



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Desenvolvimento de novos suportes cromatográficos para purificação do DNA plasmídeo

Soraia Nunes Ferreira

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

Orientador: Prof. Doutora Carla Patrícia Alves Freire Madeira Cruz  
Coorientador: Prof. Doutora Fani Pereira de Sousa

Covilhã, outubro de 2014



## Agradecimentos

Foi um ano com muitos obstáculos, mas também recheado de pequenas vitórias. Esta dissertação nunca teria sido concluída sem o apoio de pessoas, que para além de serem colegas, acabaram por se tornar fundamentais no meu dia-a-dia.

À Professora Doutora Carla Cruz, orientadora desta dissertação, expresso o meu profundo agradecimento pela infindável preocupação, disponibilidade, incentivo, apoio científico e amizade ao longo da execução deste projeto. Agradeço, também, à Professora Doutora Fani Sousa, coorientadora desta dissertação, pelo conhecimento, disponibilidade e vontade de ajudar, constantemente demonstrada ao longo deste ano.

Agradeço especialmente à Élia Mota pelos conhecimentos transmitidos na área laboratorial, paciência e apoio. Sem ela, jamais teria terminado esta dissertação.

Obrigado aos colegas do laboratório que carinhosamente apelido de “dispensa”. Agradeço a paciência que tiveram para me aturar sempre que fui fazer “monte” e ocupar o vosso espaço. Foram o meu “muro das lamentações”, uma fonte de alegria e um dos principais apoios. No entanto, de todas as pessoas presentes nesse laboratório, agradeço principalmente à Filipa Pires por toda a amizade demonstrada e por ser companhia constante independentemente das características da ocasião.

Aos meus colegas de laboratório, deixo também um agradecimento sentido. Zélia Proença, Diana Santos, Cyrille Feijó e Filipa Ramilo Gomes, obrigado por todos os momentos em que foram um ombro amigo, pela companhia diária e por todo o apoio que me deram.

Ao José Pires, agradeço o apoio e demonstrado e por me aguentar independentemente do meu estado de espírito.

Agradeço imenso à minha irmã Jéssica por todo o apoio, paciência e carinho. Por fim, muito obrigado aos meus pais por todos os sacrifícios feitos, seja pela parte económica ou pelo simples facto de ouvirem os meus desabafos.



## Abstract

In the last years, the use of plasmid DNA (pDNA) in gene therapy or DNA vaccines has been proved to be a tool with potential application in the treatment of diseases. Since this approach uses non-viral vectors, it is safer in terms of oncogene activation and it presents a decrease of the immune system response.

In this way, the pharmaceutical industry needs to obtain pDNA in larger quantities and free of contaminants (RNA, genomic DNA, endotoxins, proteins). A technique that allows purifying pDNA is affinity chromatography (AC). This method is based in specific interactions between ligands and the pDNA, allowing the elimination of some purification steps. The use of amino acids as affinity ligands has proven to be a promising approach to purify nucleic acids, since it is based on the amino acid-nucleotide biospecificity.

L-histidine and L-arginine allowed isolating the supercoiled isoform (sc) of the pDNA, indicating the presence of specific interactions between the pDNA and the amino acids. In this work are presented the results of three ligands, L-tyrosine and the dipeptides L-tyrosine-L-tyrosine and L-tyrosine-L-arginine. The dipeptides were synthesized using chemical synthesis, which involves the protection of the amine group and the carboxylic group of each amino acid, the formation of the peptide bond and, finally, deprotection using TFA (trifluoroacetic) acid. Then, the ligands were immobilized in the Sepharose CL-6B through their activation by epoxide formation with 1,4-butanediol diglycidyl ether. The support was characterized by HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) NMR (nuclear magnetic resonance).

The STD-NMR (saturation transfer difference- nuclear magnetic resonance) technique allowed identifying the preferential groups of the 5' -mononucleotides that interact with the supports Sepharose-L-tyrosine, Sepharose-L-tyrosine-L-tyrosine and Sepharose-L-tyrosine-L-arginine supports. By the SPR (surface plasmon resonance) biosensor, the affinity towards the isoforms of pVAX1-*LacZ* is determined at temperatures 10°C and 25°C, and using different buffers (Tris-HCl 10 mM e Hepes acid 10 mM). Thus, STD-NMR and SPR techniques allow us to screening of the binding affinity of these ligands to plasmid isoforms for their future application in AC.

## Key words

plasmid DNA; pVAX1-*LacZ*; L-tyrosine; L-tyrosine-L-tyrosine; L-tyrosine-L-arginine; affinity chromatography; STD-NMR; SPR



## Resumo

Nos últimos anos, a aplicação de DNA plasmídeo (pDNA) em terapia génica ou vacinas de DNA tem-se revelado uma ferramenta com potencial aplicação no tratamento de inúmeras doenças. Uma vez que esta abordagem recorre a vetores não-virais, é mais segura em termos de ativação de oncogenes e apresenta uma diminuição de reações do sistema imunitário. Deste modo, a indústria farmacêutica procura obter pDNA em maiores quantidades e isento de contaminantes (RNA, DNA genómico, endotoxinas, proteínas). Uma técnica que permite purificar o pDNA é a cromatografia de afinidade (AC). Esta metodologia baseia-se em interações específicas entre ligandos e o pDNA, permitindo a eliminação de alguns passos de purificação. A utilização de aminoácidos como ligandos de afinidade revelou ser uma abordagem promissora para purificar ácidos nucleicos, pois baseia-se na bioespecificidade aminoácido-nucleótido. A L-histidina e a L-arginina permitiram isolar a isoforma superenrolada (sc) do pDNA, indicando a presença de interações específicas entre o pDNA e os aminoácidos. Neste trabalho são apresentados os resultados de três ligandos, a L-tirosina e os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina. Os dipeptídeos foram sintetizados de acordo com o método clássico de síntese química, que envolve a proteção do grupo amina e do grupo carboxílico de cada aminoácido, e posterior formação da ligação peptídica e por fim desproteção usando TFA (ácido trifluoracético). De seguida, os ligandos foram imobilizados na *Sepharose* CL-6B através da ativação dos grupos epóxi com o reagente 1,4-butanediol diglicidil éter. O suporte foi caracterizado por HR-MAS (Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico) RMN. A técnica de STD-RMN (Diferença da Transferência de saturação por ressonância magnética nuclear) permitiu identificar os grupos preferenciais dos 5'-mononucleótidos que interagem com os suportes *Sepharose*-L-tirosina, *Sepharose*-L-tirosina-L-tirosina e *Sepharose*-L-tirosina-L-arginina. Utilizando a técnica de RPS (Ressonância Plasmónica de Superfície), foi analisada a afinidade de cada um dos ligandos em estudo em relação a cada uma das isoformas de pVAX1-*LacZ* a diferentes temperaturas ( $T=10^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ ) e usando diferentes tampões (Tris-HCl 10 mM e Hepes ácido 10 mM). Desta forma, a utilização das técnicas STD-RMN e SPR permitiu fazer o *screening* das interações dos suportes-5'-mononucleótidos e determinar a afinidade do complexo ligando: pDNA, para futura aplicação em AC.

## Palavras-Chave

DNA plasmídeo; pVAX1-*LacZ*; L-tirosina; L-tirosina-L-tirosina; L-tirosina-L-arginina; cromatografia de afinidade; STD-NMR; SPR;



# Índice

|  |    |
|--|----|
| <i>Capítulo 1: Introdução</i> .....  | 1  |
| 1.1- Aplicação terapêutica de DNA plasmídeo (pDNA) .....   | 1  |
| 1.1.1. Estrutura do pDNA.....  | 1  |
| 1.1.2. pDNA como vetor .....   | 3  |
| 1.1.3. Produção e Purificação de pDNA.....   | 4  |
| 1.1.4. Técnicas Cromatográficas para a Purificação do pDNA.....  | 7  |
| 1.2 Cromatografia de Afinidade (AC).....   | 10 |
| 1.3 Desenvolvimento do ligando (dipeptídeo) .....  | 14 |
| 1.3.1. Síntese química do ligando .....  | 14 |
| 1.4 Técnicas de análise de interação do suporte com pDNA.....  | 16 |
| 1.4.1. Diferença da Transferência de Saturação por Ressonância Magnética Nuclear (STD-RMN) .....   | 16 |
| 1.4.2. Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS RMN) .....   | 17 |
| 1.4.3. Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS) .....  | 17 |
| <i>Capítulo 2: Materiais e Métodos</i> .....   | 19 |
| 2.1. Síntese química do ligando L-tirosina-L-tirosina .....  | 19 |
| 2.1.1. Síntese química do intermediário L-tirosina metil ester .....   | 19 |
| 2.1.2. Síntese química do intermediário Boc-L-tirosina .....   | 20 |
| 2.1.3. Síntese química do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina protegido.....  | 21 |
| 2.1.4. Síntese química do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina.....  | 22 |
| 2.2. Imobilização da L-tirosina, L-tirosina-tirosina e L-tirosina-L-arginina na Sepharose CL-6B.....   | 23 |
| 2.2.1. Interação dos suportes Sepharose-L-tirosina, Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina por STD-RMN com 5´-mononucleótidos ..... | 24 |
| 2.2.2. Caracterização dos suportes através de HR-MAS RMN.....  | 25 |
| 2.3. Produção e purificação do plasmídeo pVAX1-LacZ.....   | 25 |
| 2.3.1. Cultura de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ para produção de pDNA .....  | 25 |
| 2.3.2. Lise celular e purificação do plasmídeo pVAX1-LacZ.....   | 26 |
| 2.3.3. Electroforese de agarose.....   | 27 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3.4 Preparação das diferentes isoformas do plasmídeo pVAX1-LacZ.....   | 27        |
| 2.4. Análise da interação das isoformas do plasmídeo pVAX1-LacZ com L-tirosina e os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina .....  | 27        |
| 2.4.1. Imobilização dos ligandos no chip CM5 .....   | 288       |
| 2.4.2. Ensaio de afinidade das isoformas do plasmídeo pVAX1-LacZ com os ligandos L-tirosina e os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina imobilizados na superfície do chip CM5..... | 289       |
| <i>Capítulo 3: Resultados e Discussão .....</i>  | <i>31</i> |
| 3.1. Síntese química dos ligandos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina.....   | 31        |
| 3.2. Análise da afinidade das isoformas do plasmídeo pVAX1-LacZ com os ligandos por Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS).....  | 33        |
| 3.2.1. Imobilização dos ligandos no chip CM5 .....   | 33        |
| 3.2.2. Ensaio de afinidade entre as isoformas do plasmídeo e os ligandos .....   | 34        |
| 3.3. Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS RMN).....  | 37        |
| 3.4. Análise da interação entre os suportes Sepharose-L-tirosina, Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina e os 5'-mononucleótidos por STD-RMN .....                          | 38        |
| <i>Capítulo 4: Conclusão .....</i>   | <i>47</i> |
| <i>Capítulo 5: Perspectivas Futuras .....</i>  | <i>49</i> |
| <i>Bibliografia .....</i>  | <i>50</i> |

## Lista de Acrónimos

|                    |  |
|--------------------|--|
| 5'-AMP             | Adenosina 5'-monofosfato                     |
| 5'-CMP             | Citidina 5'-monofosfato                      |
| 5'-GMP             | Guanosina 5'-monofosfato                     |
| 5'-TMP             | Timina 5'-monofosfato                        |
| AC                 | Cromatografia de afinidade                   |
| AEC                | Cromatografia de troca-aniónica              |
| ArH                | Grupo aromático                              |
| Boc                | Dicarbonato de di-tert-butil                 |
| CDCl <sub>3</sub>  | Clorofórmio Deuterado                        |
| CH <sub>3</sub> OH | Metanol                                      |
| D                  | Dimensão                                     |
| DCC                | dicilohexilcarbodiimida                      |
| DCU                | Dicicloureia                                 |
| Dmb                | 2,4-dimetoxibenzil                           |
| DMSO               | Dimetilsulfóxido                             |
| DNA                | Ácido desoxirribonucleico                    |
| DO <sub>600</sub>  | Densidade ótica a 600 nm                     |
| E. coli            | Escherichia Coli                             |
| EDC                | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida |
| EDTA               | Ácido etilenodiamino tetras-acético          |
| Fm                 | 9-fluorenilmetil                             |
| Fmoc               | cloroformato-9-fluorenilmetila               |
| g                  | grama  |
| gDNA               | DNA genómico                                 |
| GST                | glutathione-S-transferase                    |
| h                  | Hora   |

|           |  |
|-----------|--|
| HCl       | Ácido clorídrico   |
| HIC       | Cromatografia de interação hidrofóbica                   |
| HR-MAS    | Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico |
| Hz        | hertz  |
| IMAC      | Cromatografia de afinidade com metal imobilizado         |
| $K_A$     | Constante de equilíbrio de associação                    |
| kbp       | Quilo pares de bases                                     |
| $K_D$     | Constante de equilíbrio de dissociação                   |
| $k_{off}$ | Constante velocidade cinética de dissociação             |
| $k_{on}$  | Constante velocidade cinética de associação              |
| ln        | linear   |
| LPS       | lipopolissacarídeo                                       |
| M         | Massa molar (g/mol)                                      |
| mg        | miligramas   |
| min       | minuto   |
| mL        | mililitro  |
| NaCl      | Cloreto de sódio   |
| NaOH      | Hidróxido de sódio                                       |
| NHS       | N-hidroxisucinimida                                      |
| nm        | nanometro  |
| oc        | circular aberta  |
| pDNA      | DNA plasmídeo  |
| ppm       | Partes por milhão  |
| RNA       | Ácido ribonucleico                                       |
| rRNA      | RNA ribossômico  |
| mRNA      | RNA mensageiro   |
| RPLC      | Cromatografia de fase reversa                            |
| rpm       | Rotação por minuto                                       |

|                   |   |
|-------------------|---|
| RPS               | Ressonância plasmônica de superfície          |
| RU                | Unidade de Ressonância                        |
| s                 | segundos                                      |
| sc                | superenrolado                                 |
| SDS               | Dodecil sulfato de sódio                      |
| SEC               | Cromatografia de exclusão molecular           |
| SOCl <sub>2</sub> | Cloreto de tionilo                            |
| SPPS              | Síntese do Peptídeo em Fase Sólida            |
| STD               | Diferença de Trânsferência de Saturação       |
| TFA               | Ácido trifluoroacético                        |
| THAC              | Cromatografia de afinidade de tritipla-hélice |
| THF               | Tetrahidrofurano                              |
| Tris              | tris(hidroximetil)aminometano                 |
| UV                | Ultravioleta                                  |
| v                 | volume  |
| WHO               | Organização Mundial de Saúde                  |
| ZF                | Zinc-Finger                                   |
| µg                | micrograma                                    |
| µL                | microlitro                                    |
| °C                | Celsius                                       |

# Capítulo 1: Introdução

## 1.1- Aplicação terapêutica de DNA plasmídeo (pDNA)

Atualmente doentes com fibrose cística, malária, hepatite B, problemas cardiovasculares ou com doenças de origem neoplásica, entre outras, veem na terapia génica ou em vacinas de DNA uma nova oportunidade de cura ou diminuição de sintomas crónicos associados a estas mesmas doenças<sup>[1][2]</sup>. Apesar de em alguns estudos clínicos em humanos não serem obtidos os resultados desejados, demonstrando que este tipo de vacinas para humanos poderá ter ainda uma baixa imunogenicidade, estes mesmos estudos provaram também, que o uso de pDNA como vetor não-viral, é na realidade, uma forma segura de imunização havendo uma diminuição da probabilidade de ocorrer ativação de oncogenes ou reações a nível de sistema imunológico. É necessário salientar que já existem vacinas de pDNA aprovadas, desde 2005, para uso em medicina veterinária, particularmente em doenças como: melanoma canino ou infeção por vírus do nilo ocidental<sup>[2]</sup>. Logo, irrefutavelmente, o DNA tornou-se crucial na área terapêutica, permitindo uma entrega eficiente e segura de genes no alvo terapêutico. Tendo em vista estas vantagens, o pDNA passou a ser objeto de investigação na biotecnologia farmacêutica, visto haver uma necessidade de o obter cada vez mais purificado e em larga escala, respeitando as normas de agências reguladoras, e utilizando processos que sejam eficazes, rápidos e de baixo custo<sup>[3]</sup>.

Este tipo de vetor bacteriano, consiste numa pequena molécula de DNA de dupla hélice circular que se encontra no citosol da bactéria hospedeira, tendo uma capacidade de replicação independente do genoma desta. Apesar de ocorrer de forma espontânea em bactérias, pode ser modificado através de técnicas de engenharia genética, inserindo genes de interesse para expressar determinadas proteínas (uma vez que o pDNA contém zonas promotoras e de regulação) e pode ser inserido num hospedeiro bacteriano, que por sua vez o irá passar às células-filhas durante a divisão celular<sup>[4]</sup>. Esta incorporação do plasmídeo modificado (ou seja, plasmídeo recombinante) no hospedeiro dá-se através de um processo chamado transformação em que as células são previamente sujeitas a um conjunto de condições que as tornam competentes e capazes de receberem este DNA. Por métodos de seleção, como genes de resistência a antibióticos, eliminam-se as bactérias que não foram transformadas e aquelas que contêm o gene de interesse são colocadas em cultura de forma a conseguir obter grandes quantidade de biomassa com o DNA recombinante<sup>[5]</sup>.

### 1.1.1. Estrutura do pDNA

Como todas as moléculas de DNA de cadeia dupla, um plasmídeo é constituído por duas cadeias lineares de desoxirribonucleótidos antiparalelas e ligadas entre si por pontes de hidrogénio estabelecidas entre purinas e pirimidinas complementares. No caso particular do

pDNA, as duas extremidades da dupla cadeia de DNA encontram-se ligadas covalentemente, isto é, os dois esqueletos fosfodiéster encontram-se intactos, formando, assim, um loop fechado, o que lhe permite ter forma circular. O tamanho desta molécula pode variar entre 1 a 1000 quilo pares de bases (kbp) e pode adquirir diferentes conformações (isoformas) que variam na sua estabilidade<sup>[5][6][7]</sup>.

As principais conformações (figura 1) do pDNA são o superenrolado (sc), circular aberto (oc) e linear (ln). A forma superenrolada advém do facto do eixo da hélice se conseguir enrolar no espaço formando uma conformação com alto nível de organização estrutural, compacta e funcional bastante eficaz para replicar ou induzir expressão de genes<sup>[4][6][8][9]</sup>. A quebra, química ou enzimática, de uma ligação fosfodiéster numa das cadeias vai permitir que a cadeia quebrada rode sobre a cadeia intacta, deixando de haver qualquer superenrolamento. O resultado é uma molécula com uma forma circular, denominada por circular aberta (oc). Por sua vez, uma isoforma circular aberta diz-se relaxada se não existir qualquer quebra nas cadeias do DNA. Quando o corte ocorre em ambas as cadeias da dupla hélice, o pDNA adquire uma conformação linear (ln). Esta última situação pode suceder-se quando o plasmídeo é armazenado a temperatura ambiente com um pH entre 7,5 e 8,5 <sup>[8]</sup>. Quando ocorre um desemparelhamento das duas cadeias complementares, a molécula assume uma conformação desnaturada. A quebra das pontes de hidrogénio que ligam as duas cadeias (desnaturação) pode ocorrer pelo aumento de temperatura, por ação de nucleases ou ainda pela existência de sequências na dupla hélice, denominadas *hot spots*, que favorecem a separação das duas cadeias.

Regra geral, plasmídeos obtidos a partir de fermentação em *E. coli* estão, na sua maioria, na isoforma sc, no entanto podem igualmente surgir as restantes isoformas. A conformação linear (ln) é a que apresenta menor aplicação em termos terapêuticos, uma vez que pode sofrer uma degradação intracelular mais rápida e aumentar o risco de eventos de recombinação com o DNA genómico (gDNA)<sup>[10]</sup>.

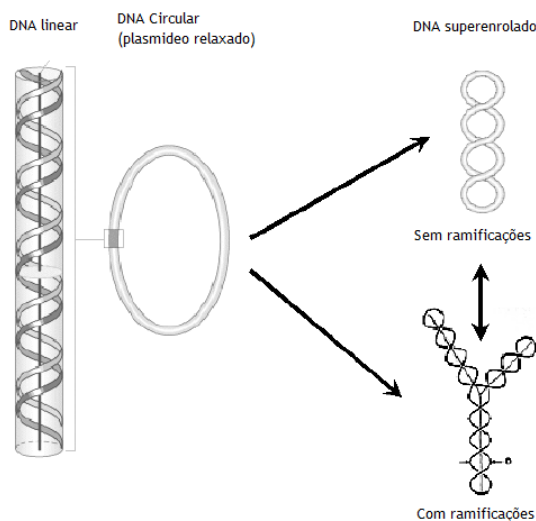
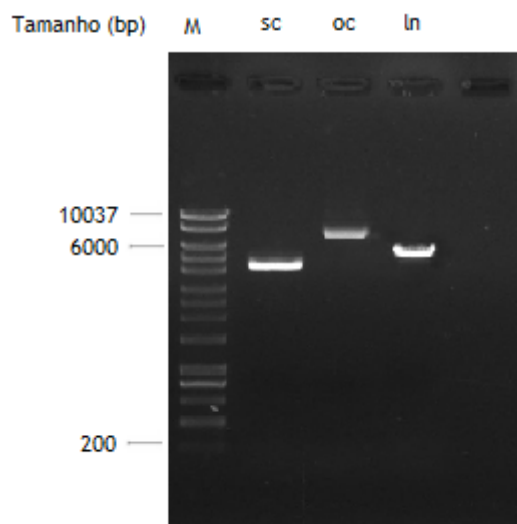


Figura 1: Diferentes isoformas de pDNA: Linear (ln), Circular aberto (oc) e Superenrolado (sc) (Adaptado de <sup>[11]</sup>).

É possível observar estas diferentes isoformas do mesmo plasmídeo recorrendo a electroforese em géis de agarose. Devido à sua natureza polianiónica, as moléculas de DNA migram em direção ao ânodo (carregado positivamente). Por outro lado, e uma vez que o gel de agarose é poroso, as moléculas mais compactas e com tamanho mais pequeno irão migrar mais quando sujeitas a aplicação de um campo elétrico<sup>[5]</sup>. Assim, a isoforma superenrolada, sendo a mais compacta de todas as isoformas, migra mais, seguida da isoforma linear, enquanto a conformação circular aberta surge mais próxima do pólo negativo.



**Figura 2:** Eletroforese obtida para as isoforma sc, isoforma oc e isoforma ln a partir de amostras obtidas de lisados purificados aplicados nos ensaios de biosensor Biacore T200. Marcador utilizado: HyperLadder™.

