

# Cromatografia de imunoafinidade

12

PAOLO BARTOLINI  
MARIA TERESA DE CARVALHO PINTO RIBELA

## NOMENCLATURA

Ab	anticorpo	Fab	cadeia leve do anticorpo
Ab:Ag	complexo antígeno-anticorpo	Fc	cadeia pesada do anticorpo
Ag	antígeno	HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
Atm	atmosfera	IDA	iminodiacetato
CNBr	brometo de cianogênio	IgG	imunoglobulina G
DMSO	dimetil-sulfóxido	$K_a$	constante de associação
DNA	ácido desoxirribonucléico	$K_d$	constante de dissociação
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	$K_e$	constante de equilíbrio
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético		

## INTRODUÇÃO

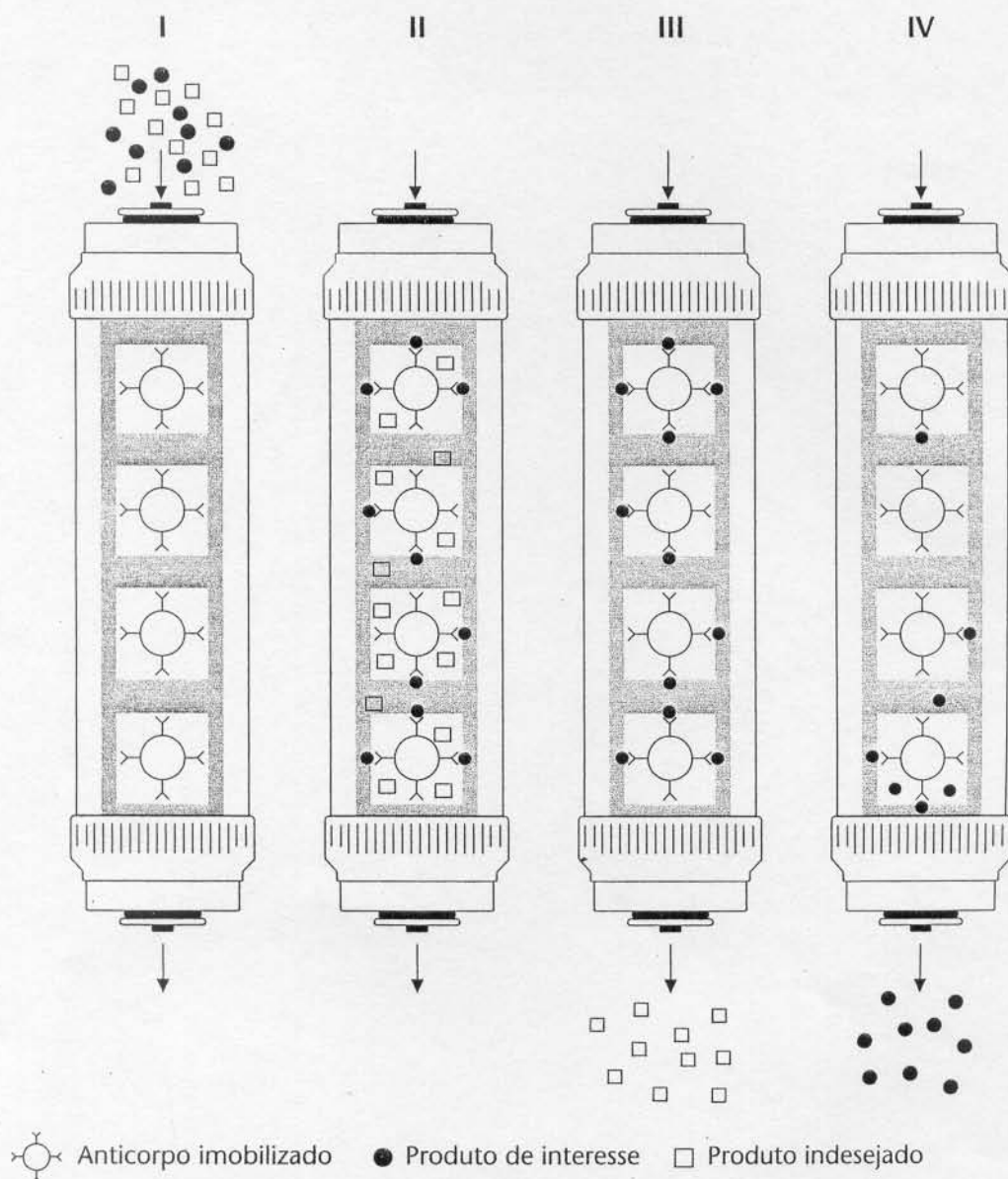
A cromatografia de imunoafinidade baseia-se no reconhecimento de epítomos antigênicos por anticorpos. A alta especificidade e afinidade dos anticorpos para com seus antígenos faz da cromatografia de imunoafinidade poderosa ferramenta para isolar um determinado composto a partir de amostras complexas, com seletividade que, em geral, não é conseguida por outros métodos cromatográficos. Esse tipo de cromatografia conse-

gue, inclusive, discriminar formas alteradas ou parcialmente degradadas da forma nativa de uma proteína, utilizando clones que produzem anticorpos, os quais se ligam apenas às formas não-nativas e não interagem com a proteína intacta.

