

## DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA A DE SUPERFÍCIE DO PNEUMOCOCO DO CLADO 4 (PspA4pro)

D. B. FIGUEIREDO<sup>1</sup>, E. CARVALHO<sup>1</sup>, S. KRASCHOWETZ<sup>1</sup>, R. T. ZANARDO<sup>1</sup>,  
G.G. SILVA<sup>2</sup>, G. CAMPANI<sup>2</sup>, T. C. ZANGIROLAMI<sup>2</sup>, J. CABRERA-CRESPO<sup>1</sup>, V.  
M. GONÇALVES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia, <sup>2</sup>Universidade Federal de São Carlos,  
Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: [douglas.figueiredo@usp.br](mailto:douglas.figueiredo@usp.br)

**RESUMO:** *S. pneumoniae* provoca doenças com elevada mortalidade infantil como pneumonia, meningite e sepse, assim buscam-se vacinas alternativas mais eficazes. Neste trabalho desenvolveu-se um processo escalonável de purificação do fragmento recombinante da PspA do clado 4 para uso em uma nova vacina, que consistiu das etapas: ruptura celular em homogeneizador contínuo de alta pressão, precipitação com detergente CTAB, clarificação, cromatografia de troca aniônica, crioprecipitação a pH4,0 e cromatografia de troca catiônica. PspA4Pro foi obtida com pureza >97% e recuperação de 30%. A eliminação final do lipopolissacarídeo (contaminante que causa febre) foi feita em resina de polilisina. Espectros de dicroísmo circular mostraram estrutura secundária correta da PspA4Pro purificada, bem como estabilidade térmica e a variações de pH. A atividade de PspA4Pro foi confirmada em ensaio de ligação à lactoferrina. Portanto, o processo é adequado à obtenção de PspA4Pro com as características requeridas para uso humano.

### 1. INTRODUÇÃO

Dentre os antígenos proteicos candidatos ao uso em vacinas pneumocócicas, a proteína A de superfície do pneumococo (PspA) tem se mostrado bastante promissora, principalmente por ser uma proteína exposta externamente à capsula polissacarídica. A estrutura da PspA é composta por quatro domínios. A porção N-terminal é bastante carregada eletricamente e apresenta estrutura secundária predominantemente do tipo  $\alpha$ -hélice “coiled-coil”. Esta porção se projeta para fora da superfície do microrganismo e nela encontra-se a região definidora de clado. Em seguida há um domínio flexível rico em prolinas. A ele segue-se um domínio com 10 repetições de uma sequência de 20 aminoácidos, responsável pela ligação à colina, ancorando a proteína aos resíduos de colina encontrados nos ácidos teicóico e lipoteicóico da parede celular. A porção C-terminal é composta por uma cauda hidrofóbica (Briles, *et al.*, 1997).

Com base na homologia e no alinhamento das sequências de aminoácidos de PspA de diferentes cepas de *S. pneumoniae*, foram observadas 3 famílias distintas desta proteína, as quais podem ser divididas em 6 grupos, denominados clados. A família 1 da PspA é constituída por dois clados: 1 e 2, a família 2, por três clados: 3, 4 e 5 e a família 3, por apenas um clado: 6 (Bogaert *et al.*, 2003). As famílias 1 e 2, em especial os clados 1 a 4, são predominantes no

mundo todo e no Brasil estão presentes em 99% dos isolados clínicos (Mantese *et al.*, 2003). Uma vez que proteínas dentro de uma mesma família apresentam reação imunológica cruzada, acredita-se que apenas duas proteínas, uma da família 1 e outra da família 2, seriam suficientes para compor uma vacina com boa cobertura das cepas de pneumococo circulantes na população.