### 1.1.2. pDNA como vetor

Um vetor é uma molécula de DNA que permite fazer clonagem de um gene de interesse e servir como veículo de expressão de proteínas em células eucariotas ou procariotas. O gene que se pretende clonar é introduzido num vetor, que é inserido numa célula hospedeira sem ser integrado no genoma do hospedeiro, tendo por isso uma replicação independente<sup>[4][5]</sup>. Existem vetores virais (como os fagos) e não-virais (como plasmídeos), sendo estes últimos mais seguros e fáceis de manipular<sup>[1][5]</sup>. A maioria dos vetores não-virais é produzida no hospedeiro *E. coli* que é uma bactéria amplamente estudada com o genoma conhecido, fácil de transformar e que tem elevado rendimento a nível de produção de biomassa. O principal vetor usado nesta bactéria permite a clonagem de fragmentos de DNA com tamanho até  $10^3$  pares de base. A sua estrutura contém vários elementos essenciais, como a origem de replicação, que origina um elevado número de cópias (500-700 cópias por célula) e permite, assim, obter um rendimento elevado de pDNA; uma marca de seleção bacteriana, de resistência a um antibiótico (e.g., canamicina); um local de clonagem múltipla a jusante do promotor, em que há sequências de reconhecimento para diferentes tipos de enzimas de

restrição; uma sequência de poliadenilação, que estabiliza os transcritos e aumenta a eficiência do promotor e um promotor eucariótico forte, normalmente de origem viral. Para confirmar a inserção do DNA no vetor, o local de clonagem múltipla está localizado no interior da sequência de um gene que expressa uma proteína cuja atividade origina um produto corado e possibilita a sua visualização. Como exemplo, pode ser descrito o caso do gene codificante para a  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*), uma enzima que permite converter um substrato cromogénico específico num substrato de cor azul. Desta forma, se o vetor não se encontrar clonado com o gene de interesse, a bactéria hospedeira irá apresentar cor azulada[5], no caso da clonagem ser bem sucedida a colónia de *E. coli* apresenta cor branca. Um vetor indicado para a *E. coli* e atualmente comercializado é o pVAX1-*LacZ* (figura 3). Este vetor tem um tamanho de 6,1 kbp, apresenta o gene de resistência a canamicina (para que se possa fazer a seleção das bactérias recombinantes) e tem apresentado alto rendimento durante o processo de replicação (Invitrogen Catalog. no. V260-20).

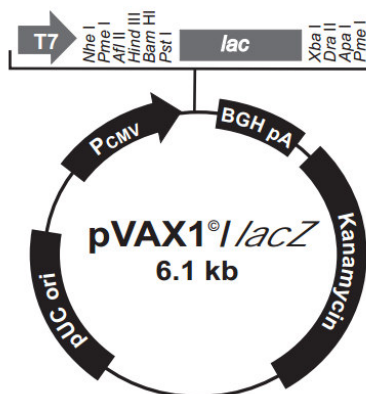
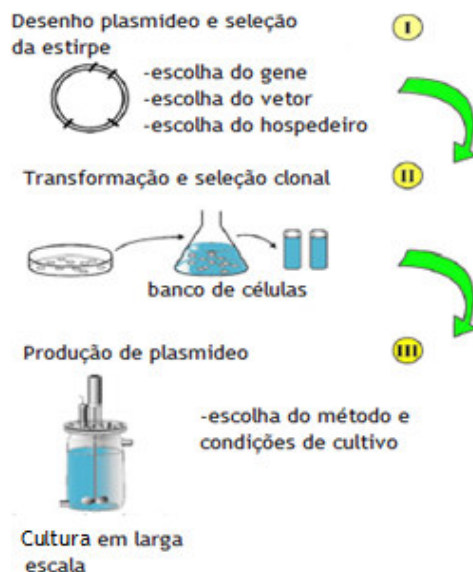


Figura 3: Esquema do vetor pVax1-LacZ (adaptado de Invitrogen Catalog. no. V260-20).

### 1.1.3. Produção e Purificação de pDNA

A produção recombinante de um plasmídeo para aplicação em terapia génica ou como vacina de DNA, inicia-se com uma etapa de desenho e construção do vetor, passando posteriormente pela transformação do hospedeiro, seguido da produção do plasmídeo e por fim a sua purificação<sup>[7]</sup>.



**Figura 4:** As três primeiras etapas para a criação de um produto que tem como base pDNA, neste caso uma vacina de pDNA (Adaptado de [7]).

Como foi referido anteriormente, o hospedeiro bacteriano mais utilizado é a *E.coli* para a produção de plasmídeos, que após sofrer transformação é cultivada em meios de fermentação com condições de pH e temperatura ideais para que se consiga atingir um elevado rendimento ao nível de biomassa (figura 4). Durante este processo, a conformação do pDNA é mantida predominantemente na forma superenrolada. Contudo, durante a manipulação associada à fermentação, purificação e armazenamento, uma parte destas moléculas sofre cortes de cadeia simples ou dupla, formando assim, espécies circulares abertas e lineares, respetivamente. Desta forma, e posteriormente, torna-se essencial promover a separação destas espécies e eliminar outros contaminantes para obter pDNA superenrolado de elevada pureza.

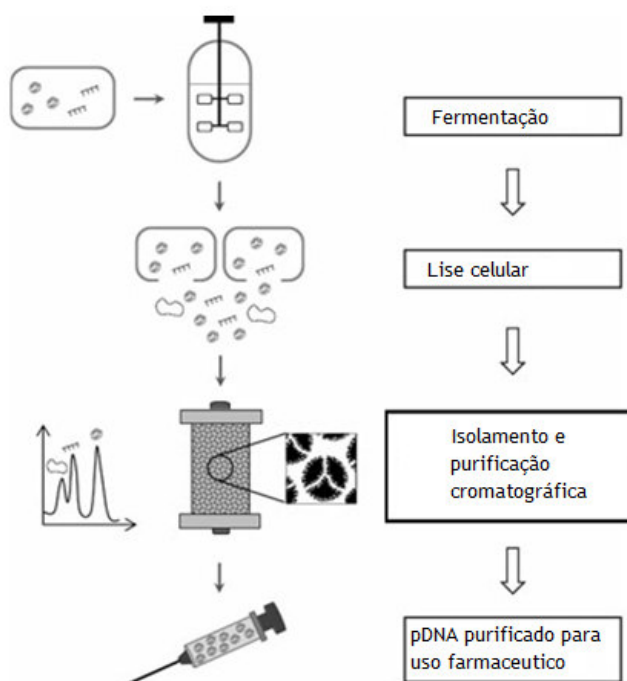
A extração do pDNA é frequentemente realizada através de lise alcalina seguida de neutralização. A maior parte dos contaminantes que advêm dessa lise têm características químicas semelhantes ao plasmídeo, nomeadamente a carga negativa (RNA, endotoxinas, gDNA), tamanho (endotoxinas, gDNA) ou hidrofobicidade (endotoxinas, gDNA)<sup>[9][12][13]</sup>. A remoção de endotoxinas é muito importante tendo em conta que estes componentes podem provocar síndrome de choque tóxico<sup>[6]</sup>. Uma vez que a isoforma sc tem maior interesse do ponto de vista farmacêutico vai haver necessidade de separar esta isoforma das restantes. A agência reguladora americana, FDA (*Food and Drug Administration*) e a WHO (*World Health Organization*) (tabela 1) recomenda que as vacinas de DNA contenham mais de 80% do plasmídeo na sua conformação sc<sup>[12]</sup>. Esta recomendação é baseada na perceção de que a isoforma sc tem uma atividade biológica superior, quando comparada com outras isoformas<sup>[4][6][8][9]</sup>. Empiricamente é expectável que a molécula superenrolada, mais

compacta, seja mais estável e que possibilite mais eficientemente a transfecção de células-alvo.

**Tabela 1:** Constituição do lisado que se obtém a partir da E.coli e os níveis de pureza exigidos pelas diferentes agências reguladoras: a FDA e a WHO (adaptado de [12]).

| <i>Constituição do lisado bacteriano:</i>                                  |  | <i>Produto Final</i>                                     |  |
|--|--|--|--|
|  |  | <i>Problemas</i>   | <i>Níveis de referência</i>  |
| 55% Proteínas<br>3% LPS<br>3% gDNA genómico<br><3% Plasmídeo<br>15% Outros | 21% RNA:<br>-53% 23S rRNA<br>-27% 16S rRNA<br>-2% 5S rRNA<br>-14% tRNA<br>-4% mRNA | Endotoxinas<br>gDNA<br>RNA<br>Proteínas<br>%sc sobre %oc | <10 E.U./mg pDNA<br><2µg/mg pDNA<br><0,2µg/mg pDNA<br><3µg/mg pDNA<br>>97% |

Por conseguinte, são necessários vários passos de purificação para obtenção da isoforma sc, sendo que as técnicas cromatográficas são apontadas como cruciais na purificação ou quantificação do pDNA<sup>[7][9]</sup>. A figura 5 esquematiza os passos que se seguem à fermentação, para que se possa obter um produto passível de ser usado com fins farmacêuticos.



**Figura 5:** Extração e purificação do pDNA (Adaptado de<sup>[13]</sup>).

No entanto, a quantidade dos contaminantes obtidos após a lise alcalina, pode ser diminuída antes do uso de técnicas cromatográficas, por exemplo, no caso da remoção de RNA, podem ser utilizadas enzimas que promovem a sua clivagem, como a RNase<sup>[12]</sup>. Pode também recorrer-se a passos de purificação usando métodos não-cromatográficos, tais como: sistema de extração de duas fases aquosas, filtração tangencial ou precipitação seletiva através de isopropanol, polietileno glicol (PEG), sais caotrópicos, entre outros<sup>[6][14]</sup>. No entanto, para

conseguir respeitar todas as exigências feitas por parte das agências reguladoras, há uma preferência pelos métodos cromatográficos devido à sua robustez, aplicabilidade e menores custos de manipulação [14].

#### 1.1.4. Técnicas Cromatográficas para a Purificação do pDNA

As técnicas cromatográficas exploram as diferentes propriedades das moléculas (carga, tamanho ou hidrofobicidade) para promover a sua separação numa amostra complexa. Apesar de cada uma das técnicas apresentar algumas limitações, estas podem ser superadas com soluções simples e acessíveis (Tabela 2). Por conseguinte, a cromatografia é amplamente usada na purificação do pDNA[6].

**Tabela 2:** Limitações e soluções de técnicas cromatográficas para a purificação de pDNA (adaptado de [6]).

| <i>Limitações</i>  | <i>Soluções</i>  |
|--|--|
| Semelhanças físicas e químicas entre as impurezas e pDNA pode levar a menos seletividade e co-eluição das impurezas com o pDNA.  | Diminuir a quantidade de impurezas antes da cromatografia (através de técnicas como: precipitação seletiva com sais; filtração tangencial).  |
| Alta viscosidade das soluções de alimentação que pode levar a maior queda de pressão e a taxas de fluxo baixas.  | -Evitar a formação de grânulos;<br>-Diluir a amostra aplicada ou usar tecnologias de leito expandido.  |
| pDNA e RNA de alto peso molecular ou grande tamanho e pequenos poros da matriz provocam:<br>-Baixos coeficientes de difusão;<br>-Picos de eluição largos e baixa recuperação;<br>-Baixa taxa de fluxo, longos tempos de separação;<br>- Menor capacidade de retenção de pDNA devido à falta de acessibilidade. | -Compactar pDNA;<br>-Diminuir o tamanho do grânulo;<br>-Uso de grânulos com superporos;<br>-Uso de camadas de membranas e monólitos;<br>-Pré-digestão de RNA de alto peso molecular com RNase. |

As técnicas cromatográficas mais utilizadas na purificação do pDNA são: **cromatografia de troca-aniónica (AEC)**, **cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)**, **cromatografia de exclusão molecular (SEC)**, **cromatografia de fase reversa (RPLC)** e **cromatografia de afinidade (AC)**[6][7][9][12][14].

- **Cromatografia de troca-aniónica (AEC)**

É uma das técnicas cromatográficas mais usadas na captura, purificação ou quantificação do pDNA dado que permite uma separação rápida dos componentes da amostra, utiliza volumes reduzidos de solventes e a regeneração das colunas pode ser realizada com hidróxido de sódio. Esta metodologia baseia-se na interação entre os grupos fosfatos do pDNA, carregados negativamente, e uma fase estacionária carregada positivamente[6][7][15]. A intensidade destas interações está relacionada com a densidade das cargas locais. Deste modo, a introdução de um gradiente de sal faz com que o pDNA elua em ordem crescente de densidade de carga, influenciado pelo comprimento da cadeia e isoforma[6][15].

É de salientar que a separação das isoformas pode ser conseguida, considerando que a isoforma sc apresenta uma densidade de carga local superior à isoforma oc, devido ao seu elevado grau de compactação. Por conseguinte, a isoforma sc elui depois da isoforma oc<sup>[6][15]</sup>. Esta técnica apresenta alguma seletividade para o pDNA na presença de outros contaminantes como RNA, endotoxinas ou resíduos de proteínas, apesar de no caso das endotoxinas existir o problema de por vezes estas co-eluírem com o pDNA<sup>[6][12]</sup>.

- **Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)**

A cromatografia de interação hidrofóbica explora as diferenças de hidrofobicidade entre o pDNA e os restantes contaminantes do lisado, para promover a separação dos componentes. Desta maneira, é possível separar pDNA das impurezas mais hidrofóbicas (RNA, gDNA, oligonucleótidos e pDNA desnaturado). Na presença de elevadas concentrações de sal, como o sulfato de amónio, o pDNA que apresenta uma estrutura em dupla hélice, pode ter as bases hidrofóbicas menos expostas, o que faz com que seja o primeiro a eluir tendo em atenção que a interação hidrofóbica com a fase estacionária da HIC é mais fraca. A cadeia simples dos ácidos nucleicos das impurezas pode permitir que se estabeleçam ligações mais fortes com os ligandos hidrofóbicos<sup>[6][16]</sup>, favorecendo a sua retenção. No caso das endotoxinas, estas são altamente hidrofóbicas quando comparadas com o pDNA, logo também ficam retidas na matriz por mais tempo<sup>[16]</sup>.

- **Cromatografia de exclusão molecular (SEC)**

A cromatografia de exclusão molecular separa os contaminantes do pDNA tendo em conta a diferença de tamanho. Este não é o método preferencial para ser usado como passo inicial de purificação, mas permite a separação do pDNA de RNA, DNA genómico e endotoxinas. Dependendo da matriz selecionada e da sua gama de fracionamento, esta metodologia também pode permitir separar a isoforma sc das restantes, uma vez que devido ao superenrolamento do plasmídeo, este apresenta um raio hidrodinâmico diferente<sup>[7]</sup>. Nesta técnica as primeiras espécies a eluir são os contaminantes com maior peso molecular (como o gDNA, multímeros de pDNA e pDNA oc), eluindo a isoforma sc após a saída do pDNA oc<sup>[6]</sup>. O RNA por apresentar uma menor dimensão elui no final do ensaio cromatográfico.

Contudo, este método apresenta a desvantagem de não ser possível obter resolução adequada quando se tenta separar ácidos nucleicos com elevado peso molecular ou conformações mais complexas, devido à falta de uma fase estacionária adequada. Todavia, este problema foi superado com o uso de um compósito de poliácridamida/dextrano, rígido e muito poroso, na fase estacionária<sup>[6]</sup>. Alguns estudos mostram também que a SEC em conjunto com a tecnologia de leito expandido (SMB) permitem a obtenção de um elevado rendimento de pDNA sc puro<sup>[7][17]</sup>.

- **Cromatografia de fase reversa (RPLC)**

Este tipo de cromatografia baseia-se na interação das regiões hidrofóbicas da molécula com os ligandos apolares imobilizados na fase estacionária<sup>[11]</sup>. As moléculas são eluídas por ordem crescente de hidrofobicidade (propriedade que vai depender do comprimento da cadeia, composição química e estrutura secundária). No caso de pDNA parcialmente desnaturado, o seu tempo de retenção é mais elevado, devido ao fato de apresentar uma maior exposição de bases hidrofóbicas. Uma maior exposição das bases hidrofóbicas ocorre também na presença de zonas ricas em AT (adenina-timina) ou na presença de oligonucleótidos de cadeia simples. Desta forma, quanto maior a exposição de bases hidrofóbicas maior o tempo de retenção. Por conseguinte, o esperado para RPLC é que o DNA de cadeia simples fique retido por mais tempo que o DNA de cadeia dupla e a isoforma oc elua antes da isoforma sc<sup>[6]</sup>.

A desvantagem desta técnica é a toxicidade e volatilidade dos solventes orgânicos que são necessários para os ensaios. Deste modo, recorre-se preferencialmente à cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) que explora a hidrofobicidade dos ácidos nucleicos, sem utilizar solventes orgânicos<sup>[7][11]</sup>.

- **Cromatografia de afinidade (AC)**

A cromatografia de afinidade baseia-se no reconhecimento molecular tendo por base a estrutura química da molécula que se pretende purificar. Devido à sua seletividade, a AC tem a vantagem de permitir a eliminação de várias etapas do processo de purificação do pDNA, aumentando os rendimentos e diminuindo custos. No entanto, existem algumas limitações em termos de robustez, interação e seletividade dos ligandos dos suportes de afinidade havendo necessidade de desenvolver novos ligandos com maior capacidade de ligação e durabilidade<sup>[7]</sup>. Esta técnica cromatográfica vai ser mais detalhada no ponto “1.2 Cromatografia de afinidade”.

A escolha da técnica cromatográfica a utilizar depende das impurezas bem como da quantidade de pDNA que é necessário purificar, tendo sempre em atenção as vantagens e desvantagens de cada uma das técnicas<sup>[6]</sup> (Tabela 3). Mas, independentemente da técnica cromatográfica utilizada, o rendimento desta, depende em parte, da escolha da matriz e do ligando. No caso da matriz, esta deve ser inerte para não influenciar as interações entre o ligando e a biomolécula. Esta fase estacionária deve apresentar uma consistência sólida, porosa, impedir adsorção não específica, ter capacidade de ligação, manter as propriedades do fluxo durante os ensaios, ser de baixo custo, simples de usar, regenerar e reutilizar<sup>[6][13]</sup>.

A fase estacionária pode ser constituída por diferentes tipos de materiais: polímeros sintéticos (como derivados de poli(acrilamida)); materiais inorgânicos (hidroxiapatite, sílica entre outros); compósitos (metacrilato) e polímeros naturais (celulose, agarose, dextrano ou quitosano). Os polímeros naturais são muitas vezes usados na purificação de pDNA devido ao fato de apresentarem níveis baixos de adsorção não específica. No caso dos polímeros sintéticos, como são mais hidrofóbicos do que os naturais, é necessário revestir a superfície

para evitar perdas de pDNA; nos materiais inorgânicos, pode haver problemas com o fluxo e no caso dos compósitos permitem a aplicação de elevados fluxos sem que haja perda da capacidade de ligação do pDNA. Para melhorar o rendimento de purificação, por vezes, as matrizes acabam por ser uma mistura deste tipo de materiais<sup>[13]</sup>.

**Tabela 3:** Vantagens e desvantagens de algumas técnicas cromatográficas para purificação de pDNA (adaptado de <sup>[6]</sup>).

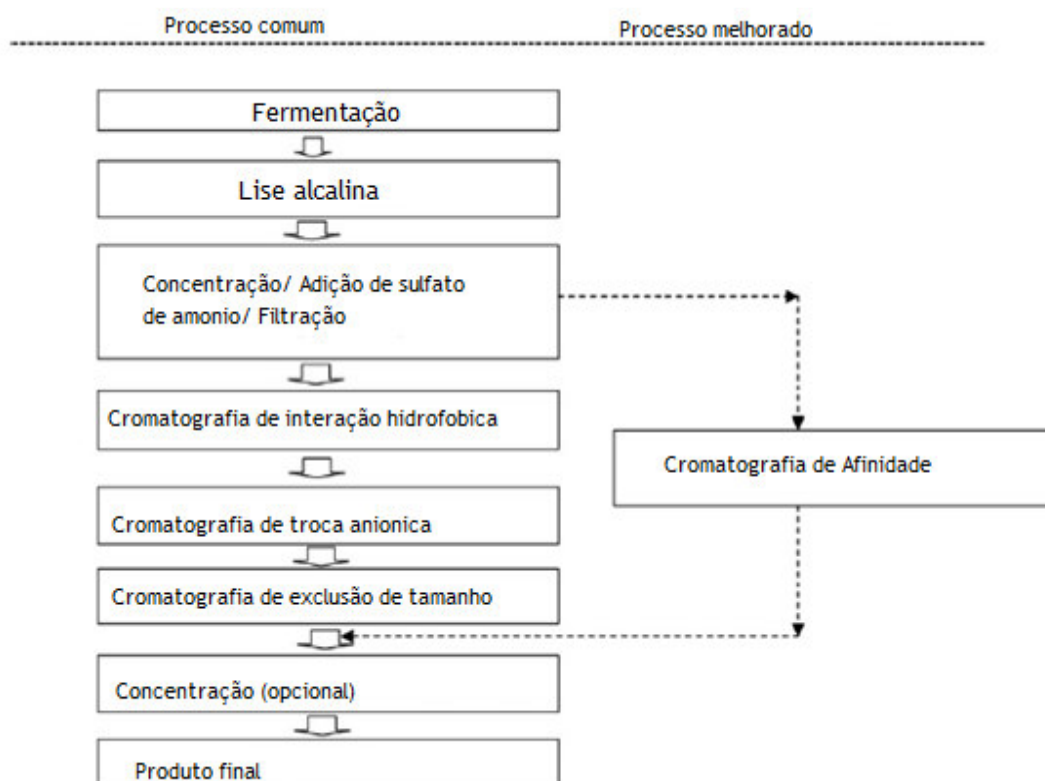
| <i>Cromatografia</i> | <i>Vantagens</i>  | <i>Desvantagens</i>  |
|----------------------|---|--|
| <u>SEC</u>           | -Separa endotoxinas, gDNA, RNA de baixo e alto peso molecular, oligonucleotidos, proteínas e isoformas de pDNA.   | -Baixos volumes de alimentação e baixas concentrações;<br>-Tempo de corrida longo para se obter grande resolução;<br>-Diluição do produto;<br>-Limitação no aumento de escala. |
| <u>AEC</u>           | -Concentração de pDNA;<br>-Rápido e simples;<br>-Remoção eficiente de impurezas com baixa densidade;<br>-Algumas fases estacionárias permitem a separação de isoformas de pDNA. | -Baixa capacidade;<br>-A co-eluição de pDNA com endotoxinas e RNA de elevado peso molecular;<br>-É difícil obter resolução para pDNA sc, outras isoformas, gDNA.               |
| <u>RPLC</u>          | -Eluição de pDNA em solventes voláteis;<br>-Separa impurezas do pDNA;<br>-Separa isoformas de pDNA.   | -Perda de integridade do pDNA;<br>-Problemas de segurança relacionados com os solventes;<br>-Processo demorado.  |
| <u>HIC</u>           | -Separa endotoxinas e ácidos nucleicos com uma cadeia simples;<br>-Certas fases estacionárias separam isoformas de pDNA;<br>Processo rápido.                                    | -Em algumas situações, o pDNA elui em altas concentrações de sal;<br>-Em alguns casos, o pDNA apresenta um grau de diluição considerável.                                      |

Em relação ao ligando, o fundamental é este apresentar uma afinidade e cinética indicada para que o pDNA possa ser capturado e depois eluído<sup>[18]</sup>. É de salientar que deve ser estável, não ser tóxico, específico para a biomolécula que se pretende purificar e ser inerte perante os outros componentes da mistura. Ao imobilizar-se um ligando numa matriz, consegue-se obter mais seletividade e especificidade para a biomolécula alvo, daí que os benefícios desta seletividade sejam aplicados à purificação do pDNA. Por vezes há inserção de um espaçador entre o ligando e a matriz com o intuito de melhorar o acesso ao ligando e impedir a interação com a matriz <sup>[13]</sup>.

