

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ESTÁGIO EM DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO III
ÊNFASE EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

INSTITUTO BUTANTAN
LABORATÓRIO ESPECIAL DE DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

MANUELLA CAZELATO PIRES

PROFa. DRa. VIVIANE MAIMONI GOLÇALVES

Desenvolvimento do processo de purificação da pneumolisina recombinante geneticamente destoxicificada obtida em *Escherichia coli*

MANUELLA CAZELATO PIRES

**Desenvolvimento do processo de purificação da pneumolisina recombinante
geneticamente destoxificada obtida em *Escherichia coli***

Versão original

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas pela Comissão de
Graduação

Área de Concentração:
Bioprocessos

Orientador(a):
Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

São Paulo – 2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pires, Manuella Cazelato

Desenvolvimento do processo de purificação da pneumolisina recombinante geneticamente destoxificada obtida em *Escherichia coli*. São Paulo, 2019.

60 f. ; il. ; 30cm

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharel em Ciências Biomédicas), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, 2019.

Área de Concentração: Bioprocessos.

Orientador(a): Gonçalves, Viviane Maimoni.

1.*Streptococcus pneumoniae*. 2.Vacina. 3.Proteína Recombinante. 4.Purificação.
5.Pneumonia.

ERRATA

PIRES, MC. Desenvolvimento do processo de purificação da pneumolisina recombinante geneticamente destoxificada obtida em *Escherichia coli*. 2019. Número total 60 f. Defesa de tese (Graduação em Ciências Biomédicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Nome: PIRES, MC

Título: Desenvolvimento do processo de purificação da pneumolisina recombinante geneticamente destoxificada obtida em *Escherichia coli*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas pela Comissão de Graduação.

Área de Concentração: Bioprocessos

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória e Agradecimentos

Inicialmente eu gostaria de agradecer aos meus pais, Manoel Pires e Marta Cazelato por continuarem acreditando, junto comigo, que devo seguir meus sonhos mesmo com todos os obstáculos que surgem no caminho. Eles são pra mim uma fonte de alegria, inspiração, dedicação, amor e tranquilidade; são o meu lar, minhas férias, minha diversão. Gostaria de agradecer também as minhas irmãs Amanda e Giovanna Pires, que mesmo sem elas saberem me auxiliaram em pequenos detalhes do trabalho, além de grandes decisões da vida.

Aos meus amigos e colegas gostaria de agradecer aqueles que estiveram comigo dia-a-dia no laboratório: Douglas Figueiredo, Felipe Grabarz, Kan Kaneko, Luciano Zane, Lucas Borban, Marcela Crivellenti, Patrícia Zorzete, Renan Mori, Ryhara Batista e Sérgio Araújo; vocês me mostraram que “não só de pesquisa vive o pesquisador” e que existem inúmeros gostos para serem explorados no mundo a fora, sem se culpar por isso. Agradeço a ajuda literal no desenvolvimento do projeto, as conversas e desabafos em dias difíceis e desanimadores, nas opiniões que se mostraram importantes para grandes escolhas e principalmente o clima maravilhoso que foi trabalhar nesse laboratório, com tantas pessoas capacitadas, multifuncionais e divertidíssimas. Não somente os amigos do laboratório mas dos laboratórios “amigos” agradeço a Bruna Pigatto, Daniele Enriquetto, Deborah Damiano, Marcos Paulo de Oliveira e Rebeca Cordellini. Fazer amizade com vocês no início foi muito fácil, temos muitas coisas em comum, e isso fez dos meus dias mais alegres possíveis, se misturando com a bagunça do nosso laboratório e auxiliando no enorme quebra-cabeça que foi esse projeto; todos nós temos nossos destinos e pode ser que eles sejam traçados juntos ou somente se encontrem em um futuro distante, mas independente de como estarão todos guardados na minha memória definitivamente com o reflexo de um sorriso grande no rosto. E para finalizar gostaria de agradecer a minha orientadora Viviane Gonçalves, pela tutela, conselhos e amizade que foi cultivada; uma pessoa de tremenda inteligência, eficiência, compreensível e principalmente que se compadece com a humanidade, uma inspiração pelas batalhas por justiça social. Aos finalmentes, agradeço o Instituto Butantan por me dar essa segunda casa, aos funcionários do laboratório Maria de Fátima e Máximo de Moraes, à USP pela capacitação profissional adquirida e à agência de fomento para que esse trabalho fosse desenvolvimento, FAPESP.

...

Aproveitar o tempo!
Meu coração está cansado como mendigo verdadeiro.
Meu cérebro está pronto como um fardo posto ao canto.
Meu canto (verbalismo!) está tal como esta e é triste.
Aproveitar o tempo!
Desde que comecei a escrever passaram cinco minutos.
Aproveitei-os ou não?
Se não sei se os aproveitei, que saberei de outros minutos?!

...

Aproveitar o tempo!
Ah, deixem-me não aproveitar nada!
Nem tempo, nem ser, nem memórias de tempo ou de ser!...
Deixem-me ser uma folha de árvore, titilada por brisa,
A poeira de uma estrada involuntária e sozinha,
O vinco deixado na estrada pelas rodas enquanto não vêm outras,
O pião do garoto, que vai a parar,
E oscila, no mesmo movimento que o da alma,
E cai, como caem os deuses, no chão do Destino.

(Pessoa, Fernando., Poesia Completa de Álvaro de Campos.
Apostila. Lisboa: Ática, 1944 (imp. 1993). – 261).

RESUMO

PIRES, Manuella Cazelato. Desenvolvimento do processo de purificação da pneumolisina recombinante geneticamente destoxicificada obtida em *Escherichia coli*. 2019. Número total de 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biomédicas) – Instituto Butantan, São Paulo, 2019. Versão original.

A bactéria *Streptococcus pneumoniae* é um importante patógeno humano que causa doenças graves, com elevadas taxas de mortalidade. As vacinas pneumocócicas atuais têm como base os polissacarídeos capsulares, mas seu custo de produção é elevado e sua cobertura é limitada aos sorotipos incluídos na formulação. Assim, vacinas proteicas têm sido propostas como alternativa. Dentre os candidatos estudados destaca-se a pneumolisina (Ply), toxina hemolítica que se liga ao colesterol da membrana, oligomerizando e gerando poros que lisam as células do hospedeiro. Ply também liga-se ao *toll-like receptor 4*, desencadeia a ativação do complemento pela via clássica dependente de anticorpos, porém inespecíficos, e recentemente foi demonstrado que os poros formados ativam o inflamassoma NLRP3. Portanto, Ply tem grande potencial vacinal e imunomodulador, por isso, devido à sua toxicidade, foi geneticamente destoxicificada para emprego em vacinas.

Este projeto propõe estabelecer o processo de purificação da proteína recombinante destoxicificada (PdT) para que possa futuramente ser avaliada para formulação de uma nova vacina pneumocócica baseada em nanopartículas para administração em pó. PdT foi clonada em *Escherichia coli* sem qualquer *tag* de afinidade para evitar as caras e relativamente ineficientes etapas de remoção da *tag*. O cultivo foi em biorreator com meio de autoindução livre de compostos de origem animal, com as especificações de produção já obtidas em processos anteriores, para produção da PdT.