## **2. OBJETIVOS**

Desenvolver um processo de purificação para obter a proteína PspA4Pro, produzida por cultivo de *E. coli* recombinante, com pureza superior a 95% com relação às demais proteínas, para uso em vacinas pneumocócicas tanto de proteínas puras como conjugadas a polissacarídeos.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Material de partida**

Devido às características antigênicas, o fragmento de PspA do clado 4 clonado contém a porção N-terminal, a região definidora de clado e a primeira parte da região rica em prolina da molécula (PspA4Pro) e foi desenvolvido pela equipe da Dra. Eliane N. Miyajiri, que gentilmente cedeu a cepa de *E. coli* transformada para a realização deste trabalho (Moreno, *et al.*, 2010). A proteína foi produzida na forma solúvel em *E. coli* BL21(DE3) empregando o plasmídeo pET37b+. Os cultivos foram centrifugados e o pellet foi congelado a -80°C até o uso.

### **3.2 Ruptura celular**

100g de pellet congelado foram ressuspensos em 1 litro de tampão de lise: tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM pH6,5 + EDTA 2,5mM com 0,1%(p/v) do detergente Triton X-100 e 1mM do inibidor de proteases *Phenylmethanesulfonyl Fluoride* (PMSF). A ressuspensão foi realizada a aproximadamente 4°C, utilizando um homogeneizador de pás a 11.000 rpm do modelo X-520 (Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH), até não haver mais grumos visíveis. Esta suspensão bacteriana foi colocada em um funil encamisado acoplado ao homogeneizador contínuo de alta pressão (APV GAULIN) com a saída também refrigerada por meio de um trocador de calor do tipo casco e tubo. A temperatura do refrigerante foi ajustada para 4°C e a pressão de trabalho foi de 500bar com fluxo de amostra de 1L/min. A amostra foi recirculada em *loop* fechado até todo o volume passar pelo menos seis vezes pelo homogeneizador e ao final foi empurrada com 500mL de tampão de lise. A fração recolhida do homogeneizador foi nomeada Homogenato.

### **3.3 Clarificação**

O Homogenato foi precipitado com uma solução 10% do detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), adicionado até a concentração de 0,085% (p/v). Após a adição do detergente o Homogenato permaneceu sob agitação por 90 min para então ser centrifugado (17696 g, 120 min, 4°C). O pellet foi descartado e o sobrenadante, chamado Clarificado, seguiu para as etapas cromatográficas.

### **3.4 Cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose**

A cromatografia de troca aniônica foi realizada em resina Q-Sepharose Fast Flow empacotada em coluna XK 50/30 (diâmetro (Ø) = 50mm e altura do leito cromatográfico (Lc) =

13cm) acoplada a um cromatógrafo BioPilot, Äkta Explorer, ou Äkta Avant (GE Lifescience). O volume de coluna (VC) foi de 250mL e o fluxo de trabalho foi de 50mL/min. A resina foi equilibrada com 5 VC de uma solução de fosfato de sódio 10mM pH6,5 (condutividade de 1,2mS/cm) e lavada com 5 VC da mesma solução após a aplicação da amostra. A eluição foi feita com um gradiente descontínuo e crescente de NaCl (150mM, 300mM e 1000mM) em fosfato-Na 15mM pH6,5 e sempre com 5 VC para cada fração. A resina foi regenerada com 3 VC de solução de NaOH 100mM. As amostras aplicadas à resina tiveram o pH ajustado para 6,5 e a condutividade para aproximadamente 1,5mS/cm. A fração não adsorvida foi chamada F1Q e as frações eluídas foram chamadas de Qx (onde x = concentração de NaCl na eluição em mM).

### **3.5 Crioprecipitação a pH4,0**

Para ser aplicada na resina de troca catiônica, a fração eluída da Q-sepharose teve seu pH reduzido para 4,0 com ácido acético glacial e foi congelado (-20°C) por pelo menos 24 horas. A amostra foi descongelada e centrifugada (17696 g, 60min, 4°C) e o sobrenadante, denominado Crio-pH4,0, foi aplicado na resina SP-Sepharose.