## 1.2 Cromatografia de Afinidade (AC)

Esta técnica, como foi sumariamente descrito no tópico anterior, faz uso de interações específicas que ocorrem entre os ligandos imobilizados numa matriz e a biomolécula alvo que se encontra na fase móvel. Estes ensaios são realizados sob condições que favorecem a

ligação ao suporte, recuperando o pDNA após a aplicação de condições que favoreçam a sua eluição. Devido ao facto de esta técnica ser seletiva, a cromatografia de afinidade pode eliminar alguns passos da purificação (figura 6)<sup>[7][18]</sup>.



**Figura 6:** Técnicas aplicadas que podem ser eliminadas quando se utiliza a cromatografia de afinidade (adaptado de <sup>[18]</sup>).

Existem alguns subtipos deste tipo de cromatografia como a cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC), a cromatografia de afinidade de tripla-hélice (THAC), a cromatografia de afinidade com proteínas imobilizadas e a cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados.

- **Cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC)**

Nesta estratégia cromatográfica, as interações ocorrem entre os iões do metal imobilizado no suporte e a molécula alvo, provocando uma separação eficiente. Um dos suportes utilizados tem sido uma resina de ácido iminodiacético (IDA) carregado com  $\text{Cu}^{2+}$ . No caso da purificação de pDNA, esta é a biomolécula menos retida, enquanto o RNA e pDNA desnaturado se ligam mais fortemente ao suporte<sup>[6][7]</sup>. Na purificação de proteínas, a IMAC tem em conta a afinidade dos aminoácidos expostos à superfície (principalmente a histidina) para com os iões metálicos do suporte. Os resíduos de L-histidina expostos são fundamentais, sendo que são os azotos presentes no anel de imidazol que interagem preferencialmente com os iões metálicos<sup>[19]</sup>. Uma vez que as bases azotadas guanina e adenina apresentam na sua

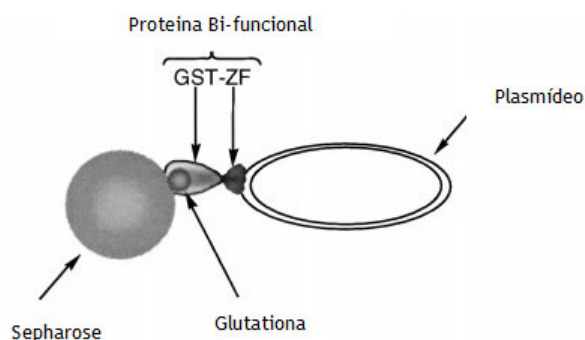
constituição anéis imidazol, os ácidos nucleicos em cadeia única também têm maior afinidade para os íons metálicos imobilizados nos suportes de IMAC. Desta forma, a técnica de cromatografia de afinidade com metal imobilizado é aplicada a purificação de ácidos nucleicos, nomeadamente pDNA, e proteínas<sup>[20]</sup>.

- **Cromatografia de afinidade de tripla-hélice (THAC)**

Esta técnica cromatográfica baseia-se na formação de pontes de hidrogénio entre a timina e a adenina ou entre a citosina protonada e a guanina, de forma a formarem o triplex TAT ou o triplex CGC<sup>+</sup>. Os nucleótidos do pDNA interagem com as bases complementares que se encontram no oligonucleótido biotilado ligado covalentemente a fase estacionária<sup>[6][7]</sup>. Um exemplo da aplicação desta técnica é a purificação do plasmídeo pXL2563, que contém a sequência poli-GAA. Neste caso, a sequência poli-GAA liga-se à sequência complementar CTT do oligonucleótido ligado covalentemente à coluna. Esta técnica pode ser aplicada a plasmídeos que contenham uma sequência específica e complementar ao oligonucleótido imobilizado, no entanto esta sequência terá de ser inserida previamente durante a construção do vetor<sup>[7]</sup>.

- **Cromatografia de afinidade com proteínas imobilizadas**

A cromatografia de afinidade com proteínas imobilizadas explora basicamente as interações de proteínas com o pDNA. Uma vez que a THAC estava limitada a certas sequências de DNA e apresentava uma cinética de ligação lenta, investigou-se o uso de sequências específicas de proteínas que interagem com o pDNA<sup>[6][21]</sup>. Um dos casos é a criação de uma proteína bi-funcional: o complexo glutatona *S*-transferase-Zinc Finger (complexo GST-ZF). Este complexo GST-ZF liga-se a um oligonucleótido que contém a sequência de reconhecimento específica de DNA. O oligonucleótido é previamente inserido no plasmídeo que se pretende purificar. Enquanto o domínio ZF reconhece a sequência no plasmídeo, a proteína GST interage com a glutatona imobilizada na Sepharose. Desta forma, permite a retenção do plasmídeo de interesse<sup>[22]</sup>.



**Figura 7:** Representação esquemática da cromatografia de afinidade com proteínas imobilizadas utilizando o complexo GST-ZF (adaptado de<sup>[22]</sup>).

- **Cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados**

Esta cromatografia tira benefícios da interação que ocorre entre os ácidos nucleicos e as proteínas. Baseia-se nas ligações que ocorrem naturalmente em sistemas biológicos<sup>[7]</sup>, e no conhecimento prévio das interações entre os aminoácidos e os nucleótidos, podendo aplicar-se à purificação do pDNA.

Nos últimos anos, os aminoácidos L-histidina, L-lisina e L-arginina<sup>[14][23][24][25]</sup> foram estudados como ligandos de AC para purificação da isoforma sc de vários plasmídeos. Para além da aplicação no processo de purificação de pDNA, os suportes de L-arginina e L-histidina também foram utilizados para purificar anticorpos como o IgG1 de rato<sup>[26]</sup>.

A L-histidina interage com proteínas, aminoácidos e catiões metálicos de formas diferentes. Estas diferentes interações fazem com que seja aplicado a biomoléculas diferentes como a purificação de pDNA sc, de RNA ou proteínas<sup>[3]</sup>. Na purificação de pDNA, após a injeção do lisado, a eluição ocorre através da aplicação de uma diminuição na concentração de sulfato de amónio (2,5 M a 0 M). Os resultados obtidos demonstraram uma forte ligação com o RNA, uma vez que tendo cadeia simples, apresenta uma maior exposição dos seus nucleótidos e facilita a interação. Por conseguinte, o RNA elui imediatamente após a eluição da isoforma sc, sendo que este suporte apresenta uma grande seletividade para esta isoforma. Devido a deformações provocadas pela torção da cadeia da isoforma sc, esta tem as bases mais expostas do que a isoforma oc. Desta forma a isoforma oc é a primeira a eluir e consegue-se uma separação entre a isoforma oc e a isoforma sc<sup>[25]</sup>.

No caso da L-lisina, o estudo permitiu comprovar que este suporte permite fazer a separação entre as diferentes isoformas de pDNA, a sc e a oc. As eluições foram realizadas usando tampões em que a percentagem de cloreto de sódio ia aumentando até atingir uma concentração final de 2 M. Verificou-se para este suporte, tal como no suporte de L-histidina, que a isoforma oc elui antes da eluição da isoforma sc<sup>[23]</sup>.

O suporte L-arginina foi testado sob condições de eluição em que houve um aumento gradual da concentração de cloreto de sódio. Para a L-arginina a ordem de eluição variou perante a que foi obtida para a L-histidina, pois da isoforma sc eluiu após o RNA ao usar-se uma concentração de 300mM de cloreto de sódio. Ainda neste estudo, a isoforma oc e o gDNA eluíram ambas á concentração de 240 mM de cloreto de sódio<sup>[27]</sup>. A ordem de eluição e as condições de interação utilizadas em cada um dos suportes L-histidina, L-lisina e L-arginina, encontram-se resumidas na tabela 4.

**Tabela 4:** Caracterização da interação de aminoácidos que funcionam como ligandos em cromatografia de afinidade (adaptado [24]).

| <i>Ligando aminoácido</i> | <i>Condições de interação</i>   | <i>Ordem de eluição</i>        |
|---------------------------|---|--------------------------------|
| <i>His</i>                | Altas concentrações de sal, promovem a retenção de ácidos nucleicos     | pDNA oc- gDNA-<br>pDNA sc-RNA  |
| <i>Arg</i>                | Ácidos nucleicos ligam-se à matriz em concentrações de sais mais baixas | pDNA oc- gDNA-<br>RNA- pDNA sc |
| <i>Lys</i>                | Ácidos nucleicos ligam-se à matriz em concentrações de sais mais baixas | pDNA oc- pDNA sc               |

Também suportes de derivados de aminoácidos têm sido utilizados na AC para purificar pDNA, nomeadamente o suporte de histamina que é um derivado da L-histidina<sup>[3][14]</sup>. O monólito de histamina foi estudado por dois métodos: um em que se usava um gradiente decrescente de sulfato de amónio e outro em que se recorria a um gradiente crescente de cloreto de sódio. O ensaio com melhores resultados foi aquele em que se utilizava cloreto de sódio, em que se obteve pVAX1-LacZ sc com 99% de pureza<sup>[28]</sup>.

Alguns dos aminoácidos têm na sua composição um anel aromático (como é o caso da L-fenilalanina, o L-triptofano e a L-tirosina), o qual pode promover ligações por empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com as bases do pDNA<sup>[3]</sup>.

### 1.3 Desenvolvimento do ligando (dipeptídeo)

Visto que os suportes de aminoácidos têm sido utilizados na AC para purificar o pDNA (tópico 1.2) permitindo obter maioritariamente a forma sc, ir-se-á explorar a utilização de dipeptídeos como ligandos de afinidade.

#### 1.3.1 Síntese química do dipeptídeo

A síntese geral de um dipeptídeo envolve a formação da ligação peptídica entre o grupo carboxilo de um aminoácido e o grupo amina do outro aminoácido, havendo libertação de uma molécula de água. A técnica clássica de síntese de dipeptídeos envolve a proteção do grupo amina do primeiro aminoácido antes de ativá-lo para poder reagir. Em relação ao grupo carboxílico, este deve ser transformado num éster ou num anidrido misto. O DCC (dicilohexilcarbodiimida) também pode ser utilizado para ativar o grupo carboxílico. Após o dipeptídeo estar formado, desprotege-se retirando-se os grupos protetores através de metodologias adequadas a cada aminoácido<sup>[29]</sup>.

Em geral utiliza-se o dicarbonato de di-tert-butil (Boc) ou o cloroformato-9-fluorenilmetila (Fmoc) entre outros, para proteger o grupo amina do aminoácido. Estes grupos protetores evitam a epimerização durante o *coupling* do dipeptídeo, facilitam a solubilidade e a sua

remoção após *coupling*, não afetam a integridade do péptido e evitam acilações adicionais [30].

O grupo carboxilo do segundo aminoácido pode ser protegido, por exemplo, com um grupo metil ou etil, benzil, 9-fluorenilmetil (Fm), sendo estes removidos com uma base. Também se podem usar outras substâncias, como é o caso do 2,4-dimetoxibenzil (Dmb), que já exigem que sejam removidas através ácidos [30].

O método de Merrifield, também chamado de Síntese do Peptídeo em Fase Sólida (SPPS), é outro exemplo de síntese de péptidos. Esta técnica inicia-se com a ligação do péptido à resina através do grupo carboxilo, sendo que este péptido já se encontra protegido no grupo amina. Essa ligação é feita com um “agente de ligação”, como a diisopropilcarbodiimida ou DCC, que forma a ligação amida com o suporte. Após este passo, o aminoácido protegido liga uma das extremidades à resina (através do grupo carboxílico do aminoácido). O passo seguinte consiste numa lavagem (com água) para retirar o excesso do reagente utilizado anteriormente, depois retira-se o grupo protetor (por exemplo com piperidina), volta-se a fazer outra lavagem e o ciclo recomeça com a inserção de mais um aminoácido protegido. A etapa final consiste na separação do polipéptido do suporte, o que pode acontecer usando ácido trifluoroacético [29][31][32]. A escolha da resina, tal como a escolha do grupo protetor, também depende dos aminoácidos utilizados [33].

Nesta técnica também são utilizados os grupos protetores Boc e o Fmoc. Sendo que no caso do primeiro, para se obter o péptido livre recorre-se a uma solução de ácido forte enquanto que para o segundo se aplica uma solução de ácido fraco [32]. O Fmoc apresenta a vantagem de ter uma excelente seletividade na sua remoção comparativamente com outros grupos protetores, além de que é possível controlar ao longo da síntese através de espectrometria de massa, a sua remoção em cada ciclo. Também é melhor do que o Boc, pois este ao ser retirado com ácidos fortes pode remover aminoácidos da resina [29].

O método SPPS tem a vantagem de serem efetuadas lavagens em cada etapa, havendo eliminação dos reagentes em excesso, produtos secundários e solventes, evitando assim uma purificação intermediária, sendo apenas necessário uma purificação final através do método de HPLC. Outra vantagem é que a inserção de cada aminoácido é mais rápida do que a síntese clássica, tem melhores rendimentos e atualmente já existem sintetizadores de péptidos automáticos [29].

No entanto, para ultrapassar a limitação do peso molecular no método SPPS foram desenvolvidos outros métodos para a síntese de peptídeos tais, como: método de tioéster, de condensação do segmento tiocarboxil, ligação química, ligação química nativa, entre outros. A maioria destes métodos não recorre a grupos de proteção [32].

Os dipeptídeos sintetizados neste trabalho foram L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina. Utilizou-se o método de síntese clássico no qual se protegeu o grupo amina da primeira L-tirosina com o grupo protetor Boc e o grupo carboxilo da segunda L-tirosina, ou L-arginina no

caso do L-tirosina-L-arginina, com um grupo metil. Após o coupling com DCC, a desproteção foi efetuada com um ácido forte como ácido trifluoroacético.

Posteriormente e após síntese dos dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina procedeu-se à sua imobilização na Sepharose CL-6B previamente ativada pelo método epóxido. Neste método, os grupos hidroxilos da Sepharose CL-6B são ativados com uma solução de hidróxido de sódio com borohidreto de sódio. É depois acrescentado 1,4-butanediol diglicidil éter que permite o posterior coupling com o ligando. Para além de se ter imobilizado os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina, também foi imobilizado o aminoácido L-tirosina para comparação com os suportes dos dipeptídeos.

## 1.4 Técnicas de análise de interação do suporte com o pDNA

Após a síntese dos dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina procedeu-se ao estudo das interações/afinidade com nucleótidos e isoformas de um plasmídeo.

As técnicas utilizadas foram: diferença da transferência de saturação por ressonância magnética nuclear (STD-RMN) e ressonância plasmónica de superfície (RPS) utilizando um biosensor ótico. Os resultados obtidos a partir destas metodologias dão informações estruturais para possível aplicação em AC<sup>[34]</sup>.

Em termos estruturais, a imobilização do ligando à Sepharose CL-6B pode ser estudado pela técnica de HR-MAS.

### 1.4.1 Diferença da Transferência de saturação por ressonância magnética nuclear (STD-RMN)

A técnica de STD-RMN permite detetar os locais de ligação envolvidos na interação de moléculas de baixo peso molecular e biomoléculas, como é o caso de complexos ligando-proteína e do sistema nucleótidos-suportes<sup>[35]</sup>. Esta capacidade advém de uma troca lenta entre o estado de ligação e o estado livre em que se mantém a possibilidade de haver uma transferência de difusão. Sendo assim, os sinais do ligando livre ou do ligando já ligado aparecem de forma distinta e podem ser identificados. Há muito tempo que esta técnica é usada para caracterizar a ligação de complexos recetor-ligante que tenham fortes ligações<sup>[36]</sup>. Basicamente esta técnica consiste na irradiação seletiva dos sinais da biomolécula e após saturação com uma dada frequência há transferência da radiação por difusão para os sinais da molécula mais pequena que se encontra nas vizinhanças da biomolécula. Essa frequência de irradiação é escolhida para um valor em que apenas se detetem os sinais da biomolécula e onde não se detetem os sinais da molécula mais pequena. O espectro de STD é obtido pela subtração do espectro onde a biomolécula foi saturada e um de referência (sem irradiação)<sup>[35][37]</sup>. Os sinais do ligando mais próximos da biomolécula têm STD mais intensos, uma vez que existe transferência de saturação mais eficiente<sup>[35]</sup>.

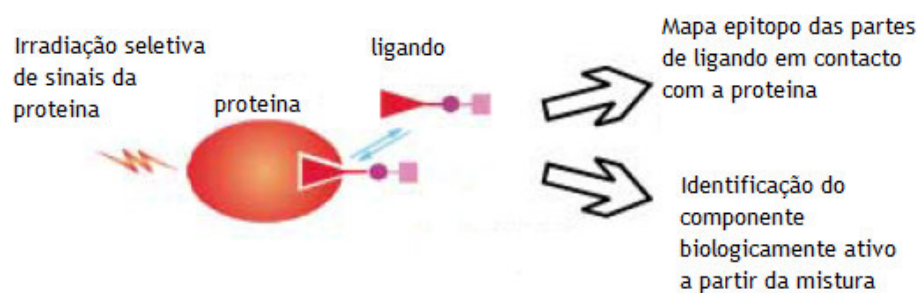


Figura 8: Representação do STD-RMN aplicado a uma proteína (adaptado de<sup>[36]</sup>).

No entanto a sensibilidade da técnica de STD-RMN pode ser afetada pela dissociação do complexo, o excesso de ligando utilizado e pela eficiência do spin de difusão da biomolécula<sup>[37]</sup>.

#### 1.4.2 Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS RMN)

A técnica de HR-MAS permite estudar amostras num estado heterogêneo entre líquido e sólido<sup>[38]</sup>. Desta forma, permite a detecção, identificação e quantificação de compostos ligados a um suporte<sup>[39]</sup>. Nesta experiência a amostra é previamente sujeita a um *swelling* dentro do rotor com o solvente deuterado mais adequado. Este rotor é depois colocado segundo um ângulo de 54,7 graus (ângulo mágico), resultando espectros de RMN de alta resolução para a caracterização de suportes<sup>[39]</sup>. Isto acontece, porque ao se colocar a amostra a girar a uma velocidade moderada de alguns kHz (4000) há alterações nas interações mais fracas (susceptibilidade magnética em heterogeneidade) mas mantem as interações mais fortes inalteradas. Logo, numa amostra heterogênea, a fase sólida passa despercebida devido a interações dipolares, ao passo que a fase líquida aparece com regiões bem definidas e semelhantes àquelas que se obtêm numa fase líquida homogênea<sup>[38]</sup>.

Utilizando esta técnica e fazendo *swelling* com um solvente como o clorofórmio, é possível caracterizar estruturalmente o suporte Sepharose-L-tirosina, suporte Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e suporte Sepharose-L-tirosina-L-arginina.

#### 1.4.3 Ressonância plasmónica de superfície (RPS)

A RPS baseada num biosensor ótico permite a medição da afinidade e/ou cinética de complexos formados, sem recorrer à marcação das moléculas com marcadores fluorescentes ou radioisótopos<sup>[40][41]</sup>. Esta técnica permite analisar a formação de diversos complexos tais como péptidos, proteínas, oligonucleotidos, lípidos, fagos, vírus entre outras<sup>[41]</sup>. Apresenta

outras vantagens tais como utilização de quantidades reduzidas de amostra, monitorização do equilíbrio, capacidade máxima de ligação de um ligando, entre outras [40][41].

O princípio da RPS utilizando o biosensor ótico consiste na formação dos plasmons (resultam da interação dos fótons de luz com os eletrões livres do ouro), que posteriormente interagem com os complexos formados e provocam uma alteração do ângulo de refração sendo detetado e registado num sensograma em função do tempo [41]. Estes ensaios consistem na imobilização de um ligando numa superfície, sob a qual passa uma solução com o analito (figura 9). A associação e dissociação do complexo analito-ligando vão provocar alterações no índice de refração. A partir desses dados consegue-se obter a concentração ativa de analito em solução e as constantes de afinidade e constantes cinéticas da ligação [41].

A imobilização do ligando dá-se num sensor-chip. Este chip consiste numa lâmina de vidro revestida a ouro (ou outro metal) que apresenta uma matriz. Esta matriz é variável sendo a mais utilizada a matriz de carboxilmetil dextrano [41].

A utilização da técnica de RPS permite traçar o perfil de associação/dissociação, calcular a constante de dissociação ( $K_D$ ) e consequentemente avaliar a afinidade das isoformas do plasmídeo pVAX1-*LacZ* com os ligandos L-tirosina e os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina. O RPS também possibilita a determinação das condições experimentais para promover a associação/dissociação de cada isoforma do plasmídeo ao ligando.

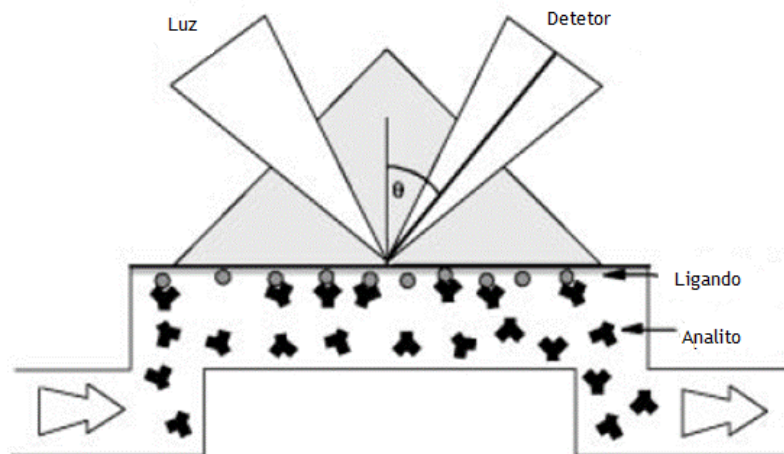


Figura 9: Esquema de uma experiência baseada em RPS (adaptado [41]).

## Capítulo 2: Materiais e Métodos

### 2.1. Síntese química do ligando L-tirosina-L-tirosina

A síntese do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina foi realizada pelo método químico clássico no qual protegeu o grupo amina do primeiro aminoácido e o grupo carboxílico da segunda L-tirosina para evitar ligações não específicas. O grupo carboxilo foi protegido através de um grupo metilo formando-se um éster, enquanto que o grupo amina foi bloqueado com o grupo Boc de forma a que não haja acilações adicionais.

#### 2.1.1. Síntese química do intermediário L-tirosina éster

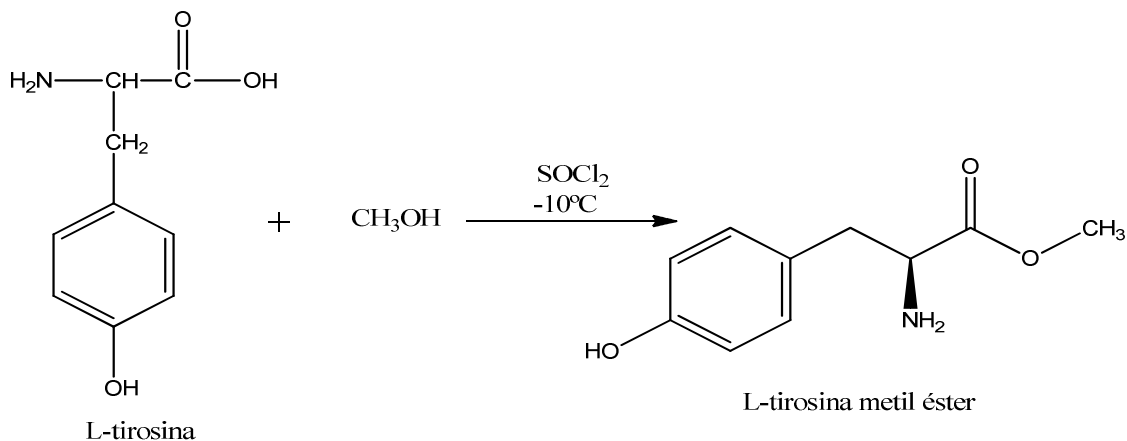


Figura 10: Síntese do intermediário L-tirosina metil éster.

