



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Purificação de uma vacina de DNA plasmídico contra o Vírus do Papiloma Humano

Rita Isabel Mota Gaspar

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotechnology
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Ângela Sousa
Co-orientador: Prof. Doutor João Queiroz

Covilhã, junho de 2015

*Às duas pessoas mais importantes da minha vida,
aos Meus Pais.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Ângela Sousa e co-orientador Doutor João Queiroz por toda a orientação, aconselhamento, disponibilidade e ajuda contínua ao longo de todo o ano.

Também gostaria de agradecer à Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde, onde foi desenvolvida toda a investigação. Particularmente ao grupo de Biotecnologia e Ciências Biomoleculares, com um especial agradecimento à Lúcia Amorim por todo o conhecimento e ajuda que me transmitiu.

Um especial obrigado a todos os meus amigos por todos os cafés, todas as longas e boas conversas, por todas as brincadeiras e gargalhadas, por toda a paciência e apoio nos dias mais difíceis.

Por último, agradeço especialmente aos meus pais por todo o sacrifício que fizeram, todo o apoio, todos os ensinamentos e conselhos, toda a paciência, por acreditarem em mim e por todo o amor.

Resumo

O vírus do papiloma humano é um vírus sexualmente transmissível e está associado a cerca de 99% dos casos de cancro do colo do útero. Este cancro é considerado a segunda maior causa de morte em mulheres ao nível mundial. As vacinas comercializadas contra este vírus são apenas preventivas, ou seja, permitem o desenvolvimento de anticorpos de memória caso não exista ainda contato com o vírus. Além disto, apresentam outras limitações, tais como o elevado custo e não protegem contra todos os tipos de vírus do papiloma humano. Desta forma, as vacinas de DNA surgiram como uma estratégia bastante promissora, pois estas vacinas têm a capacidade de induzir dois tipos de resposta, a resposta humoral e a resposta celular, evitando assim a progressão da doença.

As vacinas de DNA plasmídico requerem uma etapa de produção e uma etapa de purificação para obter apenas a isoforma superenrolada, pois é a isoforma biologicamente ativa e de interesse terapêutico. Para a etapa de purificação, têm sido desenvolvidas novas estratégias para aplicação em processos cromatográficos que apresentem elevada eficiência na separação da biomolécula de interesse. Uma das estratégias recentemente exploradas consiste na utilização de monolitos como colunas cromatográficas que permitem maior capacidade de transferência de massa. Outra das estratégias é a utilização de aminoácidos como ligandos de afinidade, por reconhecerem especificamente a isoforma superenrolada do DNA plasmídico.

Desta forma, o trabalho apresentado nesta dissertação baseou-se na utilização de uma coluna monolítica imobilizada com um ligando derivado do aminoácido de histidina (benzil-histidina). O objetivo de explorar este ligando foi estudar as interações que possam ser estabelecidas entre os grupos funcionais do ligando, como os anéis aromáticos de benzil e imidazole, e a isoforma superenrolada do plasmídeo assim como os restantes constituintes do lisado de *Escherichia coli*.

Inicialmente foram realizadas mutações nos genes E6 e E7 do plasmídeo HPV16 E6/E7 para impedir que estas proteínas antigénicas reconheçam as proteínas p53 e retinoblastoma e tenham atividade oncogénica. Posteriormente foram realizados vários ensaios com amostras do plasmídeo mutado obtidas através de um *kit* comercial, contendo apenas as isoformas superenrolada e circular aberta do plasmídeo, para avaliar o comportamento e seletividade do ligando. Os resultados mostraram que foi possível isolar a isoforma superenrolada com uma concentração de sal de 2 M de sulfato de amónio.

Posteriormente, foram realizados ensaios com a amostra complexa de lisado e confirmou-se que é possível purificar a isoforma superenrolada com uma concentração de sal de 1,65 M.

Também foram realizados ensaios de dicroísmo circular para avaliar a estabilidade estrutural do plasmídeo superenrolado no processo cromatográfico em função do tampão de eluição utilizado e verificou-se que a estabilidade da isoforma superenrolada se mantém.

Por fim, a qualidade e percentagem de pureza do plasmídeo resultante da purificação com o monolito de benzil-histidina foram avaliadas através das metodologias requeridas pelas agências reguladoras, como a “Food and Drug Administration”. Estes testes indicaram que a

amostra purificada de DNA plasmídico superenrolado apresenta 99% de pureza e está de acordo com os critérios exigidos no que diz respeito ao DNA genómico, proteínas e RNA. Relativamente às endotoxinas foi conseguida uma redução de aproximadamente 344 vezes comparativamente à amostra inicial.

Palavras-chave

Benzil-histidina, cromatografia de afinidade, isoforma superenrolada do DNA plasmídico, vírus do papiloma humano.

Abstract

The human papillomavirus is a sexually transmitted virus and is associated with about 99% of the cases of cervical cancer. This virus is the second leading cause of death in women worldwide. Conventional vaccines against this virus are only preventive and are only effective in cases where there is no contact yet with the virus. Additionally, feature other limitations, such as the high cost and do not protect against all types of human papilloma virus. In this way, DNA vaccines have emerged as a very promising strategy because these vaccines have the ability to induce two types of response, humoral response and the cellular response, thus preventing the progression of the disease. Plasmid DNA vaccines require a production step and one-step purification to obtain only the supercoiled isoform, since it is the biologically active isoform of therapeutic interest. For the purification step, new strategies have been developed for application in chromatographic processes with high efficiency for the separation of the biomolecule of interest. One of the promising strategies is to explore monoliths as chromatographic columns that allow high mass transfer capability. Another strategy is to use amino acids as affinity ligands, because they specifically recognize supercoiled plasmid DNA isoform.

In this way, the work presented in this thesis is based on the use of a monolithic column immobilized with a histidine amino acid derivative (benzyl-histidine). The goal of exploring this ligand was to study the interactions that can be established between the functional groups of the ligand, such as the benzyl and imidazole aromatic rings, and the supercoiled plasmid isoform as well as the remaining constituents of *Escherichia coli* lysate.

Initially, mutations in E6 and E7 genes were performed in the HPV16 E6/E7 plasmid DNA to prevent these antigenic proteins recognize the p53 and retinoblastoma proteins and have oncogenic activity. Later al assays were conducted with samples of mutated plasmid DNA and obtained through a commercial kit, containing only the supercoiled and open circular isoforms, to evaluate the behavior and selectivity of the ligand. The results showed that it was possible to isolate the supercoiled isoform with a salt concentration of 2 M ammonium sulfate.

Thereafter, tests were done using a complex lysate sample and confirmed that it is possible to purify the supercoiled isoform with a salt concentration of 1.65 M. Circular dichroism assays were also carried out to assess the structural stability of supercoiled plasmid DNA in chromatographic process in function of the used elution buffer and it was found that the stability of supercoiled isoform is maintained.

Finally, the quality and purity degree of plasmid resultant of purification with the benzyl-histidine monolith were evaluated through the methodologies required by regulatory agencies such as the Food and Drug Administration. These tests indicated that the purified supercoiled plasmid DNA sample presents 99% of purity and is in compliance with the criteria with regard to the genomic DNA, RNA and proteins. In relation to endotoxins, it was achieved a reduction of approximately 344 times comparing to the original sample.

Keywords

Affinity chromatography, benzyl-histidine monolith, supercoiled plasmid DNA, human papillomavirus

Índice

Introdução.....	1
1 Vírus do Papiloma Humano.....	1
1.1 Oncoproteínas E6 e E7.....	3
1.1.1 Oncoproteína E6.....	3
1.1.2 Oncoproteína E7.....	5
1.2 Vacinas preventivas e/ou terapêuticas contra a infecção por HPV.....	6
1.2.1 Vacinas preventivas.....	6
1.2.2 Vacinas terapêuticas.....	7
2 Terapia génica e vacinas de DNA.....	7
2.1 Terapia génica.....	7
2.2 Vacinas de DNA.....	8
2.3 Sistemas de entrega de DNA.....	10
2.3.1 Vetores virais.....	11
2.3.2 Vetores não virais.....	12
3 DNA plasmídico.....	12
3.1 Processo “upstream”.....	13
3.2 Processo downstream”.....	14
3.2.1 Isolamento primário do pDNA.....	15
3.2.2 Purificação do pDNA.....	15
3.2.2.1 Cromatografia de exclusão molecular.....	16
3.2.2.2 Cromatografia de troca iónica.....	16
3.2.2.3 Cromatografia de interação hidrofóbica.....	17
3.2.2.4 Cromatografia de afinidade.....	17
3.2.2.4.1 Cromatografia de afinidade com aminoácidos.....	20
3.2.2.4.1.1 Ligandos de histidina e seus derivados.....	20
4 Purificação com monolitos.....	22
Materiais e Métodos.....	23
1 Materiais.....	23
1.1 DNA plasmídico.....	23
2 Métodos.....	24
2.1 Transformação das células de <i>E.coli</i> DH5a com o plasmídeo HPV16 E6/E7 ^{MUT}	24
2.2 Confirmação da inserção do fragmento mutado.....	24
2.3 Condições de crescimento.....	25
2.4 Preparação da amostra pré-purificada com o <i>kit</i> Qiagen.....	25
2.5 Preparação da amostra de lisado.....	25
2.6 Isolamento de RNA a partir das células de <i>E.coli</i> DH5a não transformadas.....	26

2.7	Isolamento de gDNA a partir das células de <i>E.coli</i> DH5a não transformadas	26
2.8	Ensaio cromatográfico.....	26
2.9	Eletroforese em gel de agarose.....	27
2.10	Quantificação do pDNA	27
2.11	Quantificação de gDNA	28
2.12	Quantificação de proteínas	29
2.13	Quantificação de endotoxinas.....	30
2.14	Dicroísmo circular (DC).....	30
Resultados e Discussão.....		33
1	Mutações nas oncoproteínas E6 e E7 do HPV	33
1.1	Mutações na oncoproteína E6	33
1.2	Mutações na oncoproteína E7	34
2.	Construção do vetor.....	34
3.	Curvas de crescimento.....	36
4.	Ensaio cromatográfico	37
4.1	Separação das isoformas sc e oc do HPV16 E6/E7 ^{MUT}	37
4.2	Purificação da isoforma sc do pDNA a partir da amostra complexa de lisado de <i>E.coli</i> 40	
5	Dicroísmo circular	48
6	Injeção das impurezas na coluna monolítica	51
7	Parâmetros analíticos para a avaliação da qualidade do plasmídeo	53
Conclusões e Perspetivas Futuras.....		59
Bibliografia.....		61

Lista de Figuras

Capítulo 1 - Introdução

Figura 1 - Genoma e organização da estrutura do HPV.....	1
Figura 2 - Efeito da interação entre a proteína E6 e o gene supressor de tumores p53.....	4
Figura 3 - Efeito da interação entre a proteína E7 e o retinoblastoma.....	5
Figura 4 - Principais alvos da terapia génica.....	7
Figura 5 - Princípio da terapia génica.....	8
Figura 6 - Descrição dos mecanismos de geração de resposta específica humoral e celular para o antígeno.....	9
Figura 7 - Esquema do processo “upstream”.....	13
Figura 8 - Representação esquemática da construção do plasmídeo	14
Figura 9 - Esquema do processo “downstream”.....	14
Figura 10 - Estrutura da L-histidina.....	20
Figura 11 - Estrutura da L-metil histidina.....	21
Figura 12 - Estrutura da L-benzil histidina.....	21

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

Figura 13 - Plasmídeo HPV16 E6/E7.....	24
Figura 14 - Curva de referência dos padrões de DNA plasmídico (1-50 µg/mL).....	28
Figura 15 - Curva de referência dos padrões de gDNA da <i>E. coli DH5a</i> (0,005 - 50 ng/µL).....	29
Figura 16 - Curva de referência dos padrões de BSA (20 - 2000M mg/mL).....	29
Figura 17 - Curva de referência dos padrões de endotoxinas (0,005-0,1EU/mL).....	30

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

Figura 18 - Comparação entre a sequenciação da oncoproteína E6 <i>wild type</i> e a oncoproteína E6 mutada.....	34
Figura 19 - Comparação entre a sequenciação da oncoproteína E7 <i>wild type</i> e a oncoproteína E7 mutada.....	34
Figura 20 - Vetor HPV16 E6/E7 ^{MUT}	35
Figura 21 - Digestão enzimática do vetor HPV16 E6/E7 ^{MUT}	35
Figura 22 - Curva de crescimento do plasmídeo HPV16 E6/E7 ^{MUT}	36
Figura 23 - Curva de crescimento do plasmídeo HPV16 E6/E7	37
Figura 24 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de pDNA pré-purificada utilizando um gradiente de 2 passos (2,5M e 0M de (NH ₄) ₂ SO ₄) e tampão Tris-HCl (pH 8,0).....	38
Figura 25 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de pDNA pré-purificada utilizando um gradiente de 2 passos (2M e 0M de (NH ₄) ₂ SO ₄) e tampão Tris-HCl (pH 8,0).....	39
Figura 26 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de lisado utilizando um gradiente de 3 passos (3,5M; 2,8M e 0M de (NH ₄) ₂ SO ₄) e tampão Tris-HCl (pH 8,0).....	40
Figura 27 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de lisado utilizando um gradiente de 3 passos (3,2M; 2,5M e 0M de (NH ₄) ₂ SO ₄) e tampão Tris-HCl (pH 8,0).....	41
Figura 28 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de lisado utilizando um gradiente de 3 passos (3M; 2M e 0M de (NH ₄) ₂ SO ₄) e tampão Tris-HCl (pH 8,0).....	42
Figura 29 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de lisado utilizando um gradiente de 2 passos (1,8M e 0M de (NH ₄) ₂ SO ₄) e tampão Tris-HCl (pH 8,0).....	43

Figura 30 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de lisado utilizando um gradiente de 2 passos (1,75M e 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e tampão Tris-HCl (pH 8,0).....	44
Figura 31 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de lisado utilizando um gradiente de 2 passos (1,7M e 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e tampão Tris-HCl (pH 8,0).....	44
Figura 32 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de lisado utilizando um gradiente de 2 passos (1,7M e 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e tampão citrato (pH 5,0).....	45
Figura 33 - Perfil cromatográfico e análise eletroforética da amostra de lisado utilizando um gradiente de 2 passos (1,65M e 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e tampão citrato (pH 5,0).....	46
Figura 34 - Eletroforese da regeneração do monolito com 0,5 M NaOH.....	47
Figura 35 - Cromatograma e eletroforese da limpeza com NaCl 1 M.....	48
Figura 36 - Espectro de dicroísmo circular das isoformas ln, oc e sc do HPV16 E6/E7 ^{MUT} em solução de 10 mM de Tris-HCl com EDTA 10 mM.....	49
Figura 37 - Espectro de dicroísmo circular da isoforma pDNA sc do HPV16 E6/E7 ^{MUT} em solução de 10 mM de Tris-HCl com EDTA 10 mM e solução Tris-HCl 10 mM.....	50
Figura 38 - Espectro de dicroísmo circular da isoforma pDNA sc do HPV16 E6/E7 ^{MUT} em solução de 10 mM de Tris-HCl com EDTA 10 Mm (pH 8,0), solução de citrato 10 mM com EDTA 10 mM (pH 5,0), solução de sulfato de amônio 3M em Tris-HCl 10 mM com EDTA 10 mM (pH 8,0) e solução de sulfato de amônio 3M em citrato 10 mM com EDTA 10 mM (pH 5,0).	51
Figura 39. Perfil cromatográfico das amostras de RNA (A) e de gDNA (B), extraídas isoladamente da <i>E. coli</i> não transformada, no monolito de benzil-histidina utilizado um gradiente por passos de 1,65 M e 0 M de sulfato de amônio.....	52
Figura 40. Perfis cromatográficos analíticos de diferentes amostras.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Funções das "open reading frames" do vírus do papiloma humano.....	3
Tabela 2 - Vantagens das vacinas de DNA em relação às vacinas convencionais.....	10
Tabela 1 - Tabela resumo das vantagens e desvantagens dos vetores virais.....	11
Tabela 4 - Métodos cromatográficos de afinidade para purificação de pDNA.....	19
Tabela 5 - Critérios exigidos pelas agências reguladoras para a amostra purificada de pDNA sc	53
Tabela 6 - Análise da concentração, percentagem de pureza e rendimento de recuperação do plasmídeo HPV16 E6/ E7 com o monolito de benzil-histidina.....	56
Tabela 7 - Valores da quantificação de proteínas, endotoxinas e gDNA da amostra inicial e da amostra de pDNA sc.....	57

Lista de Acrónimos

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Sulfato de amónio
 μg - micrograma
 μL - microlitro
AAV - Vírus adeno-associado
ATPase - adenosina trifosfato
BCA - “*bicinchoninic acid*”
BSA - albumina de soro bovino
DC - dicroísmo circular
DNA - ácido desoxirribonucleico
 DO_{600} - densidade óptica a 600 nm
E.coli - *Escherichia coli*
EAEMP - “*European Agency for the Evaluation of Medical Products*”
EDTA - ácido etilenodiamino tetra acético
EGF - fator de crescimento epidérmico
FDA - *Food and Drug Administration*
g - grama
gDNA - DNA genómico
HCl - ácido clorídrico
HIC - cromatografia de interação hidrofóbica
HIV - vírus da Imunodeficiência Adquirida
HPV - vírus do Papiloma Humano
 K_2HPO_4 - fosfato dipotássico
Kda - kilo daltons
 KH_2PO_4 - fosfato monopotássico
Kpb - quilo pares de bases
L - litros
LAL - “*Limulus ameobocyte lysate*”
LCR - região longa de controlo
ln - linear
M - molar
mg - miligramas
MHC - Complexos de Histocompatibilidade
min - minutos
mM - milimolar
NaOH - Hidróxido de sódio
ng - nanogramas

nm - nanômetros
oc - circular aberta
ORFs - *“open reading frames”*
PCR - reação em cadeia da polimerase
PDGF - *“platelet derived growth factor”*
pDNA - DNA plasmídico
Rb - retinoblastoma
RNA - ácido ribonucleico
RT-PCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real
sc - superenrolada
SDS - dodecilsulfato de sódio
SIDA - síndrome da Imunodeficiência Humana
SPR - ressonância de plasma de superfície
Tris - Tris (hidroximetil) aminometano
UE - unidades de endotoxinas
UV - ultravioleta

Capítulo 1

Introdução

1 Vírus do Papiloma Humano

O vírus do papiloma humano (HPV) está associado a inúmeros casos de doenças genitais por todo o mundo, tais como, cancro vaginal, cancro da vulva, cancro do pênis e cancro do colo do útero [1]. Este último desenvolve-se preferencialmente em mulheres adolescentes com idades entre os 15 e os 19 anos e é considerado a segunda maior causa de morte em mulheres a nível mundial [1,2]. A infeção persistente pelo HPV é considerado o principal fator para o desenvolvimento do cancro do colo do útero e concluiu-se que o DNA do HPV está presente em cerca de 99,7% dos casos deste cancro [2].

Existem diferentes tipos de HPV, que são divididos de acordo com o risco que representam para a população mundial. São, desta forma, divididos entre HPV de baixo risco, risco intermédio e de alto risco [2]. O HPV16 e o HPV18 são considerados os vírus de maior risco para as mulheres, pois cerca de 70% são infetadas por estes genótipos. No entanto, o HPV16 é o que afeta um maior número de mulheres, fazendo deste tipo de HPV o mais perigoso e também o mais estudado [3].

Em relação à biologia molecular do HPV16, está descrito que o seu DNA é pequeno, circular, de cadeia dupla e tem cerca de 8000 pares de bases de comprimento [4]. O genoma do vírus está dividido em três regiões diferentes, nomeadamente a região longa de controlo (LCR), que ocupa cerca de 10% do genoma. As duas outras regiões são compostas pelos *early genes* (cerca de 50% do genoma) e pelos *late genes* (cerca de 40% do genoma) (Figura 1) [4].

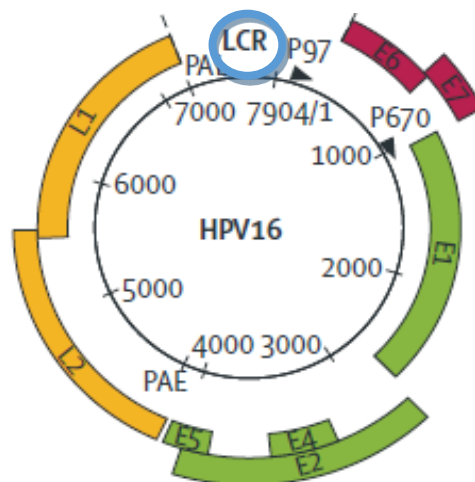


Figura 1 - Genoma e organização da estrutura do HPV. No círculo azul está representado a região de controlo, a vermelho estão representados os oncogenes (E6 e E7), a verde os *early genes* (E1, E2, E4 e E5) e a amarelo os *late genes* (L1 e L2) (adaptado de [5]).

A região LCR não codifica proteínas, porém, contém sítios de ligação para inúmeros repressores e ativadores da transcrição. Regula ainda a transcrição das regiões “*early*” e das regiões “*late*” e controla a produção de proteínas virais e partículas infecciosas. É sugerido que esta região pode desempenhar um papel importante na determinação dos possíveis hospedeiros de determinados tipos de HPV [6].

A região “*late*” é uma região codificante de proteínas e contém duas sequências “*open reading frames*” (ORFs), que podem ser traduzidas em proteínas. Essas duas ORFs são designadas de L1 e L2 e codificam para proteínas da cápside viral. A ORF L1 codifica para a proteína da cápside viral principal e é altamente conservada entre diferentes espécies de HPV. A ORF L2 codifica para a proteína menor da cápside viral e apresenta mais variação de sequência entre os diferentes tipos de HPV [6].

A região “*early*”, tal como a região “*late*”, codifica proteínas não estruturais que regulam a transcrição e a replicação do vírus [4]. É composta por seis ORFs, designadas de E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que desempenham diferentes funções que se encontram resumidas na tabela 1 [6]. Dependendo do tipo de HPV, os genes E4, E5 e E7 codificam geralmente para um único polipéptido, ao contrário dos genes E1, E2 e E6 que podem ser expressos em diferentes poliproteínas. Esta diferença de expressão é resultante do processo de splicing [4].

O gene E1 codifica polipéptidos de 68 e 27 kDa. A proteína de 68 kDa codifica para a adenosina trifosfatase (ATPase) e para a atividade da helicase e liga-se a sequências específicas dentro do LCR para iniciar a replicação do DNA [4]. O gene E2 contém o domínio de ativação da transcrição, que se designa o domínio de ligação ao DNA. Ao ter a capacidade de atuar como ativadores ou repressores da transcrição, as proteínas E2 regulam a transcrição do genoma do vírus [4]. A ORF E4 está envolvida na maturação e libertação de partículas de HPV, sendo expressa mais tarde, tal como acontece com as ORFs L1 e L2 [4]. Em relação à função da proteína E5 no ciclo de vida do HPV, ainda pouco se conhece pois é uma proteína que muitas vezes não está presente em células do cancro do colo do útero. Este facto indica que esta proteína pode não ser essencial na manutenção da transformação maligna da célula hospedeira. Desta proteína apenas é conhecido que interage com recetores da membrana celular, tais como o EGF (fator de crescimento epidérmico) e o PDGF o que pode estimular a proliferação celular em células infetadas por HPV [6, 7].

Por fim, as oncoproteínas E6 e E7 são expressas como poliproteínas com 151 e 98 aminoácidos de comprimento, respetivamente. Estas proteínas são responsáveis pela proliferação das células infetadas pelo vírus do HPV porque têm a capacidade de interferir nos mecanismos de algumas proteínas supressoras de tumores, nomeadamente da proteína p53 e da proteína retinoblastoma [4]. No capítulo seguinte a ação da E6 e E7 é explicada mais detalhadamente.

Tabela 1- Funções das "open reading frames" do vírus do papiloma humano (adaptado de [4])

Genes	Função
L1	Proteína de cápside maior
L2	Proteína de cápside menor
E1	Síntese do DNA viral
E2	Proteína reguladora da transcrição
E4	Afeta as citoqueratinas
E5	Interage com fatores de crescimento
E6	Proteína transformadora; liga-se à p53 e inicia a sua degradação
E7	Liga-se à família de genes do retinoblastoma (Rb1, p107 e p103)

1.1 Oncoproteínas E6 e E7

O potencial oncogénico do HPV16 está diretamente relacionado com as oncoproteínas E6 e E7 sendo por isso consideradas oncoproteínas que desempenham um papel chave na carcinogénese [8,9]. Estas proteínas têm capacidade para interferir na desregulação do ciclo celular, da apoptose, da reparação do DNA, da senescência e ainda da diferenciação das células. Ao desregular todos estes eventos celulares irá facilitar a acumulação de danos no DNA, o que leva a uma progressão das células cancerígenas [9]. Mais concretamente, estas proteínas conseguem afetar parte do controlo do crescimento celular, alterando as vias relacionadas com a resposta imune e transformação celular [9,10]. Desempenham ainda um importante papel devido à capacidade para impedir a ação de proteínas supressoras de tumores, nomeadamente a proteína E6 degrada a proteína p53 e a proteína E7 bloqueia a ação do retinoblastoma [10].

1.1.1 Oncoproteína E6

A oncoproteína E6 tem aproximadamente 150 aminoácidos e é rica em cisteínas. A sua principal característica é a presença de duas regiões de ligação de zinco [9]. Na base das regiões de ligações de zinco existem dois "motifs" que contêm duas cisteínas que são conservadas em todos os tipos de HPV. Na segunda região de ligação de zinco existe um "motif" LXXLL que é necessário para mediar a interação entre a proteína E6 e outras proteínas [9]. De acordo com estudos estruturais realizados em 2009, a E6 tem a capacidade de associar-se com um grande número de proteínas celulares [11]. Uma das propriedades mais bem caracterizadas da proteína E6 é a capacidade desta para induzir a degradação da proteína supressora de tumores, a proteína p53, através da via da ubiquitina [12] (Figura 2).