### **3.6 Cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose**

A cromatografia de troca catiônica foi realizada com resina SP-Sepharose 6 Fast Flow empacotada em coluna XK 26/20 ( $\varnothing = 26\text{mm}$ , Lc = 14cm, VC = 75mL, fluxo = 12mL/min). O sistema de controle da cromatografia foi o mesmo utilizado na Q-Sepharose. A resina foi equilibrada com 5 VC de uma solução de acetato-Na 25mMpH4,0 (5mS/cm) e lavada com 5 VC da mesma solução após a aplicação da amostra. As eluições foram feitas com um gradiente descontínuo e crescente de NaCl em acetato-Na pH4,0 (500mM e 650mM) e em 1000mM NaCl em acetato-Na pH6,5. A regeneração foi feita com 3 VC de uma solução de NaOH 100mM. As amostras aplicadas à resina tiveram a condutividade ajustada para aproximadamente 20mS/cm com água destilada e o pH reajustado para 4,0 com ácido acético glacial.

### **3.7 Atividade da PspA4Pro após a purificação.**

A atividade da PspA4Pro foi verificada por teste de ligação à lactoferrina humana (Sigma-Aldrich). As proteínas foram misturadas em três diferentes proporções de modo a obter-se as seguintes quantidades: 2mg de PspA4Pro + 0,5mg de lactoferrina, 1mg de PspA4Pro + 1mg de lactoferrina e 1mg de PspA4Pro + 2mg de lactoferrina. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 h e foram aplicadas a uma coluna de gel filtração TSK-GEL G2000SWXL (Tosoh Bioscience) acoplada a um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) SCL-10AVP (Shimadzu). A fase móvel utilizada foi fosfato de sódio 500mM pH7,0 com 300mM NaCl, o fluxo de 0,6mL/min e detector de UV280nm.

### **3.8 Métodos analíticos**

A concentração proteica foi medida por Lowry empregando albumina do soro bovino como padrão (Lowry, *et al*, 1951). A pureza relativa foi determinada por densitometria (densitômetro Bio-Rad GS-800) dos géis de SDS-PAGE a 12% contendo 2-mercaptoetanol (Laemmli, 1970). A pureza foi calculada como a porcentagem da banda correspondente à PspA4Pro em relação à soma das densidades das demais bandas na respectiva caneleta do gel.

### 3.9 Estrutura secundária e estabilidade da PspA4Pro após a purificação.

A estrutura secundária e a estabilidade foram avaliadas por dicroísmo circular em espectropolarímetro Jasco J-180 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan) equipado com uma unidade Peltier para controle de temperatura. Para obtenção dos espectros, a PspA4Pro purificada foi dialisada contra tampão fosfato 10 mM pH 7,0 por 18 h com 4 trocas de tampão. A concentração após a diálise foi determinada por Bradford (Bradford, 1976). A estabilidade em presença de CTAB foi avaliada acrescentando-se CTAB 0,15% à amostra dialisada antes da aquisição do espectro. Para avaliação da estabilidade térmica, a amostra foi aquecida a 1°C/min até 95° e depois resfriada até 15°C na mesma velocidade. Para avaliar a estabilidade ao pH, as amostras tiveram seu pH ajustado de 4,0 a 9,0 antes da obtenção dos espectros e a concentração proteica em cada pH foi determinada por Bradford.

### 3.10 Remoção de endotoxina

O lipopolissacarídeo (LPS), ou endotoxina, ainda presente na PspA4Pro purificada foi removido utilizando um kit de remoção de endotoxina (Pierce Thermo Science) contendo 1mL de resina de poli-ε-L-lisina em tubo falcon de 10mL. A concentração final de endotoxina foi medida por teste de Limulus Amebocyte lysate (LAL), gentilmente realizado por Bianca Pereira Carvalho, da Seção de Vacina Aeróbicas do Instituto Butantan.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura mostra o perfil de ruptura celular. A queda da DO<sub>600nm</sub>, que indica a concentração celular, atingiu o platô aos 4 min e a Abs<sub>280nm</sub> apresentou ligeiro incremento até o final do processo. Apesar de a temperatura ter aumentado de 15°C para 23,7°C ao longo do processo, isso não chegou a oferecer risco de desnaturação da PspA4Pro, como será mostrado adiante.

