boa quantidade de anticorpos diferentes é necessária para desenvolver uma resposta imune adaptativa eficaz contra corpos estranhos no organismo. Várias espécies desenvolveram novos mecanismos genéticos e estruturais dos quais derivam esses repertórios de anticorpos, no entanto, eles são geralmente isolados de fontes humanas e de roedores (CONROY, 2017).

Por essas aplicações, muita inovação resultou em técnicas e abordagens para isolar novos anticorpos (CONROY, 2017). Os coelhos apresentam uma forte resposta imunológica contra organismos estranhos por conseguirem desenvolver um mecanismo diferente de ratos e humanos na produção de diferentes anticorpos (BYSTRYN *et al.*, RAYBOULD e TAKAHASHI, 1988).

O organismo dos coelhos é muito mais complexo do que o dos ratos e possuem um baço maior, capaz de produzir uma maior diversidade de anticorpos específicos e de boa afinidade. (YU *et al.*, 2010). A imunoglobulina G do coelho tem sido objeto de estudo por trabalhos com. A IgG faz parte de uma subclasse de anticorpos. É uma proteína muito importante que pode ser usada para detectar e reconhecer doenças virais e bacterianas. Doenças infecciosas, doenças do fígado e artrite reumatóide são causadas por altos níveis de imunoglobulina G. anticorpos (NOELKEN *et al.*, 1965; GIRARDI *et al.*, 2009; RAYNER *et al.*, 2013)

Além disso, a imunoglobulina G pode ser usada para tratar doenças auto- imunes, câncer e outras condições que há uma deficiência de anticorpos. No entanto, para isso, é necessária uma quantidade muito grande de proteínas isoladas e de alta pureza (BURNOUF E RADOSEVICH, 2001). Para purificar proteínas, existem várias técnicas cromatográficas como filtração em gel, troca iônica e cromatografia por afinidade (OZKARA *et al.*, 2004; YAVUZ *et al.*, 2006).

Entre diferentes técnicas de separação para purificar uma proteína-alvo, a cromatografia de afinidade é um dos métodos bioquímicos mais seletivos e eficientes para a purificação de anticorpos usando o processo de adsorção. (ARORA *et al.*, 2017). Além disso, é o método geralmente escolhido quando há uma interação imuno-específica e, às



vezes, o único passo necessário. A cromatografia de afinidade oferece grandes vantagens na purificação de fragmentos de anticorpos ou qualquer outro tipo de fonte de proteína (AYYAR *et al.*, 2012; HEALTHCARE, 2014). Há uma diversidade de moléculas como enzimas, coenzimas, anticorpos, proteínas, ácidos nucleicos que podem ser utilizados como ligantes imobilizados em matrizes adsorventes (DENIZLI e PISKIN, 2001).

A proteína A é uma das primeiras moléculas de ligação de imunoglobulinas descobertas e vem sendo extensivamente estudada nas últimas décadas. Devido à sua afinidade com as imunoglobulinas, a proteína A encontrou um amplo uso como ferramenta na detecção e purificação de anticorpos e a molécula foi desenvolvida para um dos sistemas de purificação por afinidade mais empregados (HOVEN *et al.*, 2007).

Para otimizar o processo de purificação, é necessário encontrar as melhores condições para purificar as proteínas de uma solução biológica. Por isso, é necessário fazer um estudo extensivo sobre as condições de um processo cromatográfico. As etapas de eluição e lavagem são muito importantes e devem ter estudo e embasamento antes de serem testadas. Concentração, pH e força iônica são fatores que influenciam na purificação de uma proteína quando se usa a técnica de cromatografia de afinidade.

Os tampões de lavagem e de corrida para um processo cromatográfico não devem ter força iônica elevada, pois isso interfere na adsorção da proteína-alvo da coluna, que deve sofrer o mínimo de interação possível com a fase móvel para poder se ligar ao ligante da matriz adsorvente. Os tampões de eluição devem fornecer condições drásticas para conseguirem retirar a proteína-alvo da coluna, pois a interação de afinidade entre a Proteína A e um anticorpo específico é muito alta, por se tratar de um ligante bioespecífico. Nesse caso, os tampões devem possuir um tampão de pH ácido, como a Glicina-HCl e o Citrato de Sódio, com força iônica adequada (ARAKAWA *et al.*, 2004; SHUKLA *et al.*, 2007; MAZZER *et al.*, 2015).

Visto que a purificação de moléculas de alto valor para a indústria farmacêutica utilizando cromatografia de Proteína A possui custos bastante elevados, é necessário estabelecer as melhores condições para aproveitamento máximo do processo. O objetivo desse trabalho foi purificar anticorpos policlonais visando aplicação diagnóstica de diversas doenças, fazendo um estudo sobre as melhores condições de eluição no processo de dessorção da coluna cromatográfica. Soro do coelho será utilizado como solução matriz biológica para purificação.

## **1.1 Objetivos**

A partir de pesquisa bibliográfica, avaliar e encontrar as melhores condições de eluição para a purificação de anticorpos do soro do coelho.

## **1.2 Objetivos Específicos**

Dentro do objetivo geral, os objetivos específicos são:

- Verificar a eficácia dos tampões Glicina-HCl e Citrato de Sódio na etapa de eluição da purificação de anticorpos do soro de coelho;
- Selecionar, dentre as diversas condições de variação de molaridade do tampão eluição e concentração inicial do soro do coelho, a melhor condição para o processo de purificação;
- Confirmar o sucesso da purificação por métodos qualitativos: Dot Blot e Eletroforese.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Anticorpos

Anticorpos terapêuticos são uma classe de produtos biofarmacêuticos que têm provocado grande interesse para a desenvolvimento de tecnologia para sua purificação. Em 1986, o primeiro anticorpo monoclonal para prevenção de rejeição de transplante renal (Orthoclone OKT3) foi fundamental para que outros tipos de anticorpos, incluindo fragmentos e conjugados de proteína, fossem desenvolvidos. Dessa maneira, há uma expectativa de que esses produtos sejam dominantes do mercado biofarmacêutico até 2020 (SALIMI *et al.*, 2018).

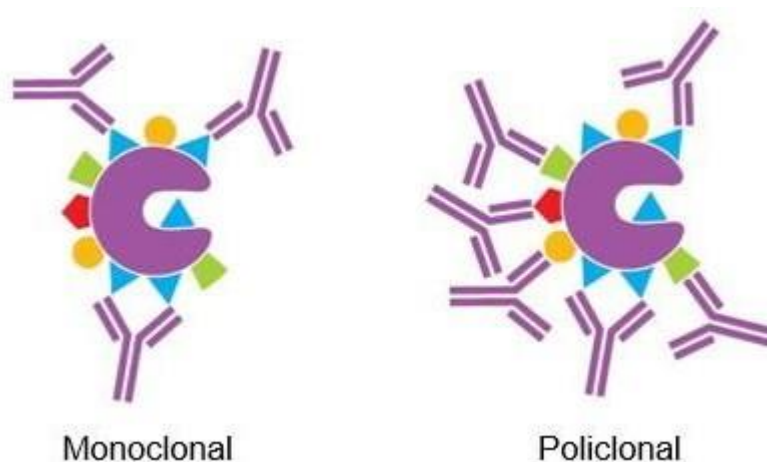
Os anticorpos são utilizados em imunodiagnóstico e imunoterapia para o tratamento de várias doenças, além de possuir aplicações de pesquisa científica. Os processos de purificação das moléculas em larga escala correspondem a 50-80% dos custos de produção. Esses processos se referem à purificação de produtos de aplicação farmacêutica, originados de fontes biológicas como animais, tecidos de plantas ou fermentação de caldo biológico. Portanto, empregar um método eficiente e econômico é de suma importância para deixar os preços dos anticorpos terapêuticos mais acessíveis (MARIAM *et al.*, 2015).

#### 2.1.1 Anticorpos monoclonais e policlonais

Os anticorpos possuem alta especificidade na identificação de antígenos. Podem ser classificados em dois tipos: monoclonal e policlonal. Os anticorpos monoclonais são produzidos por um linfócito B, sendo replicados igualmente inúmeras vezes. Dessa forma, conseguem se ligar apenas com um epítopo. Por outro lado, os anticorpos policlonais podem reagir com vários epítopos de um antígeno e são formados por diferentes linfócitos B. A imunoglobulina G é a classe mais estudada para o reconhecimento de antígenos dentre os anticorpos monoclonais e policlonais (LENZ, 2004).

A Figura 1 mostra os anticorpos se ligando apenas a epítopos específicos (ilustrados pelos triângulos) no anticorpo monoclonal, enquanto no anticorpo policlonal os anticorpos se ligam à vários outros epítopos.

Figura 1 – Anticorpos Monoclonais e Policlonais<sup>1</sup>



Os anticorpos monoclonais de mamíferos têm sido utilizados no tratamento de doenças autoimunes, hepatites, realização de diversos exames laboratoriais para detecção de doenças, como a faringite e febre reumática (MA, *et al.*, 2008; MARIAM, *et al.*, 2015), identificação de doenças infecciosas como dengue e zika (FIGUEIREDO, *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2010) e no tratamento de alguns tipos de câncer (ZARAGOZA *et al.*, 2015). Por não possuírem a capacidade de se ligar a vários epítopos de um antígeno, o uso de anticorpos monoclonais resulta em altos custos por conta de seu fracionamento proveniente dos anticorpos policlonais, além da dificuldade de identificação do antígeno de uma doença ou infecção.

Há uma grande demanda dessa classe de anticorpos em larga escala, o que requer diminuição dos custos de produção e realização de processos com alto rendimento que possam ser utilizados na indústria farmacêutica (SALIMI, *et al.*, 2018). Anticorpos policlonais, uma das proteínas terapêuticas presentes no soro, são considerados mais eficazes do que anticorpos monoclonais devido à sua capacidade de se ligarem a múltiplos epítopos em um antígeno. Dessa forma, a produção de IgG policlonal contra um antígeno pode ser útil no diagnóstico clínico e tratamento para infecção viral. (MARIAM *et. al.*, 2015).

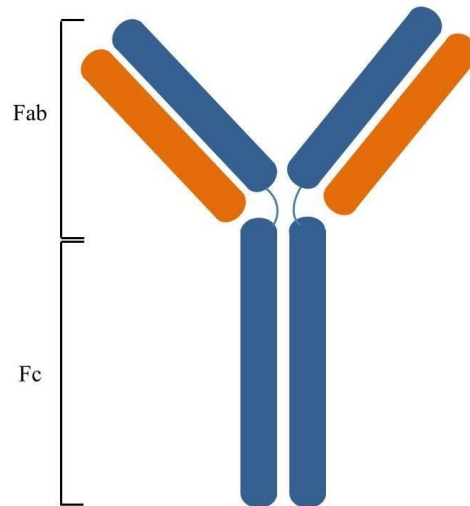
### 2.1.2 Imunoglobulina G

A imunoglobulina gerada pelo sistema imunológico dos animais funciona como um anticorpo que defende o organismo de bactérias, vírus e células cancerígenas. As

<sup>1</sup> Fonte: Imunohistoquímica na Detecção do Câncer: Mecanismos e Aplicações. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/3631856/>.

imunoglobulinas do isotipo G (IgGs) são os anticorpos mais abundantes encontrados no corpo animais, induzidos pelas Células B do plasma para proteger o corpo de patógenos, como fungos, bactérias e vírus (MEFFRE *et. al.*, 2000).

Figura 2 – Estrutura da Imunoglobulina G



Fonte: Autor.

A imunização de um antígeno específico em mamíferos é uma estratégia comum para gerar anticorpos específicos para fins terapêuticos. Além disso, funcionam como reagentes para investigação de funções protéicas. A Figura 2 mostra a estrutura de uma molécula de imunoglobulina G. Normalmente, um anticorpo IgG consiste em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, formando uma estrutura molecular em Y. O domínio Fab (fragmento de ligação ao antígeno) da IgG é responsável pela especificidade no reconhecimento de antígenos. O domínio Fc (fragmento cristalizável) é responsável pelas interações com receptores Fc ou com outras proteínas, como a Proteína A (GUO *et al.*, 2017).