Para o processo de purificação as seguintes etapas foram avaliadas: separação e lise celular, remoção de debris e impurezas do lisado, cromatografia de troca aniônica, cromatografia de troca catiônica, multi-modal e de interação hidrofóbica. O processo de purificação com os melhores resultados foi o seguinte: lise em tampão bis-tris 10 mM pH 7,0, centrifugação a 17.000 g por 2 h, cromatografia de troca aniônica com aplicação da amostra em pH 9,5 e eluição por gradiente crescente de NaCl, cromatografia de interação hidrofóbica com eluição por gradiente decrescente de NaCl. As etapas cromatográficas precisam ser otimizadas para alcançar pureza $\geq 95\%$ para usar PdT na formulação das nanopartículas.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Vacina. Proteína Recombinante. Purificação. Cromatografia.

ABSTRACT

PIRES, Manuella Cazelato. Development of the purification process of the genetically detoxified recombinant pneumolysin obtained in *Escherichia coli*. 2019. Number of pages 60p. Work for Course Conclusion (Biomedic Science Graduate) – Butantan Institute, São Paulo, 2019. Original version.

Streptococcus pneumoniae is an important human pathogen that causes severe diseases with high mortality rates. Pneumococcal vaccines are based on capsular polysaccharides, but their production cost is high and their coverage is limited to the serotypes included in the formulation. Thus, protein vaccines have been investigated as an alternative. Among the candidates, the virulence factor pneumolysin (Ply) is a promising one. Ply is a hemolytic toxin that binds to the plasmatic membrane, oligomerizes and generates pores that lyse host cells. It also binds to toll-like receptor 4, triggers complement activation by unspecific antibody-dependent classic pathway, and recently it was shown that the pores generated activates the inflammasome NLRP3. Therefore, Ply have great vaccine and immunomodulatory potential, and due to its toxicity, it has been genetically detoxified for use in vaccines.

The project aimed at developing the purification process of the recombinant detoxified Ply (PdT), so that it can be evaluated in the future for a new pneumococcal nanoparticle-based vaccine for dry powder administration. PDT was cloned into *Escherichia coli* without any affinity tag to avoid the expensive and inefficient tag removal steps. The cultivation was done in bioreactor with the animal-origin free auto-induction medium, according to the protocol previously established for PDT production.

For the purification process, the following steps will be evaluated: cell separation and lysis, removal of fragments and impurities from the lysate, anion exchange chromatography, cation exchange chromatography, multi-modal and hydrophobic interaction chromatography. The purification process with better results was the following: cell lysis with bis-tris 10 mM pH 7.0, centrifugation at 17,000 g for 2 h, anion exchange chromatography with sample application at pH 9.5 and elution with increasing NaCl gradient, hydrophobic interaction chromatography with elution with decreasing NaCl gradient. The chromatographic steps need to be optimized to reach purity $\geq 95\%$ in order to use PDT for nanoparticles formulation.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine. Recombinant Protein. Purification. Chromatography.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01. Estrutura tridimensional da pneumolisina e sua distribuição de carga eletrostática.....	05
Figura 02. Curva de titulação da pneumolisina.....	06
Figura 03. Planejamento estratégico das metodologias desse trabalho.....	10
Figura 04. Crescimento celular e consumo das fontes nutricionais do cultivo em biorreator.....	17
Figura 05. SDS-PAGE das frações (A) solúvel e (B) insolúvel das amostras de 15 a 40 h de cultivo.....	18
Tabela 01. Avaliação da influência do tampão de lise celular na solubilidade e recuperação de PdT.....	19
Figura 06. SDS-PAGE para avaliação da influência do tampão de lise na recuperação de PdT de forma solúvel.....	19
Figura 07. SDS-PAGE da avaliação do SartoClear para clarificar o Homogeneizado com uma faixa de pH de 7,0-5,0.....	20
Tabela 02. Avaliação do SartoClear para clarificar o Homogeneizado com uma faixa de pH de 7,0-5,0.....	21
Figura 08. Cromatogramas das cromatografias de troca aniônica em Q-Sepharose FF utilizando diferentes tampões.....	22
Figura 09. (A) SDS-PAGE e (B) western blot das frações das cromatografias de troca aniônica em Q-Sepharose FF utilizando diferentes tampões.....	23
Figura 10. Análise dos resultados da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose FF cuja entrada foi ajustada para pH 9,5.....	24
Figura 11. Cromatograma da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose FF com eluição em 0,5 M de NaCl.....	25
Figura 12. Análise dos resultados da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose FF com eluição em 0,5 M de NaCl.....	25

Tabela 03. Avaliação da solubilidade de PdT em diferentes pHs a partir do pool de AEC.....	27
Figura 13. SDS-PAGE para avaliação da solubilidade de PdT em diferentes pHs.....	27
Figura 14. Cromatograma da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose XL.....	28
Figura 15. Análise dos resultados da cromatografia multi-modal em CAPTO MMC de modo negativo.....	29
Figura 16. Cromatograma da cromatografia multi-modal em CAPTO MMC de modo adsortivo.....	30
Figura 17. SDS-PAGE das frações da cromatografia multi-modal em CAPTO MMC de modo adsortivo.....	31
Figura 18. Cromatograma da cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose Fast Flow.....	32
Figura 19. Análise da cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose Fast Flow.....	33
Figura 20. Cromatograma da cromatografia de interação hidrofóbica utilizando a resina Phenyl Sepharose High Performance.....	33
Figura 21. SDS-PAGE das frações da cromatografia de interação hidrofóbica utilizando a resina Phenyl-Sepharose High Performance.....	34
Figura 22. Cromatogramas das cromatografias de interação hidrofóbica utilizando as resinas PY-Phe, PY-ISO e PY-C1.....	35
Figura 23. SDS-PAGE das amostras ajustadas com 0,5 M ou 2,0 M de NaCl para entrada como primeira etapa cromatográfica na HIC.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC – *Anion Exchange Chromatography*

AI – Auto-indução

BCA - *Bicinchoninic Acid*

CEC – *Cation Exchange Chromatography*

DO – Densidade Ótica

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

Ft – *Flowthrough*

HIC – *Hydrofobic Interaction Chromatography*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE – Índice Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN-1 – Interferon tipo 1

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-8 – Interleucina 8

mAU – *milliAbsorbance Unit*

MLSB - *Macrolide-lincosamide-streptogramin B*

MMC – *Multimodal Chromatography*

MRC-1 – Receptor C da manose tipo 1

mRNA – RNA mensageiro

mtDNA – DNA mitocondrial

NaCl – Cloreto de Sódio

NETs - *neutrophil extracellular traps*

NLRP3 – *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

pI – Ponto isoelétrico

Ply – *Pneumolysin*

PMSF - *phenylmethylsulfonyl fluoride*

PS – Polissacarídeo

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SUS – Sistema Único de Saúde