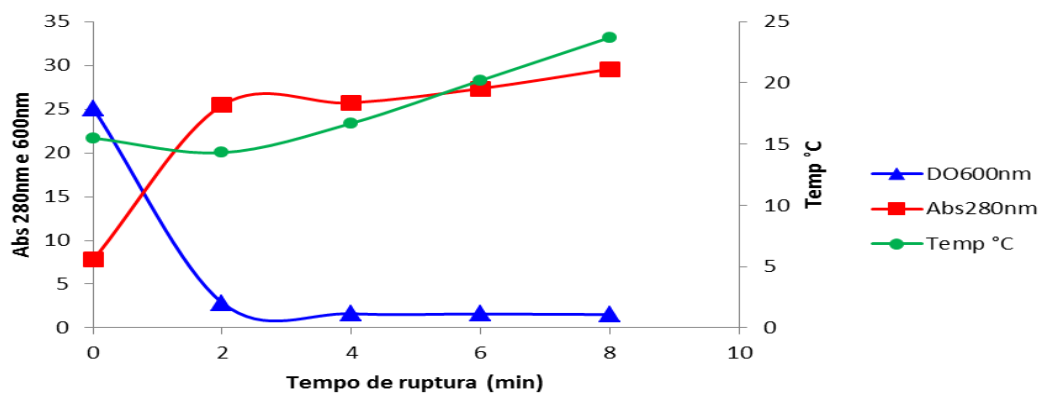


Figura 1. Acompanhamento da ruptura celular (DO 600nm), extração de proteínas (Abs 280nm) e temperatura no processo de purificação.

Como mostra a Tabela 1, a cromatografia de troca aniônica foi a etapa que mais contribuiu para a pureza da PspA4Pro (fator de purificação (FP)=1,73) com recuperação de 87,1%. Na cromatografia de troca catiônica, a PspA4Pro foi eluída em duas frações com NaCl 1M a pH4,0 e a pH6,5. Na primeira, a pureza foi de 98,5% e a recuperação de 31%, enquanto na segunda a pureza foi de 96,9% e a recuperação de 58%. Juntando as duas frações, a recuperação final deste

processo foi de 33%. Embora o ideal seja recuperar a proteína de interesse em uma única fração para não aumentar o volume, como ambas as frações atingiram a pureza requerida, ambas foram reunidas e consideradas no cálculo de recuperação final.

Tabela 1. Avaliação do processo de processo de purificação

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4 total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral (Veze)	Fator de Purificação por etapa (Veze)
Homogenato	33,3	2,5	100	100	1	1
Clarificado CTAB 0,085%	44,1	1,9	77,0	77,0	1,32	1,32
Q300	76,3	1,7	67,0	87,1	2,29	1,73
Crio + pH4,0	88,2	0,9	37,4	55,9	2,65	1,16
SP1000 pH4,0	98,5	0,3	11,6	31,0	2,96	1,12
SP1000 pH6,5	96,9	0,5	21,9	58,4	2,91	1,10

Na Figura 2A observa-se o cromatograma da PspA4Pro purificada, ou seja, o *pool* das frações SP1000 (tempo de retenção (TR) de 12,85 min) e o da lactoferrina pura (TR = 15,03 min). Após a mistura das duas (Figura 2B), nota-se em vermelho o surgimento de um novo pico correspondente às duas proteínas ligadas (TR = 12,558 min) e um segundo pico correspondente ao excesso de PspA4Pro (TR = 13,050 min). Aumentando a concentração de lactoferrina percebe-se uma transição para um pico único em verde, TR = 12,692 min, indicando somente proteínas ligadas, e novamente dois picos em azul escuro, quando há excesso de lactoferrina (TR = 15,283 min). É importante ressaltar que o fragmento recombinante obtido manteve a capacidade de ligação à lactoferrina mesmo em condições de elevada força iônica, uma vez que a fase móvel continha 300mM de NaCl e 500mM de fosfato de sódio, o que indica que o processo de purificação não afetou a atividade da PspA4Pro.