Num balão colocou-se metanol (9,6 mL) a T=-10°C e adicionou-se cloreto de tionilo (0,15 mol, 1,14 mL) gota a gota. Seguidamente adicionou-se a L-tirosina (0,013 mol, 2,4 g) e a solução ficou a agitar durante 1 h mantendo-se a temperatura igual ou inferior a -10°C. Retirou-se a reação do banho de gelo ficando a mistura a agitar à temperatura ambiente durante 2 h. Depois, colocou-se a reação em refluxo a T=50°C durante 30 min. Seguidamente concentrou-se a mistura no evaporador rotativo e colocou-se a solução em gelo para precipitar. Adicionou-se, posteriormente 10 mL de acetato de etilo o que promoveu a precipitação. Filtrou-se e tratou-se o filtrante. Obteve-se um sólido branco que foi seco na estufa de vácuo a T=55°C, durante 24 h. Este protocolo foi baseado num método anteriormente descrito<sup>[42]</sup>.

A caracterização do composto L-tirosina metil éster foi realizada por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa de alta resolução.

**Espectro <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, δ, ppm):** 3,07 (2H, quinteto, CH<sub>2</sub>), 3,74 (3H, singleto, CH<sub>3</sub>), 4,2 (1H, tripleto, H<sub>α</sub>), 6,7 e 7,06 (4H, multipletto, ArH), 8,6 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 9,52 (1H, singleto, OH).

**ESI-MS: *m/z*:** 196,09 [L+H]<sup>+</sup>

## 2.1.2. Síntese química do intermediário Boc-L-tirosina

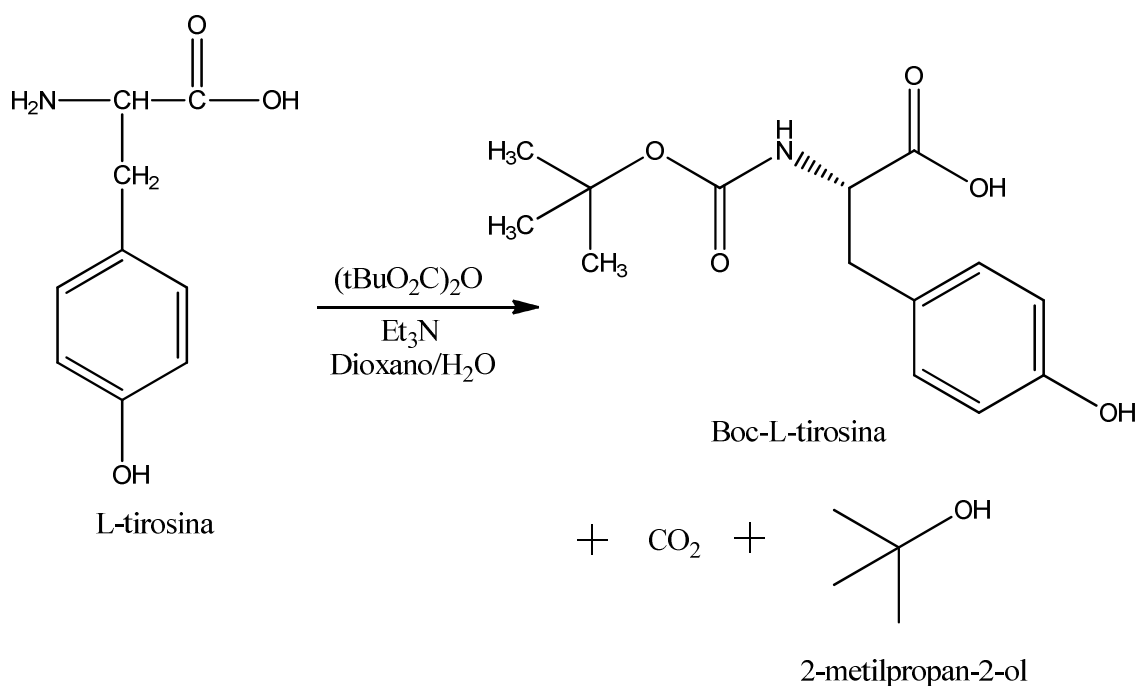


Figura 11: Síntese do intermediário Boc-L-tirosina.

Num balão colocou-se 1,4-dioxano e H<sub>2</sub>O numa proporção de 1:1 (v total=50 mL) e adicionou-se L-tirosina (13,8 mmol, 2,5 g), ficando a agitar durante 2 h. Depois acrescentou-se trietilamina (19,9 mmol, 2,9 mL) gota a gota, e após 10 min a agitar à temperatura ambiente colocou-se a reação num banho de gelo antes de se adicionar o Boc (15,2 mmol, 3,3 g). A reação permaneceu no gelo por mais 1 h e posteriormente deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante 42 h. Para que o dióxido de carbono formado fosse libertado, desenvolveu-se a reação com o balão aberto. Evaporaram-se os solventes e adicionou-se HCl 1M, o que promoveu a formação de um precipitado castanho. Extraiu-se com acetato de etilo (3x50 mL) e evaporaram-se as fases orgânicas. Por fim fez-se uma lavagem com uma solução saturada de NaCl (2x25 ml)<sup>[43]</sup>.

A caracterização do composto Boc-L-tirosina foi realizada por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa de alta resolução.

**Espectro <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ, ppm):** 1,34 (9H, singlete, Boc), 2,95 (2H, multiplete, CH<sub>2</sub>), 4,47 (1H, multiplete, H<sub>α</sub>), 5,02 (1H, singlete, NH), 5,77 (1H, singlete, OH) 6,7 e 6,9 (4H, 2 dupletos, ArH).

**ESI-MS: m/z:** 286,13 [L+H]<sup>+</sup>

### 2.1.3. Síntese química do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina protegido

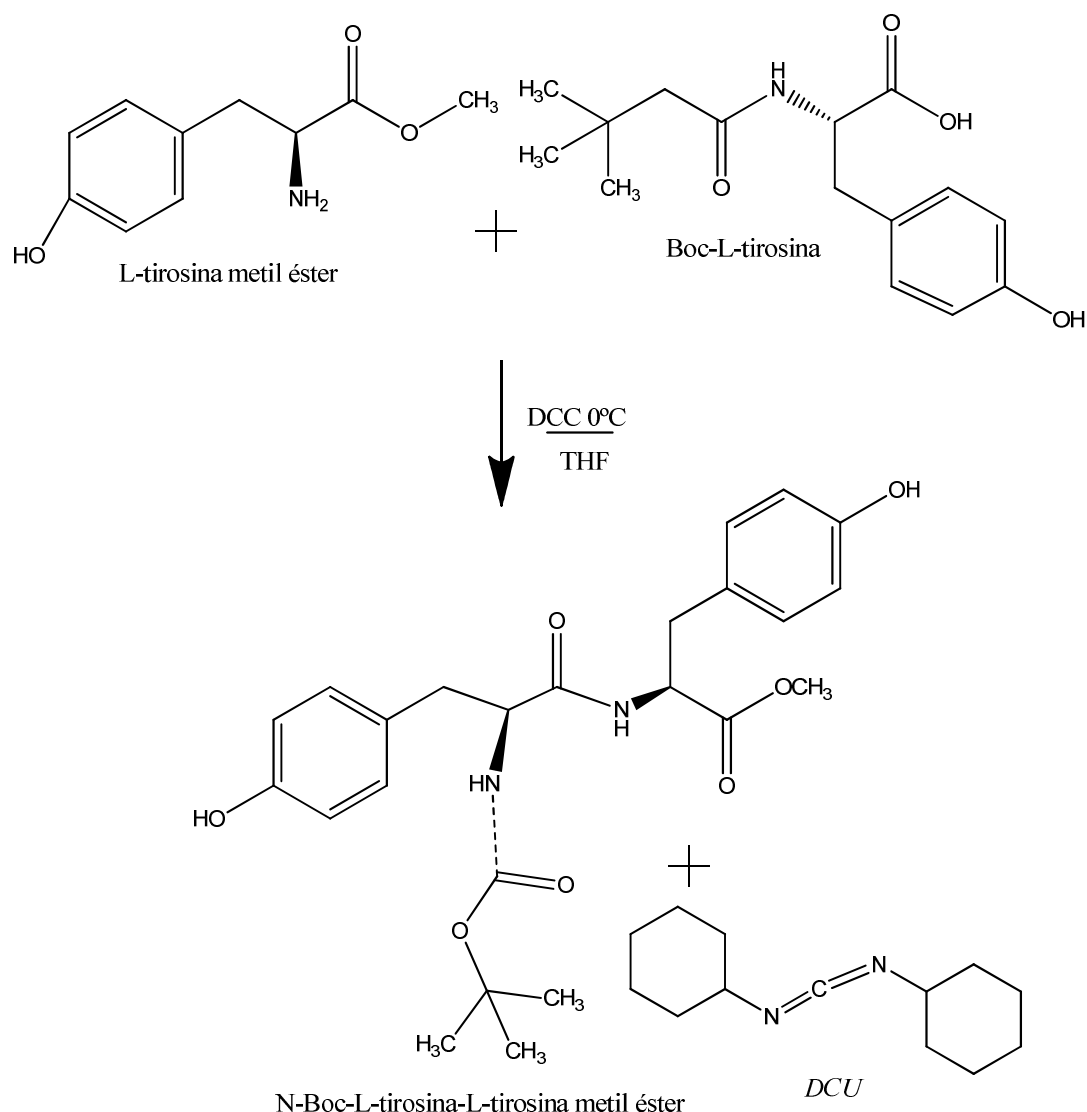


Figura 12: Síntese do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina protegido.

Uma vez que na literatura não estava documentado o *coupling* para o dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina protegido, optou-se por utilizar um protocolo geral de síntese de dipeptídeos<sup>[44]</sup>. Num balão de 100 mL, colocado previamente a aproximadamente  $T=0^{\circ}\text{C}$  dissolveu-se Boc-L-tirosina (3,6 mmol, 1 g) em 30 ml de tetrahydrofurano (THF), resultando uma solução de cor creme. Num copo dissolveu-se o DCC (3,6 mmol, 0,74 g) em 10 mL de THF e após 15 min adicionou-se ao balão. A adição foi efetuada gota-a-gota, uma vez que o DCC funciona como base e promove a formação da amida reagindo com o grupo carboxilo. De seguida, e após 15 min adicionou-se gota a gota L-tirosina metil éster (3,6 mmol, 0,7 g) e 25 ml de THF. Após 15 min, retirou-se o balão do gelo e ficou a agitar, à temperatura ambiente, durante 40 h.

O *work-up* da reação iniciou-se através de uma filtração na qual se recolhe o filtrado e foi posteriormente evaporado e lavado com frações de hexano (2x50mL). Evaporou-se o hexano e

extraíu-se com dietil éter (3x100 mL), recolhendo-se as fases orgânicas. Estas foram posteriormente evaporadas e o sólido foi seco na estufa de vácuo a T=55°C.

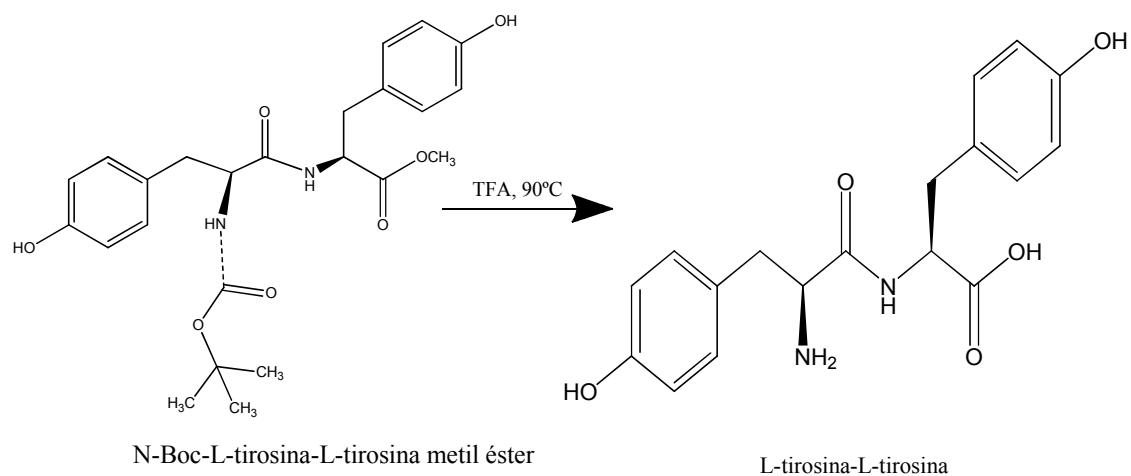
A caracterização do produto formado foi efetuada por espectroscopia de RMN utilizando como solvente o CDCl<sub>3</sub>, o que demonstrou que, para além da estrutura pretendida também se encontrava DCU (dicicloureia), um dos subprodutos da reação. Desta forma, foram feitas duas recristalizações: a primeira com clorofórmio, formando-se um precipitado que se removeu (DCU); e uma segunda lavagem, com éter de petróleo precipitando um sólido branco, removido por filtração que era o DCU.

A caracterização do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina protegido foi realizada por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa de alta resolução.

*Espectro <sup>1</sup>H RMN* (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ, ppm): 1,14 -1,34 (12H, multipletos sem resolução, CH<sub>3</sub> e Boc), 2,9 (2H, multipletos, CH<sub>2</sub>), 3,02 (2H, multipletos, CH<sub>2</sub>), 3,4 (1H, multipletos, H<sub>a</sub>), 3,69 (1H, multipletos, H<sub>a</sub>), 4,55 (1H, singletos, OH), 5,07 (1H, singletos, OH), 6,67, 6,74, 6,93 e 6,99 (8H, 4 dupletos, ArH).

*ESI-MS: m/z: 459,21 [L+H]<sup>+</sup>*

#### 2.1.4. Síntese química do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina



**Figura 13:** Desproteção do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina.

Num balão de 50 mL dissolveu-se L-tirosina-L-tirosina protegido (1,02 mmol, 466 mg) na solução de 90% de TFA e 10% de diclorometano (v = 3 mL). A mistura ficou a agitar durante 1 h à temperatura ambiente e posteriormente colocou-se em refluxo à T=90°C. Após 24 h em refluxo, colocou-se à temperatura ambiente e basificou-se com solução 5 M de NaOH pH 14. De seguida evaporou-se e extraíu-se com dietil éter (3x100 mL). Durante a evaporação das fases orgânicas formou-se um precipitado branco (que correspondia aos produtos criados pela quebra de ligações entre os grupos protectores e a molécula final), filtrando-se e eliminando-

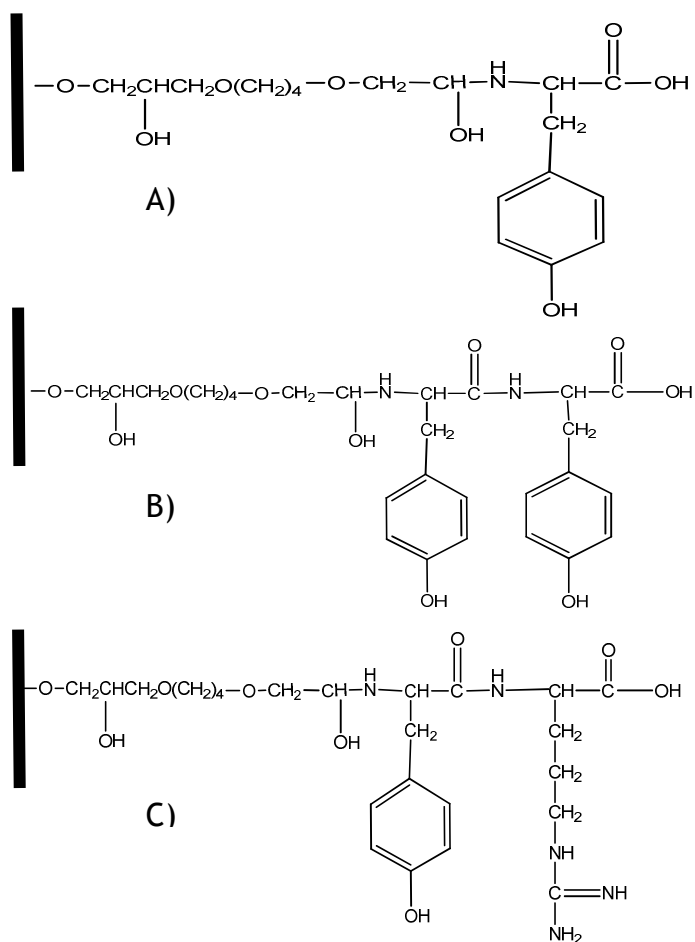
se o sólido. Terminada a evaporação do dietil éter, o composto alaranjado foi seco na estufa de vácuo.

A caracterização do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina desprotegido foi realizada por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa de alta resolução.

**Espectro  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 2,9 (2H, multiplete,  $CH_2$ ), 3,1 (2H, multiplete, CH), 3,9 (1H, multiplete,  $H_a$ ), 4,11 (1H, multiplete,  $H_a$ ), 5,46 (1H, singlete,  $OH_2$ ), 6,8; 6,9; 7,1 e 7,2 (8H, 4 dupletos, ArH).

**ESI-MS:  $m/z$ :** 349,29[L+H]<sup>+</sup>

## 2.2. Imobilização da L-tirosina, L-tirosina-tirosina e L-tirosina-L-arginina na Sepharose CL-6B



**Figura 14:** A) Sepharose- L-tirosina; B) Sepharose- L-tirosina-L-tirosina e C) Sepharose- L-tirosina-L-arginina.

Imobilizaram-se o aminoácido L-tirosina e os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina na Sepharose CL-6B (Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente procedeu-se à ativação dos grupos hidroxilos da Sepharose CL-6B e depois imobilizou-se o ligando<sup>[45]</sup>. Antes de se iniciar o

processo de imobilização, a Sepharose foi lavada com 300 mL de água mili-Q (purificada por: Milli-Q system da Millipore, Billerica, MA, EUA). A ativação dos grupos hidroxilo da Sepharose CL-6B foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: a 5 g de Sepharose CL-6B adicionou-se uma solução de NaOH 0,6 M com NaBH<sub>4</sub> 1,32 mM e após 15 min adicionou-se 5 mL de 1,4-butanediol diglicidil éter. A Sepharose CL-6B ficou a agitar num orbital a 110 rpm e T=25°C durante 6 h. Posteriormente dissolveu-se cada ligando (L-tirosina (8,27 mmol, 1,5 g), L-tirosina-L-tirosina (0,2 mmol, 70 mg) e L-tirosina-L-arginina (0,2 mmol, 70 mg)) numa solução de carbonato de sódio 2 M em que o volume utilizado desta solução dependeu da solubilidade de cada ligando. Assim sendo adicionou-se 14 mL, 7 mL e 5 mL para a L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina, respetivamente. É de salientar que se utilizou 2x mais ligando em relação à Sepharose CL-6B ativada, e que nesta situação, devido ao fato de os ligandos serem aminoácidos, temos de ter em conta o pH a que estes se encontram uma vez que para favorecer a ligação covalente à matriz, os aminoácidos têm de se encontrar na forma -NH<sub>2</sub><sup>-</sup>. Após adição da Sepharose CL-6B ativada à solução de cada ligando em carbonato de sódio, a mistura ficou a incubar no orbital a 110 rpm e T=55 °C, durante 16 h. Por fim lavou-se várias vezes a mistura com acetona-água mili-Q (1:9; 3:7; 5:5; 8:2 v/v) às quais se seguiram varias lavagens com água mili-Q (3x100 mL). Os suportes foram armazenados à T=4°C<sup>[45][46]</sup>.

### 2.2.1. Interação dos suportes Sepharose-L-tirosina, Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina por STD-RMN com 5'-mononucleótidos

Utilizando o espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado com a criosonda QCI e à T=25°C realizaram-se as experiências de STD-RMN para obter as interações entre o suporte e os 5'-mononucleótidos (5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP e 5'-TMP), que servem como modelos mais simples de ácidos nucleicos, nomeadamente pDNA, para a compreensão dos locais de ligação preferenciais ao suporte. O excesso utilizado no tubo de RMN de cada 5'-mononucleótido foi de quatro vezes mais em relação ao suporte.

Para cada experiência foram preparados dois brancos, um com 5'-mononucleótido+solução tampão e o outro com o suporte+solução tampão. A mistura 5'-mononucleótido+suporte, foi posteriormente preparada nas mesma concentrações. Os brancos permitiram, não só, selecionar as frequências utilizadas na irradiação dos prótons do suporte como também clarificar a análise dos espectros de STD. As frequências a irradiar do suporte foram escolhidas onde não havia sinais dos 5'-mononucleótidos.

Desta forma, para a Sepharose- L-tirosina usaram-se as seguintes irradiações: 1157 Hz para 5'-AMP, 1649 Hz para o 5'-CMP, 4134 Hz para 5'-GMP e 436 Hz para 5'-TMP. No caso da Sepharose-L-tirosina-L-tirosina as irradiações utilizadas foram: 1048 Hz para 5'-AMP, 789 Hz para o 5'-CMP, 1814 Hz para 5'-GMP e 436 Hz para 5'-TMP. Para a Sepharose-L-tirosina-L-

arginina usou-se 800 Hz para 5'-AMP, 700 Hz para o 5'-TMP e 1344 Hz tanto para 5'-CMP como para 5'-GMP.

Os 5'-mononucleótidos e cada suporte foram dissolvidos em tampão fosfato de potássio 100 mM a pH=8. Este tampão foi preparado em 90% de água mili-Q e 10% D<sub>2</sub>O. O pH de cada um dos 5'-mononucleótidos foi ajustado para pH 8 e regra geral, a concentração de cada um era de 206 mM. Em relação aos suportes a concentração do suporte L-tirosina foi de 56 mM e para os restantes foi 35 mM.

Cada tubo de RMN de 5 mm foi preparado da seguinte maneira: 300 µL de suporte + 300 µL de 5'-mononucleótido + 10 µL TSP 100 mM.

Para cada 5'-mononucleótido foi preparado um branco: 300 µL de 5'-mononucleótido + 300 µL de tampão + 10 µL TSP 100 mM. Foi também preparado um branco para cada um dos suportes a ser analisado: 300 µL de suporte + 300 µL de tampão + 10 µL TSP 100 mM.

Os sinais de 1H dos 5'-mononucleótidos foram previamente identificados.