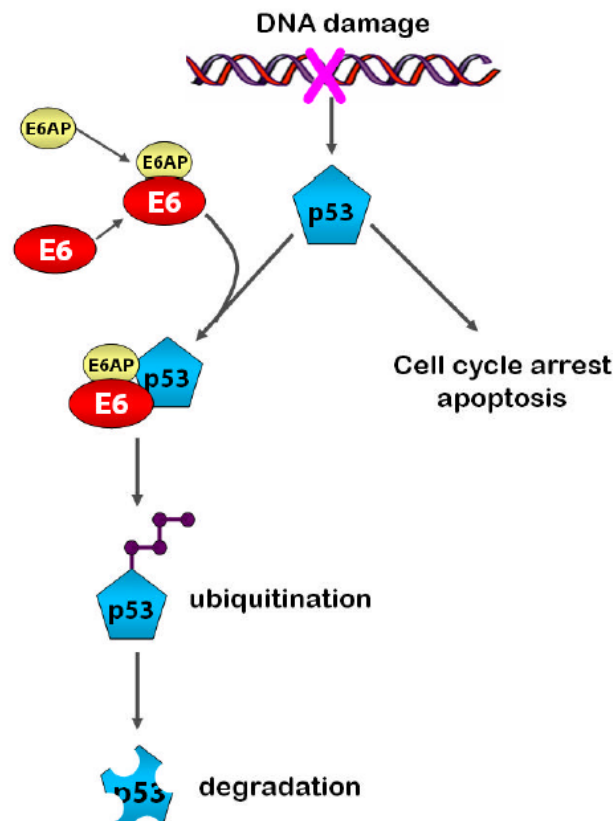


Figura 2 - Efeito da interação entre a proteína E6 e a proteína supressora de tumores p53. Os danos no DNA induzem a ativação do ciclo celular ou da apoptose. A proteína E6 do HPV liga-se à E6-AP e à p53, o que resulta na ubiquitinação mediada pela E6-AP e numa rápida degradação proteossômica da p53 (adaptado de [12]).

Como referenciado anteriormente, a proteína p53 é uma proteína fundamental no controlo do ciclo celular porque quando são detetados danos no DNA, esta bloqueia a progressão do ciclo na fase G1 e ativa proteínas envolvidas na reparação do DNA. Caso essa reparação não seja possível, a proteína p53 ativa outras proteínas envolvidas na apoptose celular, o que levará à morte celular. A p53 atua através de reguladores, tais como o p21, o que leva à inibição de uma ciclina dependente de cinase e também ao bloqueio da fosforilação do gene retinoblastoma, evitando deste forma a progressão do ciclo celular. Por outro lado, na presença da oncoproteína E6, a degradação da p53 é acelerada. Esta degradação é mediada pela enzima E6-AP, que apenas degrada a p53 na presença da oncoproteína E6. A ligação entre a oncoproteína E6, a enzima E6-AP e a p53 resulta na ubiquitinação da p53 e subsequentemente na sua degradação proteolítica (Figura 2). Por este motivo, a função anticancerígena da p53 fica comprometida, permitindo o desenvolvimento de células cancerígenas [13].

1.1.2 Oncoproteína E7

A oncoproteína E7 tem aproximadamente 100 aminoácidos e tal como a E6, contém igualmente regiões de ligação de zinco [9]. Está dividida em três domínios designados de regiões conservadas (CR 1, CR2 e CR3). A CR 2 possui uma região que contém o motivo LXCXE (Leu-X-Cys-X-Glu) que medeia a interação com a proteína supressora de tumores, o retinoblastoma, e com as suas proteínas relacionadas, a p107 e a p130.

Em células não infectadas por HPV, as proteínas Rb, p107 e p10 formam complexos com fatores de transcrição da família E2F, controlando o ciclo celular em fases específicas através de ciclinas dependentes de cinases [6]. Por outro lado, em células infectadas pelo vírus HPV, o mecanismo de controlo do ciclo celular é alterado, pois a proteína E7 interfere com o complexo E2F-Rb, fazendo com que este se dissocie. Com a dissociação do complexo, há uma libertação do E2F, esta libertação pode estimular a transcrição dos genes dependentes deste fator que são necessários para a replicação do DNA (Figura 3) [6]. Em suma, a proteína E7 vai impedir que o Rb controle a divisão celular, resultando na progressão descontrolada das células infectadas por HPV.

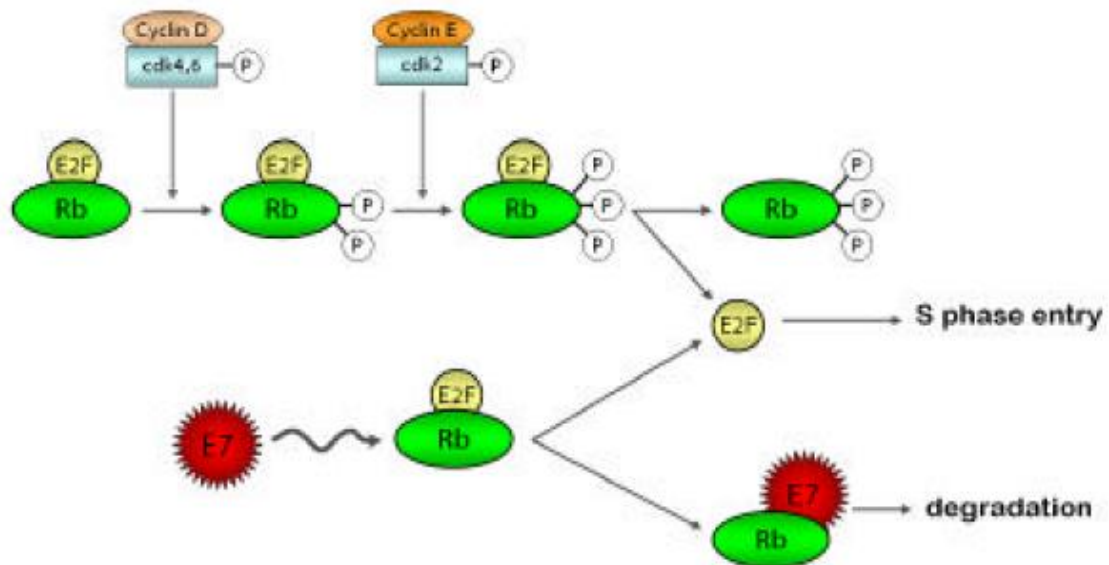


Figura 3 - Efeito da interação entre a proteína E7 e o retinoblastoma. Fosforilação sequencial do Rb pelo complexo ciclina/CDK que vai inibir a atividade repressora de tumores do Rb. A proteína E7 liga-se à forma hipofosforilada do pRB, essa ligação rompe o complexo entre a pRb e o fator de transcrição E2F o que resulta na libertação do E2F, que permite à célula entrar na fase S do ciclo celular (adaptado de [12]).

1.2 Vacinas preventivas e/ou terapêuticas contra a infecção por HPV

Nos últimos tempos têm sido desenvolvidas e comercializadas algumas vacinas contra a infecção por HPV. Nomeadamente vacinas preventivas que têm a capacidade de bloquear a infecção através da geração de anticorpos que são capazes de neutralizar o vírus [2]. Apesar do seu desenvolvimento e comercialização estas vacinas apresentam algumas desvantagens, tais como, os custos elevados de produção o que significa um preço elevado de comercialização, por este motivo os países menos desenvolvidos são impedidos de comprar as vacinas e impedidos que combater a infecção por HPV. Outra das desvantagens prende-se pelas vacinas comerciais não protegem contra todos os tipos de HPV que causam cancro do colo do útero e também não são eficazes nos casos em que já existe infecção por HPV [14].

Desta forma, para ultrapassar as vantagens associadas às vacinas preventivas foram desenvolvidas as vacinas terapêuticas que conseguem eliminar a infecção por indução de uma resposta específica ao vírus HPV mediada pelas células T que ao contrário das vacinas preventivas conseguem combater o HPV mesmo após a infecção [2,15].

1.2.1 Vacinas preventivas

As vacinas preventivas, também conhecidas como vacinas profiláticas são vacinas que utilizam partes constituintes do vírus. Como referido anteriormente, estas vacinas funcionam através da indução de anticorpos que neutralizam o vírus do HPV e reduzem significativamente presença do vírus no organismo quando ocorrer uma infecção. Estas vacinas têm como princípio mimetizar uma infecção por HPV e, desta forma, criar uma “memória” no sistema imunológico para prevenir futuras infeções por este vírus [16]. Atualmente são autorizadas em mais de 100 países duas vacinas profiláticas, a Cervarix® e a Gardasil® [17].

A vacina Cervarix® é comercializada pela GlaxoSmithKline Biologicals situada em Rixensart na Bélgica. Esta vacina permite proteção específica contra os cinco tipos de HPV com maior risco associado (tipo 16, 18, 31, 33 e 45) os quais são atualmente responsáveis por cerca de 82% dos casos invasivos de cancro do colo do útero. Os resultados obtidos na fase de ensaios clínicos mostraram que esta vacina reduz significativamente as lesões intra-epiteliais no útero em mais de 70% de raparigas que ainda não iniciaram a vida sexual, sendo considerada a vacina mais atual de programas de vacinação preventiva [17].

A Gardasil® é uma vacina quadrivalente comercializada pela Merck & Co., pois consegue combater quatro tipos de HPV (HPV 6 e 11) que são de baixo risco, assim como o HPV16 e 18 que são de alto risco [18]. A Gardasil® é composta por partículas virais altamente purificadas. As partículas são específicas para a proteína L1 da cápside presente nos vírus HPV dos tipos 6, 11, 16 e 18 [18].

Alguns estudos demonstraram que o período de proteção após a vacinação com Cervarix® é cerca de 6,4 anos e após vacinação com a Gardasil® é cerca de 5 anos [19].

1.2.2 Vacinas terapêuticas

As vacinas terapêuticas podem induzir a regressão das lesões pré-cancerosas ou, no caso de células já infectadas pelo vírus, podem regredir o cancro do colo do útero avançado [20]. Ao contrário das vacinas preventivas, as vacinas terapêuticas incluem proteínas “early” do vírus HPV, tais como as proteínas oncogénicas E6 e E7 [21]. Estas proteínas são potenciais antígenos alvo, pois estão envolvidos na regulação da transcrição e da replicação do vírus, fazendo destes genes os principais responsáveis pela transformação maligna das células [15].

2 Terapia génica e vacinas de DNA

Existem em todo o mundo muitas doenças em que os métodos terapêuticos atuais são ineficientes, levando à morte de milhões de pessoas [22]. Para ultrapassar esta grande problemática têm sido estudadas estratégias terapêuticas inovadoras, tais como, terapia génica e vacinas de DNA. Estas novas abordagens são extremamente promissoras para tratar problemas de saúde pública atuais e emergentes [22].

2.1 Terapia génica

A terapia génica tem como objetivo o tratamento de doenças pela suplementação de genes funcionais para auxiliar ou substituir genes defeituosos ou mutantes que são causadores da doença [22]. É considerada uma estratégia bastante promissora baseada na utilização de genes como biofármacos. Atualmente este tipo de terapia pode ser utilizada para curar eficazmente várias doenças adquiridas ou doenças hereditárias graves, tais como cancro, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), doenças cardiovasculares, doenças infecciosas, entre outras (Figura 4) [23].

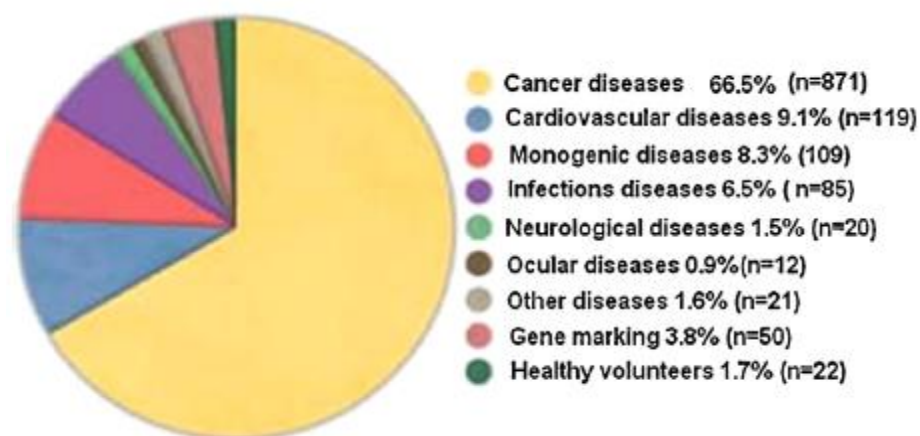


Figura 4 - Principais alvos da terapia génica (Adaptado de [23]).

Nesta terapia, um gene "normal" é inserido no genoma para substituir o gene causador de doença ou então suplementar um gene em falta de modo a expressar a proteína desejada. Assim sendo, a terapia génica torna-se complexa, pois a informação genética tem de ultrapassar vários obstáculos da célula eucariótica até atingir o núcleo da célula para ser expressa corretamente (Figura 6) [23].

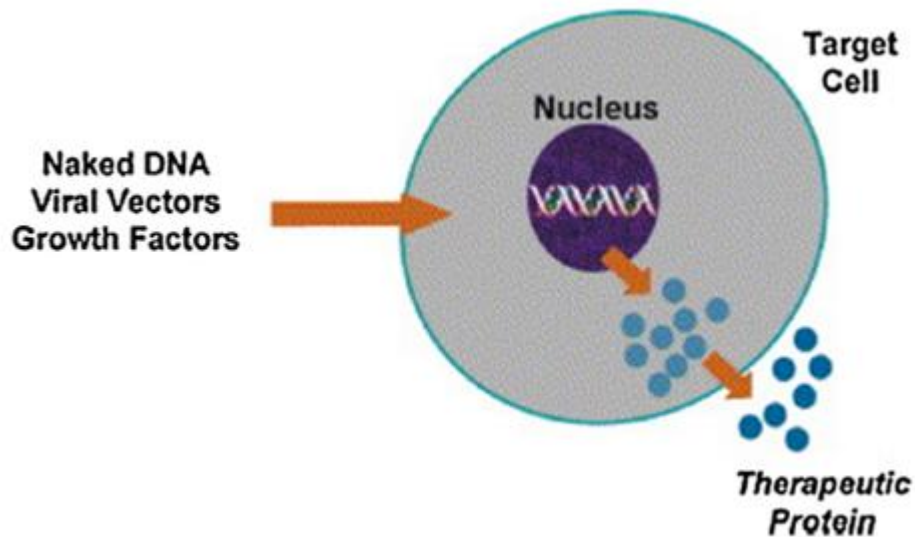


Figura 5 - Princípio da terapia génica (Adaptado de [23]).

2.2 Vacinas de DNA

Como já foi referido anteriormente, apesar do progresso e da ampla utilização de vacinas contra agentes infecciosos, existem ainda algumas infeções em que as vacinas não estão disponíveis ou não são eficazes para o tratamento dessas infeções [24]. Por este motivo, milhões de pessoas, incluindo crianças morrem anualmente de doenças infecciosas emergentes para as quais não existem vacinas eficientes. Devido à elevada taxa de mortalidade associadas a estas doenças, foi necessário compreender os mecanismos envolvidos na geração de respostas imunitárias celulares e a duração dessas respostas. Desta forma, surgiu uma nova forma de vacinação que usa o DNA que contém o gene que codifica para o antigénio de interesse porque este pode estimular a resposta humoral e igualmente a resposta celular (Figura 6) [23, 24].

No início da década de 1990 verificou-se que a vacinação de modelos animais com vacinas de DNA pode proporcionar diversas vantagens em relação às vacinas convencionais [26].

A principal vantagem das vacinas de DNA é a capacidade de gerar todos os tipos de imunidade desejada, linfócitos T citolíticos, células T auxiliares e anticorpos enquanto que as vacinas convencionais apenas induzem respostas de anticorpos [8,23,24,26].

As vacinas de DNA desencadeiam nas células as interações intra- e intercelulares necessárias para um antígeno resultar na geração de respostas citotóxicas, respostas de células T auxiliares e também na geração de anticorpos. O gene codificado nas vacinas de DNA expressa na célula uma parte antigénica do vírus. As células hospedeiras vão considerar esse DNA para transcrever o gene viral e construir a proteína viral dentro da célula. Essas proteínas antigénicas são ser conduzidas para a via de degradação do lisossoma [24]. A proteína viral é degradada em péptidos que se vão associar a complexos de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Este complexo péptidos de antígenos / moléculas de MHC classe II são reconhecidos pelas células T auxiliares (células T CD4⁺) que por sua vez vão induzir uma resposta “ajuda” pela produção de citocinas. Essas citocinas ajudam a ativar as células B em células produtoras de anticorpos (imunidade humoral) e ajudam na resposta dos linfócitos T citolíticos [26] (Figura 6).

A ativação dos linfócitos T citolíticos (células T CD8⁺) é geralmente dependente de uma via de processamento do antígeno reservada para proteínas intracitoplasmáticas que são degradadas em peptídeos e se associam com moléculas MHC de Classe I. Estes complexos (peptídeos / moléculas MHC classe I), quando apresentados na superfície de células apresentadoras de antígeno e em conjunto com moléculas co-estimuladoras, resultam na ativação das células T CD8⁺ (imunidade mediada por células).

Por outro lado, para as respostas de anticorpos, as células B reconhecem e respondem a antígenos presentes no meio extracelular ou expostos extracelularmente como proteínas transmembranares [23,25].

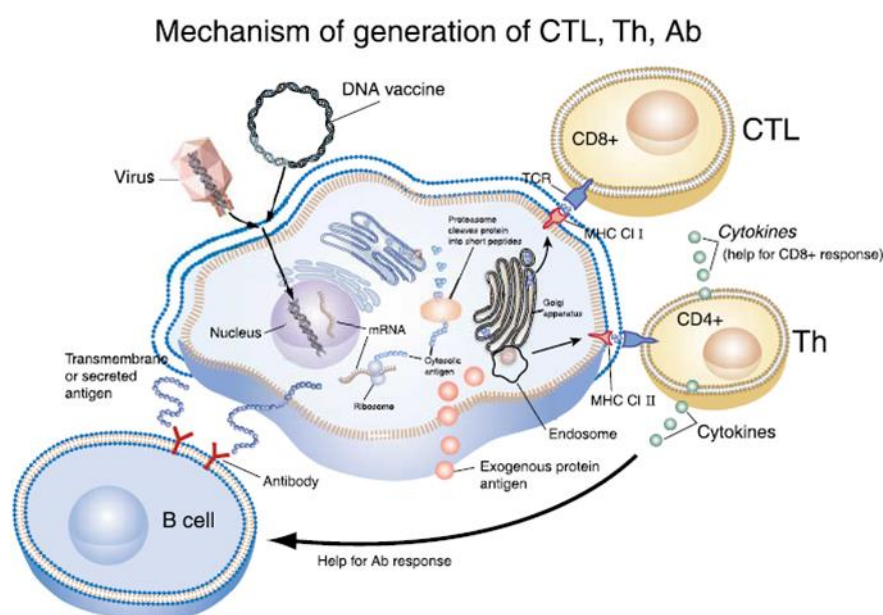


Figura 6 - Descrição dos mecanismos de geração de resposta específica humoral e celular para o antígeno. (Adaptado de [24]).

Visto que a proteína antigénica é sintetizada intracelularmente nas células transfetadas, a possibilidade do antígeno ser apresentado pelas moléculas MHC de classe I e II e induzir potenciais respostas das células T CD8⁺ para o antígeno torna-se na maior vantagem do uso de vacinas de DNA em relação às vacinas convencionais ao nível imunológico pois este mecanismo é o principal mecanismo de proteção contra agentes patogénicos intracelulares. [28].

Apesar desta ser considerada a principal vantagem das vacinas de DNA, existem outras vantagens que estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2 - Vantagens das vacinas de DNA em relação às vacinas convencionais

Vantagens	Consequência
Facilidade de produção com elevada pureza	Minimização do risco de contaminação da vacina com potenciais agentes patogénicos
Eficácia e segurança	Técnicas de produção podem reduzir a antigenicidade
Aumento da exposição do antígeno <i>in vivo</i>	Aumento da imunogenicidade
Facilidade de transporte e armazenamento	Aumento da estabilidade comparativamente a outras moléculas biológicas

No entanto, apesar dos importantes avanços neste novo método de vacinação, a aceitação oficial desta tecnologia para aplicação terapêutica humana depende da demonstração bem sucedida da sua segurança e eficácia em ensaios clínicos [29].

2.3 Sistemas de entrega de DNA

Estes sistemas podem ser aplicados tanto na terapia génica como em vacinas de DNA pois têm como finalidade facilitar a entrada do DNA nas células eucarióticas, assim como o seu transporte e entrega no núcleo sem sofrer degradação [23].

Para serem considerados eficientes, estes sistemas de entrega têm de cumprir alguns requisitos. Não podem desencadear uma resposta imunitária forte, devem conseguir transportar o DNA independentemente do seu tamanho, devem ter a capacidade de entregar o gene apenas às células alvo e devem ser fáceis de preparar, económicos, de baixa toxicidade e disponíveis comercialmente em altas concentrações [23].

2.3.1 Vetores virais

Os vírus têm a elevada facilidade de invadir células eucarióticas e usufruir da maquinaria nuclear das células do hospedeiro para expressarem o seu material genético e produzir as proteínas virais nessas células. Devido a esta característica, os vírus foram inicialmente considerados potenciais vetores para entregar genes terapêuticos ao núcleo das células alvo. Para serem usados como sistemas terapêuticos os vírus devem ser modificados, ou seja, os genes responsáveis pela sua patogenicidade devem ser substituídos pelos genes terapêuticos [23]. Os vírus mais utilizados como vetores são o retrovírus, o adenovírus, o vírus adeno-associado (AAV) e o lentivírus.

Apesar da vantagem referida anteriormente, estes vetores apresentam também inúmeras desvantagens [22,29]. As vantagens e desvantagens específicas para cada tipo de vírus estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Resumo das vantagens e desvantagens dos vetores virais

Vírus	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Alta eficiência de transfeção ❖ Transfeção em células proliferativas e não proliferativas ❖ Experiência clínica substancial 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Respostas imunes fortes ❖ Apresenta limite de tamanho de 7,5 kbp (quilopares de bases) ❖ Dificuldade de produção ❖ Dificuldade de armazenamento ❖ Expressão de curta duração
Retrovírus	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Expressão prolongada ❖ Alta eficiência de transfeção ❖ Experiência clínica substancial ❖ Baixa imunogenicidade 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Baixa eficiência de transfeção <i>in vivo</i> ❖ Apresenta limite de tamanho de 8 kb em condições <i>ex-vivo</i> ❖ As células transfetadas são apenas proliferativas ❖ Dificuldade de produção ❖ Questões de segurança (mutagéneses)
Vírus adeno-associado	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Transfeção eficiente de uma grande variedade de tipos de células <i>in vivo</i> ❖ Expressão prolongada ❖ Baixa imunogenicidade 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Dificuldade de produção ❖ Apresenta limite de tamanho de 4,5 kbp ❖ Experiência clínica limitada ❖ Questões de segurança (mutagéneses)
Lentivírus	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Transfeção em células proliferativas e não proliferativas ❖ Transfeção em células estaminais hematopoiéticas 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Dificuldade de produção ❖ Dificuldade de armazenamento ❖ Apresenta limite de tamanho de 8 kb ❖ Não há experiência clínica ❖ Questões de segurança (origens em HIV)

2.3.2 Vetores não virais

Para ultrapassar as limitações e desvantagens que dizem respeito aos vetores virais foi necessário encontrar alternativas mais seguras. Como tal foram desenvolvidos outro tipo de vetores que não são baseados em vírus e que têm capacidade para transferir DNA para a célula alvo. Estes vetores são relativamente seguros, têm uma baixa resposta imune e podem ser preparados facilmente e em grandes quantidades envolvendo baixos custos [23].

Além das vantagens já enumeradas, este tipo de vetores podem ainda transferir genes de maiores dimensões ou vários genes em simultâneo e podem ser armazenados por longos períodos de tempo devido à sua estabilidade [23].

A entrega de DNA através de vetores não virais pode ser classificada em dois grupos distintos, os métodos físicos e os métodos químicos [23]. Nos métodos físicos o DNA é entregue à célula alvo por meio de forças físicas que enfraquecem a membrana para a tornar mais permeável e permitir que o DNA chegue ao núcleo [23]. Em relação aos métodos químicos, o DNA é transportado através da membrana até ao núcleo por transportadores que podem ser preparados por reações químicas e que vão encapsular o DNA [23].

Os vetores não virais são propostos como alternativas bastante promissoras aos vetores virais pois conseguem comprimir a molécula de DNA para que ela fique mais pequena e ainda a vão proteger contra a degradação que pode sofrer por parte das nucleases [23].

Atualmente, o DNA plasmídico tem sido desenvolvido como um destes vetores não virais. Este apresenta uma série de vantagens que encaixam nas características deste tipo de vetores, pois é produzido através de fermentação bacteriana, o que faz com que seja mais fácil controlar a sua produção associada a um custo reduzido.

3 DNA plasmídico

Como já foi referido anteriormente, o DNA plasmídico tem despertado interesse terapêutico, pois é seguro, tem baixa toxicidade e é mais simples de desenvolver do que os sistemas virais [22]. Os plasmídeos são moléculas de DNA de cadeia dupla, circulares e apresentam um tamanho maior quando comparados com proteínas [31]. O seu tamanho pode variar entre 2 e 20 Kb, apresentam um peso molecular entre 10^6 e 10^7 Dalton, têm um esqueleto hidrofílico composto por um açúcar e um grupo fosfato. O seu interior é hidrofóbico e apresenta as bases azotadas empilhadas [32].

O pDNA pode apresentar-se em três conformações estruturais distintas designadas de isoforma linear, circular aberta (oc) e superenrolada (sc). Apesar de poder assumir estas três isoformas, a conformação superenrolada é considerada a isoforma de maior interesse terapêutico [32] porque as isoformas oc e linear podem estar danificadas aleatoriamente em locais da cassette de expressão eucariótica, o que faz com que estas isoformas sejam menos eficientes na expressão do gene de interesse [33]. A possibilidade do pDNA ser convertido em diferentes

isoformas depende da ação das nucleases do hospedeiro e das condições de manipulação a que está sujeito, tais como pH ou temperatura [32].