### 2.1.3 Imunoglobulina G do Coelho

Anticorpos de coelho são bastante utilizados em medicina diagnóstica e como ferramenta de pesquisa. Possuem muitas vantagens em relação aos anticorpos de ratos por reconhecerem muitos antígenos e epítomos que não provocam resposta imunológica nos ratos ou em outros animais. Além disso, anticorpos de coelho exibem alta afinidade e especificidade (WEBER *et al.*, 2017).

A maioria dos anticorpos aprovados para aplicações clínicas são originados de ratos. Contudo, o organismo desse mamífero possui um pequeno baço, o que oferece uma diversidade muito menor de resposta imunológica quando comparado ao organismo do coelho.

Por ter uma organização molecular mais complexa, o baço do coelho consegue produzir um grande número de anticorpos com alta afinidade e especificidade (YU *et al.*, 2010).

Anticorpos provenientes do soro do coelho apresentam as seguintes vantagens em relação aos anticorpos de outros mamíferos: estrutura mais simplificada, maior afinidade ao ligante, ciclo de reprodução mais rápido e maior facilidade do processo para ser aplicado em humanos. Além disso, produzem mais tipos de anticorpos diferentes (FENG *et al.*, 2011).

Apesar dos coelhos gerarem anticorpos primários da mesma maneira que ratos e humanos, eles podem desenvolver repertórios secundários de anticorpos com mecanismo semelhante à conversão gênica. Além disso, também são capazes de hipermutações somáticas, onde as células sofrem mutação para que o sistema imunológico consiga se adaptar a novos organismos invasores (SCHIAFFELLA *et al.*, 1999).

Anticorpos de coelho aparentam ser mais simples que os gerados por ratos e humanos. Diferentemente desses mamíferos, eles não possuem uma das subclasses de Imunoglobulina em seu sistema imunológico, a IgD (ROSSI *et al.*, 2005). A classe de imunoglobulinas mais abundante no soro do coelho é a IgG, que possui concentração variante de 5 a 20 mg mL<sup>-1</sup>. Diferentemente de outras espécies, a IgG do coelho não possui subclasses. Além disso, esse anticorpo tende a ter menos aminoácidos na terminação -N da cadeia, além de ter ligações dissulfídicas extras na região da cadeia pesada (FENG *et al.*, 2011).

Suspeita-se que a maior estabilidade dos anticorpos de coelho é, em parte, resultado da estabilização de um componente de cadeia leve por uma ponte dissulfeto (KNIGHT e CRANE, 1994; AN, 2009). As características mais simples da IgG de coelho facilitam a clonagem molecular e a engenharia de anticorpos que são muito críticos no desenvolvimento de medicamentos a base de anticorpos. Esses compostos causam efeitos colaterais através de interações não específicas. Portanto, a alta afinidade é muito importante para se produzir fármacos de qualidade (FENG *et al.*, 2011).

Enquanto a maioria dos anticorpos terapêuticos tem a constante de dissociação ( $K_D$ ) em nível nanomolar ou menor, anticorpos provenientes do soro do coelho possuem uma afinidade muito alta, com o  $K_D$  de grandeza picomolar (AN, 2009). Seria razoável prever que esses anticorpos deveriam apresentar melhor eficácia clínica através da interação específica com biomoléculas-alvo. Geralmente, é desejável investigar uma grande variedade de compostos para identificar condutores de fármacos. Este princípio também se aplica ao rastreamento de

anticorpos monoclonais para drogas terapêuticas de anticorpo. O coelho tem uma vantagem sobre o rato porque seu baço contém até 50 vezes mais linfócitos (FENG *et al.*, 2011).

Centenas de hibridomas podem ser gerados a partir de cada baço imunizado, fornecendo um número muito maior de anticorpos monoclonais independentes que reconhecem diferentes epítomos. Dessa forma, uma variedade de anticorpos pode ser facilmente obtida. Eles oferecem uma taxa de sucesso superior em relação a obtenção de medicamentos de maior demanda em um período relativamente curto de tempo. (FENG *et al.*, 2011).

Anticorpos provenientes do soro do Coelho possuem muitas aplicações no campo de pesquisa e de medicina diagnóstica. Anticorpos policlonais de coelho foram purificados utilizando cromatografia de troca iônica com recuperação de 80% da imunoglobulina G. (WONGCHUPAN *et al.*, 2011). Utilizando microesferas de poliestireno, Ma *et al.* (2008) investigou os aspectos que influenciam na adsorção de anticorpos de coelho, como pH e força iônica, destacando a importância do estudo da influência eletrostática, pois os mecanismos de adsorção são muito complexos por causa das características estruturais das moléculas de proteína, que contêm resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, carregando energia elétrica negativa ou positiva.

#### **2.1.4 Albumina do soro do coelho**

A albumina é a proteína do plasma mais abundante em mamíferos, multifuncional e com extraordinária afinidade com ligantes, tornando-a uma molécula transportadora para uma ampla gama de metabólitos, drogas, nutrientes, metais e outras moléculas. Devido às suas propriedades de afinidade a uma matriz ligante, as albuminas têm amplas aplicações clínicas, farmacêuticas e bioquímicas (MAJOREK, 2012).

A albumina está presente em diferentes tecidos, como intestino, fígado, músculo e pele, e cerca de 30% da albumina total em todo o corpo do animal está presente no soro. Como principal proteína no sistema circulatório dos vertebrados (representa mais de 50% da proteína total no soro), desempenha um papel importante, como principal contribuinte para a pressão arterial osmótica coloidal (MONKOS, 2005).

Essas proteínas são alergênicas e exibem um alto grau de reatividade cruzada devido à similaridade significativa de sequência e estrutura de albuminas de diferentes organismos (MAJOREK, 2012). Não há muitos trabalhos na

literatura que visam à purificação de albumina do soro do coelho. O que mais existe são estudos de sua estrutura para aplicações variadas na indústria farmacêutica e de cosméticos

(MONKOS, 2005; MAJOREK, 2012; ALI *et al.*, 2010a, ALI *et al.*, 2010b). Contudo, há trabalhos na literatura de purificação de albuminas de soro humano (NGUYEN *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2018), ovino (NEWCORBE *et al.*, 2005), bovino (LIU *et al.*, 2013) e de rato (SCHOFIELD, 1980).

## **2.2 Cromatografia**

Os anticorpos continuam sendo extremamente utilizados em inúmeras aplicações, incluindo pesquisa básica, geração de imagens, entrega direcionada, cromatografia, diagnóstico e aplicação terapêutica. No estágio de produção, os anticorpos geralmente estão presentes em matrizes complexas e a maioria das aplicações pretendidas requer purificação. A purificação de anticorpos sempre foi um processo complicado, devido à necessidade de produtos de alta qualidade e aos altos custos associados. Ao longo dos anos, uma extensa pesquisa concentrou-se em encontrar melhores metodologias de purificação para superar esse atraso. Entre uma infinidade de técnicas diferentes, a cromatografia de afinidade é um dos métodos mais seletivos, rápidos e fáceis para a purificação de anticorpos.

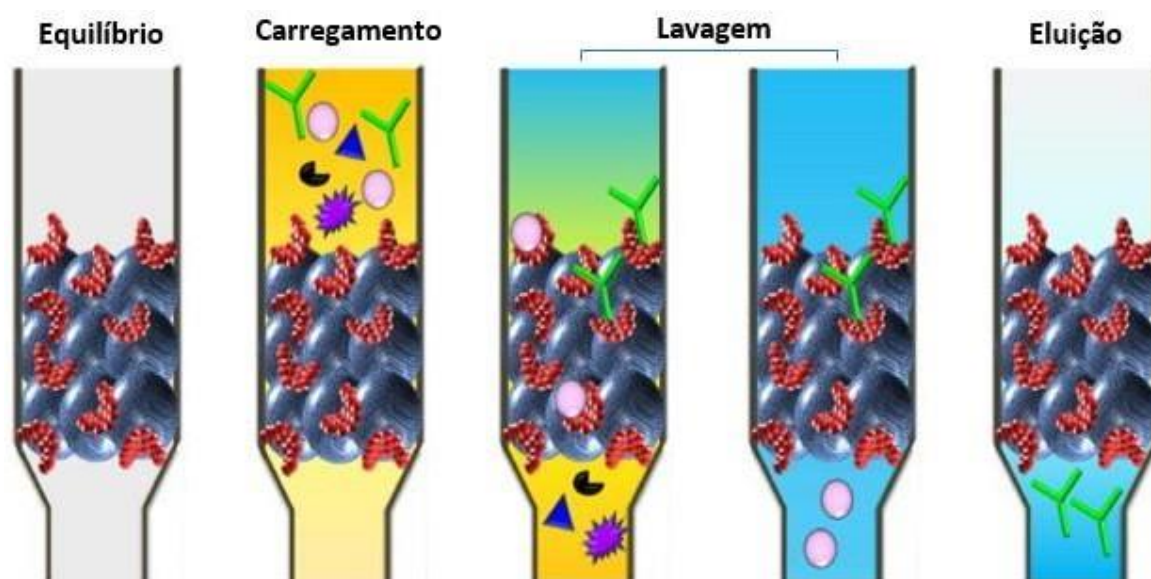
Há inúmeras pesquisas que visam estudar diferentes técnicas para alcançar um nível de purificação satisfatório, já que normalmente a indústria farmacêutica exige um alto grau de pureza para a aplicação dessas proteínas. Em trabalhos recentes, anticorpos foram purificados utilizando materiais como resina biomimética híbrida (a partir do soro humano) (ZOU *et al.*, 2019), carbono ativado (a partir do soro de hamsters) (ISHIHARA *et al.*, 2019) e complexos de íons metálicos (a partir do soro humano e de ratos) (DHANDAPANI *et al.*, 2019), dentre outros trabalhos de purificação por cromatografia (GUÉLAT *et al.*, 2016; GONDIM *et al.*, 2012, 2014; BUTCHER *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2020; ARORA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016).

### **2.2.1 Cromatografia de Afinidade**

Entre várias técnicas de separação para purificação de proteínas, a cromatografia de afinidade apresenta maior seletividade e eficiência para purificação de anticorpos por meio de processos de adsorção (ARORA *et al.*, 2017). Além disso, essa técnica é normalmente utilizada quando há uma interação imuno específica. Geralmente, apenas uma etapa é necessária para se alcançar as etapas de purificação (HEALTHCARE, 2014).



Figura 3 – Processo de Cromatografia de Afinidade



Fonte: Ayyar (2012) – Adaptado.

Essa técnica consiste em imobilizar o ligante de afinidade numa matriz. O sistema deve-se encontrar em equilíbrio com uma solução tampão de pH próximo ao neutro, como mostra a primeira coluna da Figura 3. Uma amostra de solução biológica contendo a biomolécula-alvo é então injetada no sistema junto com a fase móvel, por exemplo, como IgG no soro de Coelho, etapa representada pela segunda coluna da Figura acima, chamada de carregamento (*Loading*). O sistema deve ter um pH e composição específicos para que o ligante de afinidade possa se ligar à proteína-alvo ao mesmo tempo que outros componentes se movem pela coluna, como demonstrado na terceira e quarta coluna da Figura 3, na etapa chamada de Lavagem. Dessa forma, a proteína retida no adsorvente passa por um processo de Eluição, que também exige que o sistema tenha um pH e composição específicos para que a proteína-alvo desfaça a interação com o ligante e então deixa a coluna, completando o processo de purificação. Em seguida, a coluna é equilibrada e assim o processo poderá ocorrer novamente (ARORA *et al.*, 2017).

Há alguns parâmetros que devem ser considerados na cromatografia de afinidade, em relação ao ligante: sua especificidade com a biomolécula-alvo, sua estabilidade em condições severas de eluição e lavagem, e sua capacidade de se ligar com a proteína mesmo depois de ser imobilizado numa matriz. Todas essas características são fundamentais para definir se o ligante de afinidade é adequado para o funcionamento do processo.