A Figura 3 mostra os espectros de dicroísmo circular da PspA4Pro em tampão fosfato de sódio 10mM pH7,0 e em tampão fosfato de sódio 10mM pH7,0 com CTAB 0,15%. Neste último caso não foi possível obter o espectro abaixo de 200 nm devido à elevada absorção de luz pelo CTAB nessa faixa de comprimento de onda.

Observou-se que o maior vale na medida da elipticidade molar ocorreu entre 210 e 223nm, comprimentos de onda referentes à  $\alpha$ -hélice. Este resultado condiz com a estrutura secundária esperada para o fragmento de PspA4Pro recombinante obtido, que contém a região rica em  $\alpha$ -hélice da porção N-terminal e a primeira porção da região rica em prolinas.

O aumento da elipticidade molar entre 200 e 240nm indica perda da estrutura da PspA4Pro quando em tampão contendo CTAB. Esta perda, contudo, foi reversível, uma vez que a PspA4Pro purificada já passou por uma etapa de precipitação em CTAB durante a clarificação. Ou seja, a proteína recuperou sua estrutura secundária característica de  $\alpha$ -hélice após a retirada do CTAB ao longo do processo de purificação. Este resultado levou à hipótese de que a perda de estrutura da PspA4Pro em presença de CTAB poderia favorecer sua agregação com outras



moléculas do Homogenato durante a clarificação, o que poderia explicar a recuperação relativamente baixa desta etapa (77%, Tabela 1).