Como foi referido anteriormente, a isoforma sc é a que apresenta maior interesse terapêutico. O processo para obter a isoforma sc isolada pode ser dividido em duas partes. A primeira parte do processo pode ser caracterizada por processo “upstream” que engloba a construção do vetor com o gene de interesse, a transformação das células do hospedeiro com o plasmídeo e o crescimento das células transformadas por fermentação [34]. A segunda parte do processo pode ser designada de processo “downstream”, que engloba a extração, o isolamento primário e a purificação da isoforma de interesse dos outros constituintes do hospedeiro (RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas) [34].

No final de todo o processo a isoforma pDNA sc purificada deve seguir critérios específicos impostos pelas agências reguladoras, a Food and Drug Administration (FDA) e a European Agency for the Evaluation of Medical Products (EAEMP) [34].

3.1 Processo “upstream”

O processo de “upstream” começa com a construção do vetor e a seleção do hospedeiro bacteriano adequado, seguido da escolha e otimização das condições de fermentação, que dependem do hospedeiro [34] (Figura 7).



Figura 7 - Esquema do processo “upstream”.

Após a seleção do gene de interesse, é necessário construir o vetor, o que é bastante importante para garantir o sucesso de todo o processo. O plasmídeo deve conter os elementos necessários para a manutenção e propagação no hospedeiro bacteriano e também para expressar o gene de interesse [35].

Assim, o plasmídeo deve conter um gene de origem de replicação, que vai garantir uma amplificação do número de cópias de forma independente da maquinaria do hospedeiro, assim como um gene de resistência a um antibiótico, para que ocorra um crescimento bacteriano

seletivo. Por outro lado, o plasmídeo também deve conter uma cassete de expressão eucariota composta pelo promotor, para dar início à expressão do gene de interesse nas células eucarióticas, seguido pelo gene de interesse e por fim a sequência de terminação para finalizar a expressão desse mesmo gene (Figura 8) [36].

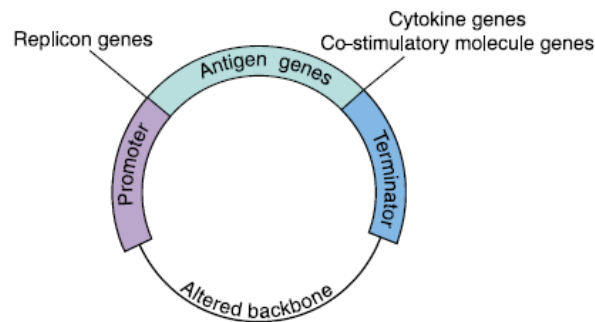


Figura 8 - Representação esquemática da construção do plasmídeo [24].

Em relação ao hospedeiro, os plasmídeos são geralmente produzidos em *Escherichia coli* (*E.coli*), uma bactéria de utilização segura na bioindústria como produtora de muitas proteínas recombinantes e plasmídeos [31].

A escolha do hospedeiro e as condições de fermentação são fatores importantes que devem ser estudados e otimizados para permitir uma produção de grandes quantidades de pDNA [34], mantendo a estabilidade e atividade biológica da isoforma sc [37].

3.2 Processo downstream”

O processo “downstream” de biomoléculas passa essencialmente por duas etapas, a etapa de lise das células resultantes da fermentação e após obter a amostra clarificada segue-se o passo de purificação com o objetivo final de obter o pDNA sc purificado [34] (Figura 9). O processo “downstream” é afetado pelas impurezas e contaminantes provenientes das condições de transformação e fermentação no processo “upstream”. Por esta razão, são necessárias algumas operações destinadas à eliminação dessas impurezas com o objetivo de obter uma amostra final de pDNA que cumpra todos os critérios exigidos pelas agências reguladoras (FDA e EAEMP). O passo de clarificação e concentração tem como finalidade eliminar da amostra algumas proteínas e alguns ácidos nucleicos. A etapa de purificação é usada para separar o pDNA sc das impurezas que são estruturalmente semelhantes como é o caso da isoforma oc, do RNA, do gDNA e das endotoxinas [34].

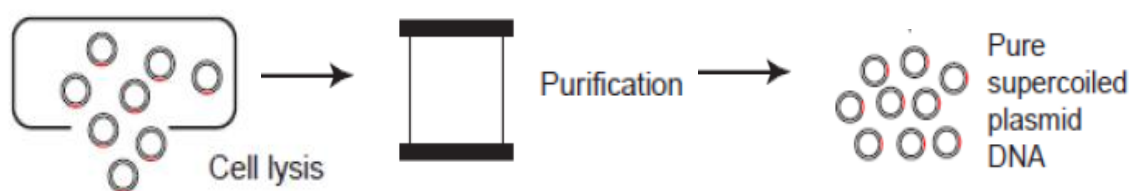


Figura 9 - Esquema do processo “downstream” (adaptado de [32]).

3.2.1 Isolamento primário do pDNA

As células da *E.coli* podem ser recuperadas utilizando técnicas de centrifugação ou microfiltração [38]. Após essa recuperação, as células contêm várias impurezas e o plasmídeo representa apenas cerca de 3% de w/w do extrato da *E.coli* [39]. Por este motivo, é necessário remover as impurezas celulares presentes no extrato da *E.coli* (proteínas, RNA, DNA genómico e endotoxinas), assim como isolar a isoforma sc das outras isoformas do pDNA, de forma a respeitar os critérios exigidos pelas agências reguladoras [40]. O processo de isolamento e purificação tem sido otimizado devido à dificuldade para separar o pDNA sc das impurezas, pois estas biomoléculas partilham características semelhantes, tais como, a carga negativa, a massa molar e a hidrofobicidade [40]. Desta forma, este é considerado o passo crítico do processo biotecnológico para a obtenção do pDNA sc para posterior aplicação terapêutica [38].

Embora possam ser usados vários métodos para romper a membrana das células de *E.coli* e recuperar o pDNA, o método mais utilizado é a lise alcalina [41]. Este método consegue romper as células a um pH elevado, utilizando uma base forte como o NaOH e com a ajuda de um detergente, o SDS, que desnatura as proteínas presentes na parede das células. De seguida, ocorre uma libertação do conteúdo intracelular, nomeadamente proteínas e ácidos nucleicos do hospedeiro, como o gDNA que se degrada nestas condições, e que se vão misturar com o pDNA e restos celulares. Embora a estrutura do pDNA sc possa também ser afetada como consequência da utilização do NaOH, pois esta base afeta as ligações de hidrogénio que unem as bases dos ácidos nucleicos, se o pH for mantido abaixo de 12,5 durante um curto período de tempo as bases permanecem ligadas, o que impede a separação das cadeias complementares [31].

Após o passo de lise, a solução é neutralizada com um ácido forte como o acetato de potássio, que precipita o gDNA desnaturado e os restos celulares. O lisado clarificado resultante da lise alcalina contém geralmente proteínas, RNA, endotoxinas, fragmentos de gDNA e pDNA que representa menos do que 1% (w/w) da solução [31]. Assim sendo, torna-se fundamental aplicar passos de concentração e clarificação da amostra de lisado, para remover proteínas, endotoxinas e restos celulares do hospedeiro e consequentemente aumentar a fração de pDNA antes da etapa de purificação [38]. A redução da presença de RNA e proteínas pode ser feita com um sal caotrópico, tal como, o sulfato de amónio [31].

3.2.2 Purificação do pDNA

A purificação do pDNA para aplicações terapêuticas requer a aplicação e desenvolvimento de tecnologias eficientes para remover as impurezas e obter o pDNA com um grau de pureza próximo de 100% e uma homogeneidade superior a 97% da isoforma sc, respeitando os requisitos das agências reguladoras como a FDA [40]. A cromatografia líquida tem sido aplicada para a purificação de pDNA pois é um método de análise de alta resolução e que está bem caracterizado na indústria biofarmacêutica [32]. No entanto, como já foi referido anteriormente, o pDNA e as impurezas apresentam semelhanças no que diz respeito à carga,

hidrofobicidade e massa molecular, o que representa um grande desafio para o isolamento do pDNA [42]. Outra limitação associada ao passo de purificação de pDNA integrado no processo biotecnológico é a baixa capacidade de ligação das fases estacionárias convencionais para moléculas de grandes dimensões, como é o caso do pDNA [31].

Têm sido exploradas diversas técnicas cromatográficas com mais ou menos sucesso para purificar o pDNA sc com o grau de pureza exigido. Essas técnicas exploram as propriedades do pDNA, tais como, o tamanho (cromatografia de exclusão molecular); a carga (cromatografia de troca iónica); a hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica) e ainda a acessibilidade das bases dos nucleótidos [32].

3.2.2.1 Cromatografia de exclusão molecular

O princípio da cromatografia de exclusão molecular assenta nos diferentes tamanhos dos componentes presentes na amostra [43]. Para o caso particular da purificação de pDNA a partir da amostra de lisado, as moléculas pequenas, como o RNA e as endotoxinas, são retardadas ao penetrar nos poros das partículas, demorando mais tempo a eluir, enquanto as moléculas maiores eluem primeiro, como é o caso do pDNA.

No entanto, devido ao facto do lisado ser uma mistura complexa de diferentes moléculas, que apresentam diferentes massas moleculares, a capacidade de resolução deste método é limitada [43]. Além disso, o isolamento do pDNA sc das outras isoformas num passo único é igualmente limitado [34].

3.2.2.2 Cromatografia de troca iónica

Na cromatografia de troca iónica são usados ligandos fortes acoplados a matrizes que podem apresentar carga positiva ou negativa, dependendo do tipo de amostra que se pretende purificar [43]. Na purificação de ácidos nucleicos, como por exemplo o plasmídeo que apresenta cargas negativas, os grupos funcionais da matriz cromatográfica devem estar carregados positivamente [43].

De acordo com os princípios da cromatografia de troca aniónica, a ligação dos ácidos nucleicos deve ocorrer preferencialmente a baixas concentrações de sal [31]. Após a etapa de ligação, é aplicado um gradiente crescente de sal para eluir sequencialmente os diferentes ácidos nucleicos [43], em função do aumento da carga líquida total, que depende do comprimento da cadeia e da conformação das diferentes moléculas [31].

A limitação deste método, quando aplicado à purificação de pDNA sc, relaciona-se com as semelhanças físicas e químicas que esta molécula apresenta com as impurezas, tais como, a composição química e a estrutura, em relação ao RNA e gDNA e a carga, em relação às

endotoxinas. Tendo em conta estas limitações a separação pode não ser eficiente em alguns casos [31].

3.2.2.3 Cromatografia de interação hidrofóbica

Este método cromatográfico permite purificar o pDNA com base na diferença de hidrofobicidade entre as moléculas presentes numa amostra. É possível a aplicação desta técnica devido à diferença da exposição das bases entre o pDNA e as outras espécies. O pDNA apresenta as bases menos expostas devido à dupla cadeia ao contrário das endotoxinas, fragmento de gDNA e RNA que apresentam cadeia simples. Desta forma, a interação entre a fase estacionária e o pDNA é fraca, ao contrário das impurezas que apresentam uma exposição maior de grupos hidrofóbicos [34,45].

Nesta técnica, a retenção do pDNA ocorre com altas concentrações de sal. A exigência de altas concentrações de sal é considerada uma limitação deste método, especialmente no que diz respeito à sua aplicação industrial, pois está associado a custos mais altos e de elevado impacto ambiental [45]. A eluição da molécula de interesse é conseguida através da diminuição da força iónica, isto é, da diminuição da concentração de sal, pois enfraquece as interações hidrofóbicas entre a molécula alvo e a matriz [27].

A retenção de ácidos nucleicos nesta técnica cromatográfica é afetada principalmente pelo seu tamanho, composição das bases e estrutura das moléculas.[34] Assim sendo, esta técnica mostra que a separação entre o pDNA e o RNA ou as endotoxinas é eficiente, o que não acontece tão facilmente para a separação das diferentes isoformas do pDNA ou do gDNA de dupla cadeia [32].

3.2.2.4 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é baseada em várias interações que permitem explorar a seletividade que ocorre entre ligandos específicos imobilizados na fase estacionária e biomoléculas presentes na fase móvel [46]. Esta técnica cromatográfica é a única que utiliza agentes específicos para reconhecer e purificar biomoléculas com base na sua função biológica ou estrutura química [46].

Esta técnica cromatográfica apresenta uma desvantagem em relação à origem biológica dos ligandos, pois estes tendem a ser frágeis e estão associados a baixas capacidades de ligação [47]. No entanto, apresentam algumas vantagens, tais como, a eliminação de alguns passos adicionais, o aumento do rendimento de recuperação, tornando-se um processo mais económico. Outra vantagem consiste na associação de ligandos adequados com suportes sólidos que permitem explorar elevada seletividade e especificidade pela molécula de interesse [41,49].

A cromatografia de afinidade separa biomoléculas com base numa interação reversível entre a molécula alvo e o ligando específico, que como referido anteriormente, está acoplado a uma

matriz cromatográfica [48]. A escolha do ligando e as condições utilizadas vão depender das propriedades moleculares das biomoléculas e a natureza físico-química e termodinâmica das suas interações moleculares [48]. Desta forma, os passos de eluição podem ser feitos utilizando um agente de competição ou por alteração de pH ou força iónica [32].

As interações específicas que podem ocorrer entre o ligando e a biomolécula alvo resultam de interações electrostáticas, interações hidrofóbicas, de forças de Van der Waals e ainda através de pontes de hidrogénio [32]. A especificidade destas interações é uma grande vantagem da cromatografia de afinidade pois permitem uma elevada seletividade e resolução [49].

Desta forma, a dificuldade de separar eficientemente a isoforma sc do pDNA das outras isoformas e das impurezas pode ser ultrapassada com a aplicação de suportes cromatográficos com uma forma estrutural adequada e com um ligando imobilizado que permite reconhecer a isoforma sc do pDNA [42]. Têm sido desenvolvidas várias estratégias de afinidade para a purificação de pDNA com mais ou menos sucesso, nomeadamente a cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados, tripla hélice, polimixina B, interação proteína-DNA e interação aminoácido-DNA. A tabela 4 resume o princípio, vantagens e desvantagens de cada estratégia.

Tabela 4 - Métodos cromatográficos de afinidade para purificação de pDNA.

Tipo de Afinidade	Princípio	Ligação Específica	Vantagens	Desvantagens
Ião Metálico Imobilizado	Ligandos quelantes carregados com iões metálicos bivalentes interagem especificamente com os átomos de azoto aromáticos	Ácidos nucleicos de cadeia simples	Separação eficiente de RNA (por ser de cadeia simples) das impurezas como o gDNA e também da biomolécula de interesse, pDNA; alta remoção de endotoxinas; separação de pDNA desnaturado	pDNA elui porque não tem afinidade com coluna; ligação de RNA à coluna incompleta em misturas complexas; co-eluição de todas as isoformas de DNA
Tripla-Hélice	Sequências específicas presentes no DNA são reconhecidas através de um oligonucleótido imobilizado formando um tripla hélice	DNA de cadeia dupla	Discriminação de diferentes plasmídeos com base na sua sequência; isolamento de pDNA sc em apenas uma etapa cromatográfica: redução de RNA, níveis gDNA e endotoxinas; possibilidade de scale-up	Perda de pNA durante a etapa de lavagem; baixos rendimentos; formação da tripla hélice lenta; tempos cromatográficos longos
Polimixina B	Imobilização de polimixina B que reconhece especificamente os lípidos presentes na estrutura das endotoxinas	Endotoxinas	Eliminação das endotoxinas presentes na amostra de pDNA	Interação não específica dos ligandos com o pDNA; baixos rendimentos; toxicidade da polimixina B
Proteína-DNA	Proteínas ou complexos proteicos imobilizados numa matriz que reconhece especificamente o DNA	pDNA	Discriminação de diferentes plasmídeos com base na sua sequência; isolamento do pDNA a partir do lisado clarificado; eliminação de proteínas e RNA da amostra	Rendimentos baixos; contaminação por gDNA
Aminoácidos -DNA	Múltiplas interações ocorrem entre o aminoácido imobilizado e os ácidos nucleicos	pDNA sc	Purificação do pDNA sc num único passo cromatográfico; eliminação eficiente de RNA, gDNA, proteínas e endotoxinas	Eluição com altas concentrações de sal e rendimentos baixos (para a histidina)

3.2.2.4.1 Cromatografia de afinidade com aminoácidos

A seleção de aminoácidos como ligandos é baseada na ocorrência natural de diferentes interações entre proteínas e ácidos nucleicos em organismos biológicos e também porque vários estudos têm descrito interações atômicas preferenciais que ocorrem entre os aminoácidos e as bases presentes dos ácidos nucleicos [50]. Este método envolve principalmente aminoácidos básicos, tais como, arginina lisina ou histidina, entre outros. Alguns estudos que envolvem o uso destes aminoácidos como ligandos demonstraram que estes permitem isolar a isoforma sc do pDNA, o que comprova a existência de interações específicas entre o pDNA e as matrizes imobilizadas com ligandos de aminoácidos [32].

3.2.2.4.1.1 Ligandos de histidina e seus derivados

O potencial do aminoácido de histidina como ligando de afinidade foi demonstrado num estudo de purificação de pDNA em que se verificou uma interação preferencial pela isoforma sc do pDNA permitindo assim o seu isolamento [51].

A seletividade deste aminoácido para a isoforma sc do pDNA pode ser explicada pela conformação estrutural desta molécula de pDNA, que ao sofrer o processo de superenrolamento vai ficar com as suas bases mais expostas [51]. Existem estudos com matrizes de agarose imobilizadas com o ligando de histidina que mostraram que as principais interações entre o pDNA e o ligando são através de interações hidrofóbicas entre as bases do pDNA e o anel de imidazole presente na molécula de histidina (Figura 10) [42].

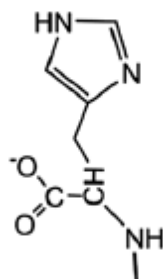


Figura 10 - Estrutura da L-histidina (adaptado [54]).

Além do estudo da matriz de Histidina-agarose, foram realizados estudos adicionais com o uso de oligonucleótidos sintéticos modelo para compreender a complexidade das interações entre a histidina e os ácidos nucleicos [52]. Esses estudos confirmaram que para além das interações hidrofóbicas entre o anel de imidazole e as bases dos ácidos nucleicos (também designadas de interações π - π), são também estabelecidas pontes de hidrogénio entre a histidina e as bases dos nucleótidos, preferencialmente com a guanina e ainda se estabelecem ligações de Van der

Walls entre o aminoácido de histidina e os grupos fosfato [53] dependendo das condições durante os passos de eluição [42].

Recentemente foi estudada a afinidade dos derivados da L-histidina (L-benzil histidina e L-metil histidina) (Figuras 11 e 12) para diferentes plasmídeos com diferentes isoformas, nomeadamente a isoforma sc do pDNA, através da técnica de ressonância de plasma de superfície (SPR) [54]. Na técnica de SPR foi utilizado um biossensor para obter informações acerca das constantes de afinidade entre os aminoácidos e o pDNA [54]. O estudo mostrou a elevada afinidade dos derivados da L-histidina para a isoforma sc do pDNA.

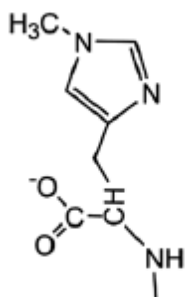


Figura 11 - Estrutura da L- metil histidina (adaptado [54]).

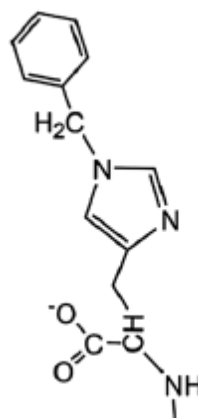


Figura 12 - Estrutura da L- benzil histidina (adaptado [54]).

Após o estudo por SPR, a separação das isoformas do pDNA foi realizada através de ensaios cromatográficos com suportes monolíticos funcionalizados com L-histidina e L-benzil histidina. Verificou-se que a retenção do pDNA ocorreu com elevadas concentrações de sulfato de amónio em ambos os suportes e que ao diminuir a concentração de sal eluiu primeiro a isoforma oc e depois a sc do pDNA [55]. Também se observou que a concentração necessária para reter e eluir o pDNA sc no monolito de benzil-histidina foi inferior à utilizada no monolito de histidina. Tal facto pode ser explicado pelo aumento de interações hidrofóbicas devido à presença de mais um anel (benzil) para além do anel de imidazole [54]. A capacidade dinâmica de ligação foi caracterizada para o monolito de histidina e mostrou que é 29 vezes mais elevada do que a capacidade de ligação obtida com a coluna convencional de agarose imobilizada com L-histidina [54].

Estes resultados preliminares indicam que a imobilização de L-histidina e seus derivados em suportes monolíticos pode ser uma estratégia promissora para purificar a isoforma sc do pDNA, pois a ligação dos dois grupos adicionais (grupo metil e grupo benzil) ao aminoácido de histidina torna estes ligandos mais hidrofóbicos, que por sua vez requerem menores concentrações de sal durante os ensaios cromatográficos e conseqüentemente diminui os custos e o impacto ambiental.

4 Purificação com monolitos

Atualmente, os monolitos são considerados uma excelente solução para a purificação de pDNA e têm sido extensivamente estudados por alguns grupos de investigação [42]. Devido ao grande interesse da aplicação dos monolitos em processos cromatográficos, estes são considerados a quarta geração das fases estacionárias cromatográficas [55].

Uma das características vantajosas associadas aos suportes monolíticos é a elevada transferência de massa que se traduz na elevada capacidade dinâmica de ligação quando comparados com os suportes convencionais [56]. Este aumento da capacidade deve-se às características estruturais destes suportes que são constituídos por canais tridimensionais interconectados, sendo que toda a área de superfície destes canais é funcional [42].

Deste modo, esta nova geração de colunas cromatográficas surgiu para ultrapassar algumas das limitações associadas às colunas convencionais. Essas limitações são a baixa difusividade, baixa transferência de massa, baixa capacidade de ligação para moléculas grandes e ensaios muito demorados [57].

Em suma, a excelente transferência de massa e as características associadas às colunas monolíticas permitem a ligação de grandes biomoléculas, como o pDNA, o que faz do uso destes suportes uma estratégia promissora para reconhecer e purificar a isoforma sc do pDNA com elevado grau de pureza e produtividade.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

1 Materiais

Todos os ensaios cromatográficos foram realizados com uma coluna analítica cromatográfica, com um volume de leito de 0,1 mL, modificada com o aminoácido L-benzil histidina, gentilmente preparada e fornecida pela BIA Separations (Ajdovščina, Slovenia).

O kit utilizado para purificação do plasmídeo foi o “Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit” da Qiagen (Hilden, Alemanha). O cloreto de sódio e sulfato de amónio foram adquiridos de Panreac (Barcelona, Espanha), o Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o ácido cítrico da Sigma (Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA).

Todas as soluções utilizadas nos ensaios cromatográficos foram preparadas com água desionizada ultra pura, purificada com o sistema Mili-Q da Milipore (Billerica, MA, EUA). Os tampões de eluição foram filtrados através de uma membrana com um tamanho de poro de 0,20 µm (Schleicher Schuell, Dassel, Alemanha) e foram sonicadas através de ultra-sons. O “iQ SYBR Green Supermix “(Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi utilizado para a quantificação de DNA genómico.

1.1 DNA plasmídico

O plasmídeo p1321 HPV-16 E6/E7 tem cerca de 8,702 Kpb e foi adquirido na Addgene (Cambridge, EUA). O vetor contém como promotor a beta-actina humana e também um gene de resistência à ampicilina (Figura 13).

Os genes E6 e E7 do pDNA HPV-16 E6/E7 foram mutados em vários pontos para prevenir o papel oncogénico destas proteínas, impedindo o reconhecimento das proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb respetivamente. As mutações foram requeridas à NZYtech (Lisboa, Portugal). Resumidamente, os genes E6 e E7 do plasmídeo *wild type* foram substituídos por genes mutados em posições específicas. Na proteína E6 foram eliminados os primeiros sete aminoácidos, na posição 57, a leucina foi substituída por uma glicina e na posição 113 houve uma substituição de uma cisteína por uma arginina. Na proteína E7, as modificações foram feitas em três posições distintas. Na posição 2, a histidina foi alterada para uma prolina, na posição 24 a cisteína foi substituída por uma glicina e por último, na posição 46 a alanina foi substituída por um ácido glutâmico.

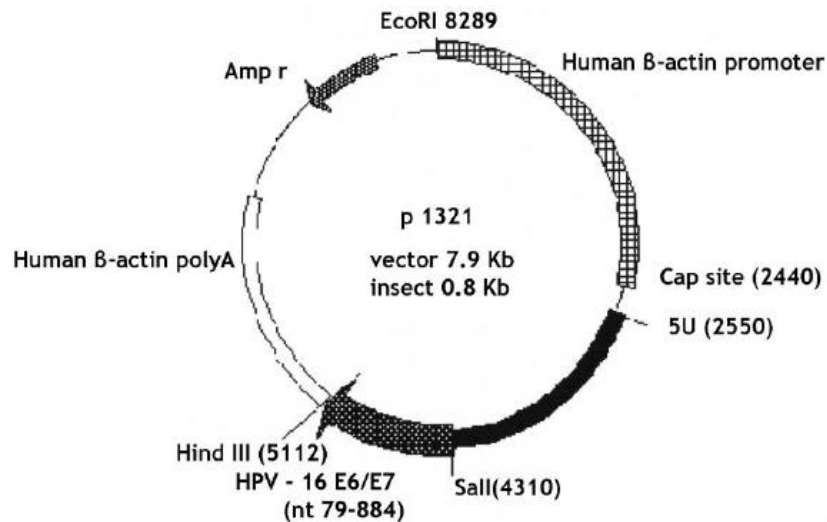


Figura 13 - Plasmídeo *wild type* HPV16 E6/E7.