TLR4 – *Toll-like receptor 4*

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	01
a.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	01
b.	Doenças pneumocócicas e vacinas.....	02
c.	Pneumolisina.....	04
2.	Justificativa.....	08
3.	Objetivo.....	09
4.	Materiais e Métodos.....	10
a.	Planejamento estratégico.....	10
b.	Produção da PdT recombinante.....	11
c.	Rompimento celular.....	12
d.	Clarificação.....	12
e.	Avaliação da terra diatomácea SartoClear para clarificação.....	12
f.	Cromatografia de troca aniônica (AEC)	13
g.	Avaliação da estabilidade de PdT em diferentes pHs.....	13
h.	Cromatografia de troca catiônica (CEC)	13
i.	Cromatografia de interação mista (MMC)	14
j.	Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)	14
k.	Eletroforese SDS-PAGE ou <i>Western Blot</i> para identificação de PdT.....	15
l.	Quantificação e determinação de pureza da PdT recombinante.....	15
m.	Avaliação e comparação de processos.....	15
5.	Resultados.....	16
a.	Avaliação da produção de PdT em biorreator para escalonamento industrial.....	16

b. Avaliação da composição de tampões de rompimento celular como etapa de recuperação de PdT de forma solúvel.....	18
c. Avaliação da terra diatomácea SartoClear como etapa de clarificação.....	20
d. Avaliação da Troca Aniônica como primeira etapa cromatográfica de purificação de PdT.....	21
e. Avaliação de estabilidade de PdT solúvel em diferentes pHs.....	26
f. Avaliação da Troca Catiônica como primeira etapa cromatográfica de purificação de PdT.....	27
g. Avaliação da Interação Mista como primeira etapa cromatográfica de purificação de PdT.....	29
h. Avaliação da Interação Mista como segunda etapa cromatográfica de purificação de PdT.....	30
i. Avaliação da Interação Hidrofóbica como segunda etapa cromatográfica de purificação de PdT.....	31
j. Avaliação da interação hidrofóbica como primeira etapa cromatográfica.....	35
6. Discussão.....	36
7. Conclusão.....	40
8. Referências Bibliográficas.....	41

Introdução

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae, usualmente denominada pneumococo, é uma bactéria Gram-positiva extracelular encapsulada de 1 micrômetro de dimensão, do tipo cocos, pertencente à família Streptococcaceae, que se dispõe em pares (diplococos) ou cadeias, anaeróbia aerotolerante, alfa-hemolítica, comumente encontrada na microbiota comensal do trato respiratório superior do homem (Alonso de Velasco et al. 1995). Se trata de um exemplo clássico de patógeno exclusivamente humano que apresenta o padrão de infecção com progressão da doença a partir da nasofaringe, alcançando a corrente sanguínea e o cérebro; o mesmo padrão apresentado pelas bactérias *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* (Mongensen et al. 2006; Corless et al. 2001).

A cápsula de *S. pneumoniae* constitui-se de um polímero viscoso firmemente aderido à parede celular, é composta do polissacarídeo capsular, polipeptídeos e glicocálice organizado, e é um dos fatores de virulência mais importantes da bactéria por impedir que células do sistema imunológico a elimine através do processo de fagocitose e por estimular a produção de anticorpos em indivíduos imunocompetentes (Brugger et al. 2016). Outros fatores de virulência da bactéria são (i) as adesinas, que permitem a adesão às células da faringe e do epitélio respiratório, (ii) as proteases inativadoras de anticorpos IgA, (iii) o peróxido de hidrogênio, que induz morte celular, (iv) a pneumolisina, que é uma proteína secretada pela bactéria, cuja função é a de desestabilizar a membrana celular da célula humana (Kadioglu et al. 2008), além de outras moléculas como (v) pili, oxidases e exoglicosidases (Subramanian et al. 2019).

Com base nos anticorpos produzidos, os pneumococos são classificados em sorotipos (Henrichsen 1995). Sabe-se que cada sorotipo corresponde a uma estrutura química diferente do polissacarídeo da cápsula e que cada um deles inibe a fagocitose com maior ou menor intensidade, o que resulta em uma habilidade diferenciada de cada sorotipo para causar a doença pneumocócica (Henrichsen 1995). Atualmente, são reconhecidos 97 sorotipos com base nas diferenças antigênicas dos polissacarídeos capsulares (Geno et al. 2015).

Doenças pneumocócicas e vacinas

Doenças pneumocócicas não-invasivas são doenças causadas pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* que ocorrem na porção superior do trato respiratório, incluindo regiões como cavidade nasal, seios paranasais, faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe) e laringe. A infecção pneumocócica pode provocar em adultos doenças menos agressivas, como otite aguda do ouvido médio, sinusite e ceratite, e doenças mais graves como pneumonia, meningite e sepse. Em casos pediátricos, além dessas mesmas doenças, também pode ocorrer bacteremia oculta, osteomielite, artrite séptica, pericardite e peritonite (Varman et al. 2017). A infecção e a propagação das doenças pneumocócicas se dão normalmente através de secreções liberadas no ar por indivíduos contaminados em contato próximo com indivíduos saudáveis, o que acontece mais comumente em estações de frio (Numminen et al. 2015). As características sintomáticas mais frequentes em indivíduos que apresentam doenças do trato respiratório superior são tosse seca, espirros, secreção e/ou congestionamento nasal, dores na face, problema de audição e fala, dificuldade para respirar, febre, garganta irritada, dificuldade de deglutição, cansaço físico, dores de cabeça e inchaço dos gânglios (André et al. 2002).

Em 2017 a Organização Mundial da Saúde (WHO) determinou que *S. pneumoniae* é um dos 12 patógenos prioritários de atenção à saúde, pois a taxa de infecção é de 27-65% das crianças do mundo e <10% dos adultos (Weiser et al. 2018). Dados de 2016 mostraram que a taxa de morte de crianças até 5 anos causadas por pneumonia é de 13%, e que as mortes acontecem principalmente em países em desenvolvimento, como países do continente africano como Zâmbia, Uganda e Namíbia, pessoas imunologicamente comprometidas e idosos (World Health Organization, 2018). No Brasil, dados do IBGE publicados em 2009 mostraram que a taxa de morbidade devido à pneumonia entre idosos de 60 anos ou mais, hospitalizados no SUS, foi de 9,1% e 10,8% para mulheres e homens respectivamente, sendo uma das 6 causas mais importantes de internação (IBGE, 2009).

O tratamento das infecções por *S. pneumoniae* baseia-se na utilização de inúmeros antibióticos, com diferentes mecanismos de ação, como penicilina, amoxicilina, cefotaxima/ceftriaxona, eritromicina, macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (Gil-Setas et al. 2004); entretanto, a resistência do pneumococo aos antibióticos tem aumentado em vários países (Linãres et al. 2010; Organización Panamericana De La Salud, 2010). Alguns sorotipos de pneumococo apresentam resistência a mais de 15 antibióticos diferentes e justamente estes sorotipos estão tipicamente presentes na microbiota das crianças (Fenoll et

al. 1998); portanto, o aparecimento de cepas multirresistentes faz com que as vacinas sejam a maneira mais eficaz de combater as doenças pneumocócicas.