Essa metodologia consiste em geral de 3 etapas, representadas esquematicamente na Figura 12.1. Na 1ª etapa (I e II) a amostra contendo o produto a ser purificado é aplicada a uma coluna com anticorpos imobilizados. Em virtude da especificidade da interação anti-

geno-anticorpo apenas o produto de interesse se liga ao imunoadsorvente. Em seguida, uma etapa de lavagem (III) com tampões suaves, como fosfato salina (PBS) pH 7,2, remove o material não retido (impurezas presentes no fluido da coluna e aquelas ligadas inespecificamente ao imunoadsorvente).

Quanto maior o volume do tampão de lavagem usado nessa etapa, maior a redução das impurezas ligadas de modo inespecífico. Entretanto, lavagens com volumes muito grandes podem acarretar perdas do produto de interesse, sendo, portanto, relevante o compromisso entre o rendimento da purificação



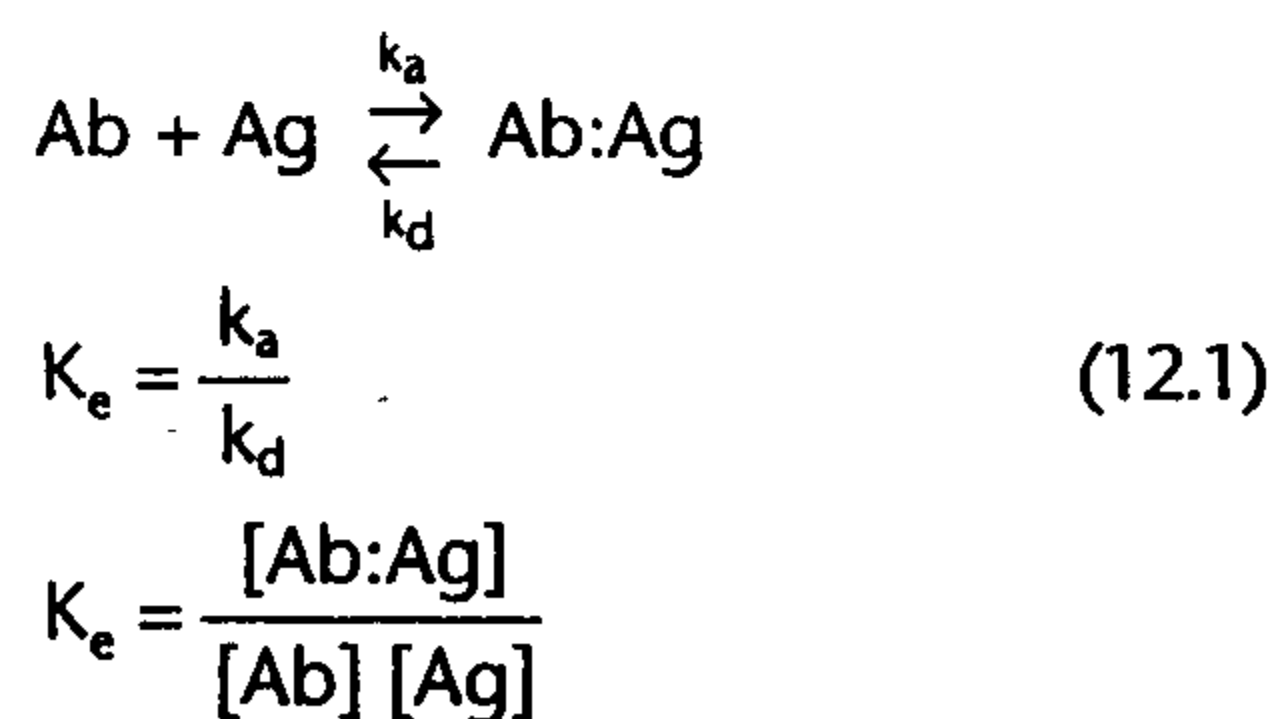
**Figura 12.1** Esquema das etapas de cromatografia de imunoafinidade: I e II – entrada da amostra; III – lavagem; IV – eluição

e a pureza do produto. Finalmente, na etapa de eluição (IV) o produto de interesse é removido da coluna empregando-se um solvente que reduz a afinidade do antígeno em relação ao anticorpo.

Em algumas aplicações o modelo adotado retém na coluna os componentes indesejáveis, deixando passar o produto de interesse. Exemplo interessante desse enfoque é relatado na literatura, para o hormônio de crescimento humano recombinante produzido em *Escherichia coli*, em que o anticorpo usado na coluna de imunoafinidade é seletivo para as impurezas derivadas da célula hospedeira, enquanto o hormônio passa pela coluna sem ser retido. Nesse caso, aumento de pureza de cerca de 300 vezes é relatado para uma única etapa de purificação utilizando colunas de Sepharose 4B, ativadas por CNBr, com IgG antiproteínas de *E. coli*, imobilizadas na matriz. A vantagem desse modelo é que o hormônio não estará exposto a condições drásticas de eluição.

## INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO

A ligação do anticorpo imobilizado (Ab) ao antígeno (Ag) com a formação de um complexo anticorpo-antígeno (Ab:Ag) é descrita pelas equações:



em que:

$K_e$  = constante de equilíbrio

$k_a$  é a constante de velocidade de 2ª ordem para a associação do Ab com o Ag ( $M^{-1}s^{-1}$ )

$k_d$  é a constante de velocidade da 1ª ordem para a dissociação do complexo Ab: Ag ( $s^{-1}$ )

[Ab:Ag] concentração molar do complexo anticorpo-antígeno no equilíbrio

[Ab] concentração molar do anticorpo no equilíbrio

[Ag] concentração molar do antígeno no equilíbrio

A interação antígeno-anticorpo apresenta elevada constante de associação (baixa constante de dissociação):  $10^{-8}$  a  $10^{-6} m^{-1}$  para anticorpos policlonais e  $10^{-12}$  a  $10^{-8} m^{-1}$  para anticorpos monoclonais. Isso resulta em ligações extremamente fortes entre o antígeno e o anticorpo imobilizado, sobretudo ligações hidrofóbicas e também ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e interações de Van der Waals. A única maneira de eluir o produto de interesse é utilizando condições que aumentem a taxa de dissociação ( $k_d$ ) do complexo antígeno-anticorpo (isto é, diminuam o valor de  $k_a$ ). Para isso são necessárias, em geral, condições drásticas de eluição (como valores extremos de pH). Estas, entretanto, podem causar desnaturação do produto ou do ligante (anticorpo ou antígeno que é imobilizado), bem como ocasionar perdas do anticorpo, seja por clivagem desse e conseqüente desligamento do suporte, seja por danificação do próprio suporte. Por outro lado, uma eluição incompleta pode ocasionar, além de baixa recuperação do produto, perda da capacidade da coluna. As condições ideais de eluição, portanto, devem ser tais que a eluição do produto seja completa após 1 a 2 volumes de coluna, evitando assim que ele se dilua

muito. É difícil estabelecer regras gerais para a seleção do método de eluição a ser adotado, uma vez que propriedades do antígeno a ser separado, como ponto isoelétrico, solubilidade e estabilidade em solução, devem ser levadas em conta em cada processo de separação.

## ESTRATÉGIAS DE ELUIÇÃO

A escolha de uma estratégia de eluição deve ser um compromisso entre conveniência, recuperação do produto e funcionalidade. A estratégia selecionada deve atender a três critérios: a) reduzir tanto quanto possível a constante de associação ( $k_a$ ); b) o produto de interesse deve manter sua atividade quando retornar a um tampão fisiológico; e c) a coluna deve manter sua capacidade e o anticorpo não deve ser danificado de modo irreversível.

As estratégias de eluição geralmente utilizadas são:

- 1) **Valores extremos de pH:** tampões a valores de pH extremos, abaixo de 2,5 e acima de 10, rompem ligações iônicas. Soluções de baixo pH são mais comumente empregadas do que as de alto pH, provavelmente porque as proteínas são mais suscetíveis à desnaturação irreversível a altos pH. As soluções de pH baixo mais comumente usadas são glicina-HCl e ácido acético, e de pH alto amônia, NaOH, tampão glicina/ NaOH e várias aminas, como etanolamina.
- 2) **Agentes caotrópicos:** íons caotrópicos, assim chamados em razão de sua capacidade de quebrar as ligações de hidrogênio e en-

fraquecer as interações hidrofóbicas; podem ser agentes eficazes para diminuir a força de interação entre antígeno e anticorpo. A capacidade de um certo ânion de induzir a dissociação do complexo antígeno-anticorpo pode ser avaliada pela classificação a seguir:



Segundo essa classificação, o tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) é um dos íons mais desestabilizantes e, sob concentração elevada, 3M, é capaz de dissociar as ligações antígeno-anticorpo. É importante restaurar a estrutura nativa da proteína o mais breve possível após a eluição, o que pode ser feito removendo o desnaturante por diálise ou dessalinização ou promovendo a diluição do meio. O uso do  $\text{SCN}^-$ , entretanto, pode ser problemático para produtos farmacêuticos.

- 3) **Agentes desnaturantes:** altas concentrações de desnaturantes, como uréia (8 M) e guanidina-HCl (6 M), são capazes de dissociar ligações de hidrogênio e, em geral, são utilizadas em situações em que o anticorpo tem afinidade muito alta e nenhum outro eluente é eficaz para a dissociação do complexo antígeno-anticorpo. Essa técnica de eluição é particularmente útil para os produtos sensíveis a valores extremos de pH. Entretanto, por causa do efeito desnaturante desses agentes seu uso é restrito às proteínas mais estáveis, à remoção das proteínas retidas na coluna, durante sua regeneração, ou em casos em que a manutenção funcional do eluato não seja necessária.