2 Métodos

2.1 Transformação das células de *E.coli* DH5a com o plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT}

O plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT} foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5a seguindo o protocolo de choque térmico (30 segundos a 42 °C num banho de água). Após o choque térmico, as células foram semeadas em placas com meio LB-agar contendo ampicilina e cresceram durante a noite a 37 °C. Posteriormente, algumas colónias foram inoculadas em meio LB e cultivado a 37 °C e 250 rpm durante a noite. O plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT} foi isolado a partir de bactérias e purificado utilizando o Kit de NZY Miniprep (NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal) e digerido com as enzimas de restrição HindIII e Sall para confirmar a transformação das células e a presença do fragmento modificado.

2.2 Confirmação da inserção do fragmento mutado

Para confirmar a inserção do fragmento mutado no vetor foi feita uma digestão enzimática do vetor com as enzimas de restrição presentes no fragmento (Sall e HindIII). Inicialmente, o plasmídeo foi digerido com a enzima HindIII (NZYtech, Lisboa, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. Após a digestão com a enzima HindIII foi feita uma nova digestão com a enzima Sall (NZYtech, Lisboa, Portugal) também de acordo com as instruções do fabricante. Por último, o resultado da digestão foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose para verificar a presença do fragmento mutado.

2.3 Condições de crescimento

A amplificação do plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT} foi obtida por fermentação da *E.coli*, estirpe DH5a. O crescimento foi efetuado a 37 °C sob uma agitação de 250 rpm utilizando um meio de crescimento Terrific Broth (TB) que é composto por 20 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 4 mL/L de glicerol; 0,017 M de KH₂PO₄ e 0,072 M de K₂HPO₄ e suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. O crescimento foi suspenso na fase log, atingindo uma OD₆₀₀ ≈ 9. As células foram recuperadas por centrifugação a 3 900 g, durante 10 minutos (min) a 4 °C e as células sedimentadas foram armazenadas a - 20 °C.

2.4 Preparação da amostra pré-purificada com o kit Qiagen

A amostra pré-purificada do plasmídeo HPV16 E6/E7 foi obtida utilizando o kit Qiagen (Hilden, Alemanha) e o procedimento foi de acordo com as instruções do fabricante. Após a lise das células, a ligação do pDNA às mini-colunas de troca iônica é promovida a baixas concentrações de sal e a condições de pH adequadas. Após a ligação do pDNA à coluna, as impurezas são removidas através de uma lavagem com uma concentração média de sal. Por último, a eluição do pDNA é promovida com a passagem de um tampão com alto teor de sal, de seguida, fez-se um passo de concentração por precipitação com isopropanol.

A amostra pré-purificada foi utilizada em ensaios cromatográficos preliminares.

2.5 Preparação da amostra de lisado

As células que foram recuperadas da fermentação foram lisadas através do método de lise alcalina modificado. O pellet de células foi homogeneizado em 20 mL de solução I (50 mM de glucose, 25 mM de Tris-HCl e 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a pH 8,0). Após a suspensão do pellet, a lise alcalina foi realizada através da adição de 20 mL de solução II (200 mM NaOH e 1% (w/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS)) durante 5 min de incubação à temperatura ambiente. A solução de lise (solução II) foi neutralizada pela adição de 16 mL de solução III (3 M de acetato de potássio a pH 5,0), com uma incubação de 20 min em gelo. Os detritos celulares, gDNA e as proteínas foram eliminados por duas centrifugações a 20 000 g, durante 30 min a 4 °C, com uma centrífuga Allegra 25R (Beckman Coulter).

De seguida foi realizado um passo de precipitação com 0,7 volumes de isopropanol e incubação em gelo durante 30 min. Depois destes passos, o precipitado foi recuperado por centrifugação a 16 000 g durante 30 min a 4 °C.

O pellet obtido pela centrifugação foi dissolvido com 1 mL de tampão 10 mM de Tris-HCl a pH 8,0. Algumas proteínas e RNA presentes foram precipitados por adição de sulfato de amónio até uma concentração final de 2,5 M, seguido de uma incubação em gelo de 15 min. Estas impurezas foram removidas por centrifugação a 16 000 g durante 20 min a 4 °C.

2.6 Isolamento de RNA a partir das células de *E.coli* DH5a não transformadas

No final da lise alcalina descrita anteriormente, dissolver 1 volume de 5 M de acetato de amónio e incubar durante 30 min à temperatura ambiente. Após a incubação foi realizado um passo de centrifugação durante 40 min a 20 000 g e 4 °C.

Desta centrifugação foi recuperado o sobrenadante e os ácidos nucleicos foram precipitados através da adição de 5 mL de PEG 6000 em 1,6 M NaCl a cada tubo. O passo seguinte foi incubar durante 30 min em gelo e após a incubação foi feita uma centrifugação durante 40 min a 20 000 g e a 4 °C. Por último, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi dissolvido em 1 mL de tampão Tris-HCl.

2.7 Isolamento de gDNA a partir das células de *E.coli* DH5a não transformadas

O isolamento do gDNA a partir das células recuperadas foi feito com o *kit* comercial “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”. Foram utilizados pellets de células de *E.coli* DH5a não transformadas resultantes de 60 mL de fermentação. O primeiro passo foi a adição de 24 mL de solução de lise nucleica às células e incubar os tubos a 80 °C durante 5 min para lisar as células. Depois de arrefecer à temperatura ambiente, foi adicionado 480 µL de solução de RNase (1mg/mL). Para homogeneizar a solução, o tubo foi invertido 5 vezes. De seguida, houve um passo de incubação durante 45 min a 37 °C. Após a incubação, deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente e foi adicionada 9,6 mL de solução de precipitação de proteínas. Agitou-se no vórtex e incubou-se em gelo durante 5 min. Após o passo de incubação em gelo fez-se uma centrifugação a 16 000 g durante 15 min a 4 °C. No fim da centrifugação transferiu-se o sobrenadante que contém o DNA para outro tubo e adicionou-se 12 mL de isopropanol à temperatura ambiente. Agitou-se gentilmente e foi possível observar a formação de uma “massa branca” que posteriormente se centrifugou a 16 000 g durante 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 8,4 mL de etanol a 70% à T^a ambiente, agitou-se invertendo o tubo até dissolver o pellet. O passo seguinte consistiu numa centrifugação a 16 000 g durante 15 min a 4 °C, depois o etanol foi aspirado e deixou-se secar o pellet durante 10 min. Depois de seco foi adicionado ao pellet 2 mL de solução de reidratação de DNA e incubou-se a 65 °C durante 1 hora agitando periodicamente a solução. Por último, as amostras de gDNA foram guardadas a -20 °C.

2.8 Ensaios cromatográficos

Os ensaios cromatográficos foram realizados utilizando o sistema AKTA *pure* (GE Healthcare Biosciences Uppsala, Suécia). O sistema consiste numa unidade de separação e um computador controlado pela versão Unicorn 6.3. O monolito utilizado nestes ensaios foi o monolito de

benzil-histidina que apresenta um volume de leito de 0,1 ml. No passo de separação de isoformas do plasmídeo de HPV16 E6/E7^{MUT}, a coluna monolítica foi equilibrada com 3,5 M sulfato de amónio em tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0) com um caudal de 1 mL/min. A amostra de plasmídeo resultante da pré-purificação com o Kit Qiagen foi injetada na coluna usando um loop 200 µL nas mesmas condições de fluxo. Após eluição das espécies não ligadas, a força iónica foi diminuída gradualmente até 0 M de sulfato de amónio em tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0) para eluir as espécies ligadas. As frações foram reunidas, de acordo com os cromatogramas obtidos, concentradas e dessalinizadas com concentradores visvapin (Vivascience) para posterior análise de eletroforese.

Para a separação da isoforma sc do pDNA a partir de uma amostra complexa de lisado, a coluna monolítica foi equilibrada com 1,65 M de (NH₄)₂SO₄ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA, pH 8,0 a 1 mL/min. A amostra de lisado foi injetada na coluna utilizando um loop de 200 µL nas mesmas condições de força iónica e caudal do equilíbrio. Após a eluição das espécies não ligadas na primeira etapa, a força iónica foi diminuída para 0 M de (NH₄)₂SO₄ com o objetivo de eluir as espécies ligadas.

As frações foram recolhidas de acordo com os cromatogramas obtidos, concentradas e dessalinizadas com concentradores visvaspin. Essas frações foram também utilizadas para análise por eletroforese, quantificação do grau de pureza e recuperação na coluna analítica e também para análise de impurezas, tais como gDNA, proteínas e endotoxinas.

Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e a absorvância foi monitorizada continuamente a 260 nm. No final de cada ensaio cromatográfico a coluna foi lavada com água MiliQ e regenerada com 0,5 M de NaOH.

2.9 Eletroforese em gel de agarose

As frações reunidas a partir de cada ensaio cromatográfico foram analisadas por eletroforese horizontal de 15 cm de comprimento, com 0,8% de gel de agarose (Hoefer, San Francisco, CA, EUA) e marcadas com greensafe (1 µg / mL). A eletroforese foi realizada a 110 V, durante 30 min com tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA a pH 8,0). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em um sistema Vilber Lourmat (ILC Lda, Lisboa, Portugal). Como marcador de pesos moleculares de DNA foi utilizado o marcador Hyper Ladder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

2.10 Quantificação do pDNA

A concentração de pDNA e a pureza das frações recolhidas a partir dos ensaios cromatográficos foram avaliadas de acordo com uma adaptação do método analítico baseado em cromatografia de interação hidrofóbica descrito por Diogo e coautores [58], utilizando a coluna HIC 15 PHE PE de 4.6/100 mm (Amersham Bioscience). A coluna foi ligada a um sistema AKTA *purifier* (GE Healthcare Bioscience) e equilibrada com 1,5 M de (NH₄)₂SO₄ em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

Após o equilíbrio, foram injetados 20 µL da amostra a analisar. Após 4 min, a condição de eluição foi alterada instantaneamente para o tampão 10 mM Tris-HCl sem sulfato de amônio. Esta condição foi mantida durante 6 min até que todas as espécies terem eluído.

A absorvância dos ensaios foi monitorizada a 260 nm. A concentração de pDNA em cada amostra foi calculada através de uma curva de calibração construída com padrões de pDNA de 1 a 50 µg/mL (Figura 14), purificado a partir de um kit comercial da Qiagen (Hilden, Alemanha).

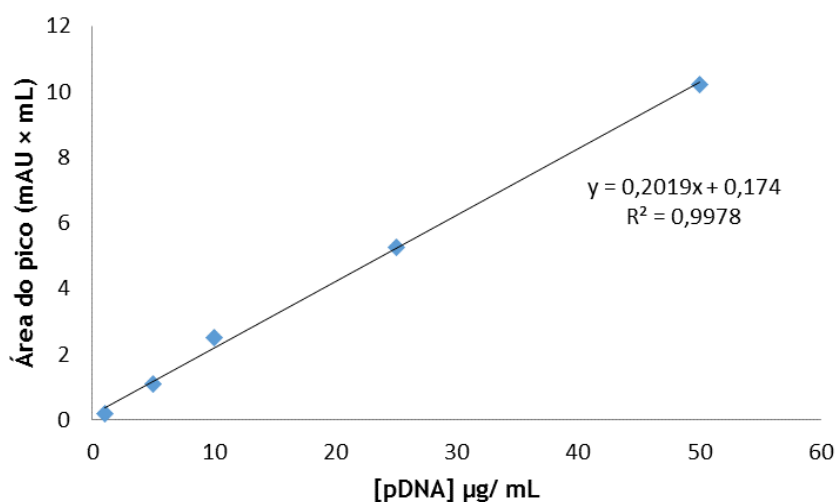


Figura 14 - Curva de referência com padrões DNA plasmídico (1-50 µg/mL).

2.11 Quantificação de gDNA

A quantificação de DNA genómico foi obtida através da reação em cadeia de polimerase em tempo real, ou seja, PCR em tempo real e o sistema utilizado foi iQS Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad), como descrito [59].

Os primers utilizados foram (5'-ACACGGTCCAGAACTCCTACG-3') e (5'-CCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCA-3') e foram usados para amplificar um fragmento de 181 pares de bases do gene 16S presente no rRNA. As amplificações foram quantificadas devido à alteração na fluorescência do corante de ligação de DNA, o "Syber Green I".

A curva de calibração para obter a concentração de gDNA foi construída através de diluições sucessivas de amostras de gDNA extraído a partir de *E.coli DH5a*, através do Wizard gDNA purification kit (Promega). As concentrações das amostras eram de 0,005 ng/µL até 50 ng/µL. A curva de calibração está apresentada na figura 15.

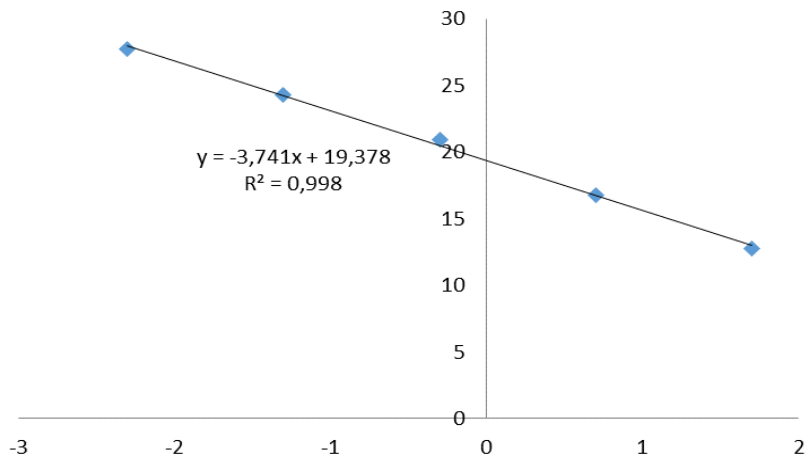


Figura 15 - Curva de referência com padrões de gDNA da *E. coli* DH5 α (0,005 - 50 ng/ μ L).

2.12 Quantificação de proteínas

O teor de proteínas presente nas amostras foi quantificado através de micro-BCA (“bicinchoninic acid”) pelo kit “protein assay” da Pierce (Rockford, EUA). A quantificação consiste na adição de 200 μ L de reagente BCA a 25 μ L de amostra numa microplaca. Após 30 min de incubação a 37 $^{\circ}$ C, mediu-se a absorvância a 592 nm num leitor de placas. A curva de calibração foi construída com albumina de soro bovino (BSA) como padrão (20 mg/mL a 2000 mg/mL) e está apresentada na figura 16.

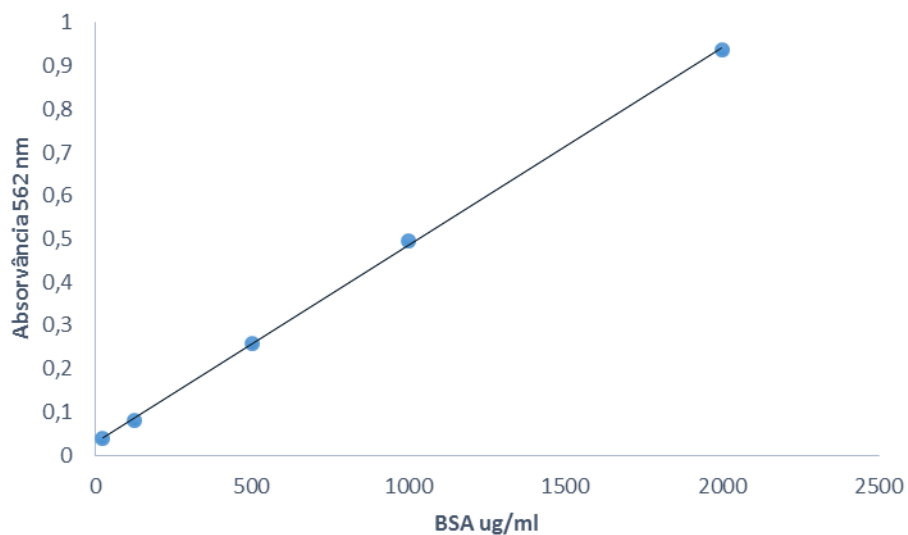


Figura 16 - Curva de referência com padrões de albumina de soro bovino (20 - 2000 mg/mL).

2.13 Quantificação de endotoxinas

A contaminação com endotoxinas foi avaliada através do kit ToxinSensor™ Chromogenic *Limulus* Amoebocyte Lysate da GenScript (USA, Inc.). A curva de calibração foi construída com endotoxinas fornecidas pelo kit, cujas concentrações estavam entre 0,005 UE/mL e 0,1 EU/mL. A curva está apresentada na figura 16.

Todos os materiais e soluções utilizadas para este procedimento devem ser livres de endotoxinas. De forma a garantir estas condições, todo o procedimento foi realizado no interior de uma câmara de fluxo laminar. As amostras para a análise e os padrões do *kit* foram diluídas com água livre de endotoxinas, que também foi usada como branco.

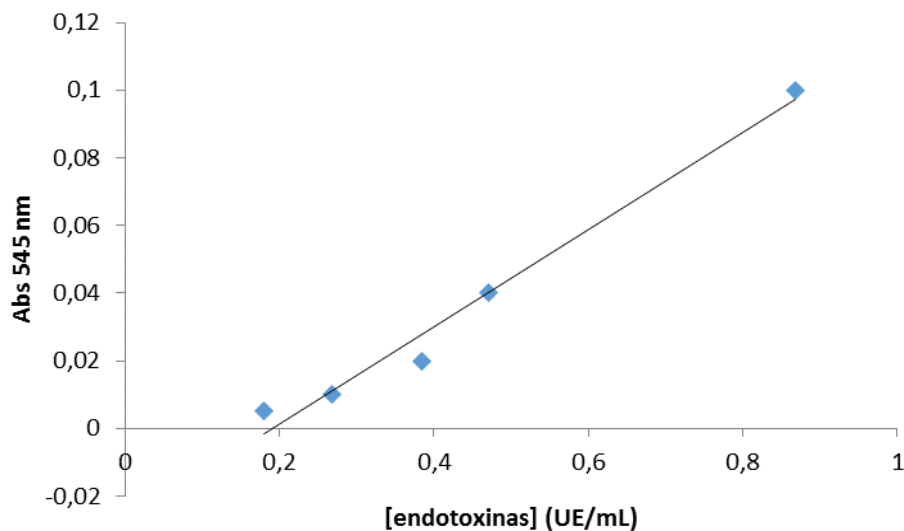


Figura 17. Curva de referência dos padrões de endotoxinas (0,005-0,1 EU/mL).

2.14 Dicroísmo circular (DC)

Esta técnica foi utilizada para monitorizar o comportamento das várias isoformas do pDNA quando sujeito a diferentes condições, tais como, diferentes tampões, diferentes pH e ainda diferentes forças iónicas.

O equipamento utilizado foi o Jasco J-1850 Spectrophotometer (Jasco, Easton, MD, EUA). Os espectros foram obtidos usando uma célula retangular de quartzo com um percurso ótico de 0,1 cm e a uma temperatura constante de 25 °C. Os espectros foram registados entre 320-210 nm com uma velocidade de varrimento de 10 nm/min e uma largura de banda espectral de 1 nm.

A concentração final das amostras de pDNA ln, sc e oc foram de 50 µg/mL em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0). O comportamento da isoforma sc do pDNA também foi avaliado com os seguintes tampões: 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0); 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH

5,0); 3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0); 3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0). Todas as soluções foram preparadas à temperatura ambiente, 30 min antes da aquisição do espectro correspondente.

Todas as medições foram realizadas sob um fluxo constante de azoto, para purgar o ozono gerado pela fonte de luz do equipamento. Os dados foram recolhidos em triplicado e as médias são apresentadas num único espectro para cada amostra após subtração do branco (tampão em que está diluída a amostra).

O ruído foi retirado usando o software Jasco J-1850, que permite melhorar a forma dos espectros sem distorcer os picos. O sinal de CD foi convertido em elipticidade molar.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

1 Mutações nas oncoproteínas E6 e E7 do HPV

Como já foi referido anteriormente, o HPV16 é considerado um HPV de alto risco e com alta probabilidade de desenvolvimento de cancro do colo do útero em mulheres, por todo o mundo [3]. O seu potencial cancerígeno relaciona-se diretamente com as proteínas oncogénicas presentes no seu genoma, a oncoproteína E6 e a oncoproteína E7. Estas proteínas têm a capacidade de interagir com proteínas supressoras de tumor presentes no ciclo celular. A interação com essas proteínas desencadeia a sua degradação, sendo estas impedidas de desempenharem funções, tais como a paragem do ciclo celular ou a indução da apoptose em células malignas. Sem a ação das proteínas supressoras de tumor as células infetadas por HPV são capazes de proliferar e desencadear o cancro do colo do útero [13]

Uma das estratégias desenvolvidas para impedir a infeção por HPV foi apresentada por Wieking e coautores, e consistiu em estudar várias mutações em sítios específicos das oncoproteínas E6 e E7 de modo a suprimir o seu potencial oncogénico [60]. As mutações vão impedir o reconhecimento e conseqüentemente a degradação da p53 pela E6 e do Rb pela E7. Se não ocorrer alterações estruturais das proteínas E6 e E7 mutadas, estas embora não sejam funcionais têm a capacidade de induzir uma resposta imunitária específica contra o HPV, impedindo a proliferação das células infetadas e conseqüentemente a infeção [60].

Para analisar as mutações nas oncoproteínas foi feita a sequenciação do fragmento mutado para comparar com a sequenciação do fragmento *wild type*. Todas as mutações basearam-se na substituição de um determinado aminoácido.

1.1 Mutações na oncoproteína E6

A oncoproteína E6 foi alterada inicialmente sendo removidos 7 aminoácidos e foi mutada em duas regiões diferentes. A primeira mutação foi na posição 57 alterando uma leucina por uma glicina e a segunda mutação na posição 113 alterando uma cisteína por uma arginina (Figura 18). Foram escolhidos estes dois locais estratégicos por serem considerados sítios de ligação da p53 com o intuito de impedir o reconhecimento entre estas duas proteínas.

```

E6wt          MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIV 60
E6mutant     -----MFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDGCIV 53
              *****
E6wt          YRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPE 120
E6mutant     YRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINRQKPLCPE 113
              *****
E6wt          EKQRHLDKKQRFHNIIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL- 158
E6mutant     EKQRHLDKKQRFHNIIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL- 151
              *****

```

Figura 18. Comparação entre a sequenciação da oncoproteína E6 *wild type* e a oncoproteína E6 mutada. As modificações estão representadas com a cor verde.

1.2 Mutações na oncoproteína E7

A oncoproteína E7 foi modificada em três regiões diferentes (Figura 19). A primeira mutação foi na posição 2 com a alteração de uma histidina por uma prolina, a segunda modificação foi na posição 24, ao substituir uma cisteína por uma glicina e por último, a terceira mutação foi feita na posição 46 alterando um ácido glutâmico por uma alanina. Todas as regiões mutadas englobam a zona de ligação ao retinoblastoma. Por este motivo, o retinoblastoma não reconhece a E7, impedindo a ligação entre as duas proteínas e consequentemente o impedimento da degradação do retinoblastoma.

```

E7wt          MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIIVTFCCK 60
E7mutant     MPGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYGYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAAPDRAHYNIIVTFCCK 60
              * *****
E7wt          CDSTLRRCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP- 98
E7mutant     CDSTLRRCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP- 98
              *****

```

Figura 19. Comparação entre a sequenciação da oncoproteína E7 *wild type* e a oncoproteína E7 mutada. As modificações estão representadas com a cor verde.

2. Construção do vetor

O vetor *wild type* utilizado foi o p1321 da Addgene que apresenta a sequência genética integral das proteínas E6 e E7, o qual foi utilizado como molde para a mutação destas proteínas. Assim, o fragmento mutado foi sintetizado, contendo nas extremidades sequências de reconhecimento para as enzimas de restrição Sall e HindIII, e foi substituído neste vetor sendo assim designado de plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT} (Figura 20).

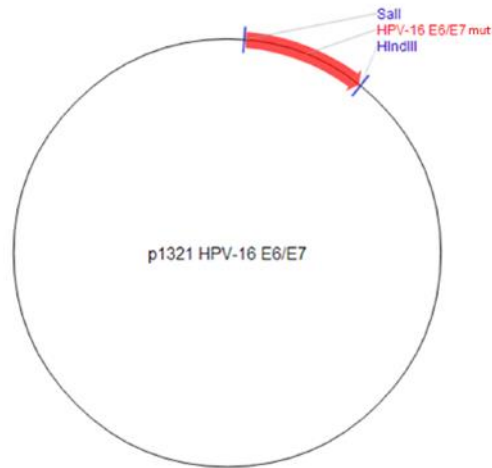


Figura 20. Vetor HPV16 E6/E7^{MUT}.

Posteriormente o vetor modificado foi inserido na *E. coli* por choque térmico. Para confirmar que a transformação das células com o vetor foi eficiente, foi realizada uma digestão com as enzimas Sall e HindIII cujos locais de restrição foram incluídos no fragmento sintetizado. Após a digestão com estas enzimas, o resultado foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e está apresentado na figura 21.

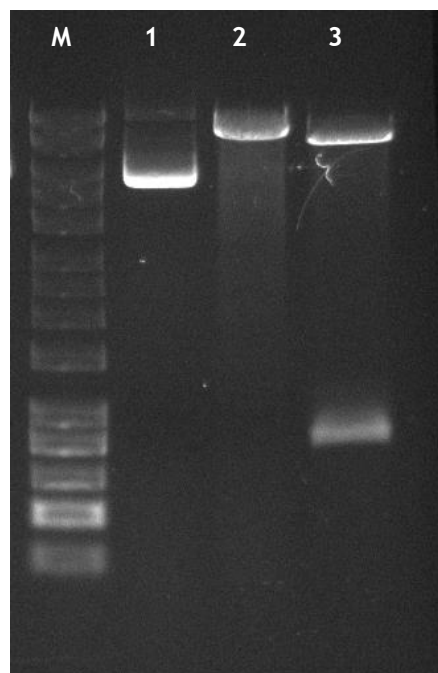


Figura 21. Digestão enzimática do vetor HPV16 E6/E7^{MUT}. A letra M representa o marcador de pesos moleculares, a linha 1 representa o plasmídeo sem ser digerido, a linha 2 representa a digestão com a enzima HindIII e a linha 3 representa a digestão com as enzimas HindIII e Sall.