Os espectros de STD resultaram da subtração do espectro *on-resonance* do *off-resonance*, ou seja subtraiu-se o espectro onde se irradiou o suporte do da referência. A percentagem de cada sinal referente à interação de cada 5'-mononucleótido foi calculado de acordo com a expressão  $(I_0 - I_{std}) / I_0$ , em que  $I_{std}$  é a intensidade do pico no espectro de std e  $I_0$  é a intensidade do sinal no espectro *off-resonance*. Cada sinal de STD foi normalizado e expresso em %. [47].

### 2.2.2. Caracterização dos suportes através de HR-MAS RMN

Estes ensaios foram realizados no espectrómetro Bruker Avance III 400MHz equipado com a sonda HR-MAS. Cerca de 12 mg de cada suporte foi inserido num rotor de zircónica com capacidade de 12 µL, e o *swelling* foi realizado com CDCl<sub>3</sub> e DMSO-*d*<sub>6</sub> durante 2-10 h. O rotor foi colocado na sonda no ângulo mágico (54,7 graus), rodando a 4000 Hz. Houve necessidade de corrigir o *tunning*, o *matching*, fazer o *lock* (para este solvente em específico) e alterar o *shim* para homogeneizar o campo magnético a que se sujeitou a amostra. Depois ajustados estes parâmetros, iniciou-se a aquisição de espectros de <sup>1</sup>H e bidimensionais. Estes espectros foram depois processados com o *software* Topspin 3.1 [39].

## 2.3. Produção e purificação do plasmídeo pVAX1-LacZ

### 2.3.1. Cultura de *E. coli* DH5α para produção de pDNA

Para a obtenção do plasmídeo pVAX1- *LacZ* de 6,05 kbp, recorreu-se à transformação da estirpe bacteriana *E. coli* DH5α (Invitrogen, EUA). Este sistema de expressão foi pré -cultivado num meio LB (*Luria-Bertani*) agar suplementado com 30 µg/mL de canamicina (Sigma-Aldrich, EUA) o que permitiu fazer a selecção das *E. coli* transformadas com o plasmídeo de interesse. Após este passo, inoculou-se a pré-fermentação que continha o meio TB, com a mesma

constituição daquele que posteriormente é utilizado na fermentação: 20 g/L triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0,017 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,072 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  com 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de canamicina. Colocou-se a pré-fermentação num agitador orbital a  $T=37^\circ\text{C}$  com agitação de 250 rpm e mantendo sempre a cultura em condição aeróbia. O controlo de crescimento efectuou-se através da medição da densidade optica (Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra)) a um comprimento de onda de 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ). Quando a pré-fermentação atingiu uma  $\text{DO}_{600} \sim 2,6$ , que corresponde a uma fase de crescimento exponencial, transferiu-se uma quantidade de pré-fermentação para o meio de fermentação, de forma a ser iniciada com uma  $\text{DO}_{600} \sim 0,2$ . A fermentação deu-se sob as condições de crescimento e controlo já aplicadas na pré-fermentação, sendo a fermentação interrompida quando a  $\text{DO}_{600}$  se apresentava com valores entre 5 e 9 o que correspondeu a uma fase de crescimento exponencial (fase log). É de salientar que um crescimento elevado, resultante de uma fermentação com  $\text{DO}_{600}$  muito elevada, pode dificultar a lise celular, o que pode resultar na recuperação de DNA plasmídeo menos puro e em menor quantidade. Após a fermentação, transferiu-se o meio de cultura para tubos de centrifugação e centrifugou-se a 4500 rpm e à  $T=4^\circ\text{C}$  (centrifuga Allegra x-22R) em ciclos de 10 min até todo o meio ter sido centrifugado. Descartou-se o sobrenadante e armazenou-se o pellet de células a  $T=-20^\circ\text{C}$ <sup>[48]</sup>.

### 2.3.2. Lise celular e purificação do plasmídeo pVAX1-LacZ

O DNA plasmídeo foi extraído utilizando o kit NZYMaxiprep da Nzytech, adequado para promover a lise alcalina das células de *E. coli* e purificar o pDNA nativo (oc+sc).

Ao pellet de células obtido na fermentação de 250 mL de meio, adicionou-se 20 mL de tampão que continha 50 mM Tris-HCl, 10 mM de EDTA (pH=8) e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNase. Ressuspendeu-se utilizando agitação de um vortex. O passo seguinte foi a lise alcalina das células recorrendo a 20 mL de 200 mM NaOH com 1% (w/v) SDS. Agitou-se lentamente à temperatura ambiente durante 5 min. De seguida, adicionou-se 20 mL de uma solução de acetato de potássio 3 M com posterior incubação em gelo durante 20 min., o que permitiu a precipitação de gDNA (DNA genómico), proteínas e contaminantes celulares. Para remover este precipitado, efectuou-se um passo de centrifugação a  $20\,000 \times g$  durante 30 min a  $T=4^\circ\text{C}$  (centrifuga Allegra 25 R). Seguidamente centrifugou-se durante 15 min adicionais, de forma a clarificar o extracto obtido.

O sobrenadante que advém da centrifugação, é então colocado nas colunas específicas para a purificação do pDNA, que contêm uma resina aniónica. Esta interacção é promovida através de condições de pH e concentração de sal controladas, nomeadamente 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % isopropanol (v/v), 0,15 % Triton® X-100 (v/v) a pH 7,0. Uma lavagem com uma solução de 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% isopropanol (v/v) a pH 7,0, permite remover os contaminantes e posteriormente, utilizando um tampão com elevada concentração de sal (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% isopropanol (v/v) com pH 8,5) promove-se a eluição do

pDNA. De seguida, concentrou-se o pDNA através da adição de 0,7 volumes de isopropanol a  $T=-20^{\circ}\text{C}$ , fez-se uma ligeira agitação do tubo onde se encontrava esta solução e deixou-se a incubar no gelo durante 20 min. Após incubação, centrifugou-se a  $15\ 000 \times g$  durante 30 min a  $T=4^{\circ}\text{C}$ . Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o pellet durante 5-10 min, à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se, depois, o pellet em 2 mL de água mili-Q.

Para quantificar o pDNA obtido, recorreu-se ao espectrofotómetro onde se determinou a absorvância a 260 nm e 280 nm; a pureza e as isoformas obtidas foram verificadas através de uma electroforese em gel de agarose. O pDNA recolhido foi armazenado a  $T=-80^{\circ}\text{C}$ <sup>[48]</sup>.

### 2.3.3. Electroforese de agarose

O controlo do produto obtido a partir da lise alcalina foi feito através da análise de electroforese em gel de agarose. Este gel foi preparado com 1% de agarose em tampão de TAE (40 mM Tris Base, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA a  $\text{pH}=8,0$ ) com  $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  de green safe. Aplicou-se um campo eléctrico com uma potência de 110 V durante 40 min. O gel foi analisado através do sistema de luz UV da UVITEC Cambridge system (Uvitec Limited, Cambridge, UK)<sup>[9]</sup>.

### 2.3.4 Preparação das diferentes isoformas do plasmídeo pVAX1-*LacZ*

Com o intuito de se obter a isoforma sc em maior quantidade, a fermentação foi interrompida na fase de crescimento exponencial ( $\text{DO}_{600}$  entre 5 e 9). Após a lise alcalina, utilizaram-se colunas do kit NZYMaxiprep da Nzytech, seguindo o procedimento descrito pelo fabricante de forma a obter-se a isoforma sc o mais purificada possível.

Tanto a isoforma circular aberta (oc) como a isoforma linear (ln), foram obtidas a partir da superenrolada. No caso da circular aberta, a amostra de superenrolado (sc) ficou à temperatura ambiente ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ) até converter em circular aberta (oc). Esta mudança foi controlada através da realização de várias electroforeses (neste caso, 3 electroforeses) e demorou cerca de 3 dias. Já no caso da isoforma linear, a amostra de supernrolado foi sujeita a uma digestão enzimática com a enzima Hind III, a amostra foi incubada a  $T=37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Mais uma vez, a produção da isoforma ln foi confirmada pela técnica de electroforese e armazenada a  $T=-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4. Análise da interação das isoformas do plasmídeo pVAX1-*LacZ* com L-tirosina e os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina

### 2.4.1. Imobilização dos ligandos no chip CM5

Os ligandos L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina foram imobilizados, de forma independente em cada célula de fluxo num chip CM5. A técnica de RPS utilizando o biosensor Biacore T200 permitiu determinar as condições experimentais para promover a associação/dissociação de cada isoforma do plasmídeo ao ligando. Estas condições serão posteriormente exploradas com o suporte Sepharose-L-tirosina em cromatografia de afinidade. Este chip apresenta uma superfície de vidro revestida a ouro, que apresenta na sua superfície uma matriz de dextrano caboximetilado (figura 15). É o mais indicado para peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos ou carboidratos.

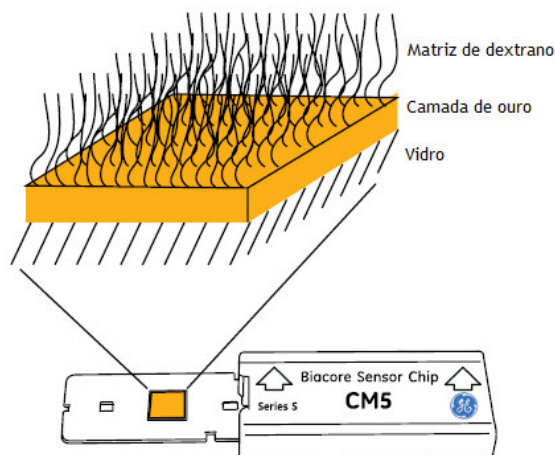
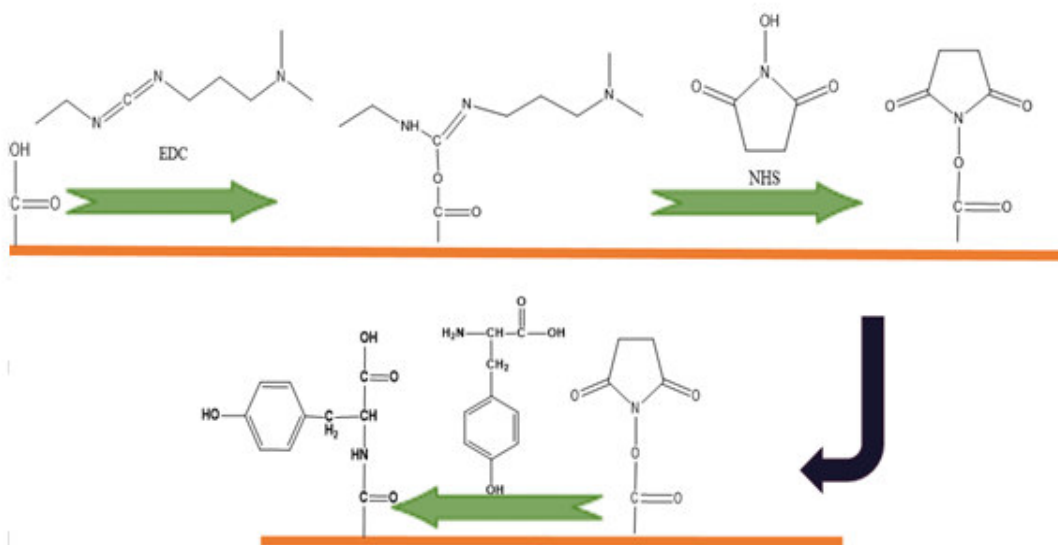


Figura 15: Esquema da estrutura do chip CM5 (adaptado Biacore sensor surface Handbook)

O método utilizado para a imobilização (figura 16) foi o método amina em que os grupos carboxilos do dextrano são ativados recorrendo à mistura EDC (0,4 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) e NHS (0,1 M N-hidroxisucínimida), permitindo a formação de ésteres reativos, os quais, posteriormente, vão reagir com o grupo amina do ligando ligando-se covalentemente à matriz de dextrano.

O protocolo aplicado foi o seguinte: o chip ficou a estabilizar dentro do biosensor durante algumas horas. O tampão de corrida foi HBS-N (0,1M HEPES e 1,5M NaCl). Cada ligando foi dissolvido numa solução de tampão borato 100 mM e pH superior a 9,1 (uma vez que o aminoácido para se ligar tem de estar na forma de  $\text{NH}_2^-$ ).



**Figura 16:** Esquema da imobilização do ligando L-tirosina no chip CM5. O mesmo método foi aplicado aos ligandos L-tirosina-L-arginina e L-tirosina-L-tirosina.

Inicialmente, injetou-se uma mistura de 1:1 de NHS 0,1 M e 0,4 M de EDC a uma velocidade de fluxo de 10  $\mu\text{L}$  / min e tempo de contato de 420 s. De seguida, injetou-se o ligando à velocidade de fluxo de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  e tempo de contato de 420 s. Posteriormente bloqueou-se os esteres reativos que não reagiram com  $\text{-NH}_2$  do ligando com solução 1 M etanolamina-HCl a  $\text{pH}=8,5$ . O protocolo foi efetuado para cada um dos ligandos em separado. A célula de fluxo 1 foi colocada como branco, isto é, a ativação foi igual às das restantes células de fluxo mas sem imobilização do ligando.

#### 2.4.2. Ensaios de afinidade das isoformas do plasmídeo pVAX1-*LacZ* com os ligandos L-tirosina e os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina imobilizados na superfície do chip CM5

O perfil de associação/dissociação das isoformas do plasmídeo pVAX1-*LacZ* com os ligandos L-tirosina e os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina imobilizados foi avaliado em dois tampões de corrida (Tris-HCl 10 mM e HEPES ácido 10 mM) e a duas temperaturas diferentes  $T=10^\circ\text{C}$  e  $25^\circ\text{C}$ . As concentrações injetadas de cada isoforma foram escolhidas tendo em conta a saturação da superfície dos ligandos em cada célula de fluxo. Seguidamente preparam-se soluções mais diluídas de plasmídeo perfazendo um total de cerca 10 tubos.

Todos os ensaios foram realizados com velocidade de fluxo de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  e tempo de contacto 420 s e realizados duplicados. No caso da isoforma sc, em Tris-HCl e HEPES ácido, e para  $T=10^\circ\text{C}$  e  $25^\circ\text{C}$  a gama de concentrações utilizadas foi 0,13 mM a 0,25  $\mu\text{M}$ . No caso da isoforma ln, em Tris-HCl e HEPES ácido, e para  $T=10^\circ\text{C}$  e  $25^\circ\text{C}$  a gama de concentrações utilizadas foi

0,125 mM 0,24  $\mu$ M. Para a isoforma oc, nos mesmos tampões e para T=10°C e 25°C a gama de concentrações utilizadas foi 0,5 mM a 0, 48  $\mu$ M.

A subtração da resposta da célula de referência para cada célula de fluxo permite eliminar as interações não específicas das isoformas com a matriz e artefactos do detetor. O perfil de associação e dissociação ligando-isoforma pDNA permitiu apenas fazer cálculos de afinidade para valores imediatamente antes da dissociação entre 300-400 s.

Desta forma, a constante de equilíbrio pode ser obtida a partir de um gráfico RU (unidade de ressonância) em função da  $C_{\text{analito}}$  (M). Em que a constante de equilíbrio é obtida por:  $R_{\text{eq}} = (K_A \times [A] \times R_{\text{max}}) / (1 + K_A \times [A] \times n)$ . Esta constante é o inverso da constante de equilíbrio de dissociação ( $K_D$ ). Considera-se valor de baixa afinidade quando a ordem de grandeza de  $K_D$  varia entre  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$ , valores com ordem de grandeza inferior a estes, são considerados de alta afinidade. Na curva que permite o cálculo de  $K_D$ , o  $R_{\text{eq}}$  tem de corresponder a metade do  $R_{\text{max}}$  que indica a capacidade de ligação máxima à superfície.

O gráfico que permite o cálculo de  $K_D$  é obtido a partir de sensogramas que correspondem ao RU vs tempo (s), no qual aparecem curvas distintas para cada concentração. Estes sensogramas permitem distinguir o momento de injeção do analito, seguido da associação/dissociação entre analito e ligando. Os sensogramas obtidos foram processados e analisados no *software* BIAevaluation v.4.1 (GE Healthcare).

## Capítulo 3: Resultados e Discussão

### 3.1. Síntese química dos ligandos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina

Os dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina foram sintetizados pelo método clássico de síntese química de péptidos o qual consiste na proteção do grupo amina do primeiro aminoácido e o grupo carboxílico do segundo aminoácido, seguido da reação de *coupling* com o reagente DCC e por fim eliminação dos grupos protetores. Deste modo, foram necessárias quatro reações intermediárias até se obter o dipeptídeo desprotegido.

A primeira reação consistia na proteção do grupo carboxílico da segunda L-tirosina com um grupo metilo. O principal substrato utilizado foi a L-tirosina que reagiu com trietilamina, obtendo-se o composto L-tirosina metil éster (figura 17).

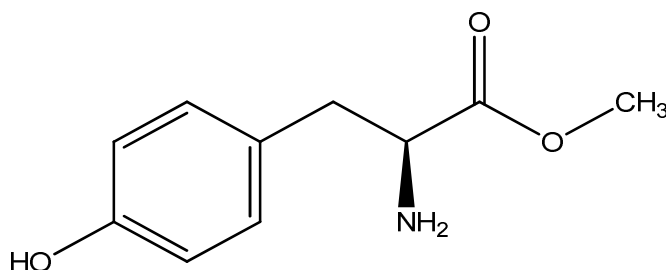


Figura 17: Estrutura química do primeiro intermediário: L-tirosina metil éster.

O segundo passo da síntese do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina teve como objetivo proteger a amina da primeira L-tirosina com o grupo Boc. Mais uma vez o substrato principal foi a L-tirosina mas desta vez reagiu com Boc. O produto foi o intermediário Boc-L-tirosina com um subproduto da reação, o 2-metilpropan-2-ol.

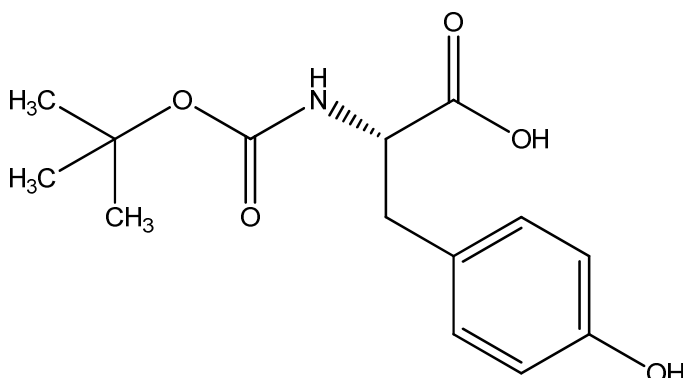


Figura 18: Estrutura química do composto Boc-L-tirosina.

A terceira reação consiste na formação da ligação peptídica através da adição do reagente de *coupling* DCC obtendo-se o dipeptídeo protegido (N-Boc-L-tirosina-L-tirosina metil éster) e o

subproduto, o DCU. A purificação do dipeptídeo foi realizada através de sucessivas recristalizações com clorofórmio e éter de petróleo para eliminar o DCU.

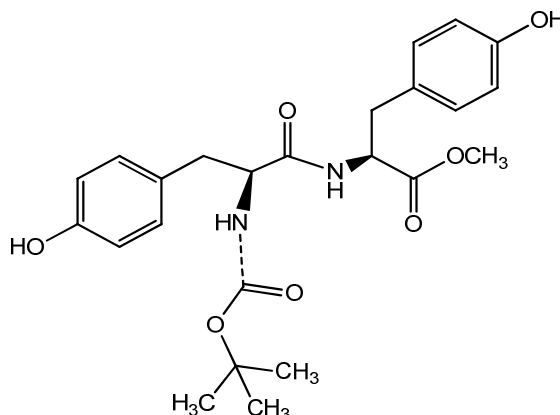


Figura 19: Estrutura química do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina protegido.

A última reação foi a desproteção do dipeptídeo (figura 20), realizada com adição de TFA em diclorometano (90:10) e basificação com hidróxido de sódio a pH 14.

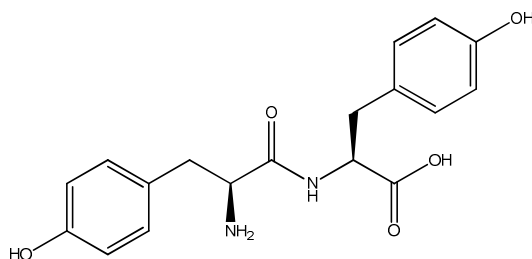


Figura 20: Estrutura química do dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina.

No caso do dipeptídeo L-tirosina-L-arginina, o coupling foi realizado seguindo um protocolo análogo ao usado para a síntese do composto L-tirosina-L-tirosina, respeitando o método clássico de síntese química de péptidos. Protegeu-se o grupo amina da primeira L-tirosina com Boc, levando à formação de Boc-L-tirosina, já previamente sintetizado para L-tirosina-L-tirosina. O grupo carboxílico do segundo aminoácido, L-arginina, foi protegido com um grupo metilo, formando a L-arginina metil éster. No entanto, a L-arginina metil éster utilizada no *coupling* foi de origem comercial e não sintetizada no laboratório, uma vez que este composto já existia em quantidade suficiente, não sendo necessário sintetizá-lo.

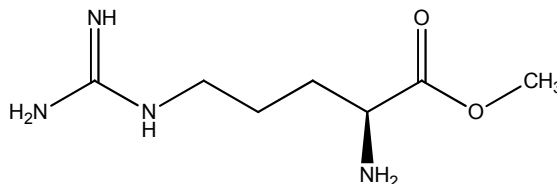


Figura 21: Estrutura química do composto L-arginina metil éster.

Para o *coupling* deste dipeptídeo também se usou o reagente DCC, que permitiu a ligação entre o Boc-L-tirosina e a L-arginina metil éster comercial. Apesar de este método ter permitido a síntese do dipeptídeo L-tirosina-L-arginina protegido, não foi possível obter resultados tão eficazes como na síntese da L-tirosina-L-tirosina, uma vez que o N-Boc-L-tirosina-L-arginina metil éster apresentava diversos contaminantes. Desta forma, tanto na imobilização no chip CM5 para ensaios de afinidade entre o pDNA e este ligando, como nos ensaios de STD-RMN, utilizou-se o dipeptídeo L-tirosina-L-arginina comercial.

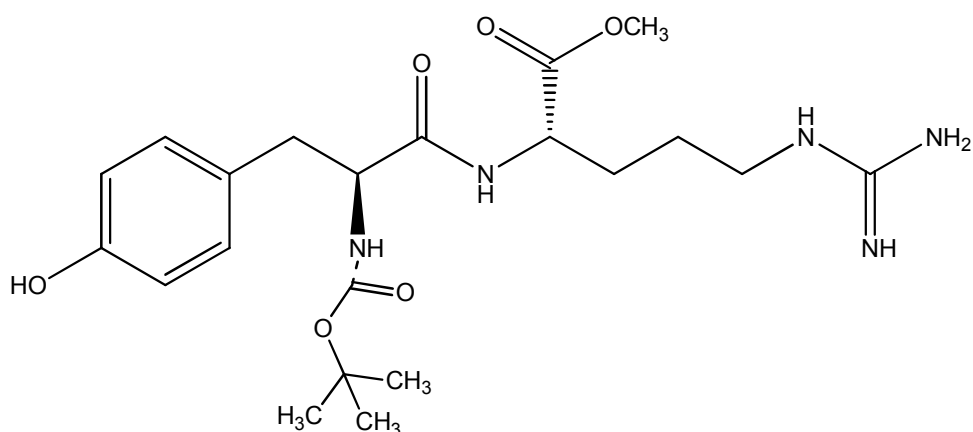


Figura 22: Estrutura química do dipeptídeo L-tirosina-L-arginina protegido.