A vacina de polissacarídeos (PS) livres, ou seja, polissacarídeos não conjugados a proteínas, embora tenham boa cobertura contra 23 sorotipos do pneumococo, apresentam algumas características desfavoráveis (Mantese et al. 2003):

1. Não ativa as células de memória;
2. Induz níveis variáveis de anticorpos, sendo estes, predominantemente IgM;
3. Produz baixa resposta imune em crianças, principalmente nos menores de dois anos por não estimularem a maturação clonal;
4. Os anticorpos produzidos são de baixa avidez;
5. A proteção é limitada aos sorotipos cujos PS foram incluídos na vacina, tornando a eficácia da vacina limitada a regiões onde tais sorotipos são predominantes.

A conjugação do PS a uma proteína carregadora transforma a natureza deste antígeno de T-independente em T-dependente, permitindo seu uso em crianças menores de 2 anos de idade. As vacinas conjugadas atualmente em uso são compostas por 10 ou 13 PS de diferentes sorotipos, cada um deles ligados quimicamente a uma proteína carregadora não relacionada à doença. Embora apresentem boa proteção aos grupos de risco, estas vacinas oferecem proteção limitada aos sorotipos cujos PS foram conjugados, desencadeando uma pressão seletiva que leva à substituição dos sorotipos que são cobertos pela vacina, por outros que não estão em sua composição, levando ao aparecimento de doenças por sorotipos não-vacinais (Pichon et al. 2013). Apesar de que PS de outros sorotipos poderiam ser inclusos em novas vacinas conjugadas, há limitações técnico-econômicas para produção de vacinas com maior valência, além das baixas capacidade e velocidade de predição dos novos sorotipos que deveriam ser inclusos.

Uma vez que proteínas são抗ígenos muito mais conservados entre diferentes cepas de pneumococo do que os PS, vacinas produzidas com抗ígenos purificados representam uma alternativa para a imunização de ampla cobertura contra o pneumococo, capaz de gerar resposta imune de memória nos principais grupos de risco, com custo de produção reduzido, visto que ela dispensaria a conjugação aos PS, e não levaria à substituição de sorotipos.

Pneumolisina

A pneumolisina (Ply) é uma toxina hemolítica que pertence à família de citolisinas dependentes de colesterol, ativadas por tiol, produzidas por algumas bactérias Gram-positivas. É formada por 4 domínios, 3 domínios não contíguos, que promovem a estabilidade e rigidez da proteína (Lee et al. 2018), ligados ao domínio ligante de membrana (domínio 4) C-terminal; possui *loops* ricas em triptofano que promove a oligomerização dos monômeros de Ply para formação de complexos (Marshall et al. 2015). A deleção do gene *ply* levou à redução da virulência dos pneumococos dos sorotipos 2 e 3 (Berry et al. 1989), e a manipulação através de mutação racional da cauda 5' do mRNA de *ply*, onde os aminoácidos originais foram substituídos por semelhantes, promoveu redução nos níveis de expressão de Ply por pneumococos e nos níveis de toxicidade em células humanas primárias e imortalizadas (Amaral et al. 2015). Essa proteína é intracelular e, como não apresenta sequência sinal conhecida, sua liberação *in vivo* tem sido relacionada à autólise (Rossjohn et al. 1998), porém recentemente foi descrito um possível novo mecanismo de transporte independente de sequência sinal (Price et al. 2012). Ply é bastante conservada entre as cepas de pneumococo, com apenas 3,3% de variação na sequência, porém há vários alelos descritos, bem como mutantes naturais com atividade hemolítica reduzida, ou até sem atividade (Jefferies et al. 2007).

A toxicidade de Ply envolve alteração de inúmeros processos fisiológicos celulares, entre eles Ply mostrou-se capaz de ligar-se ao colesterol da membrana plasmática formando oligômeros e gerando poros que resultam na lise das células do hospedeiro através da entrada celular de Ca^{2+} , levando a uma intensa resposta inflamatória local (Houlsworth et al. 1994; Kadioglu et al. 2000; Vögele et al. 2019), assim como a ativação do inflamassoma NLRP3 (McNeela et al. 2010).

Ply também desencadeia ativação da via clássica do complemento de maneira dependente de anticorpo inespecífico (Paton et al. 1984). Além disso, predominantemente o domínio 4 de Ply contribui para ativação do toll-like receptor 4 (TLR4), com indução de apoptose, estímulo de produção de citocinas, além de atividades hemolítica e de virulência (Malley et al. 2003; Chiu et al. 2019). Porém de forma alternativa, quando associada com o receptor de manose C do tipo 1 (MRC-1), Ply mostrou-se capaz de inibir a sinalização mediada por TLR4 e atividades pró-inflamatórias e assim a bactéria pode evadir da resposta imunológica.

permanecendo no espaço intracelular de macrófagos, que fica impossibilitado de associar o compartimento lisossomal ao compartimento em que a bactéria se encontra (Subramanian et al. 2019).

Ply pode ainda desencadear processos como: formação de espécie reativa de oxigênio (ROS), elastase, prostaglandina E₂, leucotrieno B₄, interleucina 8 (IL-8) e interferon tipo 1 (IFN-1) (Cockeran et al. 2011; Hu et al. 2019); formação de NETs (*neutrophil extracellular traps*), processo que contribui para atividade do sistema imune inato do indivíduo, porém de forma incontrolada e que promove formação de trombos em vasos sanguíneos (Nel et al. 2016, Anderson et al. 2018); e inibição da maturação de células dendríticas (Littmann et al. 2009).

Estruturalmente, a pneumolisina possui 53 kDa e tem superfície eletronegativa em pH neutro (Lawrence et al. 2015), seu ponto isoelétrico (pI) teórico é determinado como 5,18. A estrutura da pneumolisina, bem como a distribuição de carga em sua superfície, podem ser vistas na Figura 1, a curva de titulação pode ser vista na Figura 2.