De acordo com os resultados observados, a construção do vetor e a transformação das células de *E.coli* DH5a foram eficientes pois é possível observar dois fragmentos distintos, em que o mais pequeno corresponde ao fragmento mutado das oncoproteínas E6 e E7 e o fragmento maior corresponde ao “esqueleto” do pDNA.

3. Curvas de crescimento

Após ter as células transformadas com o vetor mutado, o objetivo foi produzir e recuperar um elevado número de cópias do plasmídeo na sua isoforma superenrolada, para que possa ter aplicação terapêutica. As condições de crescimento do plasmídeo são um dos fatores mais importantes para que exista um crescimento eficiente e em grande quantidade.

Como referido no ponto anterior, a *E.coli* é considerada o hospedeiro ideal, pois consegue produzir grandes quantidades de plasmídeo num curto período de tempo, bem como manter a sua integridade.

Para a produção do plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT} na *E.coli* DH5a, foram necessárias cerca de 4 horas de pré-fermentação, para que as células se adaptassem ao meio líquido e atingissem a fase de crescimento exponencial. Quando atingiram uma DO_{600nm} de 2,6 as células foram transferidas para um volume superior de meio, iniciando a fermentação com uma DO_{600nm} de 0,2. A fermentação demorou 8 horas até atingir uma DO_{600nm} de 7. Para construir a curva de crescimento, a DO_{600nm} foi medida de hora a hora (Figura 22).

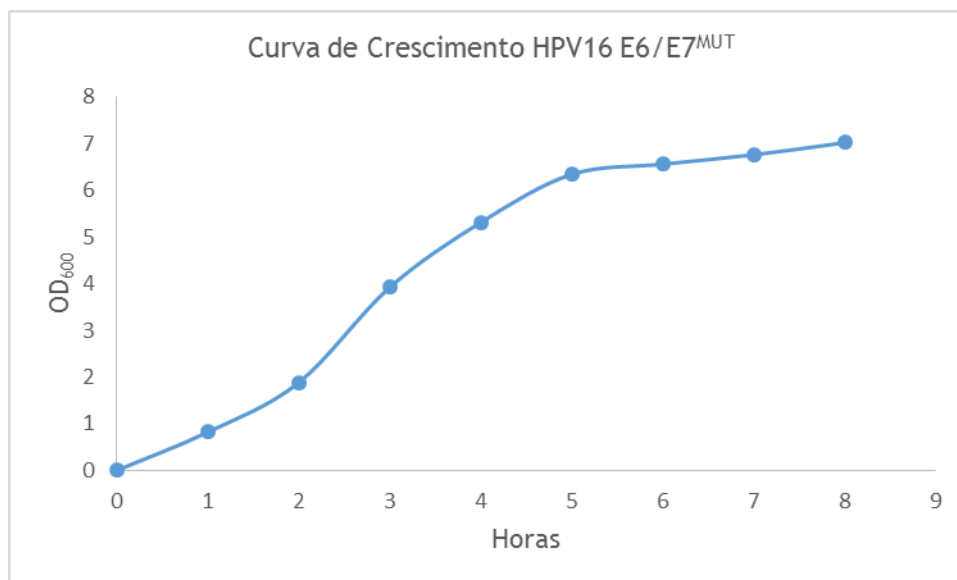


Figura 22. Curva de crescimento da *E. coli* DH5a transformada com o plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT}.

Com base na curva de crescimento construída é possível observar que na primeira hora não há um crescimento tão significativo, o que indica uma ligeira fase de adaptação ao volume de meio de fermentação. Entre as 2 e as 5 horas o crescimento de células é exponencial, ou seja,

o crescimento é mais rápido porque as células já se adaptaram ao meio. Nas últimas horas, as células atingem a fase estacionária, indicando que o crescimento começou a estagnar. Estes dados de crescimento dizem respeito às células transformadas com o plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT}, mas para fazer um estudo comparativo do crescimento, foi realizada uma fermentação das células transformadas com o plasmídeo não mutado (Figura 23). As condições de fermentação mantiveram-se idênticas entre as células transformadas com os dois plasmídeos.

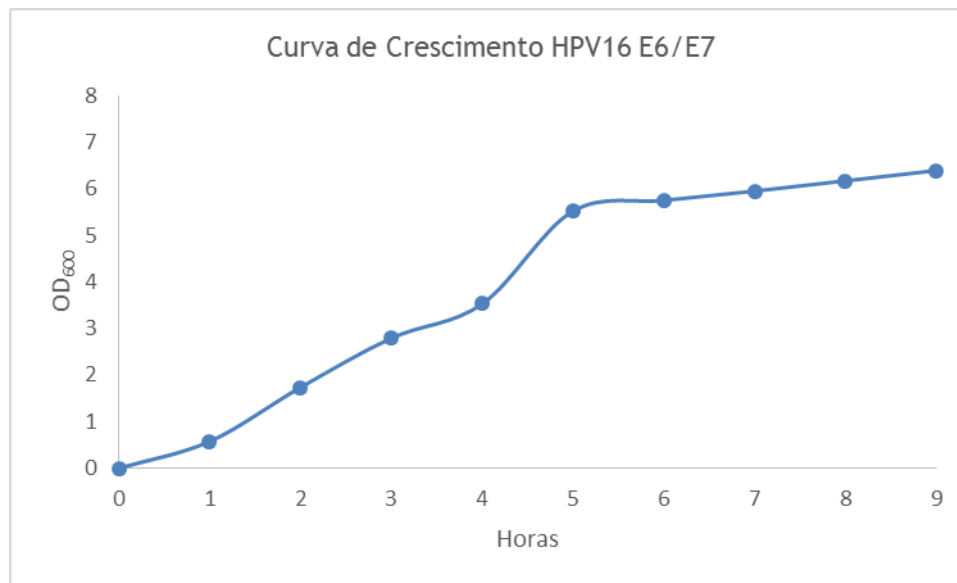


Figura 23. Curva de crescimento do plasmídeo não mutado.

Comparando as duas curvas de crescimento, é possível ver que nas primeiras horas o comportamento é semelhante, existindo apenas uma pequena diferença entre as horas 4 e 5. Apesar dessa diferença é possível observar que ambas as células de *E. coli* transformadas com os diferentes plasmídeos crescem de maneira semelhante, atingindo aproximadamente os mesmos valores de DO₆₀₀ nm.

4. Ensaio cromatográfico

4.1 Separação das isoformas sc e oc do HPV16 E6/E7^{MUT}

Os primeiros ensaios cromatográficos realizados com a coluna monolítica de benzil-histidina foram para testar a separação das isoformas oc e sc de uma amostra de pDNA pré-purificada com o Kit “QiaGen Plasmid Purification Maxi Kit”.

Tendo em conta estudos anteriores com a utilização do monolito de benzil-histidina que descreveram a separação das isoformas oc e sc do plasmídeo pVAX1-*LacZ* através de um gradiente de dois passos e também mostraram que a separação das isoformas foi obtida com uma concentração de sulfato de amónio (2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) inferior à necessária para o monolito de histidina [54]. Tendo em conta que o plasmídeo (HPV16 E6/E7^{MUT}) estudado no presente trabalho é maior que o pVAX1-*LacZ*, foi realizado um primeiro ensaio com o monolito de benzil-histidina, aplicando uma estratégia de 2 passos (tal como no pVAX1-*lacZ*) para a separação das isoformas do plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT} com uma concentração de 2,5 M no primeiro passo e 0 M de sulfato de amónio no segundo passo. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente com um fluxo de 1 mL/min. Após injeção da amostra na coluna monolítica, cuja força iónica foi acertada previamente para a concentração de equilíbrio, diminuiu-se a força iónica para zero, ou seja, na coluna passou apenas tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0) sem a presença de sal. Os resultados deste ensaio estão apresentados na figura 24.

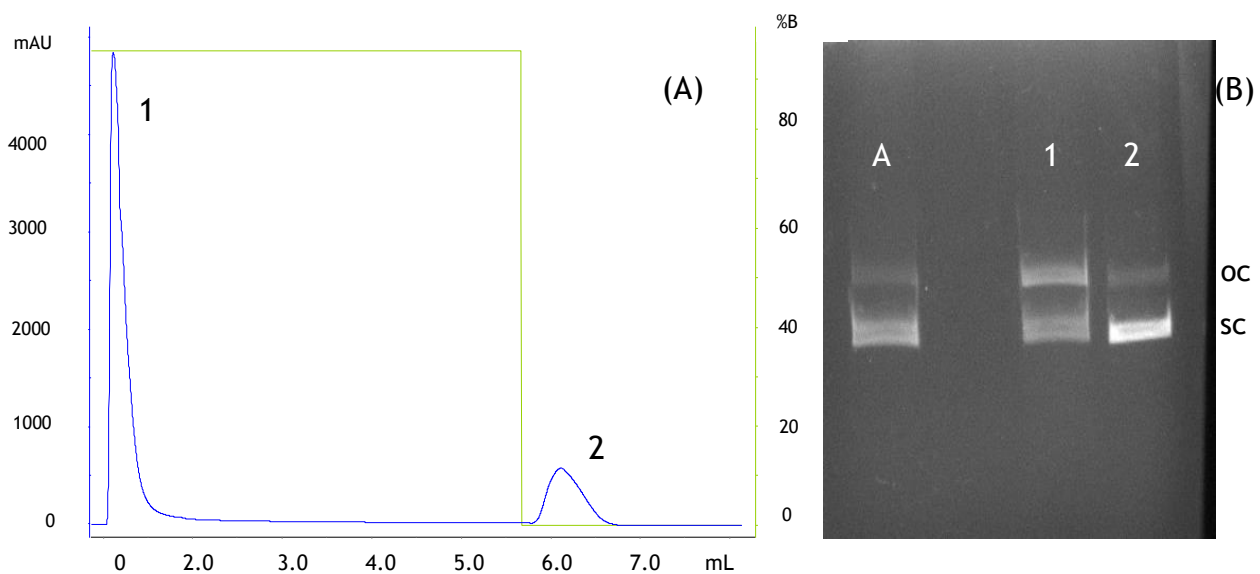


Figura 24. (A) Perfil cromatográfico da amostra de pDNA pré-purificada no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 2,5 M e 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0); bomba B: 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Caudal: 1mL/min; deteção: 260nm; volume de injeção: 200 μ L (B) Análise eletroforética dos respetivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de pDNA (oc + sc); linha 1: oc + sc; linha 2: oc + sc.

Ao observar os resultados com a concentração de 2,5 M de sulfato de amónio foi possível perceber que a concentração de sal usada foi muito elevada, porque além do pDNA sc eluir maioritariamente no segundo pico também eluiu algum pDNA oc que ficou retido nestas condições. Por este motivo, no ensaio seguinte baixou-se a concentração de sal para 2 M. Desta forma, a coluna foi equilibrada com 2 M de sulfato de amónio em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). O ensaio foi realizado à temperatura ambiente com um fluxo de 1 mL/min. Após injeção da amostra na coluna monolítica, diminuiu-se novamente a força iónica para zero. Os resultados deste ensaio estão apresentados na figura 25.

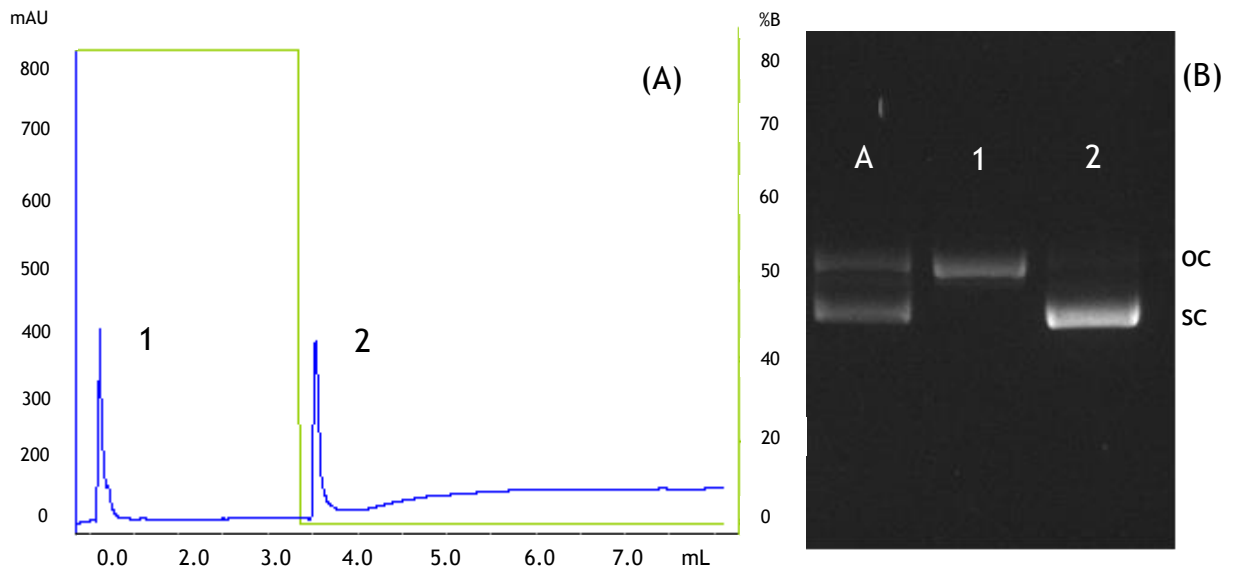


Figura 25. (A) Perfil cromatográfico da amostra de pDNA pré-purificada no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 2 M e 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0); bomba B: 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Caudal: 1mL/min; detecção: 260 nm; volume de injeção: 200 μL (B) Análise eletroforética dos respetivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de pDNA (oc + sc); linha 1: oc; linha 2:sc.

Ao observar o perfil cromatográfico e a eletroforese do ensaio, é possível perceber que ao baixar a concentração de sulfato de amónio para 2 M conseguiu-se uma separação eficiente das isoformas do plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT}, uma vez que a isoforma oc eluiu no primeiro pico e a sc ficou retida a 2 M de sal, sendo eluída no segundo pico pela diminuição da força iónica. Este resultado também mostra que o ligando de benzil histidina permite realizar ensaios de separação das isoformas de pDNA com baixas concentrações de sulfato de amónio comparativamente à concentração de sal utilizada com o ligando de L-histidina para o plasmídeo HPV16 E6/E7 não mutado em que foi utilizada uma concentração de 2,94 M [54]. O mesmo se confirma com outros estudos cromatográficos para a separação das isoformas do pVAX1-LacZ com o monolito carbonildiimidazole (CDI) ou com a coluna convencional de histidina-agarose, em que foi utilizada uma concentração de 2,3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [63, 64]. Comparando adicionalmente a concentração usada para a separação das isoformas do pVAX1-lacZ com a coluna de benzil-histidina (2 M) [54] conclui-se que apesar de serem plasmídeos diferentes, é possível aplicar este monolito com a mesma estratégia de eluição para uma separação eficiente das isoformas oc e sc de diferentes pDNA.

O reconhecimento específico desenvolvido pelo monolito de benzil-histidina pela isoforma sc do pDNA pode ser explicado pela maior exposição de bases na isoforma sc comparativamente à isoforma oc. Este facto pode ser explicado pelo fenómeno de superenrolamento que leva à torção da cadeia da molécula [63]. Como consequência deste fenómeno, as bases da isoforma sc ficam mais expostas e disponíveis para interagir com o ligando do que as bases da isoforma oc [64]. Assim, para além da predominância de interações hidrofóbicas com o anel de benzyl e imidazole do ligando de L-histidina, nomeadamente interações “ring stacking” ou interações π - π , outras forças não covalentes e elementares podem estar envolvidas no biorechecimento

da isoforma sc do pDNA, tais como, forças de Van der Waals, pontes de hidrogénio e pontes de hidrogénio - interações π [57].

4.2 Purificação da isoforma sc do pDNA a partir da amostra complexa de lisado de *E. coli*

Os resultados anteriores provaram que o ligando de benzil histidina imobilizado no monolito reconhece especificamente a isoforma sc do pDNA que ficou retido nas condições de equilíbrio utilizadas, permitindo assim a separação da isoforma oc. De acordo com estes resultados, avançou-se para o estudo da separação da isoforma sc do pDNA das impurezas presentes no lisado clarificado de *E. coli* (RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas).

O primeiro ensaio foi realizado para avaliar a afinidade do monolito para os vários componentes presentes na amostra complexa e perceber se as impurezas interagiam com o ligando, ficando desta forma retidas no monolito ou se, pelo contrário, não existia interação.

Desta forma, no primeiro ensaio, o monolito foi equilibrado com 3,5 M de sulfato de amónio em 10 mM de tampão Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0), à temperatura ambiente e com um fluxo de 1 mL/min. Após a injeção da amostra de lisado, diminuiu-se a força iónica para 2,8 M de sulfato de amónio em 10 mM de tampão Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0). Novamente, após a estabilização do UV diminuiu-se força iónica para 10 mM de tampão Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0). Após a aplicação destas condições foi obtido um cromatograma e a respetiva eletroforese, apresentados na figura 26.

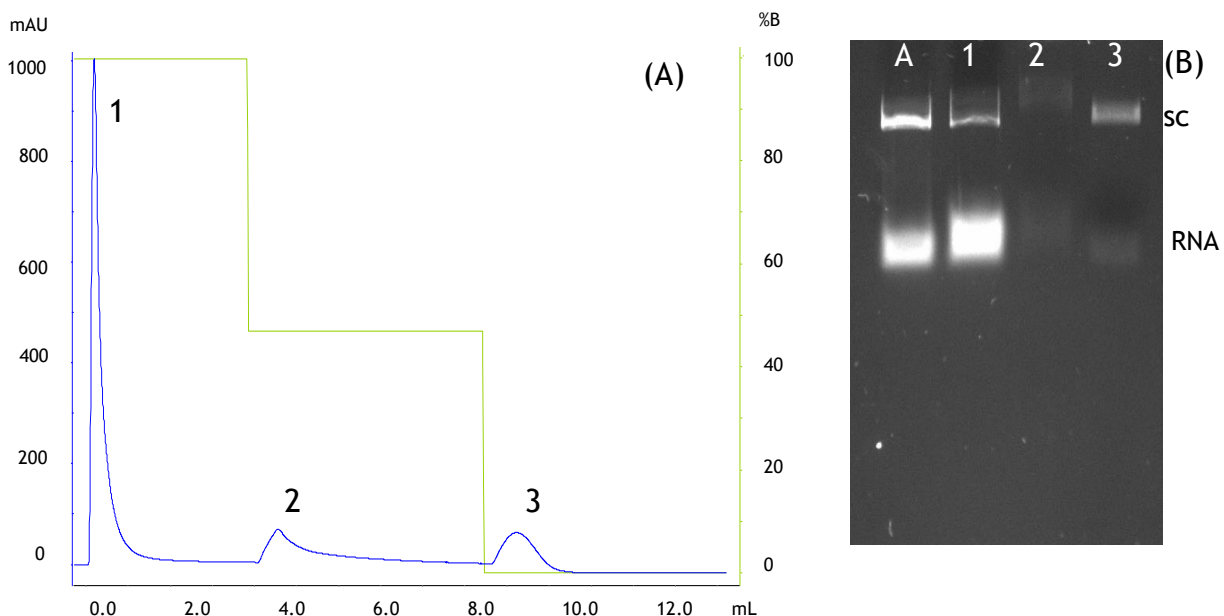


Figura 26. (A) Perfil cromatográfico da amostra de lisado no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 3,5 M; 2,8 M e 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0); bomba B: 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Caudal: 1mL/min; deteção: 260 nm; volume de injeção: 200 μL (B) Análise eletroforética dos respetivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de lisado injetada; linha 1: RNA + sc; linha 2: RNA + sc; linha 3: RNA + sc.

Ao observar o primeiro resultado para a amostra de lisado percebe-se que embora tenha sido aplicada inicialmente uma concentração de sal elevada para promover a retenção de maior parte dos constituintes da amostra, observa-se a eluição de uma grande quantidade de RNA no primeiro pico juntamente com algum pDNA sc (linha 1). Posteriormente foram aplicados dois patamares com concentrações de sal mais baixas para promover alguma seletividade entre as moléculas que tinham ficado ligadas, mas embora o pDNA sc elua maioritariamente no último pico (linha 3), ainda se encontra contaminado com RNA. Tendo em conta este resultado, para o ensaio seguinte foi necessário baixar ligeiramente a concentração no passo 1 e no passo 2 para que não haja tanta ligação de RNA ao monolito de benzil-histidina, mesmo que tenha de se sacrificar alguma perda de pDNA sc.

Para tal, no ensaio seguinte a coluna foi equilibrada com 3,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no primeiro patamar, e após a injeção da amostra a concentração foi diminuída para 2,5 M e por fim 0 M de sulfato de amónio. Os resultados deste ensaio estão apresentados na figura 27.

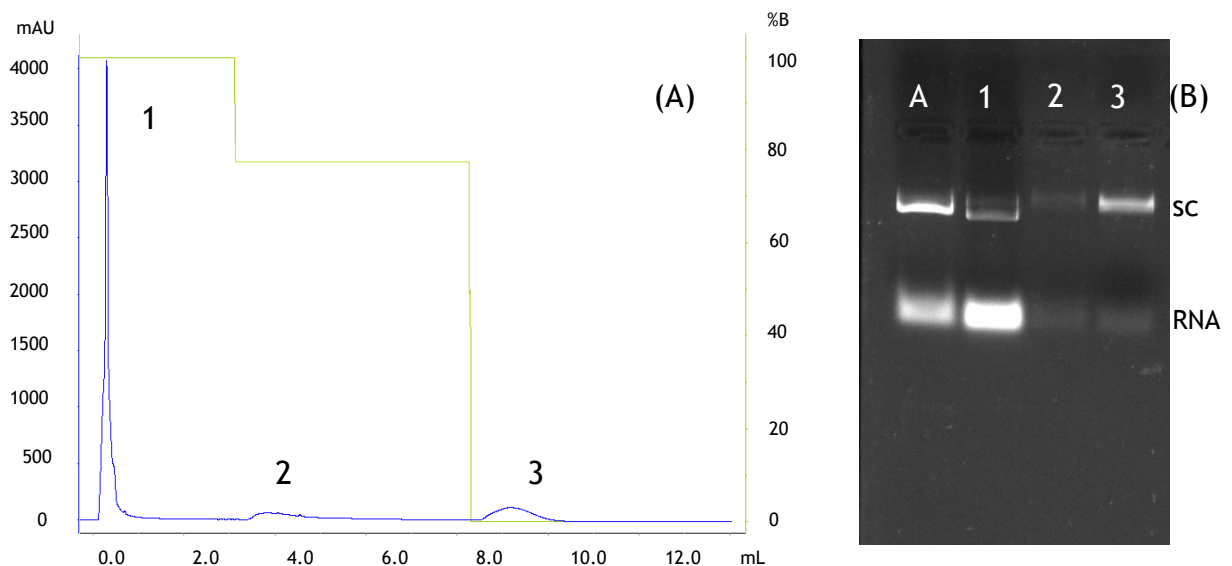


Figura 27. (A) Perfil cromatográfico da amostra de lisado no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 3,2 M; 2,5 M e 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0); bomba B: 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Caudal: 1 mL/min; deteção: 260 nm; volume de injeção: 200 μL (B) Análise eletroforética dos respetivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de lisado injetada; linha 1: RNA + sc; linha 2: RNA + sc; linha 3: RNA + sc.

Neste ensaio é possível observar que embora o gradiente aplicado tenha sido diferente do anterior, não houve alterações significativas porque o comportamento de eluição das biomoléculas é semelhante. Desta forma, foi realizado um ensaio em que as concentrações de sal no primeiro e segundo patamares fossem consideravelmente diferentes em relação aos ensaios anteriores. Como tal, foi realizado um ensaio com uma concentração de 3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no primeiro passo, 2 M no segundo passo e 0 M de sulfato de amónio no último patamar. O perfil cromatográfico e a respetiva eletroforese do ensaio nestas condições estão apresentados na figura 28.

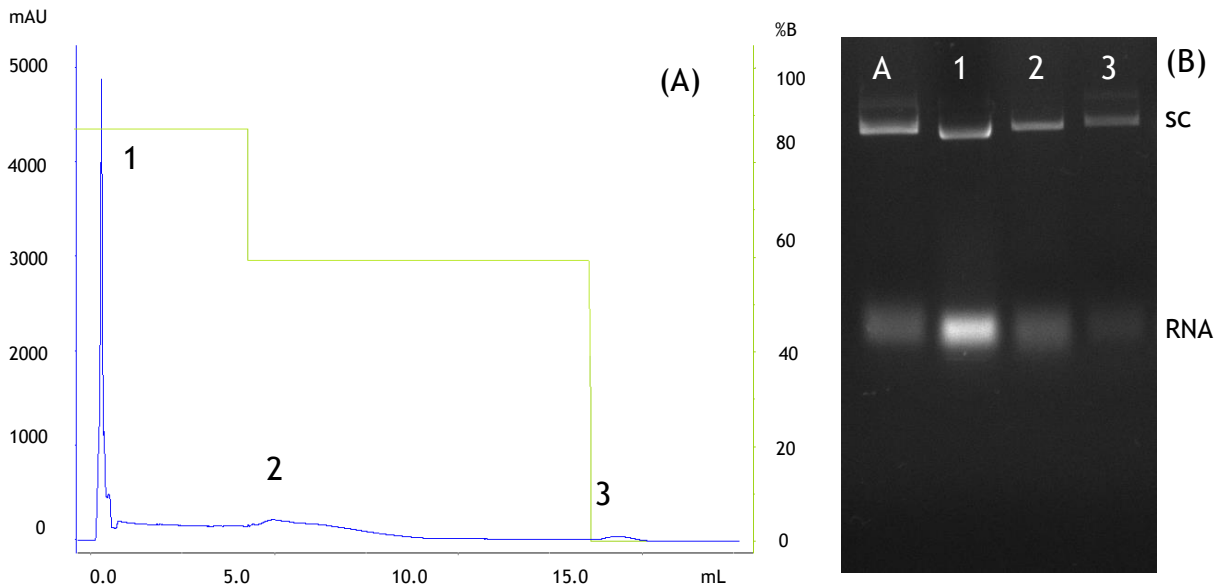


Figura 28. (A) Perfil cromatográfico da amostra de lisado no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 3M; 2M e 0M de $(NH_4)_2SO_4$. Bomba A: tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0); bomba B: 3,5 M $(NH_4)_2SO_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Caudal: 1mL/min; deteção: 260nm; volume de injeção: 200 μ L (B) Análise eletroforética dos respetivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de lisado injetada; linha 1: RNA + sc; linha 2: RNA + sc; linha 3: RNA + sc.