- 4) **Solventes orgânicos:** a alteração da polaridade do solvente de eluição mediante o emprego de solventes orgânicos é utilizada para reduzir a associação entre o Ab e o Ag. Em geral, são usados solventes orgânicos solúveis em água, como acetonitrila, dimetil-sulfóxido (DMSO), dioxano e etileno glicol, sendo este último um dos mais empregados porque ele desnatura a proteína apenas em concentrações muito altas. Essa técnica é solvente-específica em alguns casos e não depende apenas da polaridade ou da tensão superficial do solvente. Por exemplo, em um certo sistema um  $k_a = 10^8 \text{ M}^{-1}$  não é afetado por até 20% de DMSO, mas ao utilizar DMSO entre 20 e 50% o valor de  $k_a$  caiu de forma significativa. Nesse mesmo sistema, entretanto, mesmo utilizando etileno glicol em concentração acima de 60%, o valor de  $k_a$  não é significativamente reduzido. Essas mesmas soluções também são usadas para regeneração da coluna.
  - 5) **Força iônica:** alterações na força iônica induzidas por soluções com alto teor de sal ocasionam rompimento de ligações iônicas, mas também facilitam interações hidrofóbicas. Esse é um dos métodos de eluição mais suaves. Além de manter a funcionalidade da proteína, facilita também a regeneração da coluna com concentrações menores de sal. Soluções de NaCl, MgCl<sub>2</sub> e LiCl, 3 a 5 M ou saturadas, são em geral usadas para esse fim.
  - 6) **Alta pressão:** a eluição do antígeno ligado ao anticorpo imobilizado é obtida com pressões acima de 2 mil atm. Essa é uma condição suave de eluição, uma vez que a desnaturação de uma proteína só ocorre a pressões acima de 6 mil atm. A resposta do complexo antígeno-anticorpo à pressão é um efeito anticorpo-específico, sendo necessário, portanto, avaliar se o anticorpo usado é sensível à pressão antes de adotar essa estratégia de eluição.
  - 7) **Eluição por temperatura:** a dissociação do complexo antígeno-anticorpo é facilitada pelo aumento da temperatura, em decorrência da diminuição da constante de associação. Entretanto, para a maioria dos sistemas antígeno-anticorpo, a variação da constante de associação com a temperatura não é significativa dentro dos limites compatíveis com a estabilidade da proteína de interesse. Esse tipo de estratégia é suave e tem a vantagem de o produto de interesse não misturar-se com reagentes da eluição, como sais ou agentes desnaturantes.
  - 8) **Eluição bioespecífica:** a eluição do antígeno é feita pela adição de um excesso de composto de massa molar baixa (peptídeo, hapteno) que compete pelo sítio de ligação do antígeno e pode ser removido do produto por diálise ou cromatografia de exclusão molecular. Analogamente pode-se usar um composto que compete pelos sítios do anticorpo. Nesse caso, este deverá ser retirado antes da coluna ser reusada. Embora bastante eficiente, essa estratégia de eluição não é muito usada dada a dificuldade de se encontrar uma substância que concorra especificamente por um determinado par Ag-Ab.
- Alguns exemplos de produtos purificados por cromatografia de imunoafinidade empregando as diferentes estratégias já comentadas podem ser vistos na Tabela 12.1.

**Tabela 12.1** Exemplos de estratégias de eluição usadas para a cromatografia de imunoafinidade

Estratégia de eluição	Condição utilizada	Produto de interesse	Referência
pH extremo	Tris HCl 0,02 M, pH 11,6 Fosfato 0,1 M, NaCl 0,5 M KCl 1 M, pH 4,0	Hepatite B Interleucina 2	Ibarra, N. et al. (1999) Narayanan, S.R. (1994)
Agente caotrópico	KSCN 3 M, EDTA 3 mM, Tris 20 mM, pH 7,0	Eritropoetina	Yang, M. & Butler, M. (2002)
Agente desnaturante	Uréia 6,3 M em PBS (Fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M)	Pró-insulina	Hale, J. E. (1995)
Solvente orgânico	MgCl <sub>2</sub> 4 M pH 7,2 25% etileno glicol	Antissoro anti-IgG humana	Firer, M. A. (2001)
Força iônica	NaCl 0,5 M em PBS	$\gamma$ -interferon humano	Congo, J. Y. et al. (1995)
Eluição não-química	Alta pressão	$\beta$ -galactosidase	Estevez-Burugorri, L. et al. (2000)
Eluição não-química	Temperatura	Oligossacarídeos contendo glicose	Lundblad, A. et al. (1984)
Eluição bioespecífica	Piridina	DNA	Yarmush, M. L. et al. (1992)

Um aspecto também a ser considerado é a regeneração da coluna após a eluição. O reúso da coluna é muito importante do ponto de vista econômico e também do ponto de vista experimental, pois a reprodutibilidade inter-ensaios é essencial. A reutilização da coluna depende tanto das características físicas da fase sólida quanto da natureza biológica do ligante. A etapa de regeneração da coluna inclui tanto a retirada do tampão utilizado para a eluição como também a retirada dos componentes que ficaram retidos na coluna inespecificamente e não foram retira-

dos durante a eluição, ou com outras lavagens (p. ex., contaminantes, em geral desnaturados, presentes no extrato cru). Alguns protocolos sugerem o uso rotineiro de 2 M KCl/6 M uréia após cada purificação, enquanto outros sugerem o uso de solventes orgânicos. É preciso, entretanto, avaliar se, com esses tratamentos, há dano do suporte de imunoafinidade.

## IMUNOADSORVENTE

O imunoadsorvente utilizado na cromatografia de imunoafinidade pode ser produ-

zido pela imobilização, em um suporte rígido, do antígeno ou do anticorpo específico à proteína de interesse. Tanto o material do suporte quanto o método de imobilização empregado para acoplar o anticorpo ou o antígeno à matriz são importantes para o sucesso da cromatografia de imunoafinidade. A capacidade total de ligação de um imuno-adsorvente é determinada pelo número de sítios ativos de ligação que, em geral, correspondem a uma fração pequena do número total de sítios imobilizados. A simetria dos fragmentos Fab na molécula de anticorpo pré-determina estequiometria teórica de ligação antígeno-anticorpo de 2:1. Típicas capacidades de ligação para anticorpos acoplados covalentemente correspondem, em geral, a 30% de sua capacidade teórica.