Enzimas, anticorpos, proteínas e ácidos nucleicos são moléculas que podem ser utilizadas como ligantes imobilizados em matrizes adsorventes (DENIZLI and PISKIN, 2001). Vários estudos têm sido feitos para desenvolver novos tipos de ligantes, a fim de otimizar a purificação de proteínas (SALIMI *et al.*, 2018; ARORA *et al.*, 2017, ZHANG *et al.*, 2016).

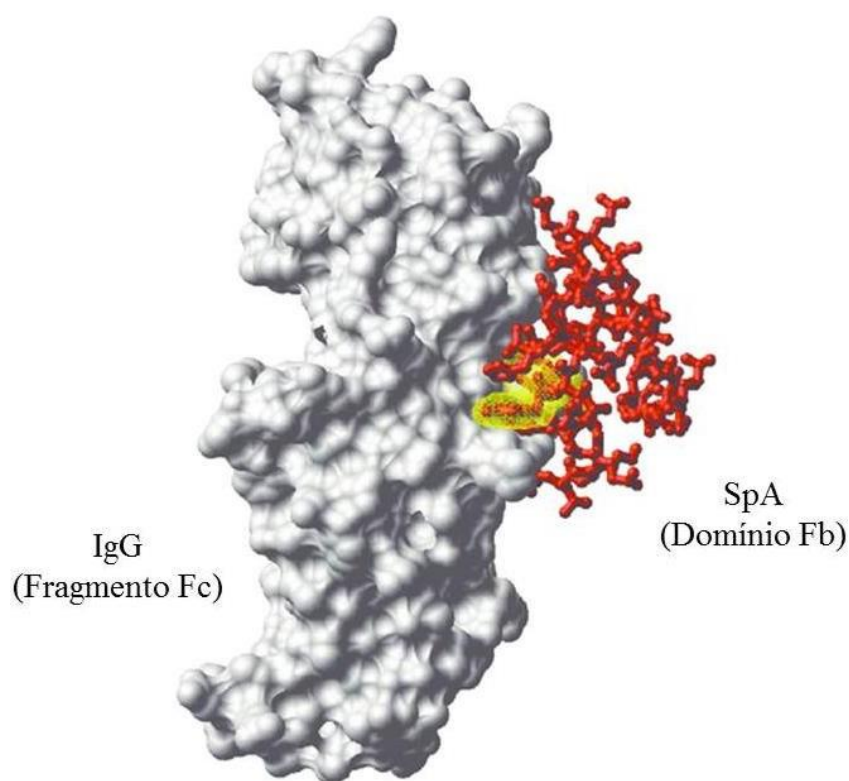
A porosidade da coluna cromatográfica, em geral, não dá acessibilidade às biomoléculas, devido ao seu grande tamanho. Isso desenvolve um grande impacto no movimento do interior das partículas, deixando o processo lento e dificultando que a coluna seja usada em sua capacidade total. Por sua vez, esses efeitos influenciam as operações, como o carregamento de proteínas e sua separação (FORRER *et al.*, 2008).

### **2.2.2 Proteína A**

A proteína A (SpA- *Native staphylococcal protein A*) possui 5 diferentes domínios de ligação homólogos a IgG, denominados E, D, A, B e C. O processo de cromatografia tem se baseado em proteína A modificada, em sua maioria derivadas do domínio B. Em comparação com a proteína não mutante, esse processo que utiliza a biomolécula modificada possui maior capacidade de ligação, um maior tempo de vida útil e estabilidade alcalina, além de melhor comportamento na eluição. A alta afinidade do ligante de proteína A para anticorpos requer condições severas de eluição com pH baixos como pH 3.0 (KREPPER *et. al.*, 2018).

A Proteína A *Staphylococcus aureus* tem sido bastante utilizada para purificação de anticorpos. Isso acontece devido à sua alta afinidade pelos domínios de ligação do tipo Fc de classes de imunoglobulinas, como por exemplo, a imunoglobulina G. Além disso, a proteína A possui alta estabilidade contra a ação de ácidos e ureia. A imunoadsorção da proteína A é usada principalmente para o tratamento de doenças relacionadas a anticorpos, como lúpus, por exemplo, por meio da eliminação de organismos patogênicos presentes no organismo. Uma alta capacidade de ligação entre IgG e a SpA imobilizada é muito importante para sua aplicação (LUO *et al.*, 2017). A Figura 4 mostra a interação da proteína A com uma molécula de Imunoglobulina G.

Figura 4 – Estrutura do complexo entre o domínio Fb da proteína A e o fragmento Fc da imunoglobulina G



Fonte: Solene *et al.* (2009), modificada pela autora.

O uso de Proteína A para uma etapa de captura primária de anticorpos diretamente de uma matéria-prima, como soro bruto, pode não ter viabilidade comercial em larga escala devido à viscosidade do soro. Além disso, essa solução biológica possui concentração relativamente alta de anticorpos e de outras proteínas (albumina, transferrina e outras proteínas séricas), além de impurezas (lipídios e muitas vezes crioprecipitados), que podem permanecer adsorvidas à coluna e impactar a dinâmica capacidade e reutilização da matriz (BAKER e BRADY, 1994).

Ainda sobre a operação, o carregamento de proteína pode ser muito ineficiente e a capacidade dinâmica de ligação muito pequena em comparação com a capacidade estática da coluna. A purificação também pode ter comportamento semelhante, já que limitações severas de transporte ampliam os picos de saída e reduzem a resolução de pico. O comportamento termodinâmico de anticorpos monoclonais e policlonais também é muito peculiar. A competição pela adsorção com sais é muito forte e a afinidade do anticorpo com a fase estacionária pode mudar drasticamente como resultado de pequenas variações da força iônica do sal (ANGARITA *et al.*, 2015).

A carga líquida de proteína pode consideravelmente mudar dependendo das variações de pH, afetando também a afinidade do anticorpo. A caracterização deste comportamento é geralmente muito complexa e ainda mais problemática por um fator adicional: A presença de fortes limitações ao transporte de massa deformam consideravelmente as formas dos picos e a aplicação de métodos típicos para caracterização de isotermas (FORRER *et al.*, 2008).

Na literatura se encontram vários trabalhos com purificação de anticorpos utilizando cromatografia de afinidade com uma coluna de Proteína A. Hober *et al.*, (2007) fizeram um estudo sobre a estrutura da molécula de SPA para aumentar a capacidade de adsorção da coluna de Proteína A com IgG humana, mostrando a importância da continuidade dos estudos relativos a esse tipo de ligante. Ele aplicou técnicas de engenharia de proteínas para melhorar ainda mais o design de moléculas de SPA, substituindo aminoácidos específicos e melhorando ainda mais o processo cromatográfico. Em um estudo mais recente, Wetterhall *et al.* (2019) conseguiu retirar a toxina de uma bactéria para obter anticorpos monoclonais utilizando uma coluna de Proteína A. A quantidade de toxina remanescente foi irrisória, provando o bom funcionamento da coluna em técnicas de purificação. No entanto, há poucos trabalhos na literatura envolvendo anticorpos policlonais, por isso é necessário o estudo dessa classe de moléculas.

## **2.3 Condições de Eluição**

### ***2.3.1 Eluição com uma coluna de Proteína A***

As etapas de um processo cromatográfico devem ser cuidadosamente estudadas. Os processos de purificação de anticorpos envolvem materiais de alto custo, e as condições de lavagem e eluição de uma coluna devem ser otimizadas para aproveitamento máximo do processo. As matrizes de Proteína A podem ser o único e mais caro item da lista de materiais necessários para o processo de purificação de anticorpos. Além disso, podem custar até 15 vezes mais que muitas colunas de troca iônica (FOLLMAN e FAHRNER, 2004).

A cromatografia de afinidade da Proteína A se baseia na ligação da região Fc (*fragment crystallizable region*) da biomolécula com o ligante imobilizado numa matriz suporte. Vários estudos comprovam a alta seletividade da Proteína A, que chega a purificar a molécula-alvo com níveis de até 99% de pureza (SHUKLA *et al.*, 2007). Por haver uma alta interação de afinidade, é necessário o uso de fortes tampões de lavagens. Cloreto de sódio com

alta força iônica (NaCl), ureia e isopropanol são exemplos são substâncias que podem ser utilizadas diluídas em tampões para remover impurezas da coluna (SHUKLA *et al.*, 2008; ABOULAICH *et al.*, 2014).

Após a etapa de lavagem, o equilíbrio da coluna deve ser feito com um tampão neutro preferencialmente de pH neutro, como por exemplo o Tris-HCl e o Fosfato de Sódio, para retirar os componentes residuais presentes no tampão de lavagem que permaneceram na coluna. A etapa de equilíbrio da coluna também tem a função de recuperar a proteína A após a lavagem com o tampão de lavagem em condições mais severas.

O tampão de equilíbrio não deve possuir uma grande quantidade de sal, pois é necessário que a proteína-alvo tenha baixa força iônica para melhor integrar-se a futuras operações. É aconselhado o uso de, por exemplo, tampão Fosfato de Sódio ou Tris-HCl 50 mM a pH neutro. As moléculas ligadas à Proteína A devem ser então eluídas com um tampão ácido, como por exemplo, Citrato de Sódio (ARAKAWA *et al.*, 2004; SHUKLA *et al.*, 2007; MAZZER *et al.*, 2015).

Newcombe *et al.* (2005) conseguiu purificar anticorpos policlonais de ovelha utilizando uma coluna de Proteína A sintética, a MAbsorbent® A2P. A imunoglobulina G de ovelha foi obtida com 80% de pureza, utilizando as condições de eluição com Citrato de Sódio.

Ejima *et al.* (2005) fez um estudo de condições de eluição utilizando o tampão citrato de sódio com diferentes concentrações de arginina, investigando a purificação de anticorpos monoclonais de humanos e de coelhos. A recuperação de imunoglobulina chegou a 100% utilizando o tampão citrato a um pH um pouco mais elevado combinado a  $1 \text{ mol L}^{-1}$  de arginina, o que indica que os padrões de eluição para a coluna de proteína A não se restringem a um pH muito baixo, pode haver um estudo de combinação com outros aminoácidos para provocar condições menos drásticas para a coluna e para o meio da proteína purificada.

Tsumoto *et al.* (2007) também fez um estudo de várias condições de eluição para subclasses de IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), também utilizando tampão citrato de sódio a diferentes pHs e arginina em diferentes concentrações. Os melhores resultados obtidos foram a um pH de 3.8 com arginina a 500 mM, com uma pureza de 92%. É um pH um pouco mais elevado quando comparado ao citrato utilizado sozinho para eluição (pH 3.3), já diminuindo um pouco as condições drásticas da etapa de eluição da cromatografia.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

O sangue de coelho foi doado pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Brasil). O soro de coelho foi extraído do sangue por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos (microcentrífuga refrigerada Cientec CT-15000R, EUA). Não foi necessária aprovação do CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) para este trabalho, pois o sangue foi entregue sem precisar do nosso manejo com os animais. Todas as corridas cromatográficas foram realizadas pelo equipamento ÄKTA Start Protein Purification System (GE Life Sciences, EUA), disponibilizado pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob orientação da Profa. Dra. Denise Hissa. A coluna HiTrap® Protein A foi usada em todas as análises (GE Healthcare, EUA). Ácido cítrico, citrato de sódio, glicina, ácido clorídrico, etanol, fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio foram adquiridos pela Sigma Aldrich (EUA). Água ultrapura (Milli-Q System, Millipore, EUA) foi usada para preparar todos os tampões e outras soluções. A Figura 5 mostra a coluna HiTrap® Protein A acoplada no ÄKTA Start Protein Purification System:

Figura 5 – Coluna HiTrap® Protein A acoplada no ÄKTA Start Protein Purification System



Fonte: Autor.