Tendo em conta o resultado deste último ensaio, o facto de baixar consideravelmente a concentração de sal nos dois primeiros patamares não melhorou a seletividade da coluna para o RNA, uma vez que esta molécula continua a ser eluída em todos os passos. E por outro lado, a seletividade para a biomolécula de interesse também foi alterada estando também o pDNA sc distribuído por todos os patamares.

Após os ensaios realizados com 3 patamares concluiu-se que era necessário aplicar outra estratégia de eluição para conseguir favorecer a seletividade entre as moléculas presentes na amostra e alcançar o objetivo de separar as impurezas da isoforma sc do pDNA. À semelhança do comportamento das isoformas do pDNA quando injetadas isoladamente, também com o lisado se pode testar uma estratégia de eluição com apenas dois patamares. O objetivo desta estratégia de eluição consiste em promover uma condição de equilíbrio que permita a eluição das impurezas mas promova a retenção apenas da pDNA sc, para que ao ser eluído pela diminuição da força iónica seja recuperado sem vestígios de impurezas. Desta forma, a coluna monolítica foi equilibrada com 1,8 M de sulfato de amónio em tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0), nas mesmas condições de temperatura e caudal dos ensaios anteriores. Após injeção da amostra e eluição das espécies que não interagiram com a coluna, a concentração de sulfato de amónio foi diminuída para zero. O cromatograma e respetiva eletroforese estão apresentados na figura 29.

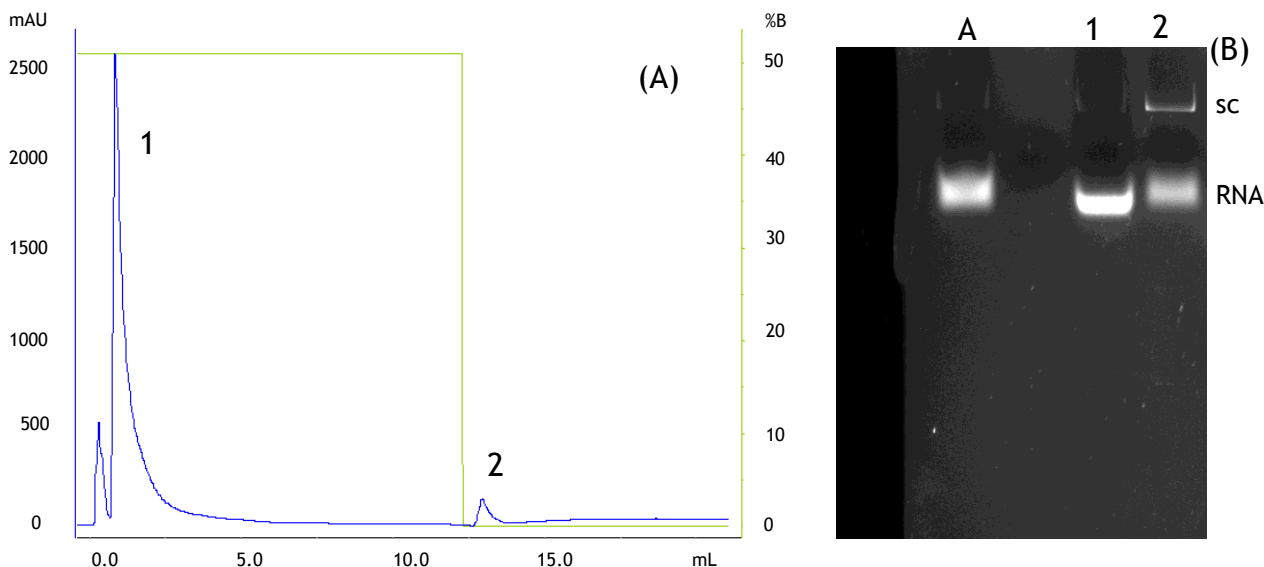


Figura 29. (A) Perfil cromatográfico da amostra de lisado no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 1,8 M e 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0); bomba B: 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Caudal: 1 mL/min; detecção: 260 nm; volume de injeção: 200 μL . (B) Análise eletroforética dos respetivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de lisado injetada; linha 1: RNA + sc; linha 2: RNA + sc.

Tendo em conta o resultado obtido com a concentração de 1,8 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é possível observar que o RNA elui maioritariamente no primeiro pico, embora se note uma pequena perda de pDNA sc, é possível assumir que este fica maioritariamente retido no monolito de benzil-histidina. No entanto, ao observar o resultado eletroforético correspondente ao pico 2 é de salientar a presença de uma quantidade de RNA elevada no passo de eluição do pDNA sc. Apesar do resultado, pode-se considerar que a estratégia de 2 passos foi vantajosa porque mesmo com uma concentração mais baixa de sulfato de amónio, a retenção do pDNA foi eficiente, revelando uma seletividade maior. De acordo com este resultado, o passo seguinte será diminuir a concentração de sulfato de amónio no primeiro patamar, para que desta forma parte do RNA não interaja com a coluna e elua totalmente no pico 1.

Assim, a concentração no equilíbrio foi diminuída para 1,75 M de sulfato de amónio em tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Não se diminuiu drasticamente a concentração de sal para não comprometer a interação do pDNA sc à coluna, pois se a concentração de sal for demasiado baixa este pode elui no pico 1 em conjunto com o RNA. As condições de temperatura, fluxo e volume de injeção de amostra mantiveram-se iguais às do ensaio anterior. Após a injeção da amostra e eluição do primeiro pico durante o flowthrough, a concentração de sulfato foi diminuída para zero, para eluir as espécies retidas no segundo pico. O cromatograma e respetiva eletroforese do ensaio nas condições referenciadas estão apresentados na figura seguinte (Figura 30).

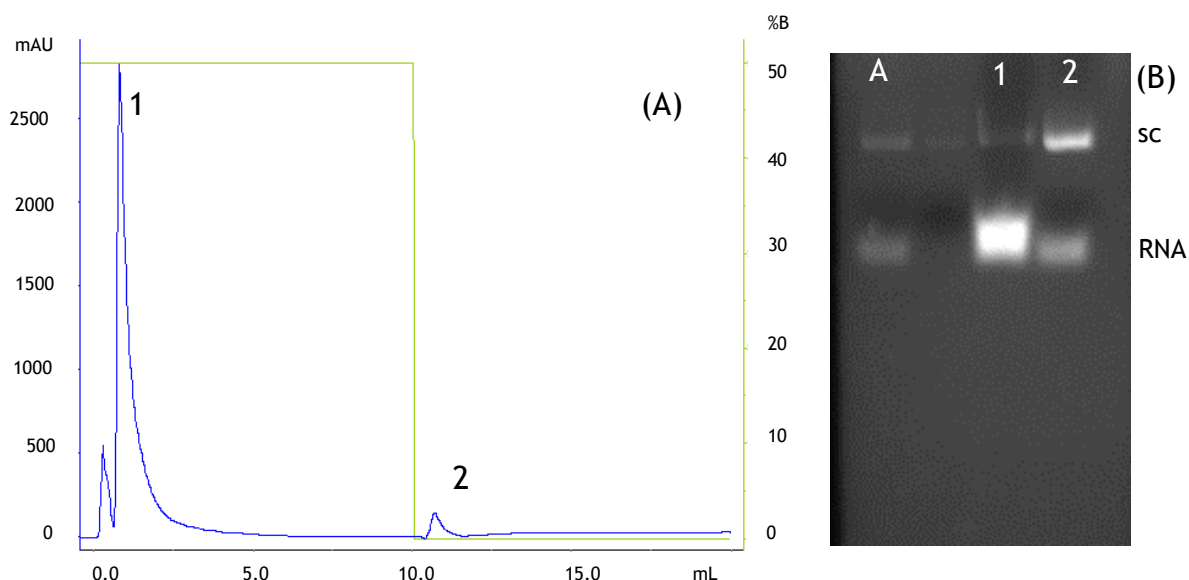


Figura 30. (A) Perfil cromatográfico da amostra de lisado no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 1,75M e 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0); bomba B: 3,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Caudal: 1mL/min; detecção: 260nm; volume de injeção: 200 μ L (B) Análise eletroforética dos respectivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de lisado injetada; linha 1: RNA + sc; linha 2: RNA + sc.

Os resultados obtidos demonstram que o comportamento cromatográfico não mudou muito do ensaio anterior para este ensaio. Analisando a eletroforese em gel de agarose é possível observar que a concentração de 1,75 M de sulfato de amônio ainda é demasiado alta, pois parte do RNA ficou ligado na coluna.

No ensaio seguinte foi usada uma concentração mais baixa de 1,7 M de sulfato de amônio em tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0). Os resultados deste ensaio estão apresentados na figura 31.

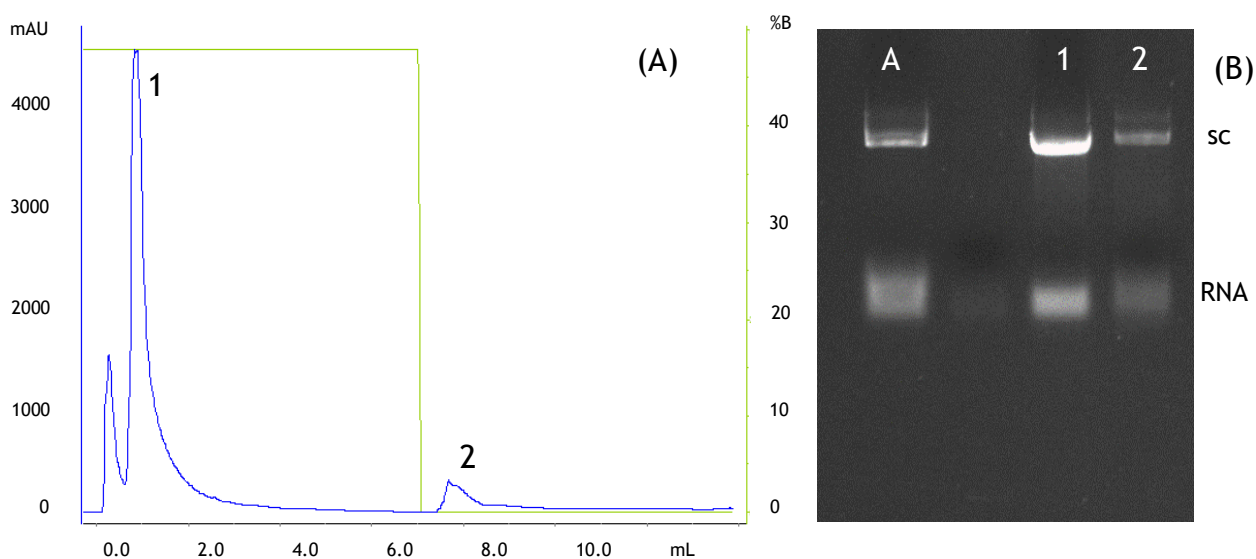


Figura 31. (A) Perfil cromatográfico da amostra de lisado no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 1,7M e 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH 8,0); bomba B: 3,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0). Caudal: 1mL/min; detecção: 260nm; volume de injeção: 200 μ L (B) Análise eletroforética dos respectivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de lisado injetada; linha 1: RNA + sc; linha 2: RNA + sc.

Ao interpretar os resultados deste ensaio é possível perceber que o comportamento do pDNA sc sofreu uma grande alteração. No primeiro patamar mantém-se a eluição do RNA, no entanto, uma grande parte da biomolécula de interesse também foi eluída. No pico 3 foi eluída uma pequena parte do pDNA sc que ficou retida, mas a contaminação por RNA ainda persiste apesar de se ter baixado a concentração. Assim sendo, a diminuição da concentração de sal não melhorou a seletividade entre o RNA e o pDNA sc no monolito de benzil-histidina.

Como o objetivo é obter apenas o pDNA sc sem estar contaminado com RNA e tentar recuperar o máximo de pDNA sc foi pensada outra estratégia para que a ligação do pDNA sc à coluna fosse mais eficiente e sem contaminação por RNA no último pico.

De acordo com a literatura, está descrito que para o monolito de L-histidina, uma estratégia de eluição com uma condição de pH 6,0, o tempo de retenção do pDNA sc aumenta em relação à mesma estratégia mas com pH 8,0 [54]. Tendo em conta este estudo foi testada uma nova estratégia de forma a aumentar a retenção do pDNA sc e melhorar a seletividade em relação ao RNA com o monolito de benzil-histidina. Desta forma, para se usar um pH 5,0 houve necessidade de trocar para o tampão citrato, tendo em conta que o tampão Tris é estável apenas para valores de pH entre 7,0 e 9,0. Assim, à semelhança do ensaio anterior, o monolito de benzil-histidina foi equilibrado com 1,7 M de sulfato de amónio em 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0), à temperatura ambiente e com um fluxo de 1 mL/min. Os resultados do ensaio estão apresentados na figura 32.

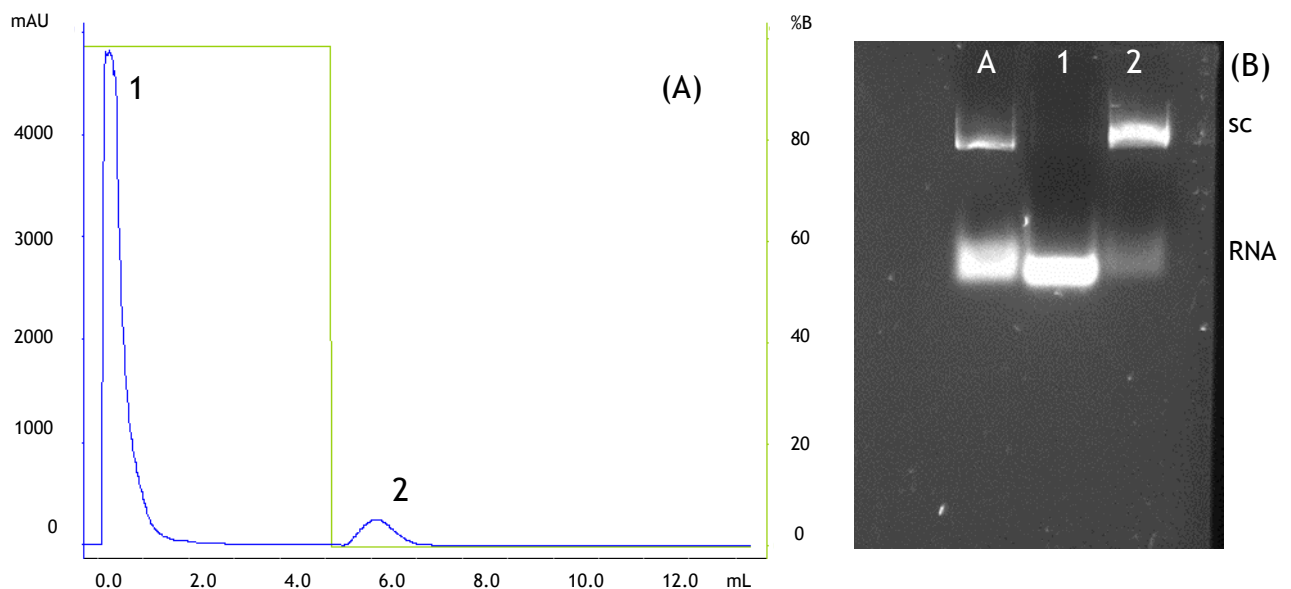


Figura 32. (A) Perfil cromatográfico da amostra de lisado no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 1,7 M e 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM citrato e 10 mM de EDTA (pH 5,0); bomba B: 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0). Caudal: 1mL/min; deteção: 260 nm; volume de injeção: 200 μL (B) Análise eletroforética dos respetivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de lisado injetada; linha 1: RNA + sc; linha 2: RNA + sc.

Os resultados mostram que a ligação do pDNA sc à coluna foi mais eficiente com o uso de um tampão citrato a pH 5,0 em comparação com o Tris-HCl a pH 8,0 utilizando a mesma concentração de sal (1,7 M de sulfato de amônio). A utilização desta nova estratégia pode ser promissora para conseguir uma separação eficiente do pDNA sc da amostra complexa de lisado. No entanto, apesar da ligação da biomolécula de interesse ser mais eficiente, a eletroforese mostra que no pico 2 ainda existe uma pequena contaminação por RNA. Para eliminar essa contaminação é necessário baixar um pouco mais a concentração de sulfato de amônio. De seguida, a coluna monolítica foi equilibrada com 1,65 M de sulfato de amônio em 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0), mantendo a temperatura e caudal dos ensaios anteriores. Os resultados estão apresentados na figura 33.

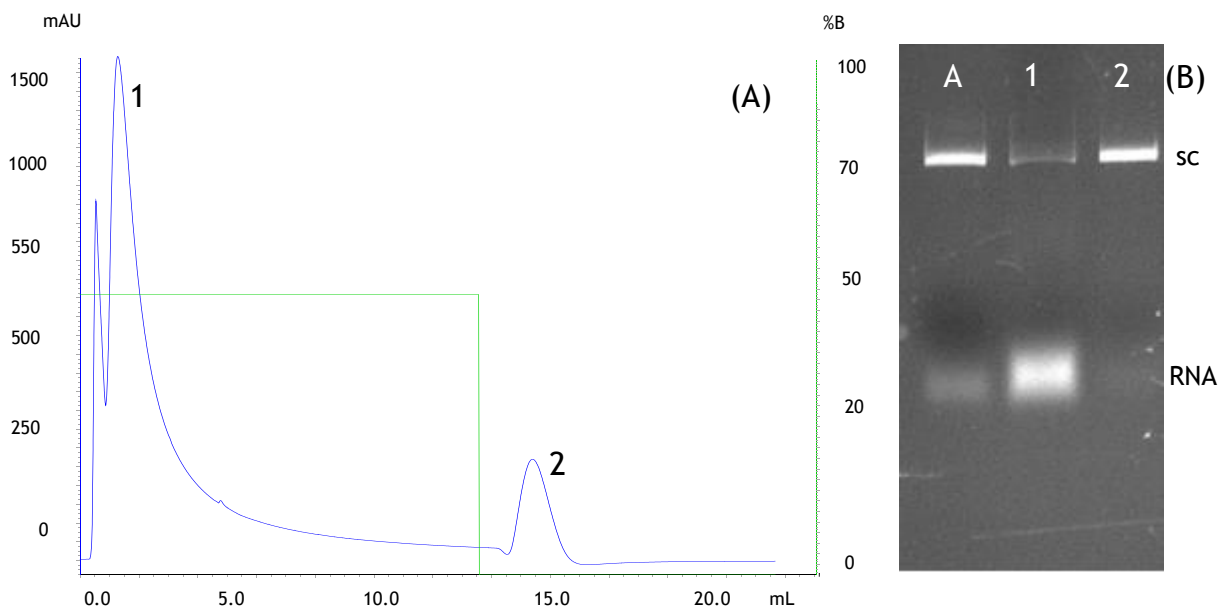


Figura 33. (A) Perfil cromatográfico da amostra de lisado no monolito de benzil-histidina utilizando um gradiente por passos de 1,65 M e 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bomba A: tampão 10 mM citrato e 10 mM de EDTA (pH 5,0); bomba B: 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0). Caudal: 1 mL/min; deteção: 260 nm; volume de injeção: 200 μL (B) Análise eletroforética dos respetivos picos recolhidos no cromatograma; Linha A: amostra de lisado injetada; linha 1: RNA + sc; linha 2: sc

Ao observar o cromatograma e a eletroforese deste ensaio é possível verificar que ao baixar a concentração de sulfato de amônio de 1,7 M para 1,65 M conseguiu-se isolar a biomolécula sc do pDNA no pico 2 sem contaminação por RNA. No entanto para garantir um grau de pureza adequado do pDNA sc foi necessário sacrificar a recuperação, sendo parte desta molécula eluída no primeiro pico juntamente com o RNA.

Na análise dos resultados da separação da isoforma sc do pDNA a partir da amostra de lisado, uma possível explicação para o comportamento da biomolécula de RNA com o ligando de benzil-histidina é que apesar do RNA ser uma molécula de cadeia simples e apresentar alguma exposição de bases, é uma molécula mais pequena em comparação ao pDNA, apresentando desta forma, menos sítios de ligação à coluna. Em relação às interações preferenciais entre o ligando de benzil-histidina e o pDNA, estas podem ser explicadas, como já foi dito anteriormente, pela interação através das bases mais expostas da isoforma sc com os anéis

aromáticos do ligando (pontes de hidrogénio, forças de van der Waals e interações de stacking ou interações π - π) [65].

Analisando os resultados correspondentes ao uso de pH 5,0 em vez de pH 8,0 é possível observar uma maior retenção do pDNA sc, o que melhorou significativamente a seletividade para o pDNA com o monolito de benzil-histidina. Tendo em conta que este ligando é um derivado da histidina, de acordo com a literatura, foi descrito que para o monolito de L-histidina, com uma condição de pH 6, o tempo de retenção para o pDNA sc aumenta [54]. O facto de aplicar um pH mais baixo que o pKa da cadeia lateral do aminoácido de histidina e levar ao aumento do tempo de retenção pode ser explicado devido à existência de outro tipo de interações para além de interações hidrofóbicas que podem afetar o tempo de retenção do plasmídeo [54]. Isto é, ao expor o ligando a uma condição de pH ácido pode favorecer a protonação do anel de imidazole presente na molécula de L-histidina, permitindo explorar interações eletrostáticas com os grupos fosfato carregados negativamente, mas também interações de stacking e interações catião - π com as bases aromáticas do pDNA [65].

Como referido anteriormente, a concentração de sulfato de amónio que permitiu a separação eficiente da isoforma sc do pDNA a partir do lisado com o monolito de benzil-histidina foi de 1,65 M. Esta concentração é muito inferior comparando com outros estudos publicados em que também se usa sulfato de amónio no tampão de eluição, Assim, a estratégia desenvolvida no presente trabalho aplica condições de eluição mais suaves o que também se reflete num menor impacto ambiental e custos associados mais reduzidos.

No final de cada ensaio, o monolito de benzil-histidina era sujeito a uma regeneração com 0,5 M NaOH e verificou-se que neste passo havia eluição de RNA e pDNA (Figura 34). Tendo em conta este resultado suspeitou-se que parte da amostra injetada inicialmente no monolito ficava ligada à coluna após passar tampão sem sal e água. Este comportamento pode dever-se à presença de interações que não se quebram em condições hidrofóbicas. Este facto pode ser explicado tendo em conta o processo de imobilização que foi utilizado neste monolito e que consiste em ativar grupos OH⁻ para interagir com o grupo amina do ligando. Parte desses grupos podem não ter reagido no processo de imobilização e ao hidrolisarem podem fazer com o RNA e o pDNA se ligue a estes e permaneçam ligados mesmo com a passagem de tampão sem sal e água.



Figura 34. - Eletroforese da regeneração do monolito benzil-histidina com 0,5 M NaOH.

A estratégia adotada para possivelmente quebrar as ligações das biomoléculas com os grupos OH foi passar 1M NaCl em tampão 10 mM citrato e 10 mM EDTA na coluna, no final de cada ensaio. Desta forma, o NaCl vai quebrar as interações iônicas e as espécies vão desligar-se da coluna. O resultado da limpeza do monolito com 1 M NaCl após o ensaio de purificação do pDNA sc com 1,65 M de sulfato de amônio está apresentado na figura 35.

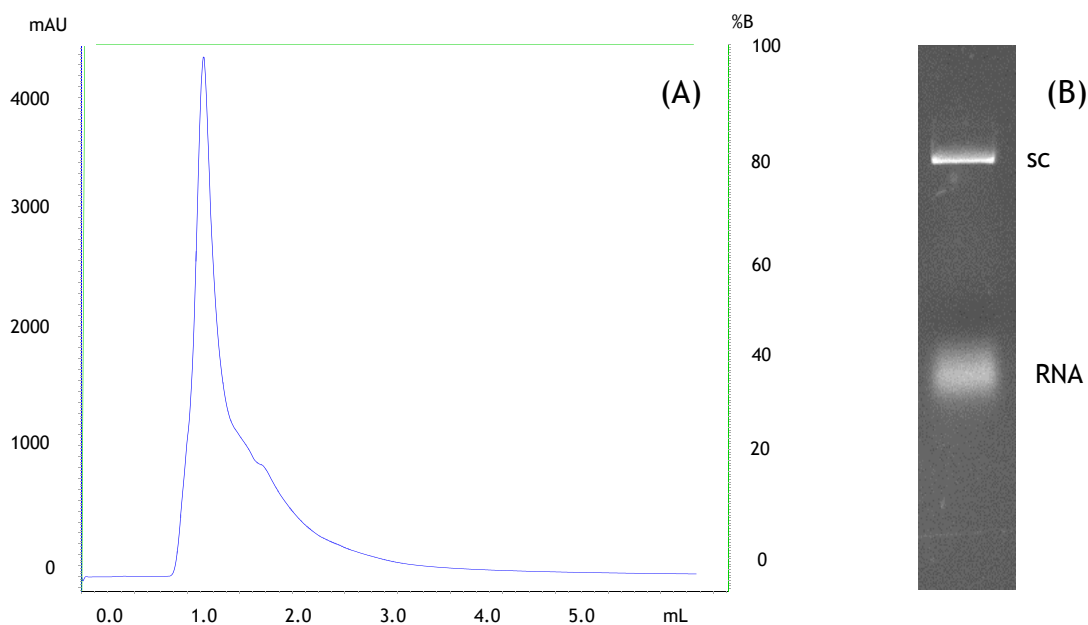


Figura 35. (A) Perfil cromatográfico da passagem de NaCl 1M na coluna. Bomba A: tampão 10 mM citrato e 10 mM de EDTA (pH 5,0); Bomba B: NaCl 1M em 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0). Caudal: 1 mL/min; detecção: 260 nm; volume de injeção: 200 μ L. (B) Análise eletroforética do pico recolhido no cromatograma.