## SUPORTES DE IMUNOAFINIDADE

O suporte sólido a ser usado em uma cromatografia de imunoafinidade deve ter uma superfície adequada para a interação antígeno-anticorpo. Processamento eficiente é obtido, em geral, com matrizes porosas cujos poros são suficientemente grandes para permitir o acesso do anticorpo e do antígeno, tal que o último possa difundir livremente, ligar-se e, posteriormente, dissociar-se do anticorpo. Porém uma matriz muito porosa pode perder estabilidade mecânica e, portanto, ser submetida a compactação com conseqüente comprometimento da sua capacidade. Matrizes não-porosas também podem ser usadas, mas nesses casos a acessibilidade do anticorpo e do antígeno é menor sendo, entretanto, toda a superfície acessível a

ambos. O suporte sólido deve conter grupos funcionais tais que a superfície possa ser ativada para uma subseqüente imobilização do ligante via uma ligação estável. É importante também que os suportes sólidos tenham baixa absorção inespecífica e/ou interação.

Os principais suportes empregados na maioria das aplicações de cromatografia de imunoafinidade são os relacionados com polímeros à base de carboidratos, como agarose ou celulose, suportes orgânicos sintéticos, como polímeros, copolímeros e derivados de acrilamida e derivados de polimetacrilato. Esses são suportes de baixa eficiência que podem operar sob influência da gravidade, fluxo peristáltico ou em baixo vácuo. As principais desvantagens desses materiais são sua limitada estabilidade em altos fluxos e pressões e suas baixas propriedades de transferência de massa. Esses fatores limitam a adoção desses suportes para cromatografias de imunoafinidade em sistemas de HPLC.

Já materiais mais rígidos e de alta eficiência, como derivados de sílica, vidro e certas matrizes orgânicas, como pérolas de azalactona ou meios de perfusão baseados em poliestireno, podem ser utilizados em sistemas de imunoafinidade por HPLC.

Pesquisas relativas a novos suportes com vantagens adicionais estão sempre sendo desenvolvidas, em especial visando ao aumento de seletividade e de capacidade de ligação.

## MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO

O anticorpo a ser imobilizado pode ser poli ou monoclonal. Ambos levam a imuno-

adsorventes eficientes, sendo os anticorpos monoclonais superiores aos policlonais em virtude de sua maior especificidade (reconhecimento de um único sítio) e capacidade de ligação. Por outro lado, do ponto de vista da praticidade, os anticorpos policlonais são mais simples de ser produzidos, com procedimentos bem estabelecidos, enquanto a produção dos monoclonais implica significativo investimento em equipamento, tempo e tecnologia especializada. Entretanto, a fonte de um anticorpo policlonal é finita e a necessidade de reforço para animais previamente imunizados pode levar a variações na quantidade e na qualidade do anticorpo. Já as células de hibridoma (híbrido resultante da fusão de células B, produtoras de anticorpo, com células tumorais neoplásicas) que secretam anticorpo monoclonal, podem ser estocadas em nitrogênio líquido, disponibilizando uma fonte de anticorpo bem estabelecida, por muitos anos. Essas considerações são especialmente importantes para as purificações relativas a produtos farmacêuticos, para os quais é exigido, na fase do registro do produto, que todas as fontes de matéria-prima sejam seguras, reprodutíveis e bem padronizadas. Nesses casos, o anticorpo monoclonal é a escolha preferencial. Entretanto, um aspecto que deve ser considerado para proteínas terapêuticas, sujeitas a legislações bastante estritas, é o risco potencial de contaminantes virais ou príons serem introduzidos pelo fato de a produção dos anticorpos monoclonais ser realizada em eucariotos.

A estrutura básica de um anticorpo típico (IgG) consiste de 4 polipeptídios, sendo 2 cadeias pesadas idênticas (Fc) e 2 cadeias leves idênticas (Fab) ligadas por pontes dissul-

feto. Essas cadeias polipeptídicas formam uma estrutura em forma de Y (Figura 12.2). Dois sítios equivalentes de ligação ao antígeno estão presentes nas extremidades terminais superiores da molécula do anticorpo.

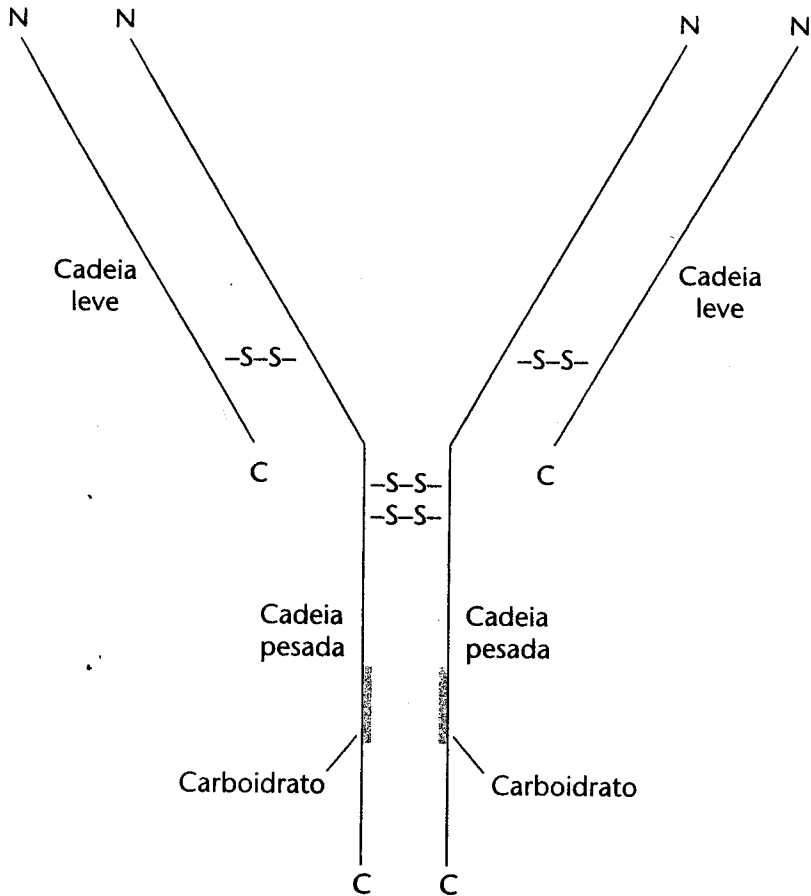
A imobilização do anticorpo à fase sólida é feita, em geral, por um dos seguintes métodos: (Tabela 12.2)