## 3.2. Análise da afinidade das isoformas do plasmídeo pVAX1-LacZ com os ligandos por Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS)

### 3.2.1. Imobilização dos ligandos no chip CM5

No chip CM5 foram imobilizados os ligandos L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina nas células de fluxo 2, 3 e 4, respetivamente. Aplicou-se o método *amino-coupling* para a imobilização dos ligandos na superfície do chip.

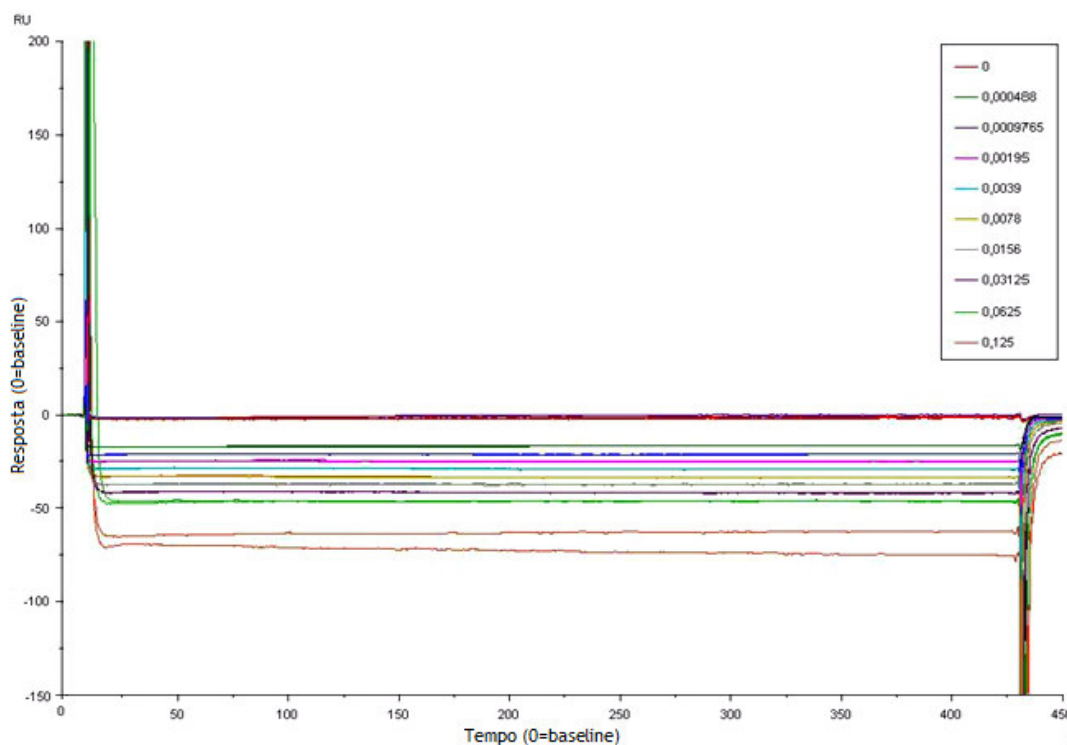
A imobilização dos ligandos pelo método amina é dependente do pH e da concentração dos ligandos. Para que haja ligação entre os estéres previamente formados após ativação dos grupos COO<sup>-</sup> com EDC/NHS é necessário que os ligandos estejam na forma -NH<sub>2</sub> para que haja formação da ligação covalente. Para isso o pH do ligando tem de ser superior ao pKa do grupo amina. Para a L-tirosina utilizou-se pH 9,71 e concentração de 27,2 mM ; para L-tirosina-L-tirosina o pH foi 9,76 e a concentração 0,24 M; e por último L-tirosina-L-arginina a concentração utilizada foi de 0,129 M e pH foi de 10,04.

Os níveis de imobilização dos ligandos na superfície ativada foram 71,7 RU, 103,5 RU e 89 RU para L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina, respetivamente. Esta resposta corresponde à diferença entre os grupos que foram ativados e os que foram imobilizados.

### 3.2.2. Ensaio de afinidade entre as isoformas do plasmídeo e os ligandos

Como foi referido no capítulo Materiais e Métodos foram utilizados dois tampões de corrida, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e Hepes 10 mM pH 7,4 e analisada a afinidade ligando/plasmídeo a duas temperaturas,  $T=10^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ . Não houve sinal nos ensaios realizados com o tampão Tris-HCl 10 mM para ambas as temperaturas, indicando que nestas condições não se estabelece interação entre os ligandos e as isoformas do plasmídeo. Os perfis dos sensogramas foram semelhantes ao apresentado na figura 23, não havendo resposta acima da baseline (0 RU). Deste modo, não foi possível efetuar nenhum cálculo de afinidade.

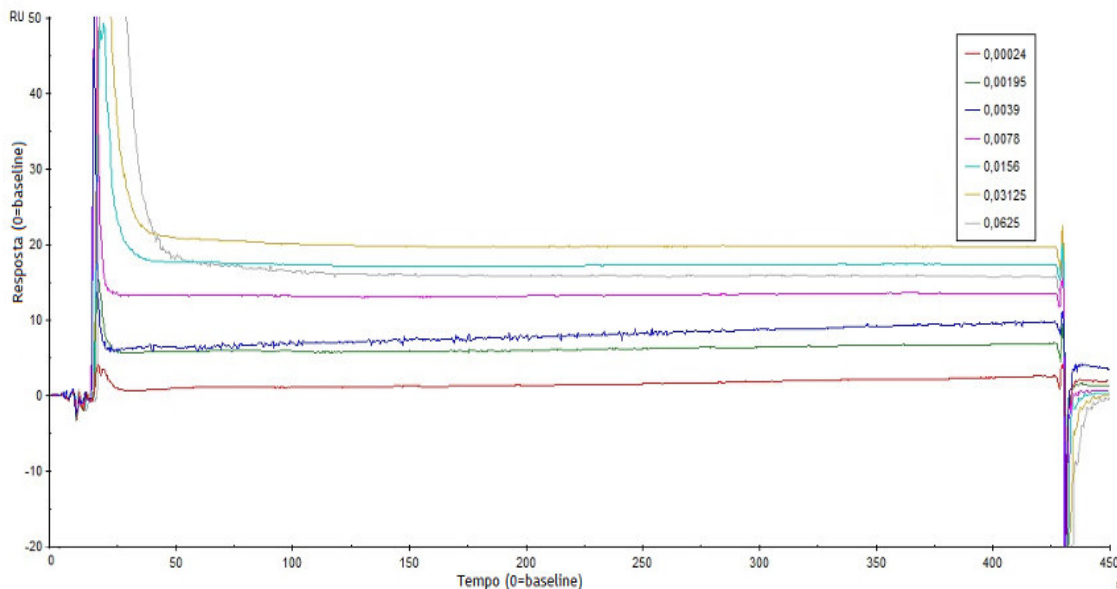
No entanto, apesar de não haver formação do complexo ligando-pDNA, estes resultados podem ser aplicados à cromatografia, na medida em que esta solução tampão pode favorecer a eluição das isoformas do pVAX1-*LacZ* que se encontrem retidas numa coluna com estes suportes de afinidade.



**Figura 23:** Perfil de sensograma que demonstra a inexistência de interação entre a isoforma In e ligando L-tirosina em Tris-HCl 10 mM a  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

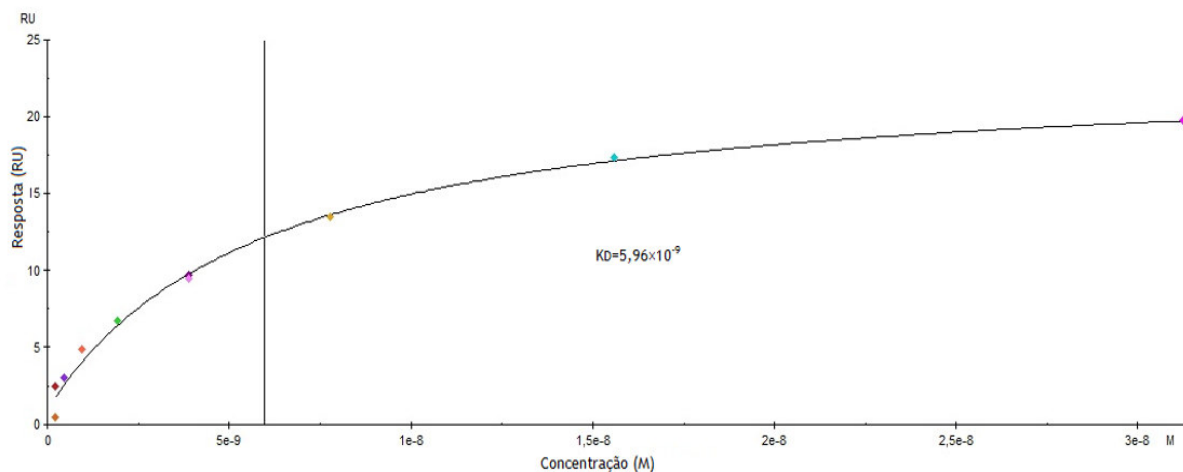
Aplicando uma solução de Hepes ácido 10 mM pH 7,4 como tampão de corrida, obteve-se sinal na maioria dos ensaios. O perfil obtido para todos os ensaios ligando/plasmídeo foi de afinidade e não cinético. Isto significa que as isoformas do plasmídeo se associam e dissociam rapidamente não sendo possível determinar  $k_{on}$  e  $k_{off}$ . Na figura 24 são apresentados exemplos

de sensogramas que mostram o perfil de afinidade entre L-tirosina e a isoforma In do pVAX1-LacZ. As constantes de dissociação correspondem a elevada afinidade.



**Figura 24:** Perfil de sensogramas que representam a associação/dissociação entre pDNA e o ligando. Este perfil corresponde à formação do complexo isoforma In-L-tirosina no ensaio em HEPES ácido 10 mM a  $T=10^{\circ}\text{C}$ .

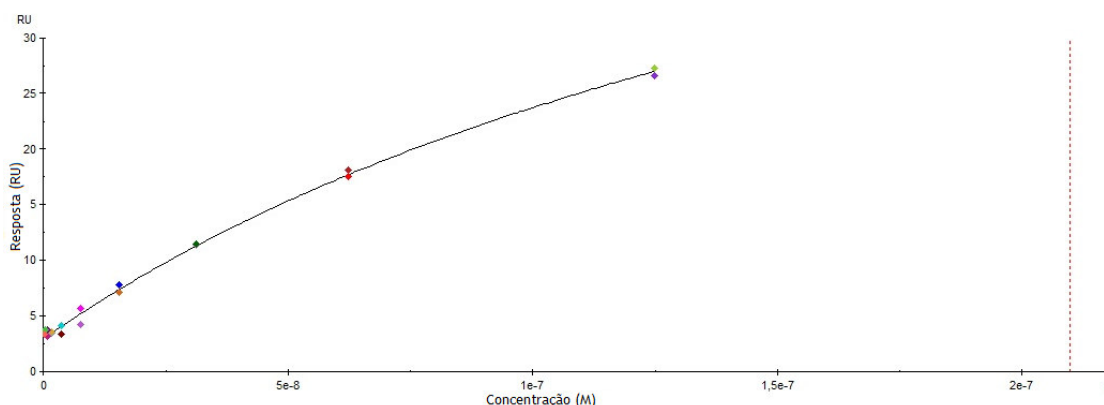
Através dos sensogramas, é possível calcular a afinidade, como a constante de dissociação de equilíbrio  $K_D$ . As constantes de dissociação no equilíbrio ( $K_D$ ) foram determinadas através da aplicação do modelo de Langmuir e traçado da curva linear dos valores RU selecionados entre 300-400 s. O valor  $K_D$  é inversamente proporcional à afinidade, ou seja, quanto maior o valor, menor a afinidade da isoforma do plasmídeo para o ligando, e vice-versa. O cálculo dos parâmetros foi realizado com o *software* BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare).



**Figura 25:** Curva resposta (RU) vs concentração do analito no qual foi possível efetuar o cálculo de  $K_D$ . Este

corresponde ao complexo isoforma oc-L-tirosina-L-arginina em HEPES ácido 10 mM a T=10°C.

O cálculo da constante de dissociação de equilíbrio só é possível quando existe saturação da superfície do ligando. A figura 26 é um exemplo de um gráfico resposta (RU) vs concentração do analito (M) em que não houve saturação da superfície L-tirosina-L-arginina com a isoforma oc.



**Figura 26:** Curva resposta (RU) vs concentração da isoforma oc no ligando L-tirosina-L-arginina em HEPES ácido 10 mM a T=10°C. Não houve saturação da superfície de L-tirosina-L-arginina.

Na tabela 5 apresentam-se os valores do  $K_D$  para as temperaturas T=10°C e T=25°C.

**Tabela 5:** Constantes de dissociação ( $K_D$ ) obtidas para os ensaios com o tampão HEPES ácido 10 mM a T=10°C e 25°C.

| <b>HEPES ácido 10 mM</b> |                              |   |   |
|--------------------------|------------------------------|---|---|
| <b>Isoformas</b>         | <b>Ligandos</b>              | <b>T=10°C</b>                                 | <b>T=25°C</b>                                 |
|                          |                              | <b><math>K_D</math></b>                       | <b><math>K_D</math></b>                       |
| <b>sc</b>                | <b>L-tirosina</b>            | $1,99 \times 10^{-8} \pm 5,5 \times 10^{-9}$  | -----   |
|                          | <b>L-tirosina-L-tirosina</b> | $1,12 \times 10^{-8} \pm 1,2 \times 10^{-9}$  | $4,75 \times 10^{-9} \pm 3,58 \times 10^{-3}$ |
|                          | <b>L-tirosina-L-arginina</b> | $1,72 \times 10^{-8} \pm 8,4 \times 10^{-10}$ | $1,97 \times 10^{-9} \pm 3,05 \times 10^{-3}$ |
| <b>ln</b>                | <b>L-tirosina</b>            | $5,96 \times 10^{-9} \pm 9,3 \times 10^{-10}$ | $5,20 \times 10^{-9} \pm 4,6 \times 10^{-10}$ |
|                          | <b>L-tirosina-L-tirosina</b> | $8,09 \times 10^{-9} \pm 7,6 \times 10^{-10}$ | $4,44 \times 10^{-9} \pm 5,1 \times 10^{-10}$ |
|                          | <b>L-tirosina-L-arginina</b> | $1,58 \times 10^{-8} \pm 1,15 \times 10^{-9}$ | $8,58 \times 10^{-9} \pm 5,83 \times 10^{-3}$ |
| <b>oc</b>                | <b>L-tirosina</b>            | -----   | -----   |
|                          | <b>L-tirosina-L-tirosina</b> | -----   | $1,18 \times 10^{-8} \pm 1,5 \times 10^{-7}$  |
|                          | <b>L-tirosina-L-arginina</b> | -----   | $6,90 \times 10^{-7} \pm 1,5 \times 10^{-6}$  |

Após a análise da tabela 5 podemos verificar que para T=10°C, a isoforma sc apresenta afinidade ligeiramente superior com a L-tirosina-L-tirosina do que com a L-tirosina-L-arginina. No entanto, a L-tirosina tem menor afinidade do que a L-tirosina-L-arginina. Isto evidencia que a presença de uma segunda L-tirosina promove a interação com a isoforma sc. No geral, e para T=10°C a isoforma ln apresenta maior afinidade comparativamente com a isoforma sc, nomeadamente com a L-tirosina, seguida da L-tirosina-L-tirosina e a menor afinidade é com a

L-tirosina-L-arginina. Para a isoforma oc a  $T=10^{\circ}\text{C}$  não houve sinal de RPS após repetição dos ensaios com concentrações crescentes de oc. Uma possível explicação poderá ser o aumento da concentração do tampão utilizado que poderá favorecer a ligação do oc aos ligandos.

Nos ensaios realizados a  $T=25^{\circ}\text{C}$ , a isoforma oc é a que apresenta menor afinidade nomeadamente com a superfície L-tirosina-L-arginina, sendo que não se obteve sinal de RPS com a L-tirosina. No geral e para  $T=25^{\circ}\text{C}$  a afinidade dos ligandos é maior para a isoforma sc, nomeadamente com a L-tirosina-L-arginina ( $K_D=1,97\times 10^{-9}$ ). No entanto não há uma diferença significativa entre as isoformas sc e ln como verificado a  $T=10^{\circ}\text{C}$ . No caso da isoforma sc, verificou-se que a presença da L-tirosina diminui a afinidade sendo esta maior com a L-tirosina-L-arginina e menor para L-tirosina-L-tirosina para  $T=25^{\circ}\text{C}$ . Para a isoforma ln a  $T=25^{\circ}\text{C}$ , tal como aconteceu para a isoforma sc a  $T=10^{\circ}\text{C}$ , a afinidade é maior verificou-se com a L-tirosina-L-tirosina seguida da L-tirosina, sendo a que apresenta menor afinidade a L-tirosina-L-arginina.

Fazendo uma perspectiva dos resultados obtidos por RPS com o tampão Hepes ácido 10 mM, verificou-se que em regra geral, a L-tirosina-L-tirosina apresenta maior afinidade para o pDNA do que a L-tirosina. Existe uma maior afinidade da isoforma sc a  $T=25^{\circ}\text{C}$  do que a  $T=10^{\circ}\text{C}$ . A interação com a L-tirosina-L-tirosina é preferencial em relação à L-tirosina-L-arginina a  $T=10^{\circ}\text{C}$ , mas a  $T=25^{\circ}\text{C}$ , a afinidade da isoforma sc é maior com a L-tirosina-L-arginina. Em todos os ensaios realizados, tanto a  $T=10^{\circ}\text{C}$  como  $T=25^{\circ}\text{C}$ , os valores de  $K_D$  obtidos (variando entre  $K_D=6,9\times 10^{-7}$  e  $K_D=8,58\times 10^{-9}$ ), apresentavam ordens de grandeza que demonstram a elevada afinidade para qualquer um dos ligandos testados, independentemente da isoforma utilizada. Sendo assim, tanto a L-tirosina-L-tirosina, como a L-tirosina-L-arginina, podem ser utilizados como ligandos em matrizes cromatográficas para reter a isoforma que se pretende purificar, sabendo que se pode recorrer a Tris-HCl 10 mM para permitir uma posterior eluição, já que não se verificou interação por RPS. No entanto, a L-tirosina como aminoácido sozinho foi, em comparação aos restantes ligandos testados, aquele que apresentou afinidade mais baixa para a generalidade das isoformas, mas sempre com valores de  $K_D$  que demonstravam alta afinidade para qualquer uma das isoformas de pVax1-LacZ, desta forma, não pode deixar de ser apontado como um ligando que futuramente deve ser testado em técnicas cromatográficas.

### **3.3. Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS RMN)**

O aminoácido L-tirosina foi imobilizado em Sepharose CL-6B. Esta imobilização iniciou-se com a ativação dos grupos hidroxilos da Sepharose CL-6B através de um protocolo em que se usa uma solução de NaOH 0,6 M com  $\text{NaBH}_4$  1,32 mM, seguido da adição de 1,4-butanediol diglicidil éter. Posteriormente adicionou-se a Sepharose ativada à solução de L-tirosina obtendo-se o suporte Sepharose-L-tirosina. Após a liofilização do suporte Sepharose-L-

tirosina, uma amostra deste foi inserida no rotor de zircônica, fazendo *swelling* em clorofórmio deuterado. Por fim, o rotor foi colocado na sonda HR-MAS e iniciou-se a aquisição de espectros de 1D e 2D.

Recorrendo à técnica de HR-MAS RMN fez-se a caracterização estrutural do suporte Sepharose-L-tirosina sintetizado. Através da análise do espectro  $^1\text{H}$  HR-MAS da Sepharose com os grupos epóxi ativados e do espectro do  $^1\text{H}$  HR-MAS da Sepharose-L-tirosina, salientam-se três desvios químicos: 5,38 ppm (-OH do anel aromático da L-tirosina); 11,26 ppm (-OH do grupo carboxílico da L-tirosina) e 2,38 ppm (-NH da ligação entre L-tirosina e a Sepharose ativada). São sinais que desviaram em relação ao espectro de  $^1\text{H}$  da L-tirosina livre e não têm multiplicidade definida que indicam a imobilização da L-tirosina na Sepharose CL-6B.

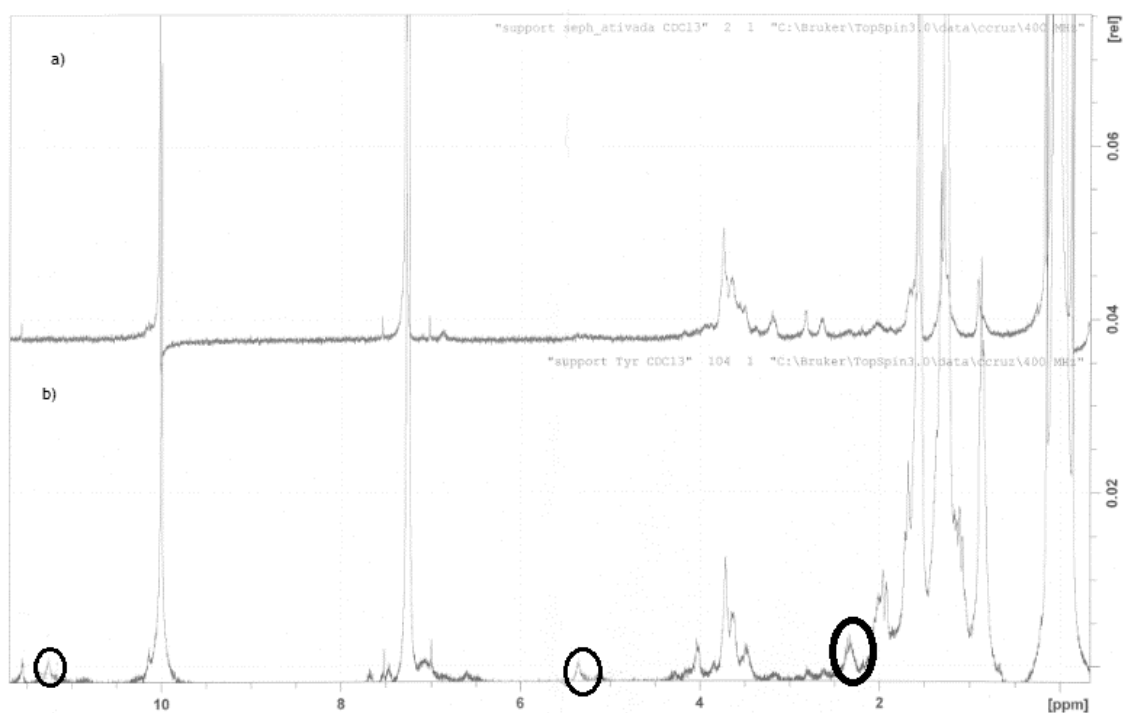


Figura 27: Espectro  $^1\text{H}$  HR-MAS Sepharose ativada (a) vs espectro  $^1\text{H}$  HR-MAS da Sepharose-L-tirosina (b).