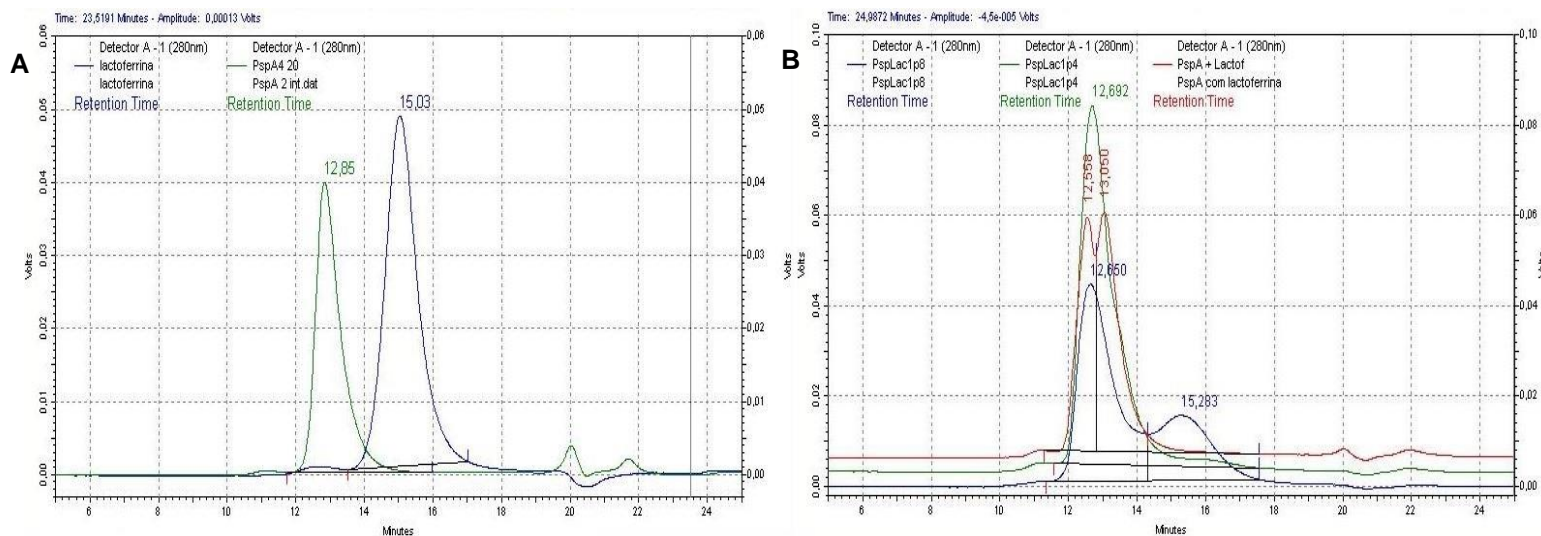


Figura 2: Avaliação da ligação de PspA4Pro à lactoferrina por CLAE. A) 2mg/mL PspA4Pro pura (verde) e 1mg/mL Lactoferrina (azul escuro); B) 2mg PspA4Pro + 0,5mg Lactoferrina (vermelho), 1mg PspA4Pro + 1mg Lactoferrina (verde), 1mg PspA4Pro + 2mg Lactoferrina (azul escuro).

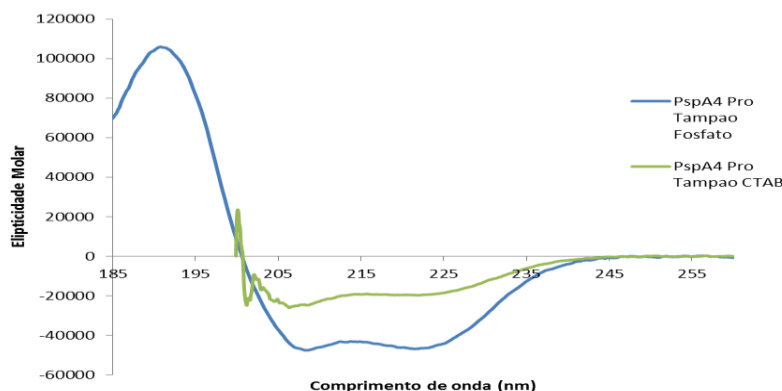


Figura 3: Espectros de dicroísmo circular da PspA4Pro na presença (verde) e ausência (azul) de CTAB.

A Figura 4 compara a elipticidade molar de uma amostra de PspA4Pro aquecida a 95°C e posteriormente resfriada, com a elipticidade de uma amostra que não passou pelo aquecimento. A sobreposição das curvas na Figura 4 indica que o aquecimento da PspA4Pro não provocou a perda irreversível da estrutura secundária da proteína, ou seja, a PspA4Pro é relativamente estável termicamente.

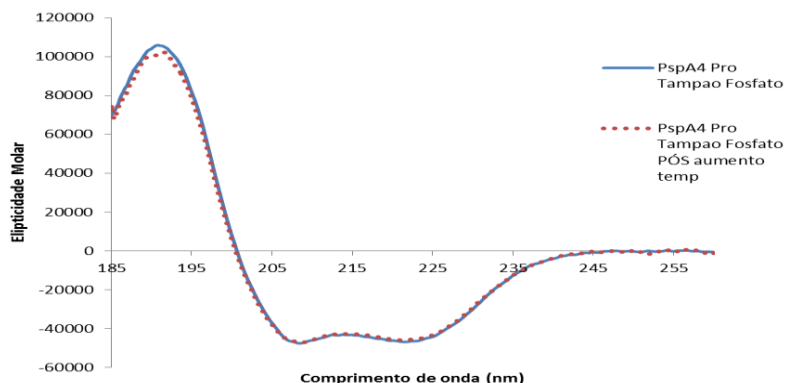


Figura 4: Espectros de dicroísmo circular da PspA4Pro sem tratamento térmico (azul) e após aquecimento até 95°C (1°C/min) e resfriamento até 15°C (em vermelho pontilhado).

Observou-se ainda que a proteína conservou melhor sua estrutura secundária em pH ácidos, com as maiores perdas de estrutura ocorrendo em pH 8,5 e 9,0 (Figura 5). A proteína apresentou maior conteúdo de  $\alpha$ -hélice em pH 5,0, valor próximo ao seu pI (4,8). A elipticidade em pH 4,0, que foi o menor valor de pH utilizado durante o processo de purificação, foi semelhante àquela dos pH próximos à neutralidade, indicando que as etapas de crioprecipitação a pH 4,0 e cromatografia de troca catiônica não devem ter afetado a estrutura secundária da proteína.