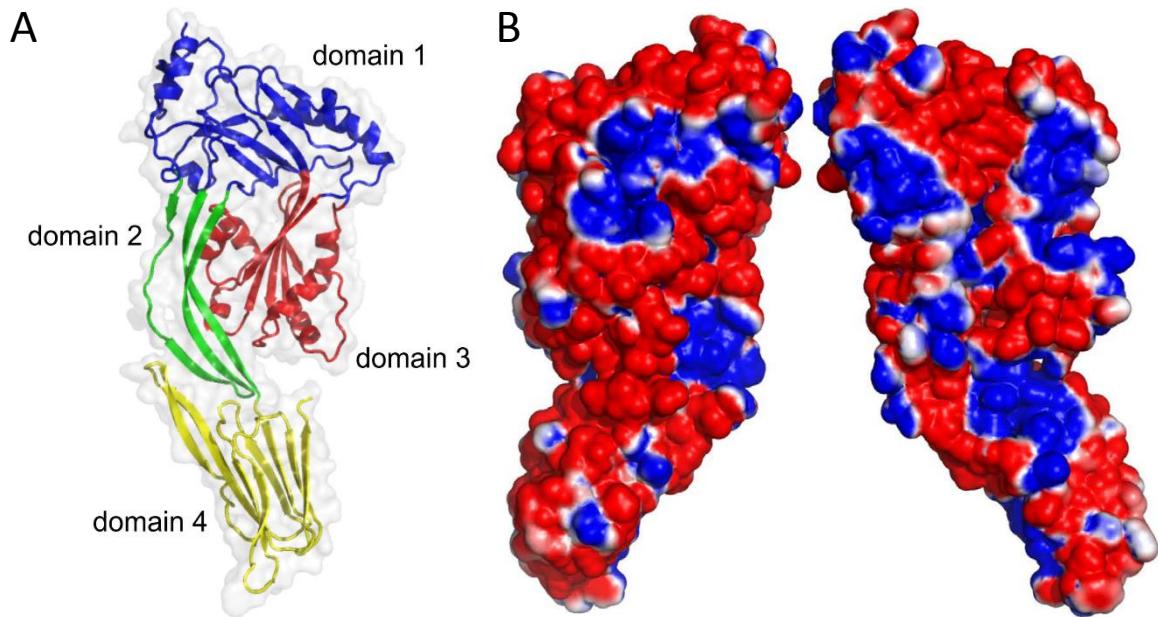


Figura 1. (A) Estrutura tridimensional da pneumolisina, adaptado de Marshall et al. (2015); (B) Distribuição de cargas na superfície da pneumolisina. As regiões em vermelho representam potencial eletronegativo, enquanto as regiões azuis representam potencial eletropositivo, adaptado de (Lawrence et al. 2015).

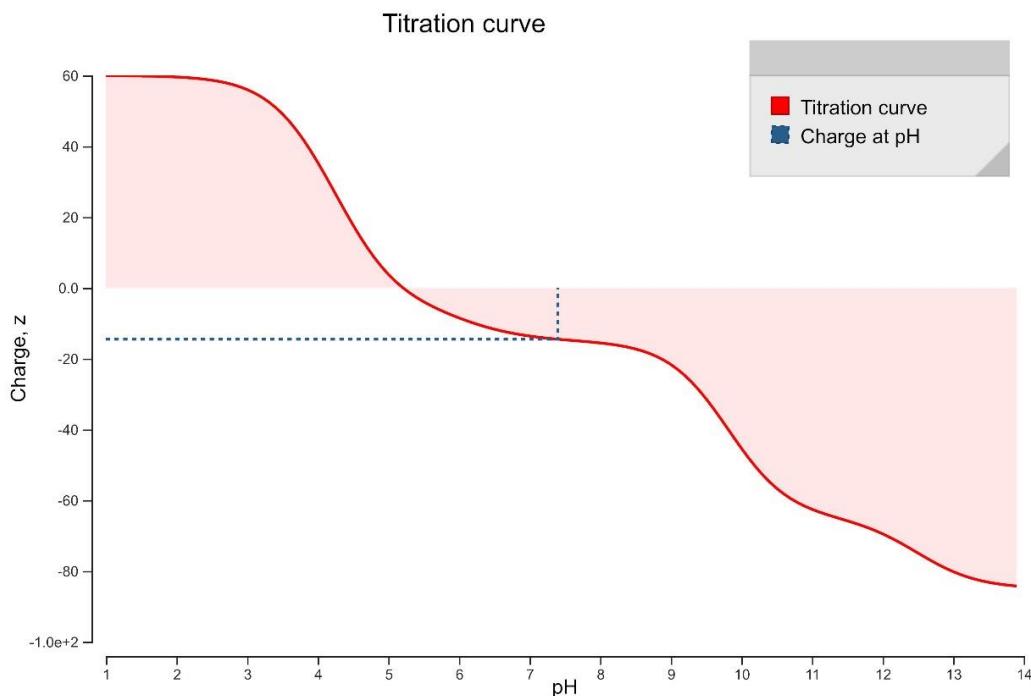


Figura 2. Curva de titulação da pneumolisina, adaptado de protpi.ch. Como o pI da proteína é de 5,18, a proteína quando submetida a pHs acima deste valor apresentará superficialmente carga negativa e vice-versa.

Devido à sua toxicidade, Ply foi geneticamente alterada para perder suas propriedades tóxicas. Diferentes tipos de mutantes destoxificados foram obtidos: PdA, com a substituição de cisteína por glicina na posição 428, que diminuiu a atividade hemolítica (Paton et al. 1991); PdB, onde triptofano 433 foi substituído por fenilalanina, mutação que aboliu a formação de poros (Paton et al. 1991); Δ6Ply, no qual foram deletados alanina 146 e arginina 147 da região formadora de poro (Kirkham et al. 2006); o mutante L460D, que perdeu a capacidade de ligar-se ao colesterol (Mann et al. 2014); D39ΔcpsΔply, um duplo mutante que identificou Ply como formador de poros na membrana mitocondrial, porém a consequente liberação de mtDNA não promoveu ativação de apoptose intrínseca (Nerlich et al. 2018); e PdT, que além das substituições C428G e W433F já descritas, tem asparagina ao invés de aspartato na posição 385, mutação que eliminou a ligação ao complemento (Berry et al. 1995). Estes toxoides foram empregados isoladamente (Alexander et al. 1994; Cockeran et al. 2011), conjugados a polissacarídeos (Paton et al. 1991; Michon et al. 1998; Lee et al. 2001) ou em combinação com outras proteínas para elaboração de vacinas pneumocócicas (Ogunniyi et al. 2000; Ogunniyi et al. 2001; Ogunniyi et al. 2007; Douce et al. 2010; Leroux-

Roels et al. 2014) e resultados promissores foram obtidos nos mais diferentes ensaios de proteção realizados.

O conjunto dessas propriedades faz de Ply não apenas um excelente candidato a uma nova vacina pneumocócica proteica, mas também aponta para um potencial efeito imunomodulador ou adjuvante dessa molécula na vacina. O isolamento e clonagem de Ply de *S. pneumoniae* sorotipo 14 é um dos exemplos dos avanços no estudo dessa proteína para desenvolvimento de vacina, que levou à otimização de algumas etapas de produção e purificação de Ply (Marini et al. 2014). Uma segunda abordagem é a forma farmacêutica de administração das vacinas, estuda-se hoje a possibilidade de administração vacinal em aerosol, com o objetivo de imunização local dos sítios mais afetados pela infecção, com ativação específica da resposta imunológica de mucosa. O trabalho de Beverley e colaboradores em 2014 mostrou que a imunização pulmonar contra infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose, induziu eficientemente o recrutamento de células T de memória, ativas, divisíveis e antígeno-dependentes; essa forma de imunização apresentou inibição, imediatamente após infecção, do crescimento das bactérias *M. tuberculosis*.