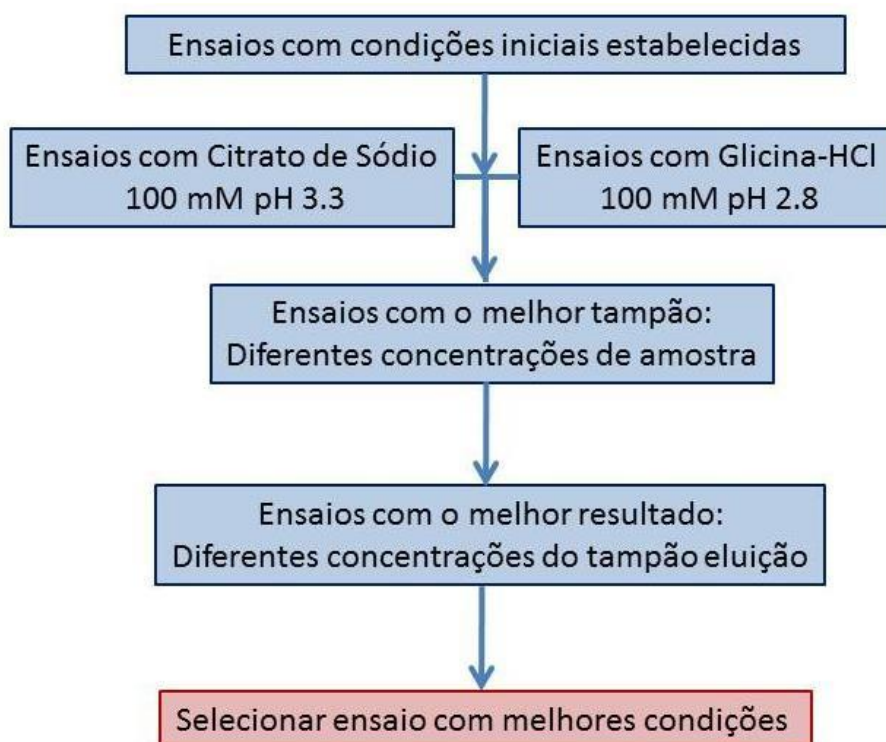
## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Corridas Cromatográficas no ÄKTA

Um método foi criado no ÄKTA System utilizando os dados da coluna HiTrap® Protein A fornecidos pelo UNICORN Start 1.0. O software possui etapas predefinidas para várias técnicas, incluindo cromatografia de afinidade, usando esta coluna específica. Todas as soluções usadas no sistema de cromatografia foram filtradas utilizando uma bomba a vácuo de 2 estágios (Mastercool, USA). A tubulação do equipamento sempre deve ser mantida em Etanol 20%. Para utilizá-la, foi lavada abundantemente com água ultrapura para o procedimento ser iniciado. Portanto, as corridas cromatográficas constituíram nas seguintes etapas: Equilíbrio, Carregamento, Lavagem, Eluição, Lavagem.

Nas corridas iniciais, o soro de coelho foi diluído em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0, de modo que a concentração final da amostra fosse 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Vários testes foram realizados para otimizar o tempo de cada etapa na corrida cromatográfica. Citrato de sódio 100 mM pH 3,3 e Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 foram os tampões utilizados na fase de eluição e tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 foi usado nas outras etapas. Outros testes foram realizados variando a concentração da amostra e a força iônica do tampão de eluição. Desta forma, seria possível estabelecer as melhores condições para purificar anticorpos do soro de coelho. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Depois que todos os experimentos do dia eram feitos, a tubulação era novamente lavada abundantemente com água e logo depois com Etanol 20%. A Figura 6 mostra um esquema dos ensaios feitos:

Figura 6 – Fluxograma referente à ordem dos ensaios



As corridas cromatográficas geraram perfis registrados pelo sistema ÄKTA (Figura 7), cuja resposta mostrou a área de cada pico de absorvância da corrida cromatográfica:

Figura 7 – ÄKTA Start: Sistema de Purificação de Proteína



Fonte: Autor.

A temperatura ambiente em todos os experimentos era de 22° C. A vazão em todas as etapas dos experimentos era de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o volume de coluna (CV) era de 1,0 mL.



Tabela 1 – Tempo de cada etapa no AKTA

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (minutos)</b>
Equilíbrio	15
Carregamento	3
Lavagem	10
Eluição	10
Lavagem <sup>1</sup>	5

<sup>1</sup> Após a eluição, é feita a lavagem para reequilibrar a coluna para a próxima corrida. Esse processo demora cerca de 30 minutos, mas nos gráficos foi representado até 5 minutos para melhor visualização.

O total de proteína no carregamento é a soma de todas as áreas de picos. Assim, é possível descobrir a quantidade de proteína que foi retida na coluna de Proteína A e que porcentagem isso representa do total de proteína carregado no sistema, já que o total de proteína retida está representado no pico de eluição. As equações 1 e 2 a seguir mostram como foi feito o cálculo de % das proteínas retidas em relação às proteínas totais:

$$P_{total} = P_{eluição} + P_{carregamento} + P_{lavagem} \quad (1)$$

$$P_{retida}(\%) = \frac{P_{eluição}}{P_{total}} \quad (2)$$

$P_{total}$  é a proteína carregada no sistema cromatográfico;  $P_{carregamento}$  é a proteína total que sai da coluna cromatográfica depois que a amostra de soro é carregada, representada pelo primeiro pico de absorção UV;  $P_{eluição}$  é a proteína total que sai da coluna cromatográfica na etapa de eluição, representada pelo segundo pico de absorção UV;  $P_{retida}$ , que é a relação em porcentagem da proteína total retida e da proteína total carregada;  $P_{lavagem}$  é a proteína que sai após a lavagem da coluna.

### 3.2.2 Análise Qualitativa das proteínas: Eletroforese SDS-PAGE

As amostras das corridas cromatográficas foram submetidas à análise por Eletroforese SDS-PAGE utilizando géis de poli(acrilamida) 7,5% (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida) sob condições desnaturantes não-redutoras (LAEMMLI 1970) utilizando o Mini-Protean III System (Bio-Rad, USA). As amostras analisadas foram selecionadas a partir dos resultados da corrida vista no programa UNICORN Start 1.0. De todas as amostras

coletadas, foram escolhidas as que demonstraram picos de absorvância, nas etapas de carregamento e eluição. As frações cromatográficas de cada etapa foram aquecidas a 95 °C por 4 min e alíquotas de 15 µL de cada amostra foram aplicadas aos géis. O padrão de baixo peso molecular (LMW) da GE (EUA) foi utilizado, com as seguintes proteínas presentes: Fosforilase - 97 kDa, Albumina - 66 kDa, Ovalbumina Carbonica - 45 kDa, Anidrase - 30 kDa, Inibidor de tripsina - 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactalbumina - 14,4 kDa e tampão de amostra com  $\beta$ -mercaptoetanol. Os procedimentos foram realizados a 180 V em géis de separação 7,5% com stacking gel 4%. O tempo médio de cada eletroforese foi de 45 minutos. As bandas de proteína foram formadas utilizando corante Comassie Blue com metanol, depois dos géis ficarem em contato com asolução por 12h. Após esse tempo, os géis foram lavados abundantemente em água destilada para retirar o excesso do corante.

### **3.2.3 Dot Blot**

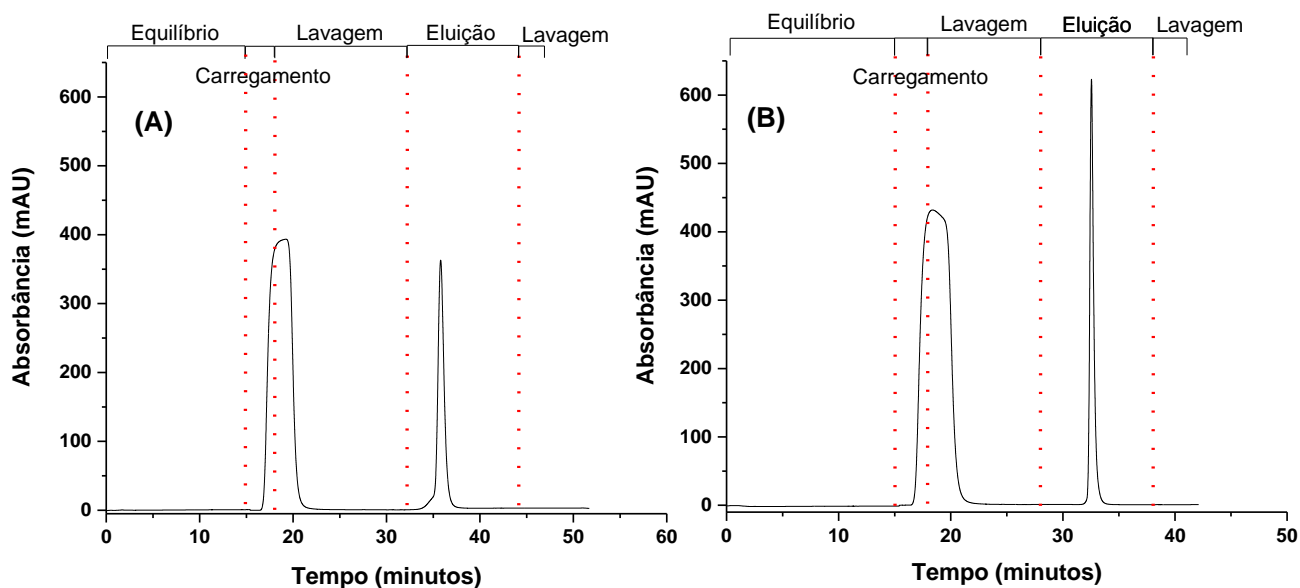
Dot Blot é uma técnica de biologia molecular para detectar biomoléculas. É uma simplificação do método Western blot. Nesse processo, uma gota contendo a molécula a ser detectada é aplicada diretamente sobre uma membrana, onde uma detecção por sondas de anticorpos é feita (STOTT, 1989). A membrana de nitrocelulose (MN) (SIGMA Dura-blottm, com poro de 0,45 mm. Cat. N0 N 9641) foi dividida em partes de 11 x 7,5 cm, disposta para adição de 96 poços onde adicionou-se, em cada poço, 3 µL de cada fração cromatográfica obtida nas corridas, bem como as amostras obtidas na concentração com Tubo Amicon 30 e 50 kDa. Nas MN foram adicionados dois poços contendo o controle positivo (Solução com presença de IgG) e um controle negativo (Solução sem a presença de IgG). Os sítios livres de ligação de proteínas presentes foram bloqueados com 5% de leite desnatado em PBS + 0,05% de Tween20 por 60 minutos. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 10 min com PBS + 0,05% de Tween20, a fim de remover totalmente a solução de bloqueio. Após sucessivas lavagens com PBS + 0,05% de Tween20, seguiu-se incubação com anticorpo secundário, Anti-Mouse IgG, produzido em bode (SIGMA-ALDRICH) diluído (1/5000) em PBS + 0,05% de Tween20, acoplado a peroxidase por mais uma hora. Após lavagens sucessivas com PBS + 0,05% de Tween20, a membrana foi revelada com a solução de 30 mL com PBS + 0,01 g de 3,3' Diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) - Sigma + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0,04 g de Nitrato de Prata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Corridas Iniciais – Comparação entre Tampões Citrato e Glicina-HCl

Inicialmente foram feitas corridas com tampão eluição a uma concentração de 100 mM, com concentração de carregamento de soro de coelho igual a  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  (Figura 8). O tampão de corrida foi o Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0, utilizado em todas as outras etapas. As corridas iniciais utilizando o tampão eluição Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 mostraram um pico de eluição mais estreito quando comparado com os picos das corridas que utilizavam o tampão eluição Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3, o que indica uma maior seletividade em relação às moléculas adsorvidas.

Figura 8 – (A) Amostra: Soro de Coelho, concentração =  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Tampão Eluição: Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3 (B) Amostra: Soro de Coelho, concentração =  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Tampão Eluição: Glicina-HCl 100 mM pH 2,8.

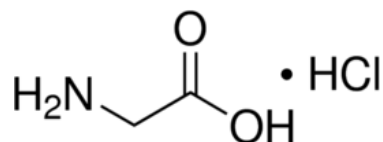


Na preparação da solução de amostra, o soro de coelho é diluído numa solução tampão de pH neutro (Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0). A O pI da IgG de coelho varia entre 5,3 -7,0 e o pI da RSA é de 5,7 (CLAUSS e JAIN, 1990). O pI da Imunoglobulina G e da Albumina de soro de coelho estão abaixo do pH 7,0, o que significa que estão negativamente carregadas quando se ligam na coluna de afinidade de Proteína. Com a passagem do tampão eluição de pH abaixo do pI das proteínas, elas se tornam positivamente carregadas e deixam a

coluna de Proteína A.