### 3.4. Análise da interação entre os suportes Sepharose-L-tirosina, Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina e os 5'-mononucleótidos por STD-RMN

Para além da imobilização do aminoácido L-tirosina em Sepharose CL-6B, também se sintetizaram os suportes Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina. O protocolo de síntese aplicado à imobilização dos dipeptídeos L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina em Sepharose CL-6B foi semelhante ao da síntese do Sepharose-L-tirosina.

Com o intuito de identificar os locais de ligação dos 5'-mononucleótidos com os três suportes, foram realizadas experiências de STD-RMN. Nestas experiências, cada um dos 5'-

mononucleótidos (5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-TMP) foram adicionados aos suportes Sepharose-L-tirosina, Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina. Cada solução de complexo 5'-mononucleótido+suporte foi irradiada com uma frequência específica, distante dos sinais do 5'-mononucleótido, de forma a saturar todos os prótons do suporte.

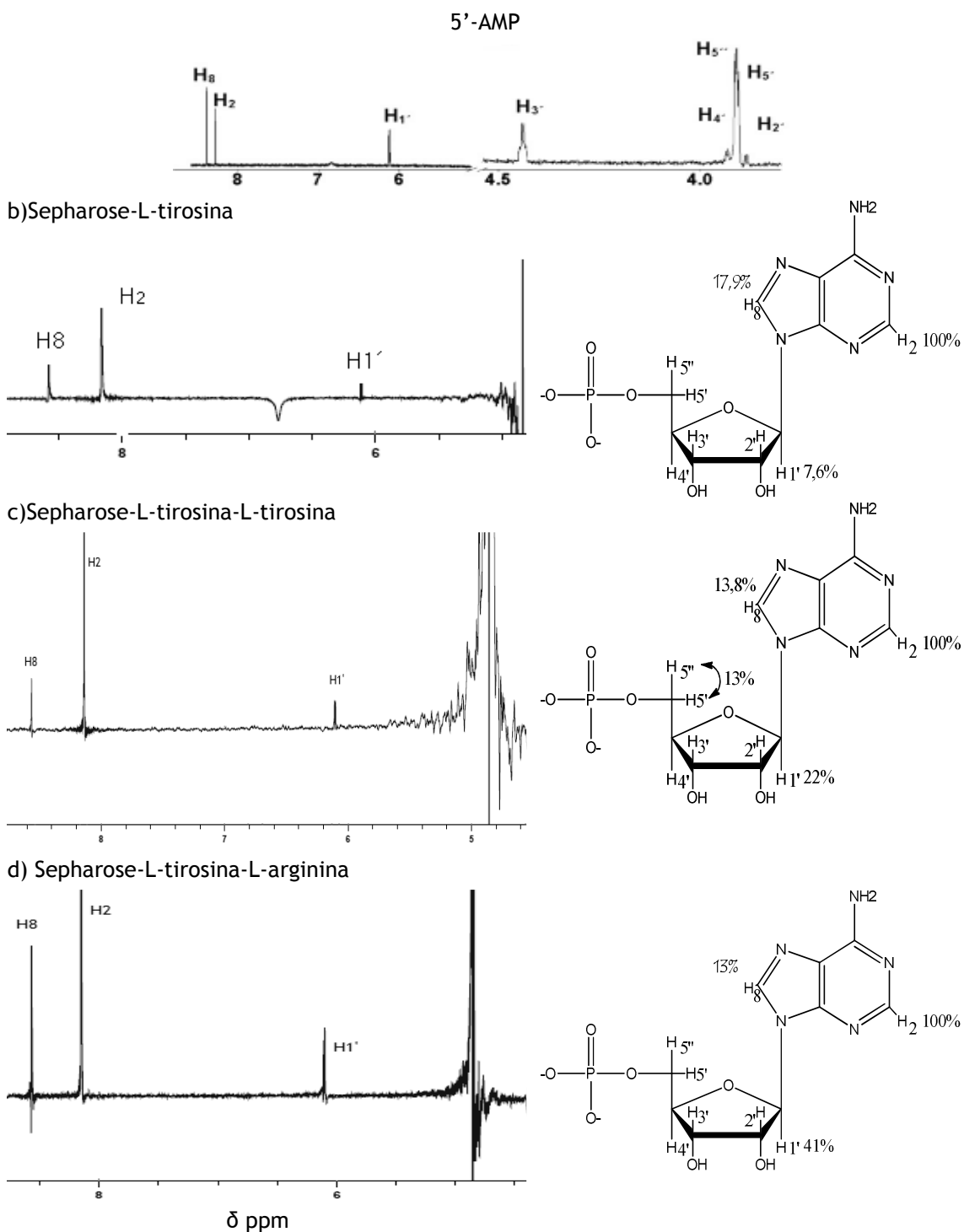


Figura 28: a) Espectro  $^1\text{H}$  RMN de 5'-AMP; b) espectro 5'-AMP:Sepharose-L-tirosina; c) espectro 5'-AMP: Sepharose-L-tirosina-L-tirosina; d) espectro 5'-AMP: Sepharose-L-tirosina-L-arginina.

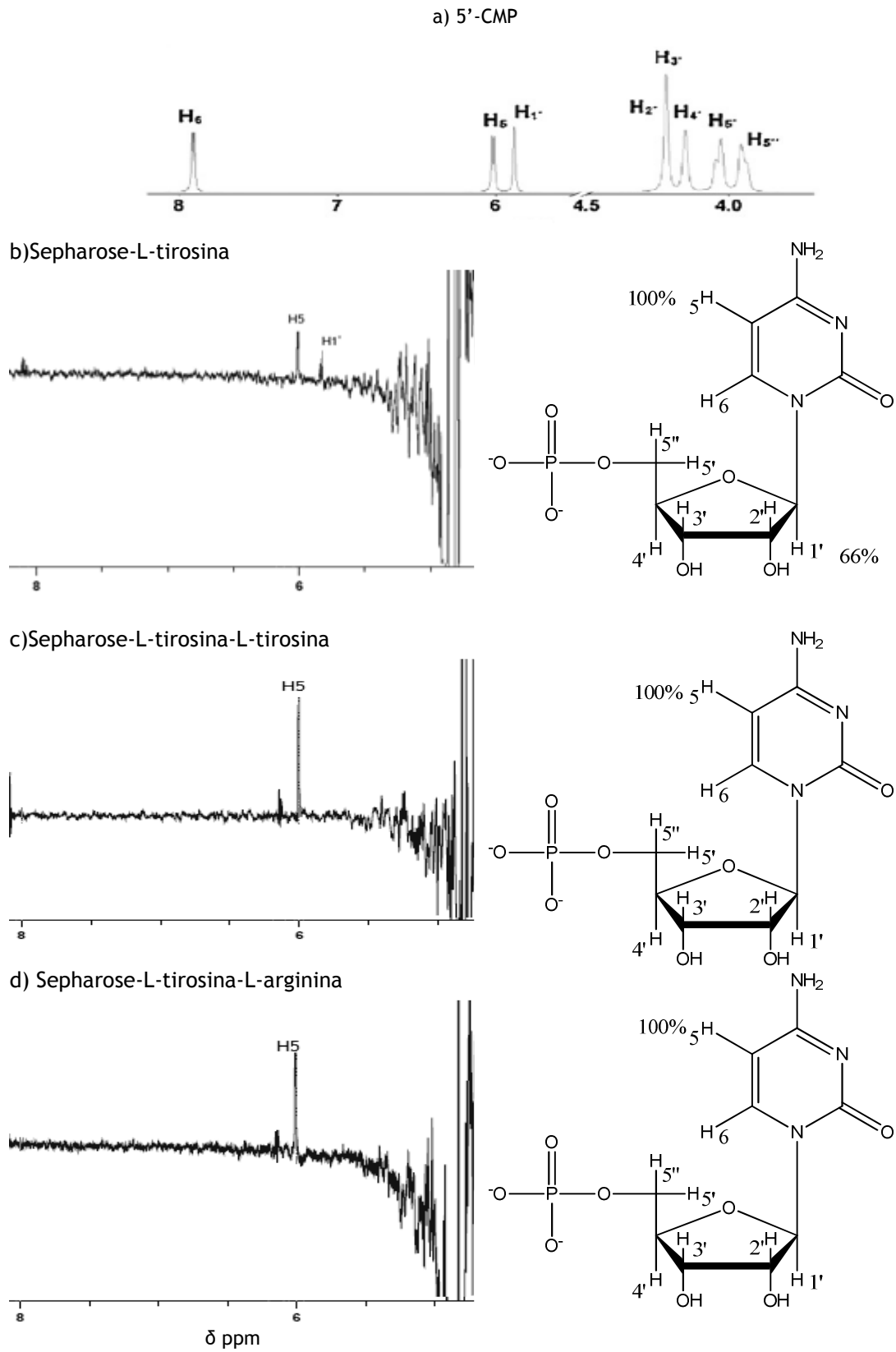


Figura 29: a) Espectro  $^1\text{H}$  RMN de 5'-CMP b) espectro 5'-CMP:Sepharose-L-tirosina; c) espectro 5'-CMP: Sepharose-L-tirosina-L-tirosina; d) espectro 5'-CMP: Sepharose-L-tirosina-L-arginina.

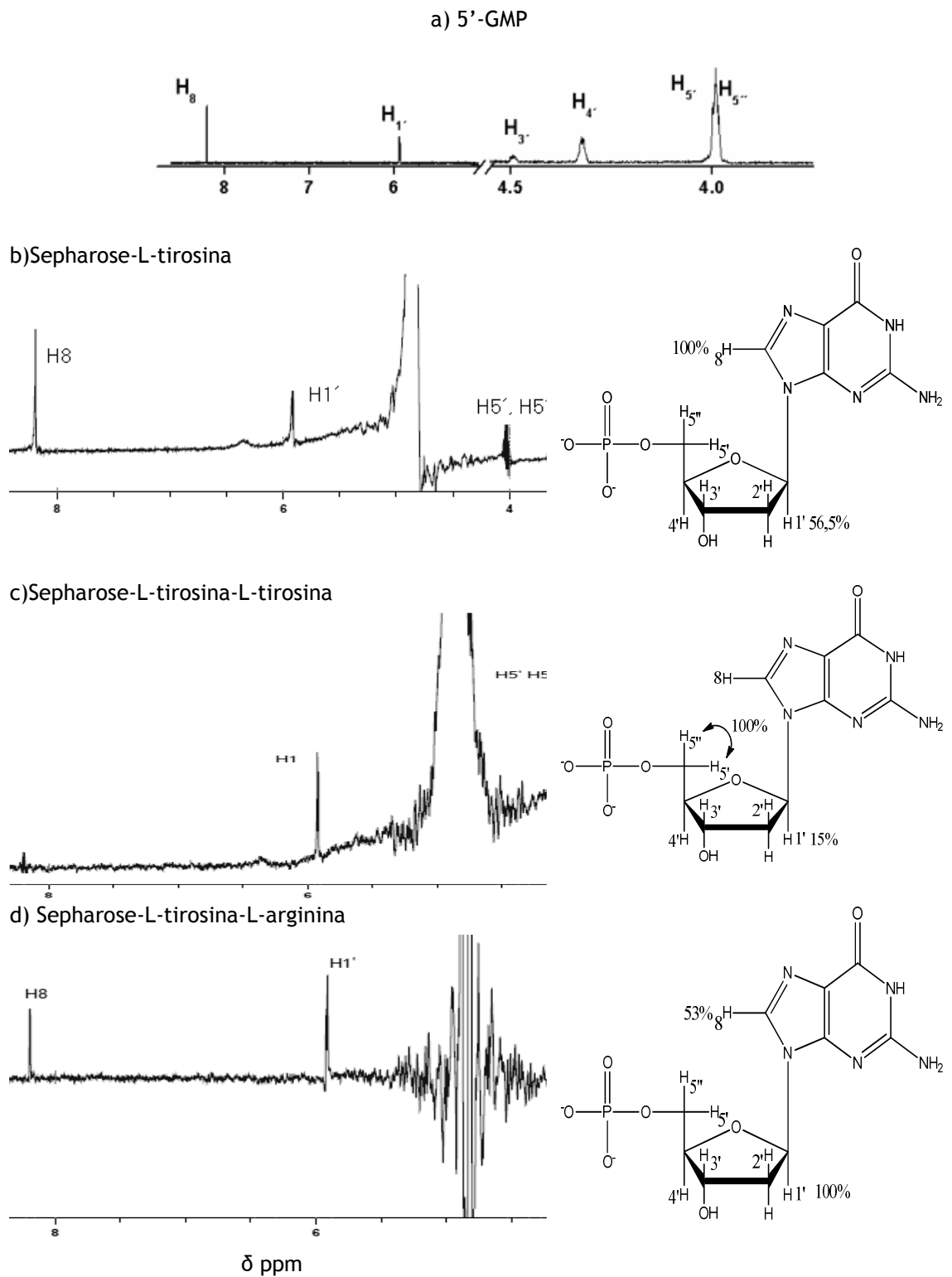


Figura 30: a) Espetro  $^1\text{H}$  RMN de 5'-GMP; b) espectro 5'-GMP:Sepharose-L-tirosina; c) espectro 5'-GMP:Sepharose-L-tirosina-L-tirosina; d) espectro 5'-GMP: Sepharose-L-tirosina-L-arginina.

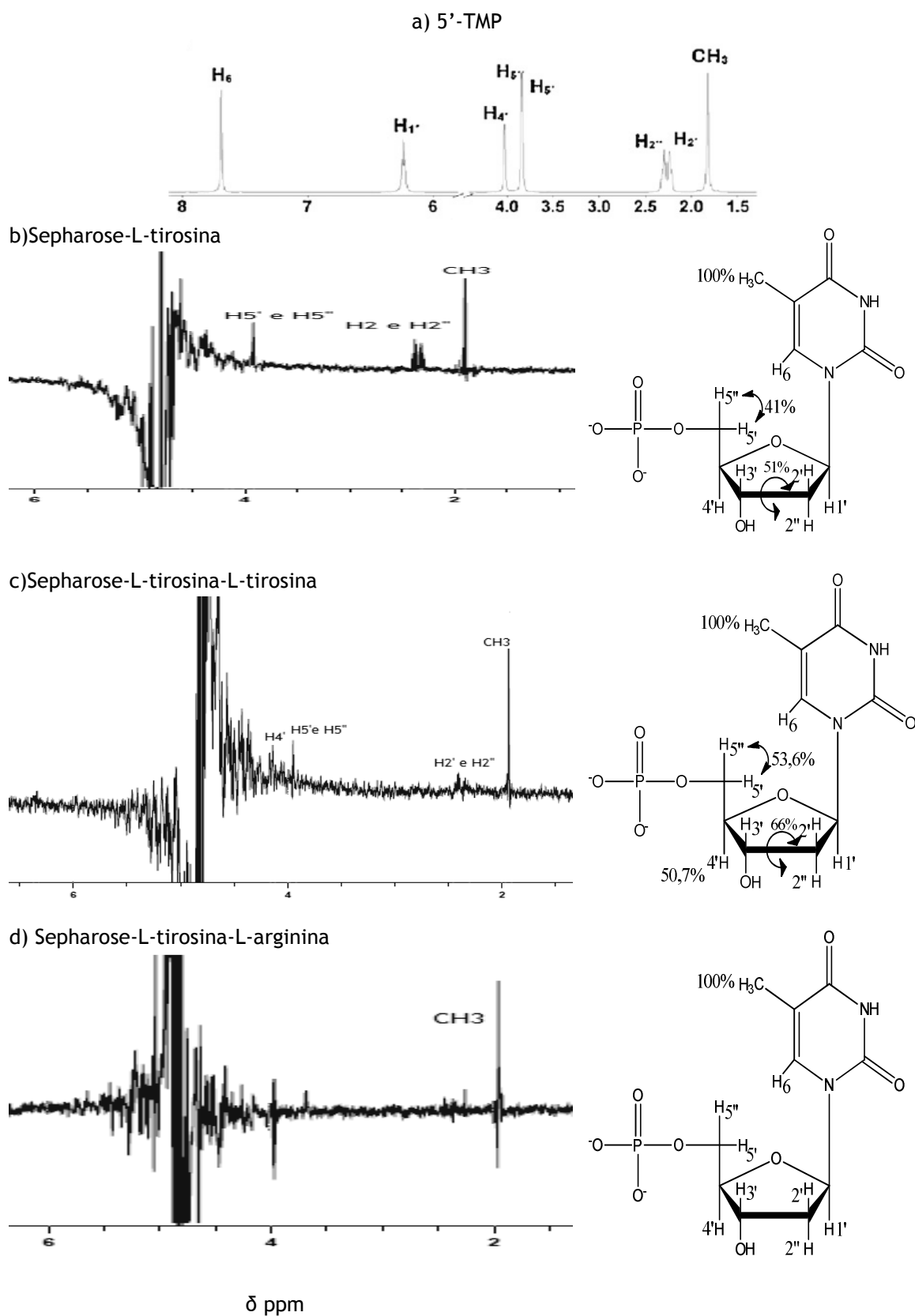


Figura 31: a) Espectro 1H RMN de 5'-TMP; b) espectro 5'-TMP:Sepharose-L-tirosina; c) espectro 5'-TMP:Sepharose-L-tirosina-L-tirosina; d) espectro 5'-TMP: Sepharose-L-tirosina-L-arginina.

Os espectros de STD-RMN apresentados nas figuras 28, 29, 30 e 31 resultam da diferença entre o espectro de transferência de saturação e o espectro de RMN de referência de cada 5'-mononucleótido, resultando no espectro de STD contendo unicamente os sinais dos prótons do 5'-mononucleótido que efectivamente se ligaram ao suporte.

Após a análise dos espectros STD-RMN representados na figura 28, relativos ao 5'-AMP e aos suportes, verifica-se que a interação com os três suportes é maioritariamente pelo próton H<sub>2</sub> da adenina (100% de saturação). Na presença do suporte Sepharose-L-tirosina há dois sinais de STD com o próton H<sub>8</sub> (17,9% de saturação) e o próton o H<sub>1'</sub> (7,57% de saturação) da desoxirribose. No caso da Sepharose-L-tirosina-L-tirosina além dos STD anteriores existe um STD com os prótons H<sub>5'</sub> e H<sub>5''</sub> (13% de saturação) adjacentes ao grupo fosfato. No caso do 5'-AMP e na presença da Sepharose-L-tirosina-L-arginina, a interacção é através dos prótons da base (H<sub>2</sub> com 100% de saturação e H<sub>8</sub> com 66% de saturação), havendo também uma interacção moderada através do próton H<sub>1'</sub> da desoxirribose (41% de saturação).

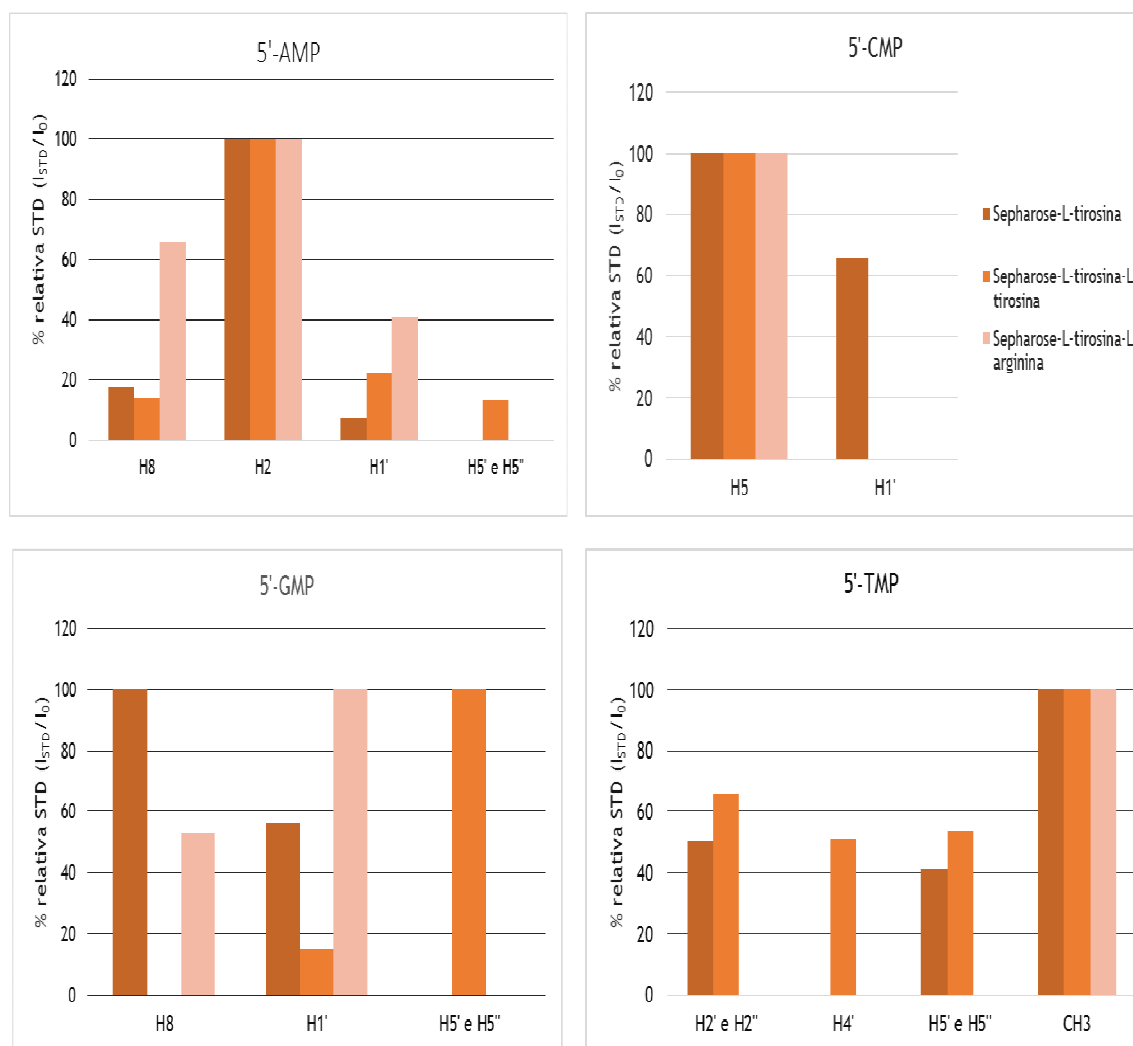
Relativamente ao 5'-CMP (figura 29) e através da análise dos espectros de STD, a interacção com os suportes estudados envolve o próton H<sub>5</sub> da citosina (100% de saturação). Existe apenas outro sinal de STD na presença do suporte Sepharose-L-tirosina através do próton H<sub>1'</sub> (66% de saturação) da desoxirribose. Este 5'-mononucleótido é o que apresenta menor % de STD.

As interacções do 5'-GMP (figura 30) com os suportes Sepharose-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina dão-se pelos mesmos prótons: H<sub>1'</sub> da desoxirribose e o H<sub>8</sub> da base. A diferença reside nas percentagens de saturação que são de 100% para o H<sub>8</sub> e 56,5% para o H<sub>1'</sub>, no caso do suporte Sepharose-L-tirosina enquanto que no caso da Sepharose-L-tirosina-L-arginina a percentagem de saturação mais alta corresponde ao H<sub>1'</sub>, seguido do próton H<sub>8</sub> (53% de saturação). No caso do suporte Sepharose-L-tirosina-L-tirosina, a interacção é maioritariamente pelos prótons H<sub>5'</sub> e H<sub>5''</sub> adjacentes ao grupo fosfato (100% de saturação) e pelo próton H<sub>1'</sub> da desoxirribose (15% de saturação). Este 5'-mononucleótido é aquele em que a percentagem máxima de saturação varia de suporte para suporte.