Justificativa

As doenças pneumocócicas são causadas pela bactéria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*, que coloniza a mucosa humana de sítios anatômicos como o trato superior respiratório, na maioria das vezes de forma assintomática, porém a bactéria pode invadir outros sítios e provocar doenças de grau severo, como a pneumonia. Esta doença é responsável por aproximadamente 13% das mortes devido a infecções do trato respiratório inferior em crianças, portanto, *S. pneumoniae* é um dos 6 patógenos mais preocupantes da atualidade, afetando principalmente crianças menores de 2 anos, idosos acima de 60 anos e pessoas imunologicamente debilitadas.

O grande motivador para o estudo desse patógeno é o aumento no número de cepas multirresistentes aos tratamentos por antibióticos, o que faz com que a vacinação seja a estratégia mais eficaz no combate ao pneumococo, e a existência de 97 sorotipos diferentes de pneumococo, cada um com composição química e imunologicamente distinta do polissacarídeo da cápsula bacteriana.

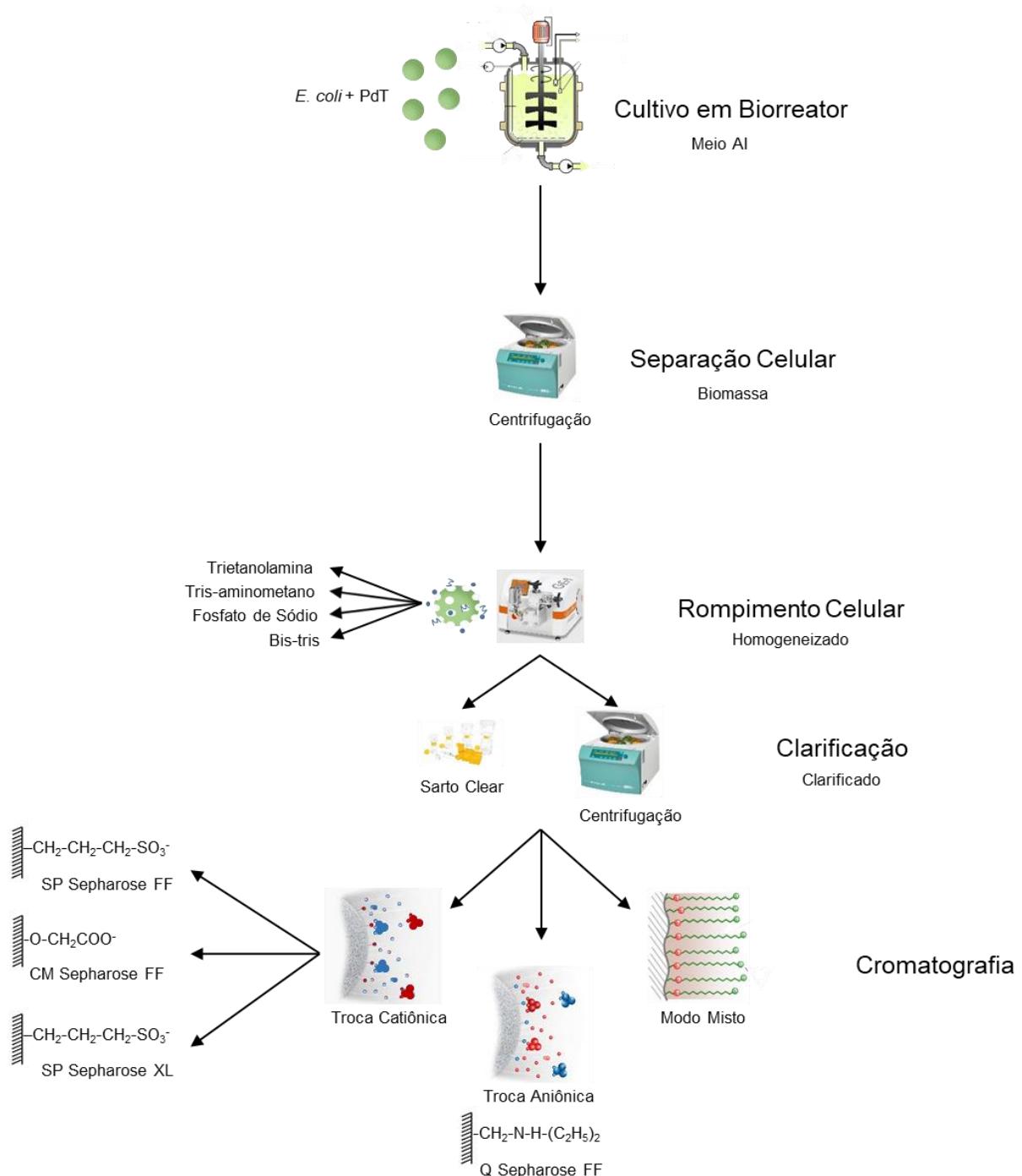
As vacinas atuais são compostas por polissacarídeos capsulares de poucos sorotipos, o que promove uma pressão seletiva que provoca a substituição dos sorotipos na população, mitigando assim os efeitos benéficos da imunização com o tempo. Desta maneira, novas abordagens vacinais baseadas em proteínas conservadas entre os diversos sorotipos estão sendo investigadas em todo mundo. Para que essas novas vacinas tenham sucesso é fundamental desenvolver processos de produção e purificação desses antígenos que alcancem elevada pureza com recuperação adequada, viabilizando assim sua produção industrial para formulação de novas vacinas pneumocócicas.

Objetivo

O objetivo deste projeto é desenvolver o processo de purificação da PdT recombinante obtida em *Escherichia coli*, de modo a obter a proteína com elevada pureza e assim futuramente permitir a formulação de uma nova vacina pneumocócica de administração por via pulmonar. Este trabalho faz parte do projeto de pesquisa RCUK/MRC-FAPESP intitulado *Pulmonary Delivery of a Targeted Mucosal Nanocarrier Vaccine for Pneumonia* (processo n. 2016/50413-8), que se propõe a avaliar nanopartículas contendo PdT e outros抗ígenos de pneumococo.