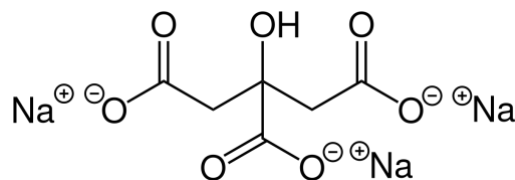
A etapa de eluição requer um tampão de baixo pH neste caso. Citrato de Sódio e Glicina-HCl são tampões adequados, que conseguem atingir essa condição extrema, diferentemente de outros tampões como Tris-HCl, Acetato de Sódio, etc. Algumas condições podem ser responsáveis pelo pico tão estreito formado quando o tampão Glicina-HCl é utilizado: a proteína A e a glicina são estruturalmente semelhantes, possuem grupo amins em comum, o que faz com que a proteína saia mais facilmente da coluna, pois a interação do tampão com a matriz é mais favorável. Além disso, o tampão Citrato de Sódio possui uma grande estrutura molecular repleta de elétrons livres, o que demanda uma maior quantidade de íons H<sup>+</sup> para se estabilizar em solução, fenômeno conhecido como solvatação. Esses íons então se tornam menos acessíveis para interagir com as moléculas de proteínas adsorvidas na coluna cromatográfica. A molécula de Glicina-HCl tem um tamanho menor, o que facilita a interação eletrostática com outras moléculas por existir menor impedimento estérico. Além disso, consegue atingir um pH menor que o do tampão Citrato de Sódio, fazendo com que a eluição seja mais eficiente. As Figuras 9 e 10 mostram as estruturas moleculares de cada tampão eluição:

Figura 9 – Estrutura molecular de Glicina-HCl



Fonte: Sigma Aldrich (2019).

Figura 10 – Estrutura molecular de Citrato de Sódio



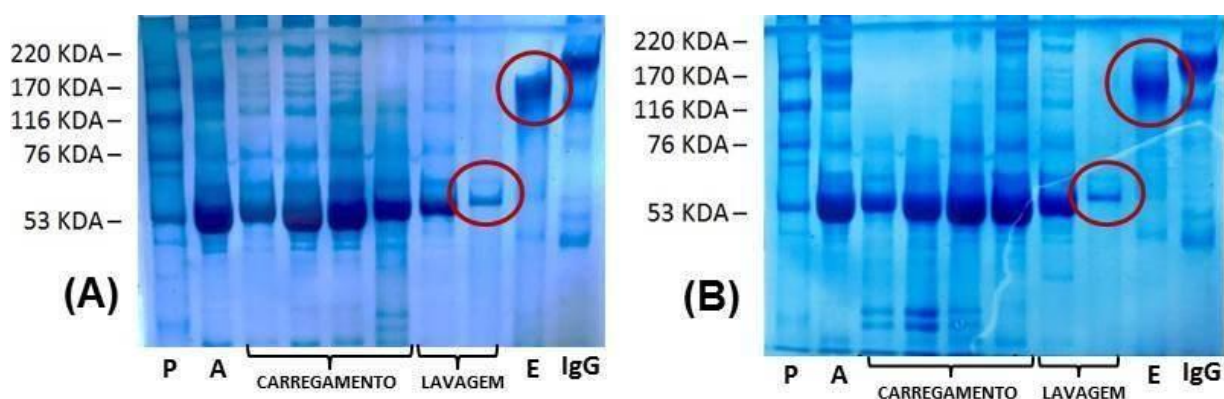
Fonte: Sigma Aldrich (2019).

O software UNICORN Start 1.0 do próprio sistema cromatográfico forneceu os valores de área de pico para todas as corridas. Dessa maneira, utilizando as áreas dos picos de

cada corrida cromatográfica, as Equações 1 e 2 foram utilizadas para calcular o total de proteína adsorvida pela coluna cromatográfica: Para a corrida com Glicina-HCl 100mM pH 2,8, foi possível recuperar 20% da proteína total carregada na etapa de eluição. Para a corrida com Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3, a proteína retida na coluna foi 21.3% da proteína total carregada na coluna.

Para descobrir quais proteínas estavam presentes em cada etapa, foram feitas as eletroforeses em amostras estratégicas, como mostra a Figura 11:

Figura 11 – (A) Eletroforese da corrida com Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3 como tampão de eluição (B) Eletroforese da corrida com Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 como tampão de eluição. Em que: P é o padrão de proteína, A é a amostra inicial a ser carregada, E é a amostra da eluição. A IgG padrão utilizada é humana comercial (Sigma). Amostra: Soro de Coelho, concentração =  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Para a faixa de eluição: o círculo vermelho é referente à IgG obtida na eluição. Para a faixa de lavagem: o círculo vermelho é referente à albumina de Coelho (RSA) obtida na lavagem.



As amostras estratégicas são as amostras de Carregamento, Lavagem e Eluição. As amostras de carregamento irão mostrar toda a composição de proteínas do soro de coelho. Já as amostras de Lavagem vão mostrar quais proteínas são fracamente adsorvidas pela coluna, de modo que a lavagem com o tampão neutro desfça a adsorção da molécula com a matriz adsorvente da coluna. No caso da eluição, a eletroforese mostrará a proteína que foi mais fortemente adsorvida pela coluna de Proteína A.

Uma banda visível de Imunoglobulina G de coelho apareceu praticamente isolada na amostra da etapa da Eluição, mais pura do que a amostra padrão de IgG, assim como a albumina do soro do coelho, na última amostra da etapa de lavagem.

Há uma pequena diferença de altura entre a IgG padrão comercial e a IgG obtida na eluição. Isso acontece porque a IgG comercial é humana e a obtida é de Coelho.

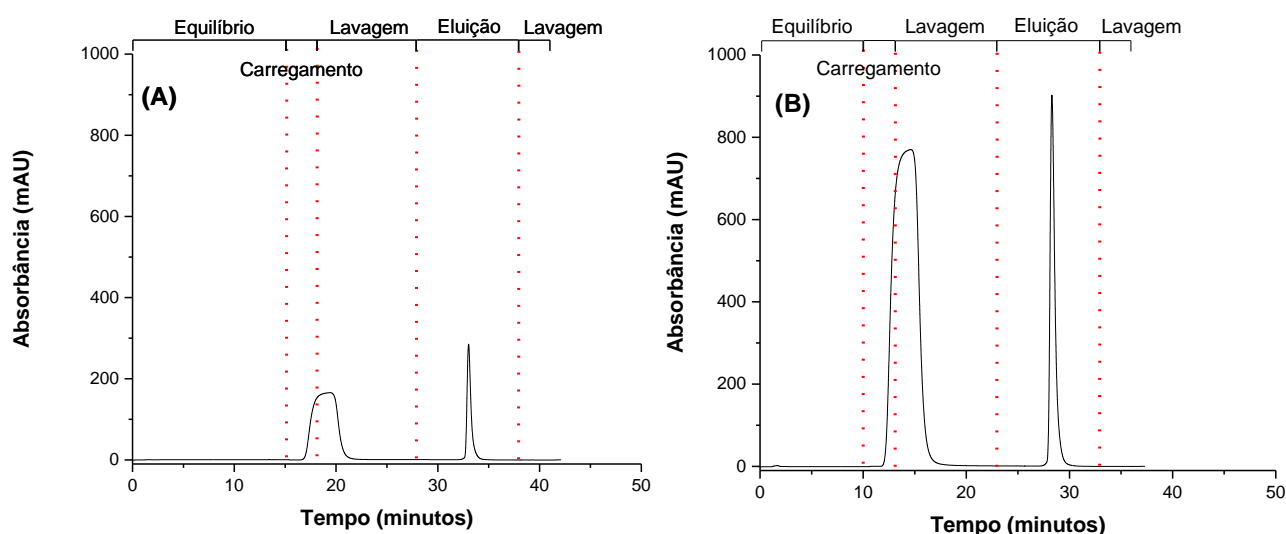
As imunoglobulinas G representam em torno de 20% das proteínas do soro (ARORA et. al, 2017; AGRISERA, [20-?]) e praticamente toda a IgG estava presente na amostra de eluição. Com isso, pode-se deduzir que boa parte da imunoglobulina G foi purificada. Para fazer essa confirmação, é necessário fazer uma análise quantitativa para saber exatamente quanto de IgG e RSA foi purificado em cada etapa, por meio das técnicas de Elisa.

Já que os experimentos com Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 como tampão de eluição mostraram maior seletividade na etapa de eluição e que os valores de proteína total adsorvida foram praticamente os mesmos, os testes feitos posteriormente foram feitos com o tampão Glicina-HCl 100 mM pH 2,8.

#### 4.2 Corridas variando a concentração da amostra carregada

A segunda fase dos experimentos consistiu em variar a concentração inicial da proteína carregada na coluna. Os experimentos foram feitos com soro de coelho diluído no tampão Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0 nas concentrações de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Dessa maneira, a Figura 12 expõe os perfis cromatográficos obtidos:

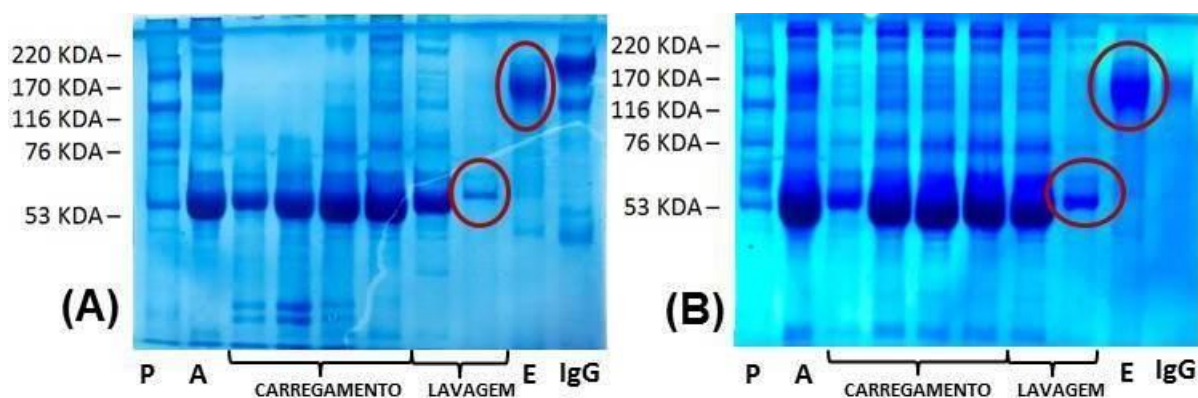
Figura 12 – (A) Amostra: Soro de Coelho, concentração = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Tampão Eluição: Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 (B) Amostra: Soro de Coelho, concentração = 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0. Tampão Eluição: Glicina-HCl 100 mM pH 2,8



A Figura 12 mostra perfis bastante semelhantes ao gráfico da corrida com concentração de soro de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  (Figura 8). A diferença se mostra apenas na absorbância, já que as concentrações do soro do coelho foram diferentes.

Para caracterizar as proteínas de cada etapa, foram feitas as eletroforeses, mostradas na Figura 13:

Figura 13 – (A) Eletroforese da corrida cromatográfica utilizando Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 como tampão eluição. Concentração da amostra carregada:  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (B) Eletroforese da corrida cromatográfica utilizando Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 como tampão eluição. Concentração da amostra carregada:  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Em que: P é o padrão de proteína, A é a amostra inicial a ser carregada, E é a amostra da eluição. Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0.