- 1) absorção física do Ab à fase sólida;
- 2) acoplamento químico do Ab à fase sólida; e
- 3) acoplamento químico covalente sítio-dirigido do Ab (nativo ou oxidado) realizado direta ou indiretamente via um polímero, metal ou ponte de proteína.

Nas duas primeiras estratégias de imobilização, ao contrário da última, a interação do Ab com a fase sólida é inespecífica, o que não permite a determinação da orientação do Ab imobilizado. Sendo assim, a fração de Ab que permanecerá funcional em acoplamentos desses tipos não é previsível. Portanto, há a possibilidade de que uma fração significativa das regiões de ligação do Ab ao Ag esteja estericamente escondida (Figura 12.3). Já no caso do acoplamento orientado, a capacidade de ligação do Ag é 2 a 8 vezes maior em relação aos métodos de acoplamento randômico, dada a possibilidade de obter melhor acessibilidade estérica aos sítios ativos de ligação.

O acoplamento do anticorpo à matriz suporte se dá via resíduos reativos, sobretudo grupos amino da lisina, presentes por toda a molécula do anticorpo, grupos carboxílicos de aspartato e glutamato, encontrados na região F<sub>c</sub>, covalentemente ligados às cadeias polipeptídicas do anticorpo e a gru-

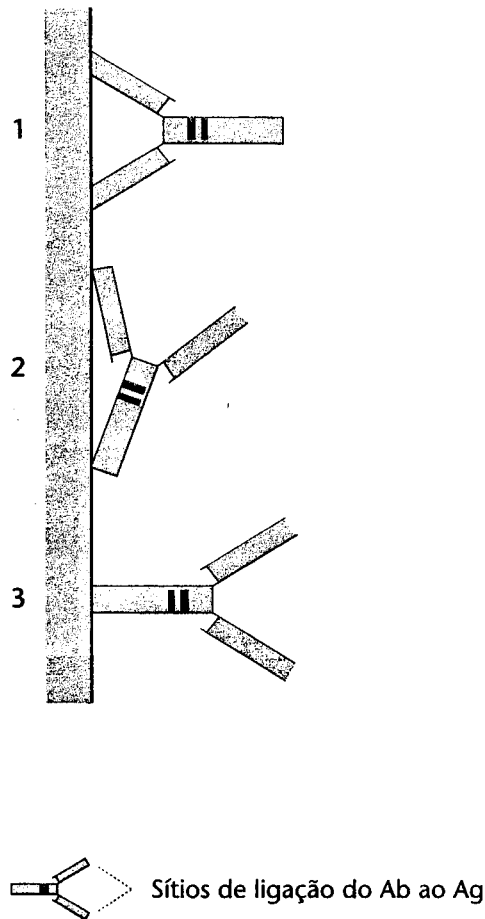




**Figura 12.2** Representação esquemática da molécula de IgG

**Tabela 12.2** Características de diferentes métodos de imobilização do Ab em colunas de imunoafinidade

Método de imobilização	Sítio de ligação do Ab ao suporte	Orientação do Ab
Absorção física	Randômico	Randômica
Ligação covalente do Ab intacto	Randômico	Randômica
Ligação covalente do Ab oxidado	Região de carboidratos em $F_c$	Orientada
Ligação do Ab via proteína A	Grupos amina da região $F_c$	Orientada
Ligação do Ab à resina carregada com metal	Porção C-terminal da região $F_c$	Orientada



**Figura 12.3** Possíveis posições dos sítios de ligação ao Ag em uma immobilização randômica do Ab: 1) não expostos à fase móvel; 2) parcialmente expostos à fase móvel; 3) totalmente expostos à fase móvel

pos fenólicos das tirosinas. Os imunoabsorventes preparados pela região de carboidratos da molécula de IgG mostram aumento significativo na capacidade de ligação ao antígeno com relação àqueles preparados pelo acoplamento pelas aminas primárias da molécula de IgG. O acoplamento ocorre ou pela ativação da matriz ou mediante reagente de acoplamento.

No caso da immobilização do anticorpo por absorção física, uma séria limitação é a perda do anticorpo imobilizado durante a etapa de

eluição do antígeno, uma vez que as ligações não-covalentes que ligam o anticorpo à fase sólida são análogas àquelas que ligam o anticorpo ao antígeno. Já no caso dos dois outros métodos de acoplamento, o anticorpo imobilizado é retido durante a eluição do antígeno, permitindo a regeneração da coluna de afinidade.