Materiais e Métodos

Planejamento estratégico



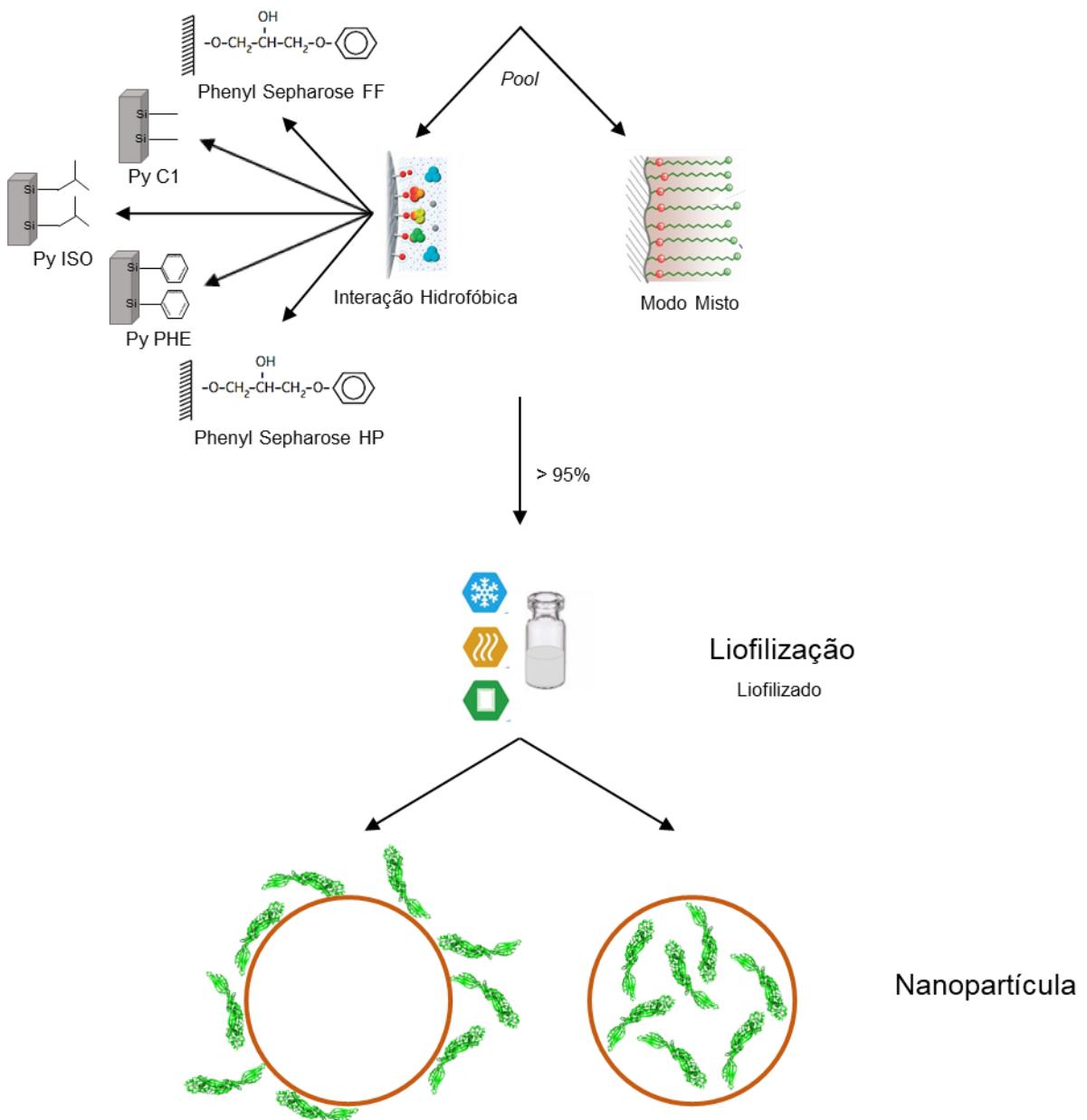


Figura 3. Planejamento estratégico das metodologias desse trabalho.

Produção da PdT recombinante. O cultivo para produção de PdT foi realizado em biorreator de 10 L com 6 L de meio de autoindução (AI, Campani et al. 2016) a 25°C, com controle da concentração de oxigênio dissolvido em 30% da saturação pela malha de controle de agitação (150 a 1000 rpm) e adição de O₂ puro ao ar de entrada (0 a 100%). O meio AI contém glicose e glicerol como fontes de carbono e lactose como indutor. Quando a glicose se esgota, o microrganismo passa a consumir glicerol e lactose, a qual atua como indutor da

síntese da proteína heteróloga que foi clonada sob o controle do operon Lac. Amostras foram retiradas para medida da densidade ótica (DO) a 600 nm e, após centrifugação a 4.500 g por 5 min, o sobrenadante foi usado para determinar a concentração das fontes de carbono consumidas e dos ácidos orgânicos produzidos e o *pellet* para verificar a produção da proteína. Para isso foi empregado o HPLC com a coluna Aminex HPX-87H (Bio-rad), fase móvel 5 mM H₂SO₄, 0,6 mL/min, detecção dos ácidos por UV 210 nm e dos açúcares e glicerol pelo índice de refração. Após o cultivo, as células foram centrifugadas a 6817 g por 30 min e a biomassa obtida foi congelada para processamento posterior.

Rompimento celular. Para realizar a lise das células, a biomassa congelada a -20 °C foi ressuspensida na proporção de 1 g:10 mL de tampão de lise a 4°C, contendo 1 mM de EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), 0,1% de Triton X-100 e 1 mM de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*); diferentes composições do tampão de lise foram testadas, de forma que obtivéssemos a maior quantidade solúvel de PdT: (i) trietanolamina, (ii) tris-aminometano, (iii) fosfato de sódio e (iv) bis-tris, todos na concentração de 10 mM; após ressuspensão da biomassa no tampão com auxílio do Mixer X-520 (PolyScience), as células foram rompidas em homogeneizador contínuo de alta pressão PandaPLUS (*GEA Lab Homogenizer*), sempre mantidas sobre o gelo, em 4 etapas de aproximadamente 1.500 bar, com avaliação da eficiência da lise através da leitura de absorbância DO 600 nm. Essa amostra foi nomeada Homogeneizado.

Clarificação. Após obtenção do Homogeneizado, os *debris* celulares foram separados por centrifugação (17000 g por 2 h) e ressuspensos em 8 M de ureia (para quantificar a perda de PdT em corpos de inclusão, nomeado Fração Insolúvel) e o sobrenadante (nomeado Clarificado) foi ajustado e filtrado em filtro 0,45 µm para ser aplicado à primeira cromatografia (nomeado Entrada).

Avaliação da terra diatomácea SartoClear para clarificação. O Homogeneizado foi distribuído em 6 amostras de volumes iguais e os pHs ajustados com ácido acético 2 M: (i) amostra 1 em pH 7,0, (ii) amostra 2 em pH 6,5, (iii) amostra 3 em pH 6,0, (iv) amostra 4 em pH 5,5, e (v) amostra 5 em pH 5,0. Todas as amostras foram centrifugadas por 1h30 a 4500 g, os *pellets* foram pesados e ressuspensos em ureia 8 M, aos sobrenadantes foi adicionado a terra diatomácea na concentração 30 g/L e filtrados em filtros de 0,45 µm. A avaliação de precipitação de PdT foi feita por densitometria do SDS-PAGE dos *pellets* e dos sobrenadantes de cada uma das amostras.