Analisando os resultados da figura comprova-se que as espécies ligadas aos grupos hidrolisados eluem quando se quebram as interações iônicas com a passagem de NaCl 1 M.

5 Dicroísmo circular

Esta técnica tem como objetivo estudar a estrutura de proteínas e também ácidos nucleicos em solução [66]. Permite assim avaliar o efeito de determinadas condições sobre a estabilidade do pDNA, possibilitando o conhecimento das condições mais apropriadas para a purificação. Os espectros são apresentados em termos de elipticidade molar, tornando possível comparar diretamente a intensidade das bandas obtidas para as diferentes amostras [66]. O espectro característico de pDNA apresenta uma banda negativa a 225 nm e uma banda positiva a 275 nm [67].

Neste trabalho, a técnica de dicroísmo circular teve como objetivo estudar a estabilidade da estrutura do pDNA sc em função das várias condições de eluição que foram usadas,

nomeadamente diferentes tampões, diferentes pHs e na presença de sal, pois nos estudos cromatográficos o pDNA está sujeito a concentrações de sal elevadas.

Para tal, o primeiro estudo realizado foi para avaliar a diferença de estrutura das 3 isoformas do pDNA em solução de 10 mM de Tris-HCl. O espectro do estudo das isoformas está apresentado na figura 36.

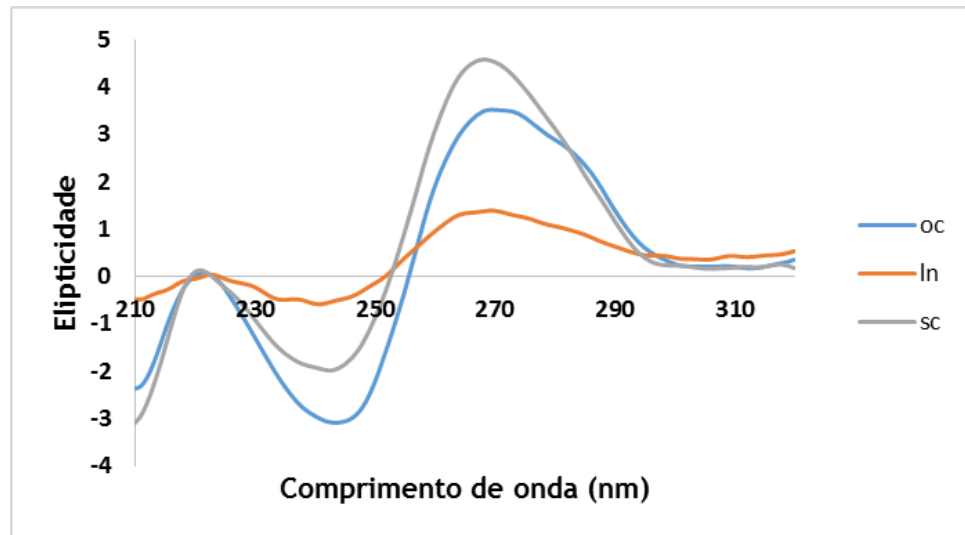


Figura 36. Espectro de dicroísmo circular das isoformas ln, oc e sc do HPV16 E6/E7^{MUT} em solução de 10 mM de Tris-HCl pH 8,0.

Ao analisar o espectro das isoformas é visível um decréscimo de intensidade da banda positiva, bem como o efeito oposto na banda negativa para a isoforma ln. Este resultado confirma que as diferentes isoformas do mesmo plasmídeo apresentam diferenças estruturais e a elevada intensidade da banda positiva da isoforma sc pode estar relacionada com o elevado grau de enrolamento desta conformação [68]. Outro dos estudos feitos por DC foi o efeito que o EDTA tem na estrutura do pDNA sc. O EDTA é utilizado na estratégia de purificação como um estabilizador da isoforma, para que não exista a conversão para a isoforma oc durante todo o processo cromatográfico e manipulação das amostras. Para tal, é interessante estudar o efeito que os tampões de Tris-HCl (pH 8,0) com e sem EDTA têm sobre o pDNA sc. Os espetros de DC deste estudo estão representados na figura 37.

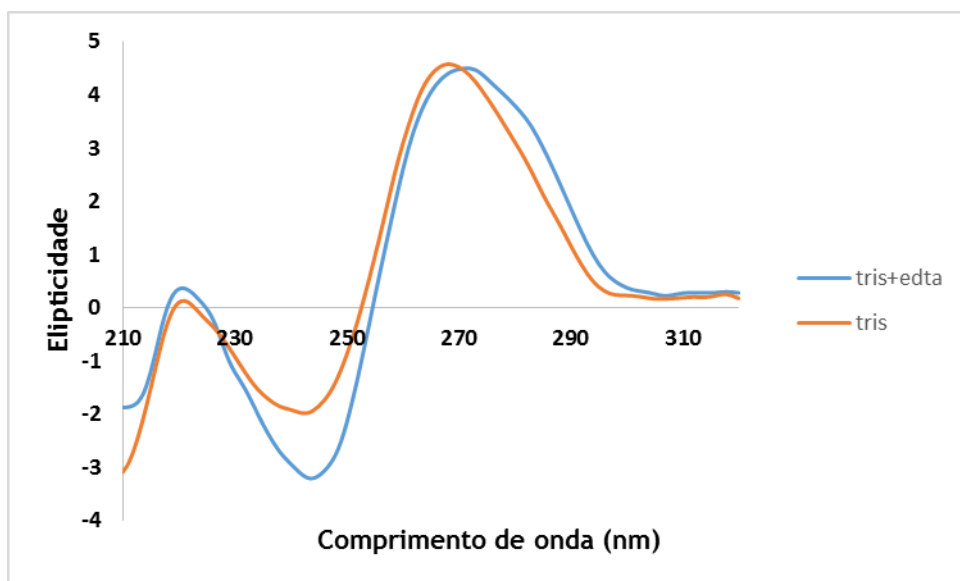


Figura 37. Espectro de dicroísmo circular da isoforma pDNA sc do HPV16 E6/E7^{MUT} em solução de 10 mM de Tris-HCl com 10 mM EDTA pH 8,0 e solução 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

Ao avaliar os resultados deste estudo é possível perceber que na presença de EDTA, a estrutura da isoforma sc é mantida, apenas altera a intensidade da banda negativa. Tendo em conta que essa alteração não é muito significativa conclui-se que com o uso de EDTA permite manter a estabilidade da isoforma sc do pDNA, não alterando a sua estrutura.

O estudo seguinte foi feito para comparar os tampões e respetivos pHs utilizados nos ensaios cromatográficos sobre a estrutura do pDNA sc, ou seja, para comparar o tampão 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0) com o tampão 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0). Adicionalmente também foi estudado o efeito da adição de sulfato de amónio aos tampões anteriores na estabilidade do pDNA sc para mimetizar as condições usadas nos ensaios cromatográficos. Para tal foram obtidos os espectros da isoforma sc com 3 M de sulfato de amónio em 10 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 8,0) e 3 M de sulfato de amónio em 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0). Os espectros de DC estão representados na figura 38.

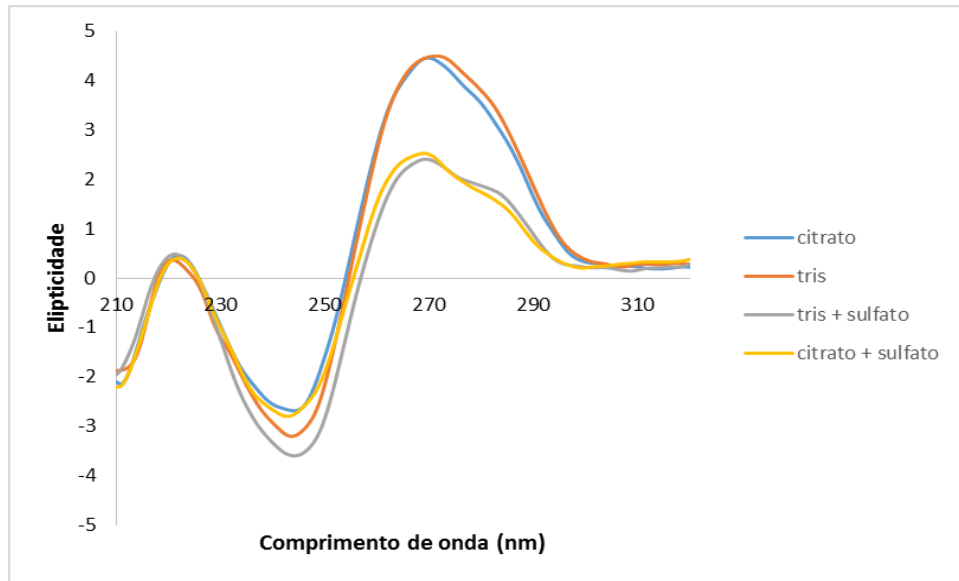


Figura 38. Espectro de dicroísmo circular da estrutura da isoforma pDNA sc do HPV16 E6/E7^{MUT} em solução de 10 mM de Tris-HCl com 10 mM de EDTA 10 mM (pH 8,0), solução de 10 mM de citrato com 10 mM de EDTA (pH 5,0), solução de sulfato de amônio 3M em 10 mM de Tris-HCl 10 mM com 10 mM de EDTA 10 mM (pH 8,0) e solução de sulfato de amônio 3M em 10 mM de citrato com 10 mM de EDTA 10 mM (pH 5,0).

Ao analisar os espectros referentes à isoforma sc em diferentes tampões verifica-se que a influência do pH na ausência de sal não produz um efeito significativo na estrutura do pDNA, tal como está descrito na literatura [69]. Este resultado mostra que apesar do tampão Tris utilizado nos ensaios cromatográficos ter sido substituído pelo citrato para estabelecer condições ácidas (pH 5,0), essa alteração não influencia a estrutura da isoforma sc.

Nos espectros correspondentes à isoforma sc, quando foi adicionado 3 M de sulfato de amônio aos tampões anteriores, é possível observar que há uma diminuição da intensidade da banda positiva a 275 nm quando comparado à mesma amostra sem a presença de sal. Este resultado indica que forças iônicas elevadas afetam a estrutura do pDNA sc. Contudo, apesar do sal afetar negativamente a estrutura do pDNA sc, o tempo em que esta amostra está sujeita a uma força iônica elevada é relativamente curto e após o ensaio cromatográfico a amostra é dessalinizada e recupera a estrutura inicial, tal como já foi comprovado por DC em estudos anteriores [70].

6 Injeção das impurezas na coluna monolítica

Após o gradiente de eluição ter sido definido para a separação do pDNA sc a partir da amostra de lisado, foi realizado um estudo do comportamento cromatográfico das impurezas (RNA e gDNA) quando injetadas isoladamente para confirmar se vão ou não eluir no patamar onde elui o pDNA sc. As amostras injetadas no monolito de benzil-hididina, RNA e o gDNA isolados, foram extraídas de células de *E.coli* DH5a não transformadas de acordo com os procedimentos descritos no tópico dos materiais e métodos.

A coluna foi equilibrada com 1,65 M de sulfato de amônio em 10 mM citrato e 10 mM EDTA (pH 5,0). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e com um fluxo de 1 mL/min. O cromatograma que corresponde à injeção do RNA está apresentado na figura 39 (A) e o que corresponde ao gDNA está representado na figura 39 (B).

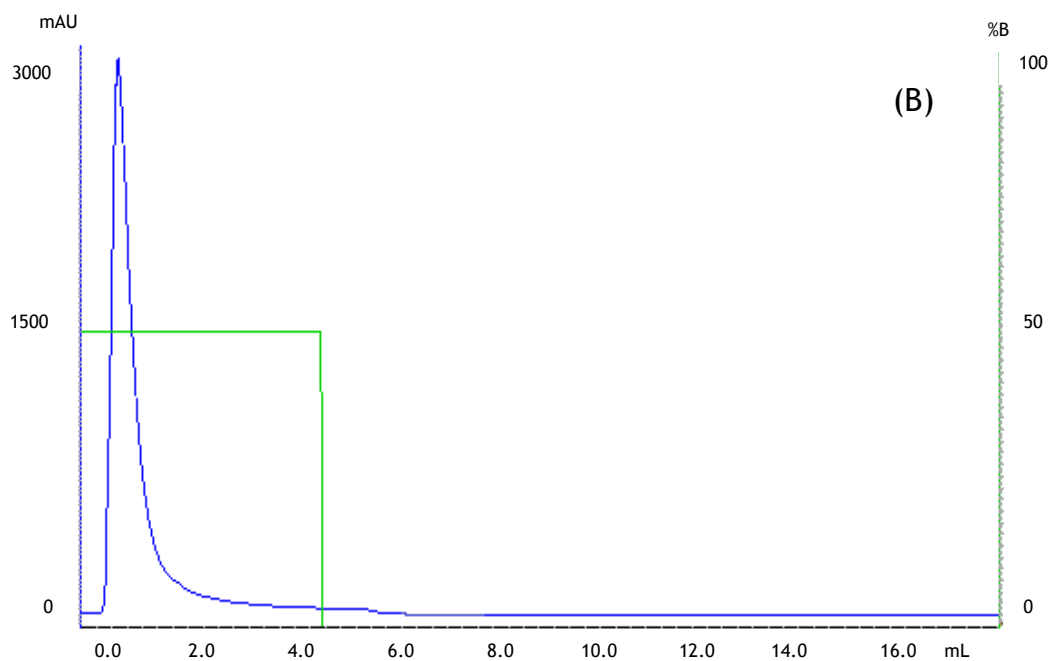
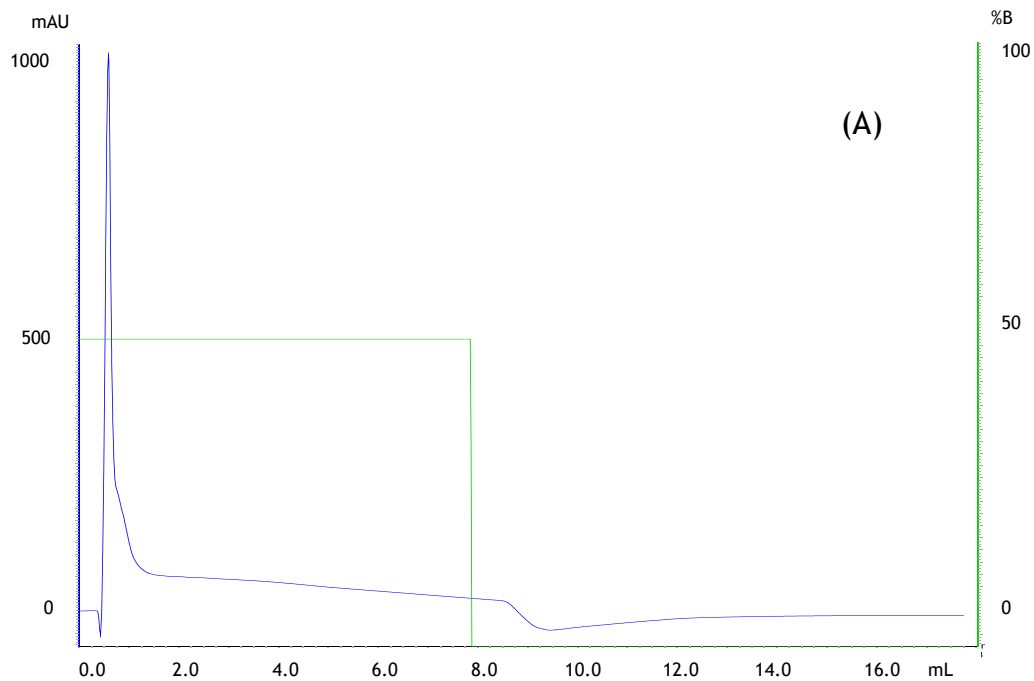


Figura 39. Perfil cromatográfico das amostras de RNA (A) e de gDNA (B), extraídas isoladamente da *E. coli* não transformada, no monolito de benzil-histidina utilizado um gradiente por passos de 1,65 M e 0 M de sulfato de amônio.

Pela análise dos perfis cromatográficos do RNA e gDNA, é possível perceber que em ambos os ensaios nenhuma das impurezas apresenta um tempo de retenção semelhante à biomolécula de interesse, pDNA sc. Este resultado comprova que nestas condições de pH, condutividade, temperatura e fluxo, as impurezas injetadas isoladamente tendem a eluir durante o flowthrough, logo após a sua injeção.

7 Parâmetros analíticos para a avaliação da qualidade do plasmídeo

O pDNA sc recuperado dos ensaios cromatográficos tem de seguir os critérios de pureza impostos pelas agências reguladoras, nomeadamente pela FDA, para que possa ser usado como um biofármaco em ensaios terapêuticos. Esses critérios impõem que a amostra purificada deve apresentar uma homogeneidade >97% de pDNA na conformação sc e deve conter um valor mínimo ou inexistente de impurezas constituintes do hospedeiro, tais como RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas (tabela 5).

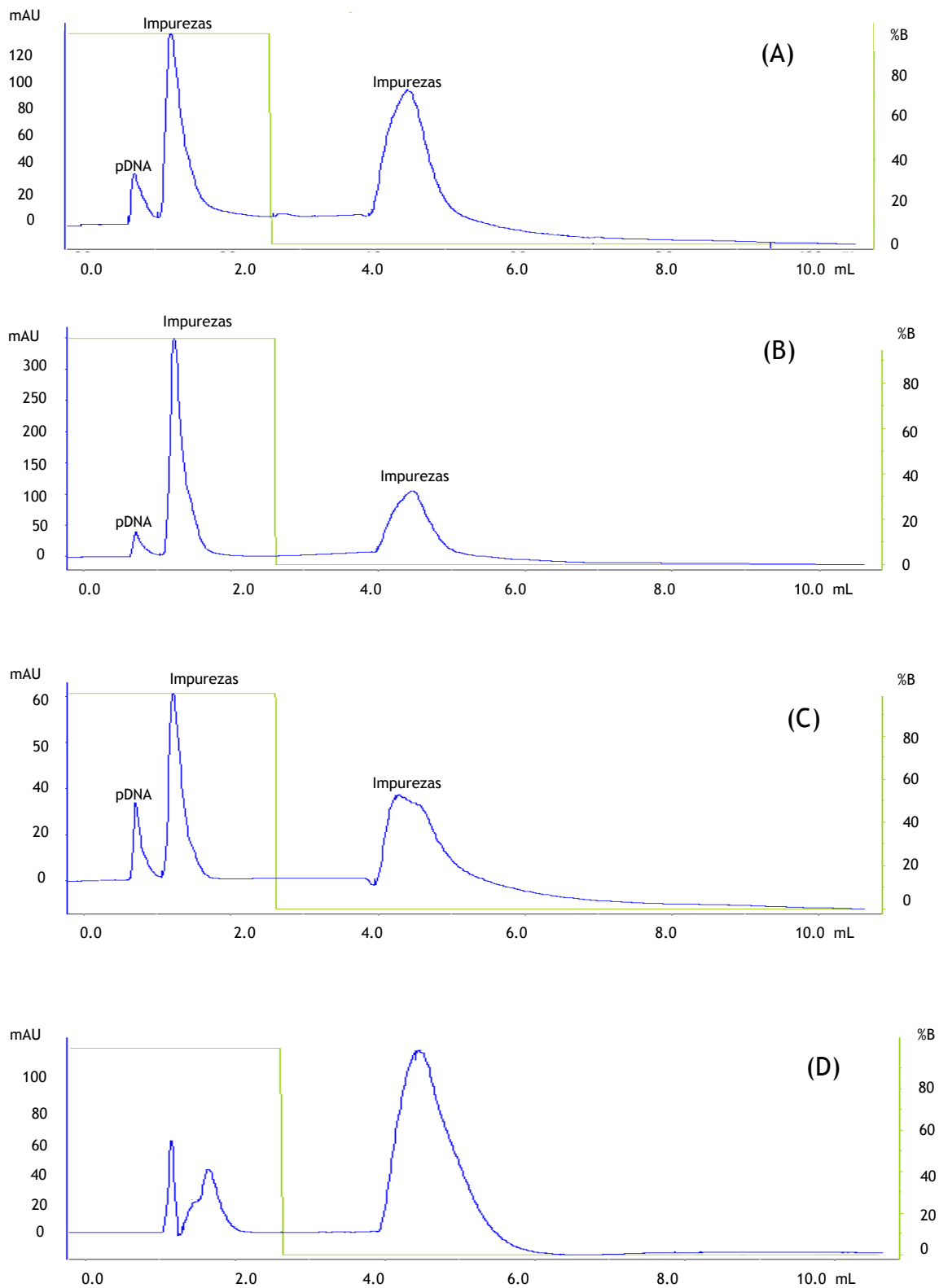
Tabela 5 - Critérios exigidos pelas agências reguladoras para a amostra purificada de pDNA sc (adaptado de [62]).

Impurezas e % homogeneidade	Critérios Específicos
Homogeneidade	>97% da isoforma sc
gDNA	<2ng/μg pDNA
RNA	Indetetável
Endotoxinas	<0,1 EU/μg pDNA
Proteínas	Indetetável

A percentagem de pureza e recuperação do pDNA sc presente na amostra foram quantificadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a presença de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, o gDNA foi quantificado por PCR em tempo real (RT-PCR), as endotoxinas pelo método de LAL e as proteínas foram determinadas através do método micro-BCA [33, 66].

Como referido anteriormente, a percentagem de pureza e também a quantidade de pDNA sc purificado foram determinados por HPLC utilizando uma coluna de fenil-agarose através de cromatografia de interação hidrofóbica [58]. Este método consiste em determinar não só a concentração de pDNA, através de uma curva de calibração, mas também determinar a presença de outros componentes na amostra de lisado de *E. coli*, como gDNA proteínas e RNA. A amostra a analisar é injetada na coluna analítica, após ter sido equilibrada com 1,5 M de sulfato de amónio, e como o pDNA não tem afinidade com a coluna de fenil vai ser imediatamente eluído com um tempo de retenção de 0,7 min. De seguida elui o gDNA que foi retardado na coluna com um tempo de retenção de 1,15 min. Mais tarde, quando a

concentração de sulfato de amônio é diminuída para zero eluem as espécies que tinham ficado retidas, nomeadamente algumas proteínas e o RNA com um tempo de retenção de aproximadamente 4 min. Os cromatogramas das amostras analisadas por este método estão apresentados na figura 40.



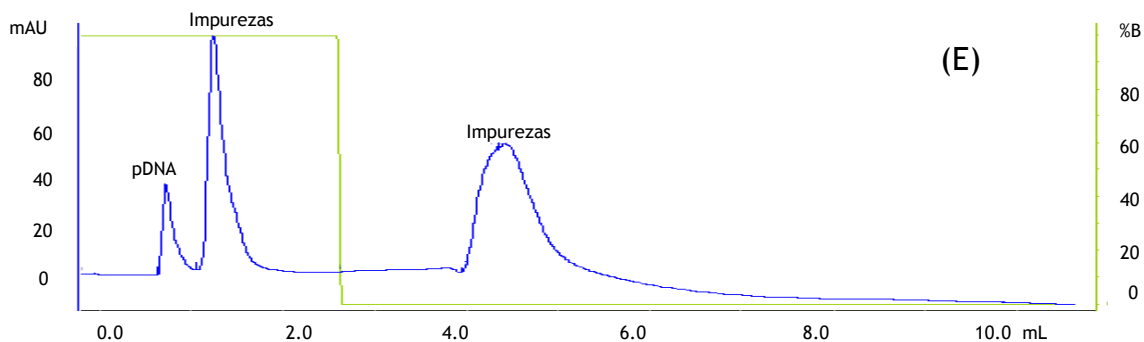


Figura 40. Perfis cromatográficos analíticos das diferentes amostras analisadas. (A) amostra inicial de lisado (B) pico 1 recuperado com 1,66 M de sulfato de amónio (C) pico 2 recuperado com 0 M de sulfato de amónio (D) Ensaio em branco da injeção do tampão sem sal (E) pico 3 - passo de limpeza com 1 M NaCl.

O cromatograma analítico representativo da amostra de lisado de *E. coli* (Figura 40 (A)) mostrou um pico aos 0,7 min correspondente ao pDNA e uma grande quantidade e variedade de impurezas que eluem mais tarde [58].

No cromatograma que representa o pico 1 (Figura 40 (B)) recuperado a 1,65 M de sulfato de amónio no ensaio de purificação com o monolito de benzil-histidina, é possível perceber que existe um pico significativo aos 0,7 min. Como já se tinha verificado anteriormente na análise eletroforética, existe uma percentagem de perda de pDNA sc no pico 1 (Figura 33). Em relação às impurezas, é possível observar a presença destas pelos elevados picos que aparecem a outros tempos de retenção.

No cromatograma analítico da amostra de interesse (pico 2 recuperado com 0 M de sulfato de amónio no ensaio de purificação com o monolito de benzil-histidina), observa-se um pico aos 0,7 min, representativo do conteúdo de pDNA desta amostra (Figura 40 (C)). No entanto é possível também observar pequenos picos que correspondem aos tempos de retenção das impurezas. Desta forma, o resultado analítico não é concordante com a eletroforese do ensaio nem com o teste de injeção das impurezas na coluna. Para perceber o aparecimento dos picos representativos das impurezas, foi injetado na coluna analítica o tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (Figura 40 (D)). Este ensaio serviu de branco para perceber se os picos de impurezas correspondiam à amostra ou ao comportamento da coluna. Tendo o resultado do branco é possível subtrair a área dos picos de interferências aos restantes cromatogramas e no caso da amostra de interesse apenas existe pDNA, pois a diferença com o ensaio em branco anula as áreas das interferências.