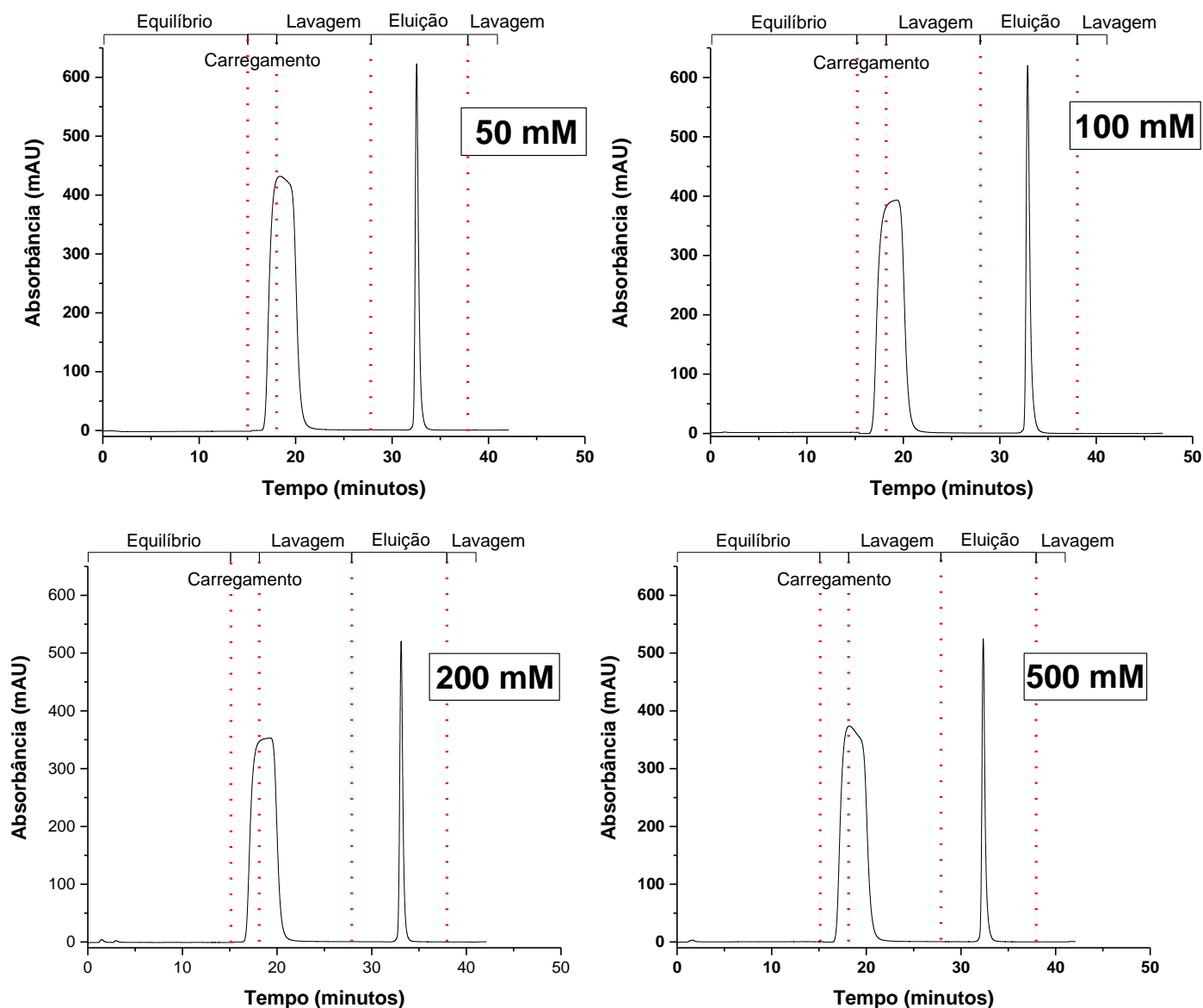


Todas as porcentagens de proteína total adsorvida tiveram valores em torno de 20%. Novamente, os valores são bastante próximos entre si, indicando que a concentração do soro do coelho não tem influência significativa sobre o processo cromatográfico. As eletroforeses também indicaram purificação de imunoglobulina G, bastante concentrada na corrida de concentração de amostra  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . A RSA da corrida B possui mais contaminantes em relação à corrida A e às outras corridas feitas anteriormente, provavelmente por conta da alta concentração de proteínas, sendo necessário coletar outra amostra de lavagem para análise. Os testes seguintes foram realizados utilizando a concentração mediana dos testes ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A IgG de coelho da amostra de eluição apresentou pureza maior que a amostra padrão, com menos contaminantes.

### 4.3 Corridas variando a molaridade do tampão eluição

A terceira fase dos experimentos consistiu em investigar a influência força iônica do tampão eluição no processo de dessorção. O tampão Glicina-HCl pH 2.8 foi preparado em 5 concentrações diferentes (incluindo a concentração dos testes já feitos, de 100 mM): 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM e 1000 mM. Esse estudo foi inspirado pelo trabalho de Tsumoto *et al.* (2007), que fez um estudo comparativo de tampões na etapa de eluição de uma coluna cromatográfica de Proteína A, variando a força iônica do tampão Citrato de Sódio. Os resultados estão expressos na Figura 14:

Figura 14 – Corrida cromatográfica utilizando Glicina-HCl pH 2,8 como tampão eluição em diferentes molaridades. Amostra: Soro de Coelho, concentração = 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Tampão de Lavagem: Fosfato de Sódio 25 mM pH 7,0.





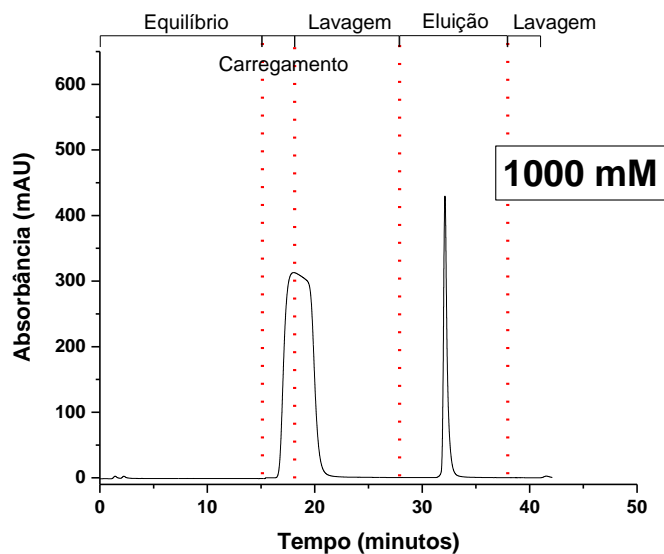
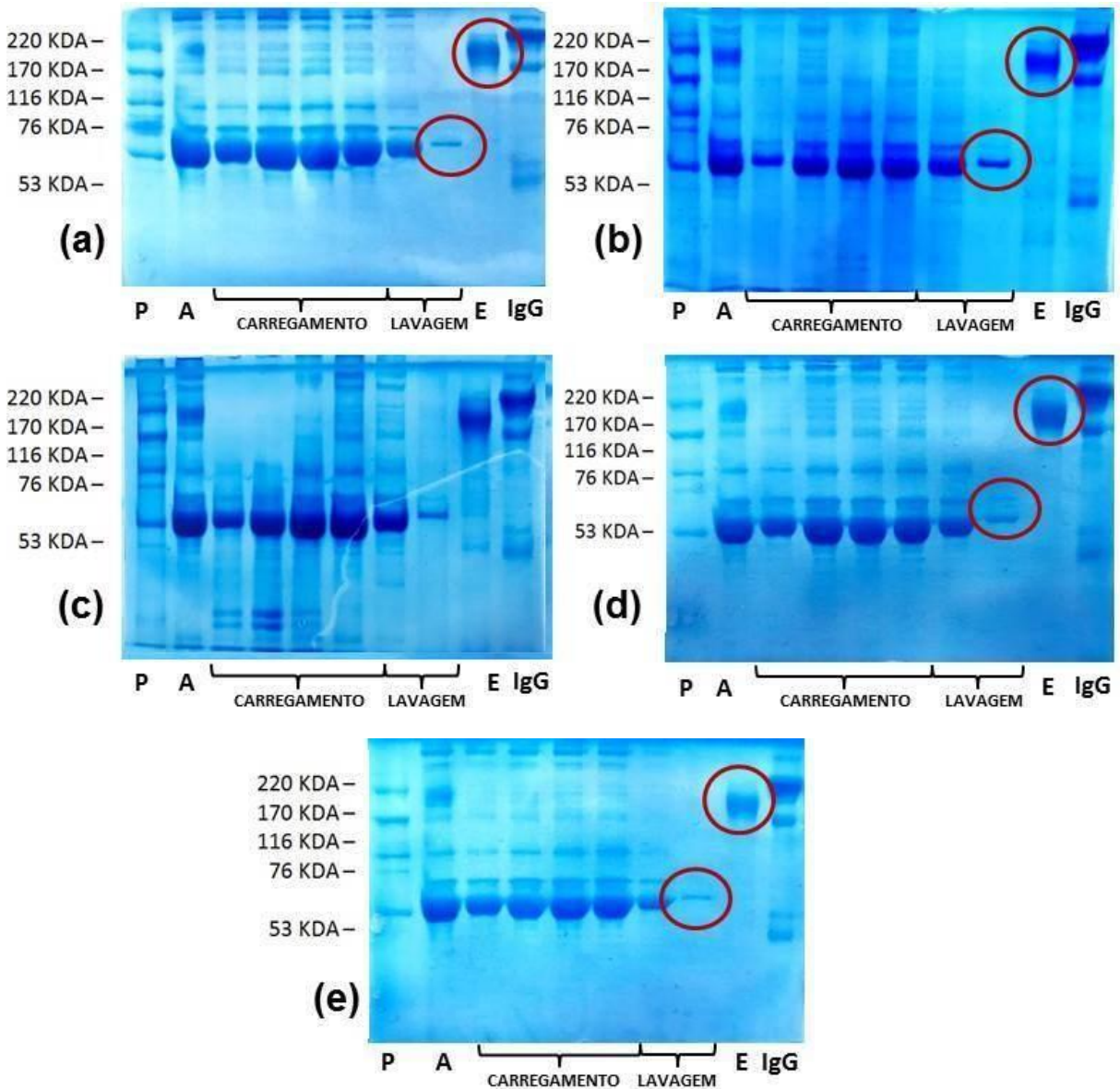


Tabela 2 – Proteína Total Retida: Comparação entre diferentes molaridades do tampão eluição

<b>Proteína Total Retida</b>					
<b>Concentração do tampão eluição</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>
<b>50 mM</b>	16,7%	16,9%	17,2%	0,3%	16,9%
<b>100 mM</b>	19,9%	16,3%	17,4%	1,87%	17,9%
<b>200 mM</b>	17,0%	17,3%	17,0%	0,2%	17,0%
<b>500 mM</b>	16,1%	14,8%	16,1%	0,8%	15,7%
<b>1000 mM</b>	15,9%	14,8%	14,1%	0,9%	14,9%

A Tabela 2 mostra que a força iônica do tampão eluição não possui influência significativa na etapa de eluição. O baixo desvio padrão das triplicatas mostra a precisão do equipamento e a coerência dos dados obtidos. Novamente, as eletroforeses de cada corrida foram feitas a fim de identificar as características das proteínas em cada etapa do processo cromatográfico, como mostra a Figura 15:

Figura 15 – Eletroforese das corridas cromatográficas utilizando Glicina-HCl pH 2,8 como tampão eluição em diferentes concentrações: A) 50 mM B) 100 mM C) 200 mM D) 500 mM E) 1000 mM. Em que: P é o padrão de proteína, A é a amostra inicial a ser carregada, E é a amostra da eluição.



As eletroforeses das corridas da terceira fase do experimento mostraram um padrão semelhante ao das corridas anteriores, cumprindo o objetivo de purificar as moléculas-alvo, Imunoglobulina G e albumina do soro do coelho.