No caso do 5'-TMP (figura 31), para todos os suportes, a interacção é através do grupo metilo (100% de saturação) da base. No entanto, observaram-se dois sinais de STD com os suportes Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina, através dos prótons H<sub>5'</sub> e H<sub>5''</sub> (53,67% e 41,2% de saturação, respetivamente) e prótons H<sub>2'</sub> e H<sub>2''</sub> (66% de saturação para o suporte Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e 50,5% suporte Sepharose-L-tirosina), indicando o envolvimento da desoxirribose e dos prótons adjacentes ao grupo fosfato na interacção com o suporte. Desta forma, podemos concluir que a interacção preferencial com os suportes é pelo grupo metilo do 5'-TMP, seguida da desoxirribose, no caso dos suportes Sepharose-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-tirosina (H<sub>2'</sub>, H<sub>2''</sub> e H<sub>4'</sub>) e dos prótons adjacentes ao grupo fosfato. Este 5'-mononucleótido apresenta mais contactos com o suporte-L-tirosina-L-tirosina do que com o suporte-L-tirosina-L-arginina (apenas um STD envolvendo o grupo metilo).

Analisando os suportes e no caso da Sepharose-L-tirosina e os 5'-mononucleótidos (5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-TMP) interagem preferencialmente pela base. Na presença da Sepharose-L-

tirosina-L-tirosina a interação é idêntica e preferencialmente pela base com exceção do 5'-GMP que é através dos prótons H<sub>5'</sub> e H<sub>5''</sub> adjacentes ao grupo fosfato. Para a Sepharose-L-tirosina-L-arginina o resultado é idêntico ao do suporte L-tirosina-L-tirosina com exceção para o 5'-GMP, em que a interação com o suporte é pelos prótons da desoxirribose.



**Figura 32:** Percentagem relativa de STD de cada um dos 5'-mononucleótidos com os suportes Sepharose-L-tirosina, Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina.

No geral, as interações envolvidas entre os suportes podem ser de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre o anel aromático da L-tirosina e as bases dos 5'-mononucleótidos. No caso do 5'-TMP a interação pode ser hidrofóbica devido ao envolvimento do grupo metilo, assim como com a desoxirribose. No caso do 5'-GMP a interação com a Sepharose-L-tirosina e Sepharose L-tirosina-l-tirosina é diferente; no primeiro caso ligações de hidrogénio, empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e *van der Waals* podem ser as predominantes enquanto que no segundo suporte podem ser interações hidrofóbicas e de *van der Waals*.

A figura 32 representa os sinais de STD de cada 5'-mononucleótido com os suportes, através do cálculo da percentagem de saturação.

Em estudos anteriores, outros aminoácidos que atualmente já foram aplicados na cromatografia de afinidade, também foram imobilizados em Sepharose e posteriormente, tal como aconteceu com a Sepharose-L-tirosina, com a Sepharose-L-tirosina-L-tirosina e com a Sepharose-L-tirosina-L-arginina, foram analisados por STD-RMN onde se avaliou a sua interação com cada um dos 5'-mononucleótidos. A tabela 6 resume os resultados obtidos nas experiências de STD-RMN para os suportes Sepharose-L-histidina, Sepharose-L-lisina e Sepharose-L-arginina<sup>[47][35][34]</sup>.

**Tabela 6:** Tabela resumo dos resultados obtidos em estudos anteriores para a interação entre 5'-mononucleótidos:Sepharose-L-histidina <sup>[47][35]</sup>, 5'-mononucleótidos:Sepharose-L-lisina <sup>[34]</sup> e 5'-mononucleótidos:Sepharose-L-arginina <sup>[34]</sup>.

|               | <i>Sepharose-L-histidina</i>   | <i>Sepharose-L-lisina</i>   | <i>Sepharose-L-arginina</i>   |
|---------------|--|---|---|
| <b>5'-AMP</b> | -Os sinais mais intensos são H <sub>5'</sub> e H <sub>5''</sub> no grupo fosfato;<br>-Moderada intensidade nas interações com a desoxirribose. | -Sinal mais intenso com o grupo fosfato;<br>-Baixa intensidade com a desoxirribose ou adenina.  | -Sinal mais intenso é com H <sub>5'</sub> e H <sub>5''</sub> do grupo fosfato.  |
| <b>5'-CMP</b> | -Sinais intensos na interação com o grupo fosfato;<br>-intensidade moderada na interação com a desoxirribose.                                  | -Sinais obtidos são análogos aos que foram obtidos para o suporte Sepharose-L-arginina.   | -Sinais intensos com a desoxirribose e H <sub>5'</sub> e H <sub>5''</sub> do grupo fosfato;   |
| <b>5'-GMP</b> | -Ligação preferencial pela desoxirribose;<br>-Ligação moderada pelo H <sub>5'</sub> e H <sub>5''</sub> do grupo fosfato.                       | -Ligação mais intensa é com a desoxirribose;<br>-Ligação moderada pelo H <sub>5'</sub> e H <sub>5''</sub> do grupo fosfato.                               | -Ligação mais intensa é com a desoxirribose;<br>-90% de intensidade com H <sub>5'</sub> e H <sub>5''</sub> ;<br>-14% com H <sub>8</sub> da Guanina. |
| <b>5'-TMP</b> | -A ligação ao grupo metilo da Timina é a que acontece com maior intensidade.<br>-Existe também interação mais fraca com a desoxirribose.       | - Liga-se com maior intensidade ao grupo fosfato, seguido da interação com a desoxirribose;<br>-Sinal moderado de interação com o grupo CH <sub>3</sub> . | -Liga-se com maior intensidade pelo grupo fosfato;<br>-Existe também uma interação forte com o grupo metilo da Timina.                              |

Analisando a tabela 6, observa-se um padrão nas interações entre cada um dos 5'-mononucleótidos e os suportes testados, é semelhante independentemente do suporte analisado. No caso do 5'-AMP e 5'-CMP a interação preferencial é sempre através dos prótons adjacentes ao grupo fosfato. Para o 5'-TMP os prótons preferenciais envolvidos na interação com os suportes são os do grupo metilo da base azotada enquanto que para o 5'-GMP são os da desoxirribose.

Fazendo um paralelismo entre os resultados de STD-RMN obtidos para os aminoácidos que já foram utilizados em AC e os resultados obtidos para os suportes testados nesta dissertação, verifica-se que no caso da 5'-TMP e do 5'-GMP existe uma semelhança nas interações. Tanto a Sepharose-L-tirosina, como a Sepharose-L-tirosina-L-arginina ou a Sepharose-L-tirosina-L-tirosina, no 5'-TMP, apresentam interações pelo grupo metilo, sendo na sua maioria

interações hidrofóbicas. Para o 5'-GMP, apesar de não ser uma interação preferencial, qualquer um destes suportes apresenta uma interação moderada através da desoxirribose, sugerindo possíveis ligações de hidrogénio e interações de *van der Waals*.

As principais diferenças entre os suportes já sintetizados (Sephacrose-L-histidina, Sepharose-L-lisina e Sepharose-L-arginina) e os novos suportes são com o 5'-AMP e o 5'-CMP. Para estes 5'-mononucleótidos, com a exceção do suporte Sepharose-L-tirosina-L-tirosina (em que existe apenas um STD de baixa intensidade referente aos prótons  $H_{5'}$  e  $H_{5''}$ ), não existe qualquer interação através do grupo fosfato como sucedia nos suportes com os aminoácidos L-histidina, L-lisina e L-arginina. Isto pode acontecer devido a uma preferência de ligação por parte do anel aromático da L-tirosina com os anéis das bases azotadas de 5'-AMP e 5'-CMP, promovendo as interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , o que não ocorria em suportes com a L-lisina e L-arginina. No caso do 5'-AMP e 5'-CMP, além de interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , existem também ligações de hidrogénio e interações *van der Waals*.

Para os suportes Sepharose-L-tirosina, Sepharose-L-tirosina-L-arginina e Sepharose-L-tirosina-L-tirosina verificou-se que as interações fundamentais foram de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas. Este resultado vai de encontro ao que foi obtido para o suporte Sepharose-L-histidina, uma vez que este aminoácido apresenta um anel imidazol que promove as interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$ . Nesse caso, interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e interações hidrofóbicas entre a L-histidina e DNA/RNA fizeram com que em ensaios cromatográficos os ácidos nucleicos apresentassem uma tendência para eluírem com a diminuição da concentração de sal. Posto isto e tendo em conta a exposição dos nucleótidos nas cadeias, a ordem de eluição obtida foi: pDNA oc- gDNA- pDNA sc-RNA<sup>[25]</sup>. Desta forma, é possível que a eluição, nos novos suportes sintetizados, seja análoga à obtida com o aminoácido L-histidina. Associando os resultados obtidos por STD-RMN e aqueles que foram obtidos para RPS, ficou comprovado que os ligandos L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina podem ser testados como ligandos de afinidade em AC para purificação de pDNA.

## Capítulo 4: Conclusão

Em estudos anteriores, verificou-se que aminoácidos como a L-histidina, L-lisina ou a L-arginina podiam ser aplicados na cromatografia de afinidade, obtendo-se pDNA com os níveis de purificação exigidos pelas agências reguladoras (como a FDA). Dado que é um objetivo da indústria farmacêutica obter pDNA cada vez mais puro, houve a necessidade de estudar novos ligandos de afinidade. O objetivo deste trabalho foi explorar a possibilidade de utilizar outros aminoácidos ou dipeptídeos na cromatografia de afinidade para purificação do DNA plasmídico. Inicialmente procedeu-se ao estudo do tipo de interações envolvidas e a posterior avaliação do seu comportamento na purificação de pDNA, de modo a que estes possam ser utilizados em colunas cromatográficas. Os ligandos utilizados foram: L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina. O dipeptídeo L-tirosina-L-tirosina foi sintetizado seguindo o método clássico de síntese de dipeptídeos. Neste método, protege-se a amina do primeiro aminoácido com um grupo protetor Boc e o grupo carboxílico do segundo aminoácido com um grupo metil.

O tipo de interações envolvidas e a afinidade dos ligandos foram avaliados por RPS e por STD-RMN. A técnica de RPS permitiu avaliar a afinidade da L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina com as isoformas do plasmídeo pVAX1-LacZ. Nos ensaios realizados em Hepes ácido 10 mM, observou-se que a afinidade é maior para a isoforma sc com L-tirosina-L-arginina a  $T=25^{\circ}\text{C}$  ( $K_D=1,97\times 10^{-9}$ ) e o menor para a isoforma oc com o mesmo ligando ( $K_D=6,9\times 10^{-7}$ ). Para o ligando L-tirosina, a afinidade é maior para a isoforma ln tanto a  $T=10^{\circ}\text{C}$  ( $K_D=5,96\times 10^{-9}$ ) como a  $T=25^{\circ}\text{C}$  ( $K_D=5,20\times 10^{-9}$ ). O ligando L-tirosina-L-tirosina apresentou maior afinidade para a isoforma ln ( $K_D=4,44\times 10^{-9}$ ). No geral, qualquer um destes ligandos apresentou elevada afinidade para as isoformas do plasmídeo pVAX1-LacZ visto que os valores de  $K_D$  obtidos são da ordem de grandeza de  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$  M.

Através da técnica de STD-RMN, obteve-se informação estrutural acerca dos prótons dos 5'-mononucleótidos envolvidos na ligação aos três suportes. As interações predominantes com 5'-AMP e 5'-CMP com os suportes foram semelhantes sendo estas interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre os anéis aromáticos da L-tirosina e os anéis das bases azotadas dos 5'-mononucleótidos. No caso do 5'-TMP, as interações foram preferencialmente pelo grupo metilo, sugerindo interações hidrofóbicas. Apenas para o 5'-GMP existem diferenças no tipo de interações; com os suportes Sepharose-L-tirosina e Sepharose-L-tirosina-L-arginina, as interações ocorreram preferencialmente pela desoxirribose e pela base azotada, as possíveis interações formadas foram ligações de hidrogénio, empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e interações de *van der Waals*. No caso do suporte Sepharose-L-tirosina-L-tirosina a interação do 5'-GMP foi através dos prótons do grupo fosfato.

Os resultados obtidos por RPS e STD-RMN permitiram fazer o *screening* das interações entre os ligandos e nucleótidos/ácidos nucleicos e determinar as constantes de dissociação de equilíbrio com as isoformas do pVAX1-*LacZ*, demonstrando que os ligandos L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina podem ser utilizados na purificação de pDNA em cromatografia de afinidade.

## Capítulo 5: Perspetivas Futuras

O desenvolvimento de novos ligandos para suportes cromatográficos para purificação de ácidos nucleicos é fundamental para que a AC possibilite a obtenção de pDNA cada vez mais puro e com rendimentos mais elevados. Deste modo, futuramente deverão ser testados outros derivados de aminoácidos ou peptídeos.

Em relação aos ligandos testados (L-tirosina, L-tirosina-L-tirosina e L-tirosina-L-arginina), uma vez que já se comprovou a alta afinidade para a isoforma sc do plasmídeo pVAX1-*LacZ*, a continuação deste trabalho passará pela sua aplicação em colunas cromatográficas. Estas colunas irão ser testadas a diferentes condições de pH e temperaturas, podendo ser aplicadas a outros vetores não-virais como o pcDNA3-FLAG-p53.

## Bibliografia

- [1] Hasche A. & Voß C. (2005). Immobilisation of a repressor protein for binding of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*. vol. 1080. 76-82
- [2] Coban, C., Kobiyama, K., Jounai, N., Tozuka, M. & Ishii, K.J. (2013). DNA vaccines: A simple DNA sensing matter?. *Hum. Vaccin. Immunother.* vol. 9. 2216-2221
- [3] Caramelo-Nunes, C., Almeida, P., Marcos, J.C. & Tomaz, C.T. (2014). Aromatic ligands for plasmid deoxyribonucleic acid chromatographic analysis and purification: an overview. *J. Chromatogr. A*. vol. 1327. 1-13
- [4] Lehninger, A. & Nelson, M.M., Cox, David L. (2011). *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fifth edit. New York: W.H. Freeman and Company. p.307, 312, 949,954
- [5] Videira, A. (2011). *Engenharia Genética: Princípios e Aplicações*. Lisboa: LIDEL, p.4-7,35,47
- [6] Diogo, M.M., Queiroz, J.A. & Prazeres, D.M.F. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*. vol. 1069. 3-22
- [7] Ghanem, A., Healey R. & Adly, F.G. (2013). Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: a review. *Anal. Chim. Acta*. vol. 760. 1-15
- [8] Cupillard, L., Juillard, V., Latour, S., Colombet, G., Cachet, N., Richard, S., Blanchard, S. & Fischer, L. (2005). Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine*. vol. 23. 1910-1916
- [9] Mota, É., Sousa, Â., Černigoj, U., Queiroz, J.A., Tomaz, C.T. & Sousa, F. (2013). Rapid quantification of supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid using a monolithic ion exchanger. *J. Chromatogr. A*. vol. 1291. 114-21
- [10] Smith, C.R., DePrince, R.B., Dackor, J., Weigl, D., Griffith, J. & Persmark, M. (2007). Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: shifts in elution order of linear DNA. *J. Chromatogr. B*. vol. 854. 121-127
- [11] Ferreira, G.N.M. (2005). Chromatographic Approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination. *Chem. Eng. Technol.* vol. 28. 1285-1294
- [12] Stadler, J., Lemmens, R. & Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. *J. Gene Med.*, vol. 6su. 54-66, 2004.
- [13] Sousa, Â., Sousa, F. & Queiroz, J.A. (2012). Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification. *J. Sep. Sci.* vol. 35. 3046-3058
- [14] Černigoj, U., Vidic, U., Barut, M., Podgornik, A., Peterka, M. & Štrancar, A. (2013). A multimodal histamine ligand for chromatographic purification of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*. vol. 1281. 87-93
- [15] Sum, C.H., Chong, J.Y., Wettig, S. & Slavcev, R.A. (2014). Separation and purification of linear covalently closed deoxyribonucleic acid by Q-anion exchange membrane chromatography. *J. Chromatogr. A*. vol. 1339. 214-218.

- [16] Pereira, L.R., Prazeres, D.M.F. & Mateus, M. (2010). Hydrophobic interaction membrane chromatography for plasmid DNA purification: Design and optimization. *J. Sep. Sci.*, vol. 33 .1175-1184
- [17] Paredes, G., Makart, S., Stadler, J. & Mazzotti, M. (2005). Simulated Moving Bed Operation for Size Exclusion Plasmid Purification. *Chem. Eng. Technol.* vol. 28. 1335-1345
- [18] Han, Y. & Forde, G.M. (2008). Single step purification of plasmid DNA using peptide ligand affinity chromatography. *J. Chromatogr. B.* vol. 874. 21-26
- [19] Murphy, J.C., Jewell, D.L., White, K.I., Fox, G.E. & Willson, R.C. (2003). Nucleic Acid Separations Utilizing Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Biotechnol. Prog.* vol. 19. 982-986
- [20] Cano, T., Murphy, J.C., Fox, G.E. & Willson, R.C. (2005). Separation of genomic DNA from plasmid DNA by selective renaturation with immobilized metal affinity capture. *Biotechnol. Prog.* vol. 21. 1472-1477
- [21] Darby, R., Forde, G., Slater, N.K.H. & Anne, H.V. (2007). Affinity purification of plasmid DNA directly from crude bacterial cell lysates. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98. 1103-1108
- [22] Woodgate, J., Palfrey, D., Nagel, D.A., Hine, A.V. & Slater, N.K.H. (2002). Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 79.450-456
- [23] Sousa, Â., Sousa, F. & Queiroz, J.A. (2011). Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification. *J. Chromatogr. B.* vol. 879.3507-3515
- [24] Sousa, F., Sousa, Â., & Queiroz, J.A. (2010). Amino acids-nucleotides biomolecular recognition: from biological occurrence to affinity chromatography. *J. Mol. Recognit.* vol. 23. 505-518
- [25] Sousa, F., Freitas, S., Azzoni, A.R., Prazeres, D.M.F. & Queiroz, J.A. (2006). Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol. Appl. Biochem.* vol. 45.131-140
- [26] Arakawa, T., Tsumoto, K., Kita, Y., Chang, B. & Ejima, D. (2007). Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids.* vol. 33. 587-605
- [27] Sousa, F., Prazeres, D.M.F. & Queiroz, J.A. (2009). Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *J. Gene Med.* vol. 11.79-88
- [28] Sousa, Â., Almeida, A.M., Černigoj, U., Sousa, F. & Queiroz, J.A. (2014). Histamine monolith versatility to purify supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid from *Escherichia coli* lysate. *J. Chromatogr. A.* vol. 1355. 125-133
- [29] Solomons, F.B.C., Graham, T.W. (2009). *Química Orgânica*. 9ª Edição. LTC. vol 2. p.424-430.
- [30] Isidro-Llobet, A., Alvarez, M. & Albericio, F. (2009). Amino acid-protecting groups. *Chem. Rev.* vol. 109. 2455-2504

- [31] Amblard, M., Fehrentz, J.A., Martinez, J. & Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* vol. 33. 239-254
- [32] Aimoto, S. (2001). Contemporary Methods for Peptide and Protein Synthesis. *Curr. Org. Chem.* vol. 5. 45-87
- [33] Cherkupally, P., Acosta, G.A., Ramesh, S., De la Torre, B.G., Govender, T., Kruger, H.G. & Albericio, F. (2014). Solid-phase peptide synthesis (SPPS), C-terminal vs. side-chain anchoring: a reality or a myth. *Amino Acids.* vol. 46. 1827-1838
- [34] Cruz, C., Cabrita, E.J. & Queiroz, J.A. (2011). Screening nucleotide binding to amino acid-coated supports by surface plasmon resonance and nuclear magnetic resonance. *Anal. Bioanal. Chem.* vol. 401. 983-993
- [35] Cruz, C., Cabrita, E.J. & Queiroz, J.A. (2011). Analysis of nucleotides binding to chromatography supports provided by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. A.* vol. 1218. 3559-3564
- [36] Meyer, B. & Peters, T. (2003). NMR Spectroscopy of Proteins NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew. chemie.* vol. 42. 864-890
- [37] Yu, F., Roy, S., Arevalo, E., Schaeck, J., Wang, J., Holte, K., Duffner, J., Gunay, N.S., Capila, I. & Kaundinya, G.V. (2014). Characterization of heparin-protein interaction by saturation transfer difference (STD) NMR. *Anal. Bioanal. Chem.* vol. 406. 3079-3089
- [38] Viéville, J.M.P., Charbonnier, S., Eberling, P., Starck, J.-P. & Delsuc, M. (2014). A new NMR technique to probe protein-ligand interaction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* vol. 89. 18-23
- [39] Carvalho, L.R., Corvo, M.C., Enugala, R., Marques, M.M.B. & Cabrita, E.J. (2010). Application of HR-MAS NMR in the solid-phase synthesis of a glycopeptide using Sieber amide resin. *Magn. Reson. Chem.* vol. 48. 323-330
- [40] Homola, J., Yee, S.S. & Gauglitz, G. (1999). Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors Actuators B. Chem.* vol. 54.3-15
- [41] Rich, R.L. & Myszka, D.G. (2011). BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J. Mol. Recognit.* vol. 14. 223-228
- [42] Kuznetsova, E.A., Sazonova, N.M., Nikitin, S.V., Zhmurenko, L.A. & Gudasheva, T.A. (2013). Synthesis of the potential dipeptide neuroleptic dilept and its active metabolite. *Pharm. Chem. J.* vol. 47. 243-246
- [43] Jung, M.E. & Lazarova, T.I. (1997). Efficient Synthesis of Selectively Protected L -Dopa Derivatives from L -Tyrosine via Reimer - Tiemann and Dakin Reactions. *J. Org. Chem.* vol. 62. 1553-1555
- [44] Sorokina, Y.M., Sladkova, A.A., Popova, L.A., Shadyro, O.I. & Knizhnikov, V.A. (2012). Synthesis of dipeptides based on valine and threonine. *Russ. J. Org. Chem.* vol. 48. 1297-1301
- [45] Caramelo-Nunes, C., Tente, T., Almeida, P., Marcos, J.C. & Tomaz, C.T. (2011). Specific berenil-DNA interactions: an approach for separation of plasmid isoforms by pseudo-affinity chromatography. *Anal. Biochem.* vol. 412. 153-158

- [46] Platis, D. & Labrou, N.E. (2008). Affinity chromatography for the purification of therapeutic proteins from transgenic maize using immobilized histamine. *J. Sep. Sci.* vol. 31. 636-45
- [47] Cruz, C., Santos, S.D., Cabrita, E.J. & Queiroz, J.A. (2013). Binding analysis between L-histidine immobilized and oligonucleotides by SPR and NMR. *Int. J. Biol. Macromol.* vol. 56. 175-180
- [48] Sousa, F. & Queiroz, J.A. (2011). Supercoiled plasmid quality assessment by analytical arginine-affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.* vol. 1218. 124-129