Por último, no pico recuperado com a passagem de 1 M NaCl na coluna, conclui-se que parte do pDNA ficou retido à coluna de benzil-histidina durante o ensaio com sulfato de amónio, sendo depois eluído juntamente com impurezas no passo de limpeza com NaCl. Este resultado ajuda a compreender a baixa recuperação do pDNA injetado na coluna durante o ensaio com sulfato de amónio.

Após determinar as áreas dos picos obtidos nos perfis cromatográficos analíticos para cada amostra analisada, foi quantificada a concentração de pDNA através da curva de calibração. Para determinar o grau de pureza do pDNA sc, foi calculada a razão da área de pDNA pelo somatório de todas as áreas presentes no cromatograma analítico desta amostra. Para determinar o rendimento de recuperação do pDNA sc foi calculada a razão entre a massa de plasmídeo injetada na coluna, e a massa de plasmídeo recuperada, em microgramas. Os resultados da quantificação de pDNA na coluna analítica de fenil mostraram que o grau de pureza da amostra purificada no segundo pico do ensaio de purificação foi acima de 99% e que o rendimento de recuperação foi de 31,58%. Os resultados estão resumidos e apresentados na tabela 6. A percentagem de recuperação de 31,58% de pDNA sc obtida com a coluna de benzil-histidina é consideravelmente mais baixa quando comparado com outros estudos publicados na literatura. Como por exemplo os 74% de pDNA sc recuperado com monolito de carbonildiimidazole (CDI) [61], ou os 62% de recuperação obtidos utilizando uma estratégia de cromatografia de afinidade de tripla hélice [72] e também a percentagem de recuperação de 75% conseguida com a utilização de discos monolíticos de troca iónica [73]. Apesar destas percentagens de recuperação, outras publicações também mostraram percentagens de recuperação do pDNA sc mais baixas e similares à conseguida com o monolito de benzil-histidina, como os 40% de recuperação conseguidos com a coluna convencional de histidina-agarose [62] ou os 39,18% com o suporte monolítico modificado de arginina [74].

Tabela 6 - Análise da concentração, percentagem de pureza e rendimento de recuperação do plasmídeo sc HPV16 E6/E7^{MUT} com o monolito de benzil histidina.

Amostras analisadas	Volume (mL)	pDNA		Pureza (%)	Rendimento (%)
		µg/mL	µg		
Amostra lisado	0,2	119,84	23,97	-	-
Pico 1 (pDNA sc e impurezas)	0,3	19,31	5,79	-	24,16
Pico 2 (pDNA sc)	0,3	25,23	7,57	>99	31,58
Pico 3 (limpeza com NaCl)	0,3	27,77	8,33	-	34,76

Para além da perda de pDNA sc no primeiro pico do ensaio de purificação (24,16%) assim como na quantidade que ficou retida e é posteriormente recuperado no passo de limpeza com 1 M NaCl (34,76), é importante considerar igualmente algumas perdas durante a manipulação das amostras recuperadas do ensaio de purificação no passo de dessalinização e concentração utilizando os concentradores. Apesar de não ser possível recuperar uma alta percentagem de pDNA sc com o monolito de benzil-histidina, todo o pDNA sc recuperado no segundo pico apresenta um grau de pureza >99% tirando partido da vantagem de utilizar baixas concentrações de sal para a separação da sc do pDNA, e consequentemente do baixo impacto económico e ambiental.

Relativamente à presença de proteínas na amostra de pDNA sc, estas devem ser indetetáveis para se poder avançar para estudos terapêuticos porque a presença de proteínas pode desencadear respostas alérgicas, tal como choques anafiláticos ou doenças crónicas e autoimunes [75]. Desta forma, as agências reguladoras, como a FDA, estabeleceram que o teor de proteínas na amostra purificada de pDNA sc deve ser indetetável. Como referido anteriormente, o nível de proteínas na amostra foi determinado através do ensaio micro-BCA. Os resultados mostram que o nível de proteínas da amostra inicial é de 188,5 µg/mL, enquanto que na amostra purificada não é possível detetar o teor de proteínas. Estes resultados mostram uma diminuição bastante significativa do nível de proteínas da amostra inicial para a amostra de pDNA sc e está de acordo com os critérios recomendados.

O teor de endotoxinas presente na amostra purificada também é um dos critérios referidos pela FDA. As endotoxinas surgem principalmente devido à etapa de lise alcalina que ao rebentar a membrana das bactérias leva à libertação de endotoxinas do hospedeiro para o meio, sendo difíceis de remover [76]. Níveis elevados desta impureza podem afetar a proliferação das células e ainda a eficiência de transfeção [77]. Por estes motivos é necessário uma remoção eficiente de endotoxinas para a amostra de pDNA sc poder ser aplicada em processos terapêuticos. Os resultados do teor de endotoxinas na amostra estão apresentados na tabela 7 e mostram que existiu uma diminuição de aproximadamente 344 vezes do teor de endotoxinas presente na amostra inicial para o teor na amostra purificada.

Por último, outra das impurezas que deve ser controlada segundo as agências reguladoras é o gDNA porque a sua presença na amostra final de pDNA sc pode levar à integração no genoma de célula eucariótica após transfeção, e levar à expressão de oncogenes que são codificados por alguns fragmentos de gDNA, podendo induzir à formação de tumores [71]. A determinação da quantidade de gDNA na amostra de interesse foi obtida através de PCR em tempo real. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 7. De acordo com os resultados a amostra purificada tem 0,65 ng gDNA/µg de pDNA. Este valor está abaixo do limite máximo de gDNA imposto pela FDA (2 ng/ µg de pDNA).

Tabela 7 - Valores da quantificação de proteínas, endotoxinas e gDNA da amostra inicial e da amostra de pDNA sc.

Amostra	Proteínas (mg/mL)	Endotoxinas (UE/µg de pDNA)	gDNA (ng/µg de pDNA)
Amostra Inicial	183,53	275,84	44,37
Pico sc do pDNA	Indetetável	0,8	0,65

Tendo em conta os resultados da quantificação das impurezas no ensaio de purificação com o monolito de benzil-histidina verificou-se uma redução bastante significativa para todas as impurezas. Comparando estes valores com outros estudos, em relação às proteínas os resultados foram semelhantes na maioria dos estudos publicados na literatura, pois todos apresentam a

quantificação de proteínas como indetetável. Relativamente à quantificação de endotoxinas, como foi referido anteriormente, o valor apresentado para a purificação com o monolito de benzil-histidina é ligeiramente acima com o critério exigido pela FDA e igualmente acima de valores referenciados na literatura, no entanto, foi conseguida uma redução bastante significativa em relação à amostra inicial (aproximadamente 344 vezes). Por último, o valor de gDNA encontra-se dentro dos valores exigidos pelas agências reguladoras e fazendo uma comparação é possível observar um valor mais baixo relativamente aos valores de 8,23 ng/μg de pDNA e 3,4 ng/μg de pDNA alcançados com a monolito de arginina [74] e com a coluna convencional de histidina-agarose [62], respetivamente. Tendo em conta o estudo com a utilização do monolito CDI, os valores de gDNA são aproximadamente iguais aos valores conseguidos com o monolito de benzil-histidina (0,57 ng/μg de pDNA para o CDI e 0,65 ng/μg de pDNA para o monolito de benzil-histidina).

Tendo em conta todos os valores apresentados, relativamente aos parâmetros analíticos da qualidade do pDNA pode-se concluir que com a utilização do monolito imobilizado com o ligando de benzil-histidina é possível obter uma amostra pura da isoforma sc do pDNA com os valores de impurezas de acordo com os critérios exigidos pelas agências reguladoras, embora com um rendimento de 32%.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas Futuras

Atualmente, milhares de pessoas morrem por todo o mundo devido a doenças incuráveis provocadas por vírus. Assim, é fundamental desenvolver novas vacinas que permitam ultrapassar as limitações das vacinas convencionais e baixar consideravelmente o número de mortes mundialmente.

Desta forma, as vacinas de DNA surgiram como uma alternativa mais segura e eficiente quando comparadas às vacinas convencionais. Para obter uma vacina de pDNA segura é necessário aplicar processos de purificação eficientes para respeitar o grau de pureza exigido pelas agências reguladoras e evitar efeitos adversos. Podem ser aplicados vários processos cromatográficos de purificação do pDNA mas aquele que desperta mais interesse aos investigadores é a cromatografia de afinidade utilizando aminoácidos como ligandos, pois a estratégia explora várias interações entre o pDNA e o ligando mimetizando o ambiente biológico.

Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma nova estratégia de purificação de pDNA a partir de uma amostra complexa de lisado utilizando como ligando um derivado de aminoácido, a benzil-histidina. Inicialmente, a separação das isoformas do plasmídeo HPV16 E6/E7^{MUT} foi otimizada, explorando vários tipos de interações, nomeadamente as hidrofóbicas, que promovem a ligação ou eluição das isoformas de acordo com a força iónica utilizada. Observou-se que a estratégia de separação de isoformas desenvolvida com este monolito pode ser aplicada com sucesso em plasmídeos diferentes. Posteriormente foram testadas estratégias semelhantes para aplicar na amostra de lisado de *E.coli*. A purificação da isoforma sc do pDNA foi conseguida utilizando uma estratégia de dois passos, diminuindo a concentração de sulfato de amónio (1,65 M no primeiro passo e 0 M no segundo). Comparando com o comportamento do monolito de histidina, foi possível baixar consideravelmente a concentração de sal utilizada nos ensaios cromatográficos com o monolito de benzil histidina. Também foram realizados ensaios de dicroísmo circular para avaliar a estabilidade estrutural do pDNA sc no processo cromatográfico em função do tampão de eluição utilizado. Após a análise dos espectros de DC é possível concluir que a estabilidade da isoforma sc se mantém.

Por fim, a qualidade e percentagem de pureza do plasmídeo resultante da purificação com o monolito de benzil-histidina foram avaliadas através das metodologias requeridas pelas agências reguladoras, como a FDA. Estes testes indicaram que a amostra purificada sc está de acordo com os critérios exigidos no que diz respeito ao gDNA, proteínas e RNA. Relativamente às endotoxinas foi conseguida uma redução de aproximadamente 344 vezes comparativamente à amostra inicial.

Em suma, nos processos cromatográficos utilizando o monolito de benzil-histidina é possível obter a amostra de pDNA sc purificada baixando significativamente a concentração de sal

usada, tornando-se uma vantagem promissora porque permite baixar o custo do processo mesmo em escalas industriais e baixar também o impacto ambiental causada pelas altas concentrações de sal. A utilização do monolito de benzil-histidina permite ainda manter a estabilidade estrutural da isoforma pDNA sc e mostra uma boa capacidade e seletividade para separar os ácidos nucleicos presentes no lisado de *E.coli* da amostra de interesse, o pDNA sc. Futuramente, pretende-se ainda usar o monolito de benzil-histidina para determinar a capacidade de ligação dinâmica do suporte modificado para depois serem feitos ensaios de saturação com a amostra de lisado, aplicando a estratégia de purificação desenvolvida neste trabalho para tentar uma recuperação de maior quantidade de pDNA sc. Além disto, podem ainda ser realizados estudos *in vitro* para avaliar a transfeção e expressão das oncoproteínas E6 e E7 mutadas, codificadas no plasmídeo, e confirmar se o grau de pureza obtido no processo de purificação não vai interferir na eficiência de transfeção.

Capítulo 5

Bibliografía

- [1] J. Paavonen, "Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias.," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 11 Suppl 2, pp. S3-9, Nov. 2007.
- [2] T. C. W. Chien-Fu Hung, Archana Monie, Ronald D. Alvarez, "DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside," *Exp Mol Med*, vol. 39, no. 6, pp. 679-689, 2011.
- [3] F. Khorasanizadeh, J. Hassanloo, N. Khaksar, S. Mohammad Taheri, M. Marzaban, B. H Rashidi, A. Akbari Sari, and K. Zendehtel, "Epidemiology of cervical cancer and human papilloma virus infection among Iranian women - analyses of national data and systematic review of the literature.," *Gynecol. Oncol.*, vol. 128, no. 2, pp. 277-81, Feb. 2013.
- [4] R. G. McKaig, R. S. Baric, and A. F. Olshan, "Human papillomavirus and head and neck cancer: Epidemiology and molecular biology," *Head and Neck*, vol. 20, no. 3. pp. 250-265, 1998.
- [5] J. Doorbar, "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.," *Clin. Sci. (Lond).*, vol. 110, no. 5, pp. 525-41, May 2006.
- [6] T. Park, H. Fujiwara, D. Ph, and T. C. Wrigf, "Molecular Biology of Cervical Cancer and its Precursors," 1995.
- [7] S. Motoyama, C. A. Ladines-llave, S. L. Villanueva, and T. Maruo, "The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis," vol. 50, no. 1, pp. 9-19, 2004.
- [8] P. Finzer, A. Aguilar-Lemarroy, and F. Rösl, "The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis," *Cancer Lett.*, vol. 188, pp. 15-24, 2002.
- [9] M. Tommasino, "The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis.," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 26, pp. 13-21, Jun. 2014.
- [10] H. Pan and A. E. Griep, "Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 E6 or E7 transgenic mice: implications for tumor suppressor gene function in development.," *Genes Dev.*, vol. 8, no. 11, pp. 1285-1299, Jun. 1994.
- [11] H. L. Howie, R. A. Katzenellenbogen, and D. a Galloway, "Papillomavirus E6 proteins.," *Virology*, vol. 384, no. 2, pp. 324-34, Feb. 2009.
- [12] H. Jo and J. W. Kim, "Implications of HPV infection in uterine cervical cancer Review Article," vol. 3, pp. 419-434, 2005.
- [13] C. R. Silva, A. M., Quintas, A. Halpern, A. P. Ascenso, C. Videira, A. Azevedo, C. de Oliveira, *Bioquímica: organização molecular da vida*, 2008.
- [14] J. W. Wang and R. B. S. Roden, "Virus-like particles for the prevention of human," *Expert Rev. Vaccines*, vol. 12, no. 2, pp. 129-142, 2013.

- [15] T. C. W. Chien-Fu Hung, Barbara Ma, Archana Monie, Shaw-Wei Tsen, "Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions," *Expert Opin Biol Ther*, vol. 8, no. 4, pp. 421-439, 2008.
- [16] I. H. Frazer, "Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. January, pp. 46-54, 2004.
- [17] T. F. Schwarz, "Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine, Cervarix??" *Adv. Ther.*, vol. 26, no. 11, pp. 983-998, 2009.
- [18] M. R. Mclemore, "Gardasil ® : Introducing the New Human Papillomavirus Vaccine," vol. 10, no. 5, p. 1188, 2006.
- [19] M. H. Einstein, M. Baron, M. J. Levin, A. Chatterjee, R. P. Edwards, F. Zepp, I. Carletti, F. J. Dessy, A. F. Trofa, A. Schuind, and G. Dubin, "human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years," *Hum. Vaccin.*, vol. 5, no. 10, pp. 705-719, 2009.
- [20] E. L. Franco, E. Duarte-Franco, and A. Ferenczy, "Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection.," *CMAJ*, vol. 164, pp. 1017-1025, 2001.
- [21] A. Mahdavi and B. J. Monk, "Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges.," *Oncologist*, vol. 10, pp. 528-538, 2005.
- [22] Y. Han, S. Liu, J. Ho, M. K. Danquah, and G. M. Forde, "Using DNA as a drug—Bioprocessing and delivery strategies," *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 87, no. 3, pp. 343-348, Mar. 2009.
- [23] D. Ibraheem, A. Elaissari, and H. Fessi, "Gene therapy and DNA delivery systems.," *Int. J. Pharm.*, vol. 459, no. 1-2, pp. 70-83, Jan. 2014.
- [24] M. Liu, "DNA vaccines : a review," *J. Intern. Med.*, vol. 253, no. 253, pp. 402-410, 2003.
- [25] S. Gurunathan, D. M. Klinman, and R. A. Seder, "DNA VACCINES : Immunology , Application , and Optimization," *Evaluation*, pp. 927-974, 2000.
- [26] J. J. Donnelly, J. B. Ulmer, and M. A. Liu, "DNA vaccines," *Life Sci.*, vol. 60, no. 3, pp. 163-172, 1996.
- [27] S. L. Wu and B. L. Karger, "Hydrophobic interaction chromatography of proteins.," *Methods Enzymol.*, vol. 270, pp. 27-47, 1996.
- [28] J. B. Ulmer, T. M. Fu, R. R. Deck, a Friedman, L. Guan, C. De Witt, X. Liu, S. Wang, M. A. Liu, J. J. Donnelly, and M. J. Caulfield, "Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA.," *J. Virol.*, vol. 72, no. 7, pp. 5648-5653, 1998.
- [29] R. J. Anderson and J. Schneider, "Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer.," *Vaccine*, vol. 25 Suppl 2, pp. B24-34, Sep. 2007.
- [30] A. J. Phillips, "The challenge of gene therapy and DNA delivery," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 53, no. 9, pp. 1169-1174, Sep. 2001.
- [31] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, and D. M. F. Prazeres, "Chromatography of plasmid DNA," *J. Chromatogr. A*, vol. 1069, no. 1, pp. 3-22, Mar. 2005.

- [32] F. Sousa, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA.," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 9, pp. 518-25, Sep. 2008.
- [33] L. Cupillard, V. Juillard, S. Latour, G. Colombet, N. Cachet, S. Richard, S. Blanchard, and L. Fischer, "Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats," *Vaccine*, vol. 23, no. 16, pp. 1910-1916, Mar. 2005.
- [34] G. N. Ferreira, G. A. Monteiro, D. M. Prazeres, and J. M. Cabral, "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications.," *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 9, pp. 380-388, 2000.
- [35] K. J. Prather, S. Sagar, J. Murphy, and M. Chartrain, "Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 33, no. 7, pp. 865-883, Dec. 2003.
- [36] M. A. Liu and J. B. Ulmer, "Human clinical trials of plasmid DNA vaccines.," *Adv. Genet.*, vol. 55, pp. 25-40, Jan. 2005.
- [37] F. Sousa, L. Passarinha, and J. A. Queiroz, "Biomedical application of plasmid DNA in gene therapy: A new challenge for chromatography," *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 26, no. 1, pp. 83-116, Jan. 2009.
- [38] D. M. F. Prazeres, G. N. M. Ferreira, G. A. Monteiro, C. L. Cooney, and J. M. S. Cabral, "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks," *Trends Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 169-174, Apr. 1999.
- [39] A. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Differential interactions of plasmid DNA, RNA and genomic DNA with amino acid-based affinity matrices," *J. Sep. Sci.*, vol. 33, no. 17-18, pp. 2610-2618, 2010.
- [40] J. Stadler, R. Lemmens, and T. Nyhammar, "Plasmid DNA purification.," *J. Gene Med.*, vol. 6 Suppl 1, pp. S54-S66, 2004.
- [41] H. C. B. J. Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 7, no. 6, 1979.
- [42] A. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification.," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3046-58, Nov. 2012.
- [43] L.Z. Li, Y. Liu, M.-S. Sun, and Y.M. Shao, "Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1139, no. 2, pp. 228-235, 2007.
- [44] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, and D. M. Prazeres, "Studies on the retention of plasmid DNA and Escherichia coli nucleic acids by hydrophobic interaction chromatography.," *Bioseparation*, vol. 10, no. 4-5, pp. 211-220, 2001.
- [45] Y. Xiao, A. Rathore, J. P. O'Connell, and E. J. Fernandez, "Generalizing a two-conformation model for describing salt and temperature effects on protein retention and stability in hydrophobic interaction chromatography.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1157, no. 1-2, pp. 197-206, Jul. 2007.
- [46] A. Ghanem, R. Healey, and F. G. Adly, "Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: a review.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 760, pp. 1-15, Jan. 2013.

- [47] C. R. Lowe, A. R. Lowe, and G. Gupta, "New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals.," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 49, no. 1-3, pp. 561-574, 2001.
- [48] A. Jungbauer and R. Hahn, "Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology," *J. Sep. Sci.*, vol. 27, no. 10-11, pp. 767-778, 2004.
- [49] G. A. Platonova and T. B. Tennikova, "Chromatographic investigation of macromolecular affinity interactions," *J. Chromatogr. A*, vol. 1065, no. 1, pp. 75-81, 2005.
- [50] F. Sousa, C. Cruz, and J. A. Queiroz, "Amino acids-nucleotides biomolecular recognition: From biological occurrence to affinity chromatography," *J. Mol. Recognit.*, vol. 23, no. 6, pp. 505-518, 2010.
- [51] F. Sousa, C. T. Tomaz, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support.," *Anal. Biochem.*, vol. 343, no. 1, pp. 183-5, Aug. 2005.
- [52] A. Sousa, F. Sousa, D.M.F. Prazeres and J. A. Queiroz, "Histidine affinity chromatography of homo- oligonucleotides . Role of multiple interactions," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 23, no. October 2008, pp. 745-753, 2009.
- [53] C. Cruz, E. J. Cabrita, and J. A. Queiroz, "Analysis of nucleotides binding to chromatography supports provided by nuclear magnetic resonance spectroscopy," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 22, pp. 3559-3564, 2011.
- [54] L. F. A. Amorim, F. Sousa, J. A. Queiroz, C. Cruz, and A. Sousa, "Screening of L-histidine-based ligands to modify monolithic supports and selectively purify the supercoiled plasmid DNA isoform," *J. Mol. Recognit.*, no. November 2014, p. n/a-n/a, 2015.
- [55] A. Jungbauer and R. Hahn, "Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1184, no. 1-2, pp. 62-79, Mar. 2008.
- [56] A. Jungbauer, "Chromatographic media for bioseparation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1065, no. 1, pp. 3-12, 2005.
- [57] A. Sousa, D. Bicho, C. T. Tomaz, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Performance of a non-grafted monolithic support for purification of supercoiled plasmid DNA," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 13, pp. 1701-1706, Apr. 2011.
- [58] M. Diogo, J. A. Queiroz, and F. Prazeres, "Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 998, pp. 109-117, 2003.
- [59] G. A. Martins, S. A. M., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S. Monteiro, "Comparison of real-time polymerase chain reaction and hybridization assays for the detection of Escherichia coli genomic DNA in process samples and pharmaceutical-grade plasmid DNA products," *Anal. Biochem.*, vol. 322, no. 1, pp. 127-129, 2003.
- [60] B. G. Wieking, D. W. Vermeer, W. C. Spanos, K. M. Lee, P. Vermeer, W. T. Lee, Y. Xu, E. S. Gabitzsch, S. Balcaitis, J. P. Balint, F. R. Jones, and J. H. Lee, "A non-oncogenic HPV 16 E6/E7 vaccine enhances treatment of HPV expressing tumors," *Cancer Gene Ther.*, vol. 19, no. 10, pp. 667-674, 2012.
- [61] A. Sousa, C. T. Tomaz, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Successful application of monolithic innovative technology using a carbonyldiimidazole disk to purify supercoiled plasmid

- DNA suitable for pharmaceutical applications.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 46, pp. 8333-43, Nov. 2011.
- [62] F. Sousa, S. Freitas, A. R. Azzoni, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step.," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 45, no. Pt 3, pp. 131-40, Nov. 2006.
- [63] M. Tanigawa and T. Okada, "Atomic force microscopy of supercoiled DNA structure on mica," *Anal. Chim. Acta*, vol. 365, no. 1-3, pp. 19-25, 1998.
- [64] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette, "Behavior of supercoiled DNA.," *Biophys. J.*, vol. 74, no. 4, pp. 2016-2028, 1998.
- [65] C. Caramelo-Nunes, P. Almeida, J. C. Marcos, and C. T. Tomaz, "Aromatic ligands for plasmid deoxyribonucleic acid chromatographic analysis and purification: An overview," *J. Chromatogr. A*, vol. 1327, pp. 1-13, Jan. 2014.
- [66] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, "How to study proteins by circular dichroism," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1751, no. 2, pp. 119-139, 2005.
- [67] A. Sousa, P. Pereira, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Binding mechanisms for histamine and agmatine ligands in plasmid deoxyribonucleic acid purifications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1366, pp. 110-119, 2014.
- [68] D. Serban, J. M. Benevides, and G. J. Thomas, "DNA secondary structure and Raman markers of supercoiling in Escherichia coli plasmid pUC19," *Biochemistry*, vol. 41, no. 3, pp. 847-853, 2002.
- [69] A. M. O'Mahony, M. F. Cronin, A. McMahon, J. C. Evans, K. Daly, R. Darcy, and C. M. O'Driscoll, "Biophysical and structural characterisation of nucleic acid complexes with modified cyclodextrins using circular dichroism," *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 5, pp. 1346-1355, 2014.
- [70] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, and D. M. F. Prazeres, "Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography.," *Anal. Biochem.*, vol. 275, no. 1, pp. 122-124, 1999.
- [71] G. N. M. Ferreira, "Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination," *Chem. Eng. Technol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1285-1294, 2005.
- [72] T. Schlupe and C. L. Cooney, "Purification of plasmids by triplex affinity interaction," *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 19, pp. 4524-4528, 1998.
- [73] F. Smrekar, A. Podgornik, M. Ciringer, S. Kontrec, P. Raspor, A. Štrancar, and M. Peterka, "Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns," *Vaccine*, vol. 28, no. 8, pp. 2039-2045, 2010.
- [74] A. Soares, J. A. Queiroz, F. Sousa, and A. Sousa, "Purification of human papillomavirus 16 E6/E7 plasmid deoxyribonucleic acid-based vaccine using an arginine modified monolithic support.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1320, pp. 72-9, Dec. 2013.
- [75] P. R. P. Briggs, Jonathan, "Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals," *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 9, pp. 850-859, 1991.

- [76] B. Mattiasson, K. Teeparuksapun, and M. Hedström, "Immunochemical binding assays for detection and quantification of trace impurities in biotechnological production," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 1, pp. 20-27, 2010.
- [77] K. A. Butash, P. Natarajan, A. Young, and D. K. Fox, "Reexamination of the effect of endotoxin on cell proliferation and transfection efficiency," *Biotechniques*, vol. 29, no. 3, pp. 610-619, 2000.