Após a aplicação da PspA4Pro purificada à resina de poli- $\epsilon$ -L-lisina, a concentração de LPS foi reduzida de 3,1 EU/mg de proteína para 0,6 EU/mg. A passagem da proteína pela resina reduziu em 80% a concentração de endotoxina por miligrama de proteína, atingindo a concentração similar à exigida para outras vacinas de uso humano (<1EU/mg) (European Pharmacopoeia, 2005).

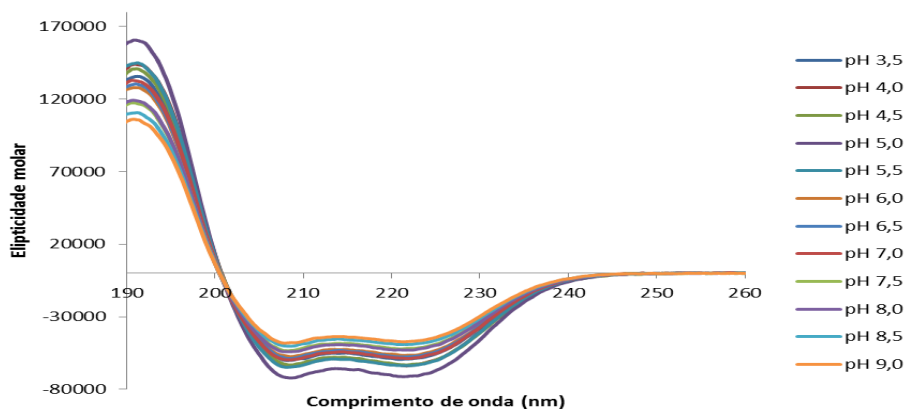


Figura 5: Espectros de dicroísmo circular da PspA4Pro em diferentes valores de pH.

## 5. CONCLUSÃO

O processo de purificação desenvolvido possibilitou a obtenção de PspA4Pro com a pureza requerida e baixa concentração de LPS. A precipitação com CTAB e a cromatografia de troca aniônica foram as etapas que mais contribuíram para o aumento da pureza. Estudos adicionais são necessários para estabelecer a condição adequada para eluir a PspA4Pro em uma única fração na cromatografia de troca catiônica. O processo de purificação não alterou a estrutura secundária da PspA4Pro, que manteve sua capacidade de ligação à lactoferrina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOGAERT, D.; HERMANS, P.W.M.; ADRIAN, P.V.; RUMKE, H.C.; DE GROOT, R.; Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine* v. 22, p. 2209-2220, 2003

BRADFORD, M.M., Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* v.72, p. 248-254, 1976

BRILES, D.E.; HOLLINSHED, S.; SWIATLO, E.; BROOKS-WALTER, A. *et al.* PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microbial Drug Resistance*, v. 3, p. 401-408, 1997.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5ª ed. v. 1, p. 161-168, 662 – 664, 2005.

LAEMMLI, U.K.; Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. v.227, p682-685, 1970.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, R. H. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

MANTESE, O.C.; PAULA, A.; MORAES, A.B.; MOREIRA, T.A.; GUERRA, M.L.L.S. BRANDILEONE, M.C.C.; Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas do *Streptococcus pneumoniae*. *J.Pediatrics*, v. 79, p. 537-42, 2003.

MORENO, A. T., OLIVEIRA, M. L. S., FERREIRA, D. M., HO, P. L., DARRIEUX, M., LEITE, L. C. C., FERREIRA, J. M. C., PIMENTA, F. C., ANDRADE, A. L. S. S., MIYAJI, E. N. Immunization of Mice with Single PspA Fragments Induces Antibodies Capable of Mediating Complement Deposition on Different Pneumococcal Strains and Cross-Protection. *Clinical and Vaccine Immunology*. v.17, p. 439-446. 2010.