No geral, todas as corridas cromatográficas em todas as condições testadas mostraram uma satisfatória purificação da Imunoglobulina G de coelho, visto que as bandas da eletroforese se mostraram menos contaminadas que o próprio padrão da Imunoglobulina comercial. Nessas circunstâncias, as melhores condições escolhidas seriam: Tampão de eluição

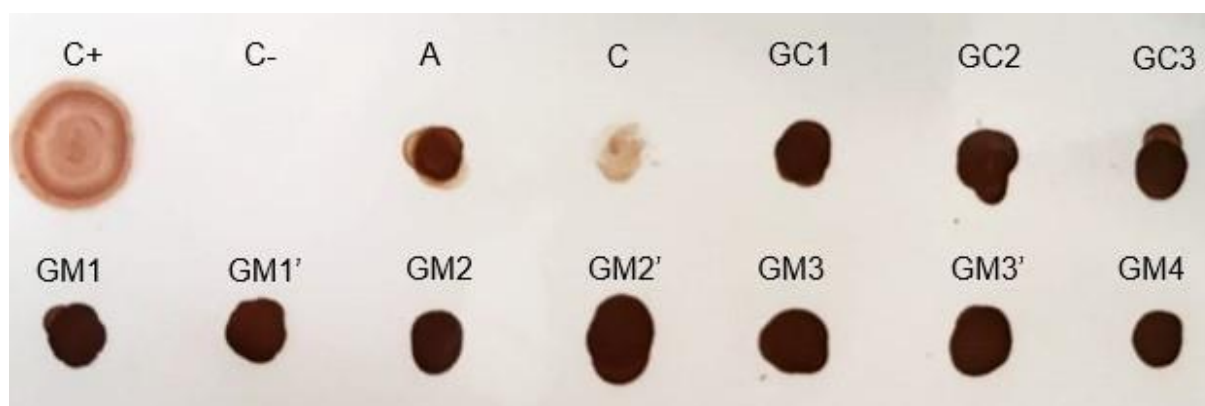
Citrato de Sódio 100mM pH 3,3 e concentração de 2,5 mg/mL soro de coelho. Isso porque a concentração de sal no tampão eluição não precisa ser tão elevada, e como uma margem de garantia pode-se utilizar a segunda menor concentração dos ensaios cromatográficos. A concentração de soro de coelho seria o valor intermediário, pois uma concentração muito alta ou muito baixa pode atrapalhar a leitura em outros ensaios.

A etapa de regeneração não foi necessária pois em ensaios iniciais foi verificado que toda a proteína retida na coluna já tinha saído na etapa de Eluição. O ÄKTA Start Protein Purification System mostrou que na etapa de regeneração praticamente nenhuma proteína saiu da coluna. Além disso, as condições básicas extremas da regeneração poderiam danificar a tubulação do sistema. Rudolf *et al.* (2009) purificou IgG de coelho utilizando uma coluna de Proteína G utilizando as mesmas condições de eluição com Glicina-HCl. As eletroforeses mostraram que a IgG de coelho conseguiu ser purificada com uma contaminação mais expressiva de RSA comparado aos ensaios desse trabalho feito com uma coluna da Proteína A. Além disso, o uso da proteína G em purificações industriais é muito restrito, devido à estabilidade superior da proteína A em comparação à Proteína G, (HOBER *et al.*, 2007).

Newcombe *et al.* (2005) conseguiu purificar anticorpos policlonais de ovelha utilizando uma coluna de Proteína A sintética, a MAbsorbent® A2P. A imunoglobulina G de ovelha foi obtida com 80% de pureza, utilizando as condições de eluição com Citrato de Sódio. As eletroforeses mostraram que, nas eluições utilizando citrato de sódio, a IgG de ovelha se mostrou contaminada com albumina do soro. Wongchupan *et al.* (2011) investigou a purificação de IgG de coelho utilizando colunas de troca aniônica. Contudo, houve perda de Imunoglobulina G devido à formação de complexos com a RSA nos pHs que foram trabalhados. As eletroforeses também mostraram contaminação significativa de RSA nas amostras. Em comparação com os resultados mencionados, as amostras obtidas nesse trabalho na etapa de eluição se mostraram com menor contaminação. A partir disso, foi realizado o teste de Dot Blot para confirmar a presença de IgG nas amostras dos picos de Eluição.

Amostras da etapa de eluição das corridas cromatográficas previamente expostas nesse trabalho foram submetidas ao método de Dot Blot de identificação de biomoléculas. Na Figura 16, é possível ver os poços de controle negativo e controle positivo, amostra inicial do soro de coelho ( $C = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e as amostras de eluição de algumas corridas realizadas. Tais corridas variaram tanto a molaridade do tampão eluição como a concentração inicial do soro de coelho carregado no sistema.

Figura 16 – Procedimento Dot Blot das amostras de eluição das corridas cromatográficas: C+ = Controle Positivo; C- = Controle Negativo; A = Amostra Inicial (soro de coelho); C = Corrida com eluição de Citrato de Sódio 100 mM pH 3,3 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GC1 = Corrida com eluição de Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GC2 = Corrida com eluição de Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; GC3 = Corrida com eluição de Glicina-HCl 100 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 5,0 mg mL<sup>-1</sup>; GM1 e GM1' (duplicatas) = Corrida com eluição de Glicina-HCl 50 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GM2 e GM2'= Corrida com eluição de Glicina-HCl 200 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GM3 e GM3'= Corrida com eluição de Glicina-HCl 500 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; GM4 = Corrida com eluição de Glicina-HCl 1000 mM pH 2,8 e concentração inicial de soro de coelho igual 2,5 mg mL<sup>-1</sup>.



A amostra correspondente à corrida com o citrato mostrou-se mais clara, com menor concentração, mas com IgG ainda presente. As demais corridas feitas com Glicina-HCl apresentam coloração intensa confirmando a presença do anticorpo.

## 5 CONCLUSÃO

A coluna cromatográfica de Proteína A foi capaz de purificar imunoglobulina G e albumina do soro de Coelho utilizando os tampões Glicina-HCl pH 2.8 e Citrato de Sódio pH 3.3 na etapa de eluição em diversas concentrações. O tampão Glicina-HCl mostrou picos de eluição mais estreitos que o outro tampão, o que representa uma grande seletividade às moléculas-alvo presentes no soro de coelho. As análises de eletroforese indicaram que ambos os tampões purificaram RSA e IgG nas etapas de Lavagem e Eluição, respectivamente. O Dot Blot confirmou a presença da Imunoglobulina G de coelho nas etapas de eluição de todas as corridas cromatográficas. Dessa maneira, as condições de eluição das corridas cromatográficas foram satisfatórias na purificação de anticorpos policlonais do soro de coelho. Mais testes devem ser feitos para medir quantitativamente as proteínas em cada etapa do processo cromatográfico.

## REFERÊNCIAS

- ABOULAICH, N.; CHUNG, W. K.; THOMPSON, J. H.; LARKIN, C.; ROBBINS, D.; ZHU, M. A novel approach to monitor clearance of host cell proteins associated with monoclonal antibodies. **Biotechnology Progress**, v. 30, p. 1114–1124, 2014.
- AGRISERA. **Molecular weight and isoelectric point of various animal immunoglobulins.** [20–?]. Disponível em: < <https://www.agrisera.com/en/info/molecular-weight-and-isoelectric-point-of-various-immunoglobulins.html>>. Acesso em: 17 out. 2019.
- ALI, M. S.; GULL, N.; KHAN, J. M.; ASWAL, V. K.; KHAN, R. H. Multi-technique approach on the effect of surfactant concentrations on the thermal unfolding of rabbit serum albumin: Formation and solubilization of the protein aggregates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, n. 2, p.169-175, 2010b.
- ALI, M. S.; GULL, N.; KHAN, J. M.; ASWAL, V. K.; KHAN, R. H. Unfolding of rabbitserum albumin by cationic surfactants: Surface tensiometry, small-angle neutron scattering, intrinsic fluorescence, resonance Rayleigh scattering and circular dichroism studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.352, n. 2, p. 436-443, 2010a.
- AN, Z. **Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic.** Wiley, 2009.
- ANGARITA, M.; MÜLLER-SPÄTH, T.; BAUR, D.; MORBIDELLI, M. Twin-columnCaptureSMB: A novel cyclic process for protein A affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1389, p. 85–95, 2015.
- ARAKAWA, T.; PHILO, J.S.; TSUMOTO, K.; YUMIOKA, R.; EJIMA, D. Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions. **Protein Expression and Purification**, v. 36, p. 244–248, 2004.
- ARORA, S.; SAXENA,V.; AYYAR, V. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. **Methods**, v. 116, p. 84-94, 2017.
- AYYAR, B. V. et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. **Methods**, v. 56, n. 2, p. 116-29, 2012.
- BAKER, R. M.; BRADY, A. M.; CAMBRIDGE, B.S. **Separation for Biotechnology**, v. 3, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1994, p. 427.
- BUTCHER, R. E.; MARTIN-ROUSSEY, G.; BRADFORD, R. A.; TESTER, A.; OWCZAREK, C.; HARDY, M. P.; CHEN, C. G.; SANSOME, G.; FABRI, L. J.; SCHMIDT, P. M. Optimizing high throughput antibody purification by using continuous chromatography media. **Protein Expression and Purification**, v. 159, p. 75-82, 2019.
- BUTLER, J. E. Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays. **Methods**, v. 22, n.1, p. 4-23, 2000.

- BYON, H.R.; CHOI, H.C. Network Single-Walled Carbon Nanotube-Field Effect Transistors (SWNT-FETs) with Increased Schottky Contact Area for Highly Sensitive Biosensor Applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, 2188-2189, 2006.
- BYSTRYN, J.C.; JACOBSEN, J.S.; LIU, P.; HEANEY-KIERAS, J. Comparison of cell-surface human melanoma-associated antigens identified by rabbit and murine antibodies. **Hybridoma**, v.1, p. 465-472, 1982.
- CLAUSS, M.A.; JAIN, R. K. Interstitial Transport of Rabbit and Sheep Antibodies in Normal and Neoplastic Tissues. **Cancer Research**, v. 50, p. 3487-3492, 1990.
- CLONIS, Y.D.; LABROU, N.E.; KOTSIRA, V. P.; MAZITSOS, C.; MELISSIS, S.; GOGOLAS, G. Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification. **Journal of Chromatography A**, v. 891, p. 33-44, 2000.
- CONROY, P.J.; LAW, R.H.P.; CARADOC-DAVIES, T.T.; WHISSTOCK, J.C. Antibodies: from novel repertoires to defining and refining the structure of biologically important targets. **Methods**, v. 116, p. 12-22, 2017.
- DA SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 135, p. 173-180, 2010.
- DENIZLI, A.; PIŞKIN, E. Dye-ligand affinity systems. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 391-416, 2001.
- DENIZLI, F.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Affinity microspheres and their application to lysozyme adsorption: Cibacron Blue F3GA and Cu(II) with poly(HEMA-EGDMA). **Polymer International**. v. 48, p. 360-366, 1999.
- DHANDAPANI, G.; NAIR, D. K.; KALE, R. R.; WACHTEL, E.; NAMBOOTHIRI, I. N. N.; GUY, P. Role of amphiphilic [metal:chelator] complexes in a non-chromatographic antibody purification platform. **Journal of Chromatography B**, v. 1133, 2019.
- FENG, L.; WANG, X.; HONGCHUAN, J. Rabbit monoclonal antibody: potential application in cancer therapy. **American Journal of Translational Research**, v.3, n. 3, p. 269-274, 2011.
- FIGUEIREDO, A.; VIEIRA, C. S. N.; DOS SANTOS, F. J.; JANEGITZ, C. B.; AOKI, M. S.; JUNIOR, P. P.; LOVATO, L. R.; NOGUEIRA, L. M.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, E. G. F. Electrical Detection of Dengue Biomarker Using Egg Yolk Immunoglobulin as the Biological Recognition Element. **Scientific Reports**. v. 5, 2015.
- FOLLMAN, D. K.; FAHRNER, R.L. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 79-85, 2004.
- FORRER, N.; BUTTÉ, A.; MORBIDELLI, M. Chromatographic behavior of a polyclonal antibody mixture on a strong cation exchanger column. Part I: Adsorption characterization **Journal of Chromatography A**, v. 1214, p. 59-70, 2008.