A reação de acoplamento não sítio-dirigido que liga o anticorpo covalentemente à fase sólida utiliza agentes ativadores, em geral de 3 tipos:

- a) *ativadores solúveis que permitem acoplamento químico direto entre grupos funcionais, em geral um grupo  $-NH_2$  de um componente com um grupo  $-COOH$  de outro, como o brometo de cianogênio (CNBr) e a carbodiimida. Nas Figuras 12.4 e 12.5 são apresentadas esquematicamente as ativações por CNBr e carbodiimida, respectivamente;*
- b) *ativadores solúveis que funcionam como ligação entre grupos funcionais idênticos ou diferentes, como glutaraldeído e ácido maléico que atuam como ligação entre dois grupos amina ou o N-sucinimidil 4-maleimidobutirato, que liga grupos tiol do suporte a grupos amino da proteína; e*
- c) *ativadores ligados à fase sólida incluem polímeros com grupos ativos (p. ex., epoxi-derivados) que permitem acoplamento covalente a grupos  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-SH$  da proteína.*

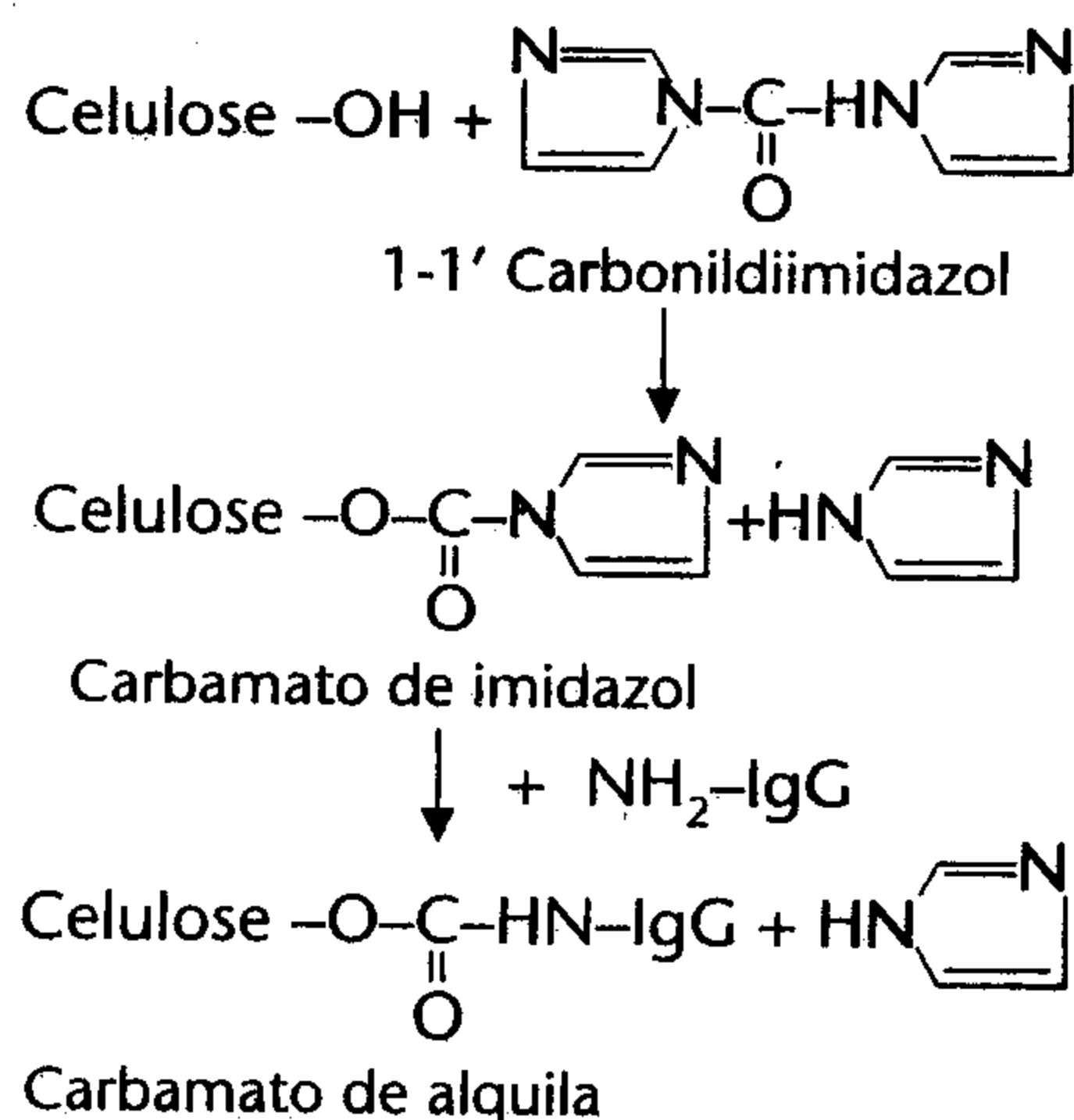
Quando o procedimento de imobilização do Ab é sítio-dirigido, os sítios de ligação do Ab ficam expostos à fase móvel, fora da su-

perfície da fase sólida, o que garante boa acessibilidade estérica aos sítios ativos de ligação. São utilizadas várias estratégias de imobilização orientada:

- a) **Acoplamento direto à fase sólida**  
A maneira mais efetiva da imobilização dirigida é pela ligação do Ab à fase sólida via um único sítio de ligação. Nessa estratégia, a região  $F_c$  do anticorpo (região de carboidratos) é oxidada com periodato formando grupos aldeído que são então ligados quimicamente ao suporte sólido. Como os anticorpos são glicosilados apenas em um único sítio do domínio  $CH_2$  de cada cadeia pesada, então as duas regiões Fab do anticorpo ficarão completamente livres para interagir com o antígeno na fase móvel. A imobilização, segundo essa estratégia, depende da concentração do periodato, do pH da reação, do tempo e da temperatura.
- b) **Acoplamento via pontes de proteína**  
Proteína A derivada de *Staphylococcus aureus* e proteína G derivada de *Strepto-*



**Figura 12.4** Etapas do acoplamento de uma proteína a uma matriz ativada com CNBr



**Figura 12.5** Exemplo de acoplamento de IgG a uma matriz de celulose ativada com carbodiimida

*coccus*, ambas proteínas bacterianas com alta afinidade de ligação por amino grupos da porção  $F_c$  do anticorpo, têm sido usadas como braços espaçadores bioespecíficos para orientar o Ab na fase sólida. Essas proteínas são ligadas covalentemente à fase sólida de várias formas, como diretamente via grupos aldeído, via grupos epoxi ou glutaraldeído. Elas aumentam a distância entre os anticorpos e a superfície da matriz, facilitando a formação estável e eficiente do complexo anticorpo-antígeno. Tem sido usada também proteína G biotinilada ligada à avidina, previamente acoplada à fase sólida. O uso desse sistema de alta afinidade biotina/avidina como um sanduíche intermediário mantém elevada biofuncionalidade da proteína G.

c) **Acoplamento a suportes carregando metais**

Essa estratégia é baseada na interação de resíduos de histidina com metal e expõe o anticorpo a concentrações baixas de

reagentes oxidantes durante a imobilização. Nessa estratégia um anticorpo é imobilizado pela porção C-terminal da cadeia pesada  $F_c$ , a uma resina com grupos funcionais iminodiacetato (IDA) carregada com  $\text{CoCl}_2$ . Uma oxidação do Co com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (do estado +2 para o estado +3) resulta em complexos  $\text{Co}^{3+}$  - anticorpo ligados irreversivelmente. Estes só serão removidos com reagentes que reduzam o metal para  $\text{Co}^{2+}$  na presença de agentes quelantes, como EDTA, uma vez que as interações com o  $\text{Co}^{2+}$  são reversíveis.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grande variedade de biomoléculas, naturais ou recombinantes, incluindo hormônios, imunoglobulinas, enzimas e citoquinas, tem sido purificada por cromatografia de imunoafinidade. Embora a cromatografia de imunoafinidade com anticorpos monoclonais seja altamente eficiente para a purificação dessas

moléculas dada sua versatilidade, alta afinidade e seletividade, seu uso em larga escala não é freqüente. Nesse caso, o alto custo decorrente da produção desses anticorpos monoclonais para uso industrial e a impossibilidade, em muitos casos, de reusar uma mesma coluna em virtude das drásticas condições de eluição adotadas, que podem danificar o imunoabsorvente, tornam seu uso economicamente proibitivo. Alternativa recente para essa limitação tem sido o uso, embora ainda limitado, de anticorpos recombinantes com a especificidade

desejada. Trata-se de fragmentos funcionais de anticorpos ( $F_c$  e Fab) expressos em bactéria, uma vez que a síntese da molécula completa de imunoglobulina ativa ainda não foi bem-sucedida. Entretanto, o avanço da ciência, tanto no campo dos anticorpos, melhorando suas propriedades de ligação e resistência à degradação, quanto no de suportes novos com características mais eficientes e na química de acoplamento, tem viabilizado cada vez mais a utilização da cromatografia de imunoafinidade em larga escala.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONGO, J.Y. & CHEN, W. "Purification of recombinant human interferon-gamma by immunofluorescence affinity chromatography with monoclonal antibody". *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 3, 1995.
- ESTEVEZ-BURUGORRI, L. et al. "High-pressure induced recovery of beta-galactosidases". *Biotechnology Letters*, v. 22, 2000.
- FIRER, M.A. "Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, 2001.
- HALE, J.E. "Irreversible, oriented immobilization of antibodies to Cobalt-Iminodiacetate resin for use as immunofluorescence media". *Analytical Biochemistry*, v. 231, 1995.
- IBARRA, N. et al. "Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen". *Journal of Chromatography B*, v. 735, n. 2, 1999.
- LUNDBLAD, A.; SCHROER, K. & ZOPF, D. "Affinity purification of a glucose-containing oligosaccharide using a monoclonal antibody". *Journal Immunological Methods*, v. 68, 1984.
- NARAYANAN, S.R. "Preparative affinity chromatography of proteins". *Journal of Chromatography A*, v. 658, 1994.
- NISNEVITCH, M. & FIRER, M.A. "The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, 2001.
- SOARES, C.R.J. "Ensaio imunoradiométrico para a determinação de proteínas bacterianas contaminantes em lotes de hormônio de crescimento humano recombinante produzido no IPEN-CNEN/SP". São Paulo, 1995. 76 p. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- YANG, M. & BUTLER, M. "Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms". *Biotechnology Progress*, v. 18, n. 1, 2002.
- YARMUSH, M.L. "Immunoabsorption: Strategies for antigen elution and production of reusable adsorbents". *Biotechnology Progress*, v. 8, n. 3, 1992.
- YARMUSH, M.L. et al. "Immunoaffinity purification: basic principles and operational considerations". *Biotechnology Advances*, v. 10, n. 3, 1992.