GIRARDI, E.; HOLDOM, M. D.; DAVIES, A. D.; SUTTON, B. J.; BEAVIL, A. J. The crystal structure of rabbit IgG-Fc. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 77-83, 2009.

GONDIM, D. R.; DIAS, N. A.; BRESOLIN, I. T. L.; AZEVEDO, D. C. S. ; SILVA, I. J. Human IgG adsorption using dye-ligand epoxy chitosan/alginate as adsorbent: influence of buffer system. **Adsorption**, v. 20, p. 925-934, 2014.

GROM, M.; KOZOROG, M.; CASERMAN, S.; POHAR, A.; LIKOZAR, B. Protein A affinity chromatography of Chinese hamster ovary (CHO) cell culture broths containing biopharmaceutical monoclonal antibody (mAb): Experiments and mechanistic transport, binding and equilibrium modeling. **Journal of Chromatography B**, v. 1083, p. 44-56, 2018.

GUO, W.; TANG, F.; QIN, K.; ZHOU, M.; LE, Z.; HUANG, W. Glycoengineering and glycosite-specific labeling of serum IgGs from various species. **Carbohydrate Research**, v. 446-447, p. 32-39, 2017.

HEALTHCARE, GE. **Affinity Chromatography. Vol. 1: Antibodies**. Handbook from GE Healthcare Life Science, 2014.

HOBER, S.; NORD, K.; LINHULT, M. Protein A chromatography for antibody purification. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 40-47, 2007.

ISHIHARA, T.; MIYAHARA, M.; YAMADA, T.; YAMAMOTO, K. Innovative next-generation monoclonal antibody purification using activated carbon: A challenge for flow-through and column-free processes. **Journal of Chromatography B**, v. 1121, p. 72-81, 2019.

JANG, C.H. ; STEVENS, B.D. ; CARLIER, P.R.; CALTER, M.A.; DUCKER, W.A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, 2002.

KNIGHT, K.L.; CRANE, M.A. Generating the antibody repertoire in rabbit. **Advances in Immunology**, v. 56 , p. 179-218, 1994.

KREPPER, W.; SATZER, P.; BEYER, M. B.; JUNGBAUER, A. Temperature dependence of antibody adsorption in protein A affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1551, p. 59-68, 2018.

LENZ, G. Métodos Imunológicos. **Biofísica**, p. 1-14, 2004.

LI, S.; LI, L.; CHEN, Z.; XUE, G.; JIANG, L.; ZHENG, K. ET al. A novel purification procedure for recombinant human serum albumin expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 149, p. 37-42, 2018.

LIMA, S. A.; SANTANA, C. C.; **Processos de Extração e Purificação de Biomoléculas: 1**. ed. Aracaju: Universitária Tiradentes, 2017.

LIU, Q.; SHI, S.; LIU, L.; YANG,H.; SU, W.; CHEN, X. Separation and purification of bovine serum albumin binders from *Fructus polygoni orientalis* using off-line two-dimensional complexation high-speed counter-current chromatography target-guided by ligand fishing. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, 2013.



- LUO, H.; LEE, N.; WANG, X.; LI, Y.; SCHMELZER, A.; HUNTER, A.K. et al. Liquid-liquid phase separation causes high turbidity and pressure during low pH elution process in Protein A chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1488, p. 57-67, 2017.
- MA, Q.; SONG, Y. T.; YUAN, P.; WANG, C.; SU, G. X. QDs-labeled microspheres for the adsorption of rabbit immunoglobulin G and fluoroimmunoassay. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 64, n. 2, p. 248-254, 2008.
- MAJOREK, K. A.; POREBSKI, P. J.; DAYAL, A.; ZIMMERMAN, M. D.; JABLONSKA, K.; STEWART, A. J.; CHRUSZCZ, M.; WLADEK MINOR, W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, v. 52, n. 3-4, p. 174-182, 2012.
- MARIAM, S. H. S.; OOI, C. W.; TAN, W. S.; JANNA, O. A.; ARBAKARIYA, A.; TEY, B. T. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 144, p. 133-138, 2015.
- MATSUMURA, H.; SABURI, M. Protein adsorption and wetting of the protein adsorbed surfaces studied by a new type of laser reflectometer. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 47, n.2, p. 146-152, 2006.
- MAZZER, A.R. ; PERRAUD, X. ; HALLEY, J.; O'HARA, J. ; BRACEWELL, D.G. Protein A chromatography increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation hold, **Journal of Chromatography A**, v. 1415, p. 83-90, 2015.
- MEFFRE, E.; CASELLAS, R.; NUSSENZWEIG, M. C. Antibody regulation of B cell development. **Nature Immunology**, v.1, pp. 379-385, 2000.
- MONKOS, K. A comparison of solution conformation and hydrodynamic properties of equine, porcine and rabbit serum albumin using viscometric measurements. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1748, n. 1, p. 100-109, 2005.
- MÜLLER-SPÄTH, T. et al. Two step capture and purification of IgG2 using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 974-984, 2010.
- NEWCOMBE, A. R.; CRESSWELL, C.; DAVIESA, S.; WATSONB, K.; HARRIS, G.; O'DONOVAN, K. ET AL. Optimised affinity purification of polyclonal antibodies from hyperimmunised ovine serum using a synthetic Protein A adsorbent MAbsorbent® A2P. **Journal of Chromatography B**, v. 814, p. 209-215, 2005.
- NGUYEN, M. T.; HEO, Y.; DO, B. H.; BAEK, S.; KIM, C. J.; JANG, Y. J.; LEE, W.; CHOE, H. Bacterial overexpression and purification of soluble recombinant human serum albumin using maltose-binding protein and protein disulphide isomerase. *Protein Expression and Purification*, v. 167, 2020.
- NOELKEN, M. E.; NELSON, C. A.; BUCKLEY III, C. E.; TANFORD, C. Gross conformation of rabbit 7 S  $\gamma$ -immunoglobulin and its papain-cleaved fragments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 240, p. 218-224, 1965.

PFISTER, D.; DAVID, L.; HOLZER, M.; NICOUD, M. R. Designing affinity chromatographic processes for the capture of antibodies. Part I: A simplified approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1494, p. 27-39, 2017.

RAYBOULD, T. J.; TAKAHASHI, M. Production of stable rabbit-mouse hybridomas that secrete rabbit mAb of defined specificity. **Science**, v. 240, p. 1788-1790, 1988.

RAYNER, L. E.; KADKHODAYI-KHOLGHI, N.; HEENAN, R. K.; GOR, J.; DALBY, P. A.;

PERKINS, S. J. The Solution Structure of Rabbit IgG Accounts for Its Interactions with the Fc Receptor and Complement C1q and Its Conformational Stability. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 3, p. 506-523, 2013.

ROSSI, S.; LAURINO, L.; FURLANETTO, A.; CHINELLATO, S.; ORVIETO, E.; CANAL, F. et al. Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 124, p. 295-302, 2005.

RUCKENSTEIN, E.; ZENG, X. Albumin separation with Cibacron Blue carrying macroporous chitosan and chitin affinity membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 142, p. 13-26, 1998.

SAHIN, N.O.; BURGESS, D.J. Competitive interfacial adsorption of blood proteins. **Farmaco**, v. 58, 1017-1021, 2003.

SALIMI, K.; USTA, D. D.; KOÇER, I.; ÇELİK, E.; TUNCEL, A. Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO<sub>2</sub> microspheres for affinity purification of immunoglobulin G. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 178-185, 2018.

SANTANA, A. L. C. L.; DOS SANTOS, S. E.; BRESOLIN, L. T. I.; SILVA, J. I. Capítulo 9 – **Cromatografia de Afinidade**: Conceitos e Aplicações. p. 197.

SCHIAFFELLA, E.; SEHGAL, D.; ANDERSON, A. O.; MAGE, R. G. Gene conversion and hypermutation during diversification of VH sequences in developing splenic germinal centers of immunized rabbits. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 3984-3995, 1999.

SCHOFIELD, J. D. Altered proteins in ageing organisms— purification and properties of serum albumin from adult and ageing C57BL mice. **Experimental Gerontology**, v. 15, n. 5, p. 443-455, 1980.

SELLBERG, A.; ANDERSSON, N.; HOLMQVIST, A.; NILSSON, B. Development and Optimization of a Single Column Analog Model for a Multi-Column Counter-Current Solvent Gradient Purification Process. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 40, p. 187-192, 2017.

SHUKLA, A. A.; HINCKLEY, P. Host cell protein clearance during protein A chromatography: development of an improved column wash step. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1115–1121, 2008.

SHUKLA, A. A.; HUBBARD, B.; TRESSEL, T.; GUHAN, S.; LOW, D. Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches, **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 28-39, 2007.

STEINEBACH, F.; ANGARITA, M.; KARST, J. D.; MÜLLER-SPÄTH, T.; MORBIDELLI, M. Model based adaptive control of a continuous capture process for monoclonal antibodies production. **Journal of Chromatography A**, v. 1444, p. 50-56, 2016.

SUBRAMANIAN, G. **Continuous Biomanufacturing: Innovative Technologies and Methods**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, 2018.

TANG, J.; ZHANG, X.; CHEN, T.; WANG, Y.; LI, Y. Removal of half antibody, hole-hole homodimer and aggregates during bispecific antibody purification using MMC ImpRes mixed-mode chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 167, 2020.

MASSOLINI, G. Chromatographic tools for plant-derived recombinant antibodies purification and characterization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2019.

SOLÈNE, G.; TOTROV, M.; FERNANDEZ-RECIO, J. Computer applications to prediction of protein–protein interactions and rational drug design. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, v.2, n.1, 2009.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; SENCZUK, A.M.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 7, p. 1677-90, 2007.

VASILETS, V.N.; KUZNETSOV, A.V.; SEVASTIANOV, V.I. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v.69, n. 428, 2004.

WEBER, J.; PENG, H.; RADER, C.. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, 2017.

WETTERHALL, M.; GRÖNBERG, A.; GRÖNLUND, S.; BJÖRKMAN, T.; SANDBERG, L.; MUSUNURI, S.; CHALOUPKA, K.; GAMMELL, P. Removal of *B. cereus cereulide* toxin from monoclonal antibody bioprocess feed via two-step Protein A affinity and multimodal chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1118–1119, p. 194-202, 2019.

YANG, H.; GURGEL, P.V.; CARBONELL, R.G. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 910-918, 2009.

YOON, J.Y.; PARK, H.Y.; KIM, J.H.; KIM, W.S. Adsorption of BSA on Highly Carboxylated Microspheres—Quantitative Effects of Surface Functional Groups and Interaction Forces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 177, n. 2, p 613–620, 1996.

YU, Y.; LEE, P.; KE, Y.; ZHANG, Y.; YU, Q.; LEE, J., et al. A humanized anti-VEGF rabbit monoclonal antibody inhibits angiogenesis and blocks tumor growth in xenograft models. **PLoS One**, v. 5, 2010.

ZARAGOZA, D. M.; AVILA, H. R.; GOVEZENSKY, T.; MENDOZA, L.; RUÍZ, M. M. D.; SALOMA, O. P. Comparison patterns of 4 T1 antigens recognized by humoral immune response mediated by IgG and IgM antibodies in female and male mice with breast cancer using 2D-immunoblots. **Immunobiology**, v. 220, n. 9, p. 1050-1058, 2015.

ZHANG, C.; LONG, A. M.; SWALM, B.; CHAREST, K.; WANG, Y.; HU, J.; SCHULZ, C.; GOETZINGER, W.; HALL, B. E. Development of an automated mid-scale parallel protein purification system for antibody purification and affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 128, p. 29-35, 2016.

ZHANG, H.; MEYERHOFF, M. E. Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 2; p. 609-616, 2006.

ZHU, W.; GONG, G.; PAN, J.; HAN, S.; ZHANG, W.; HU, Y. et al. High level expression and purification of recombinant human serum albumin in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 147, p.61-68, 2018.

ZOU, X.; ZHANG, Q.; LU, H.; LIN, D.; YAO, S. Development of a hybrid biomimetic ligand with high selectivity and mild elution for antibody purification. **Chemical Engineering Journal**, v. 368, p. 678-686, 2019.