Cromatografia de troca aniônica (AEC). A resina de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow (GE Life Science) foi testada como primeira etapa cromatográfica. A resina Q-Sepharose Fast Flow se trata de uma resina cuja matriz é *cross-linked* com 6% de agarose (polímero natural modificado) e o grupo funcional é um amônio quartenário e de base forte, -CH₂-N-H-(C₂H₅)₂, os volumes de coluna utilizados nesses experimentos foram de 25 mL e 77 mL. Foram testados diversos tipos de tampões em concentrações que variaram de 10 mM a 30 mM, em diferentes pHs (de 6,5 a 9,5) para determinar o melhor tampão para adsorção de PdT. Os tampões testados foram (1) Bis-tris (Sigma); (2) Bis-tris propano (Sigma); (3) Trietanolamina (Sigma); (4) Tris-aminometano (Tris, Carlo Erba); (5) Fosfato de sódio (Nuclear); e (6) Acetato (Anidrol). A eluição foi executada com os respectivos tampões em gradiente linear crescente de sal, de 0 a 1 M de NaCl (Anidrol) ou em eluição por gradiente descontínuo (“degraus” ou “steps”). As etapas cromatográficas foram (i) equilíbrio da coluna com tampão sem sal, (ii) aplicação da Entrada, (iii) lavagem da coluna com tampão de equilíbrio sem sal, (iv) eluição da PdT em tampão com sal (fase móvel) e (v) regeneração e reequilíbrio da coluna.

Avaliação de estabilidade de PdT solúvel em diferentes pHs. PdT, eluída da cromatografia AEC, em bis-tris 10 mM foi separada em 9 amostras diferentes de volume 6 mL e cada um deles foi ajustado ao pH desejado utilizando uma solução concentrada de ácido acético 2 M. Após 1 h das amostras em agitação todas foram congeladas *overnight* e posteriormente centrifugadas por 30 min à 4500 g; o *pellet* foi descartado e o sobrenadante quantificado por BCA e avaliada pureza por SDS-PAGE.

Cromatografia de troca catiônica (CEC). A cromatografia de troca catiônica foi testada como primeira etapa. Três colunas Hitrap (GE Life Science) foram testadas: (i) SP-Sepharose Fast Flow; (ii) SP-Sepharose XL e a (iii) CM-Sepharose Fast Flow. As resinas Fast Flow têm matriz de *cross-linked* 6% de agarose e a XL tem matriz de 6% de agarose *cross-linked* com dextrana. As resinas SP possuem como grupo funcional -CH₂-CH₂-CH₂-SO₃⁻, e a CM o grupo -O-CH₂COO⁻, as colunas possuíam volume de 1 mL. Todas as colunas foram equilibradas com tampão acetato 20 mM em pH 5,5 e eluídas no mesmo tampão em gradiente linear crescente de 0 a 1 M de NaCl. Para isso, estabeleceu-se que a CEC operaria como uma cromatografia negativa, na qual as impurezas da amostra são adsorvidas à resina, enquanto a proteína de interesse mais pura é obtida no *flowthrough* (*Ft*).

Cromatografia de interação mista (MMC). Este tipo de cromatografia permite mais de um tipo de adsorção, como é o caso da resina utilizada nesse trabalho, a Capto-MMC (GE Life Science), com volume de 14 mL, possui matriz de *crosslinked* agarose e características funcionais de interação iônica e hidrofóbica ao mesmo tempo, assim aprimora as chances de ligação da proteína de forma mais específica. Essa cromatografia foi executada em duas etapas diferentes do processo de purificação. Quando aplicada como primeira etapa cromatográfica foi avaliada como cromatografia negativa, na qual a proteína de interesse não é adsorvida, ou seja, o clarificado foi utilizado como entrada e a PdT foi recuperada no *flowthrough*. Neste caso, a coluna foi equilibrada com tampão acetato 20 mM em pH 5,5 e os contaminantes eluídos no mesmo tampão em gradiente linear crescente de 0 a 1 M de NaCl.

Quando aplicada como segunda etapa cromatográfica, a Capto-MMC foi avaliada para adsorção da proteína de interesse, ou seja, o *pool* eluído de uma primeira cromatografia (no caso da AEC) foi utilizado como entrada, a PdT foi adsorvida e posteriormente eluída da coluna. Neste caso, a coluna foi equilibrada e reequilibrada com tampão acetato 20 mM pH 4,2, e após injeção da amostra e reequilíbrio, a eluição foi feita em 2 etapas: (i) em tampão acetato 20 mM pH 4,2 com concentrações crescentes de NaCl e (ii) em tampão fosfato 20 mM pH 7,0; para finalizar a coluna foi regenerada e reequilibrada.

Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Foram testados diversos tipos de resinas cromatográficas: (1) Phenyl Sepharose Fast Flow (GE Life Science); (2) Phenyl Sepharose High Performance (GE Life Science); (3) Py-ISO (Kopp Technologies); (4) Py-C1 (Kopp Technologies); e (5) Py-PHE (Kopp Technologies). As resinas da GE e Kopp possuem matriz em *cross-linked* agarose e sílica, respectivamente, e os grupos funcionais são –O-CH₂-CH(OH)-CH₂-O-C₆H₅, –O-CH₂-CH(OH)-CH₂-O-C₆H₅, CH₄, C₂H₈ e C₆H₆, respectivamente. Foram usadas colunas de 1 mL, exceto Phenyl Sepharose FF cujo volume foi de 20 mL. A cromatografia foi avaliada como segunda etapa cromatográfica, a partir dos *pools* eluídos das AEC. As resinas foram equilibradas com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 e concentração de NaCl variando de 0,5 M a 2 M (dependendo da resina); a eluição foi feita com o mesmo tampão, porém sem sal e em gradiente linear decrescente ou em gradiente linear descontínuo. As etapas cromatográficas foram (i) equilíbrio da coluna com tampão com sal, (ii) aplicação da Entrada (*pool* de eluição da AEC), (iii) lavagem da coluna com tampão de equilíbrio com sal, (iv) eluição da PdT em tampão sem sal e (v) regeneração e reequilíbrio da coluna.

Eletroforese SDS-PAGE ou Western Blot para identificação de PdT. Foram feitas eletroforese e/ou *western blot*, para verificar qual das bandas presentes se tratava da PdT, que tem tamanho esperado de 53 kDa. Para isso executou-se a (i) eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, com aplicação de 4 µg a 10 µg de proteína por poço, (ii) coloração com *Comassie blue* e descoloração com ácido acético glacial e álcool, ou (ii) transferência para membrana de nitrocelulose por 1h20 a 20 V em tampão com tris-base, glicina, SDS 10%, etanol e água. Após a transferência, a membrana foi (iii) corada com Ponceau S para confirmar a transferência e (iv) lavada com tampão PBS-Tween 0,05%; (v) incubada *overnight* ou por 1 h com tampão de bloqueio (PBS + 5% leite desnatado), (vi) lavada novamente com tampão PBS-Tween 0,05%, (vii) incubada *overnight* ou por 1 h com anticorpo primário policlonal anti-PdT obtido em coelho 1:5000, (viii) lavada novamente com tampão PBS-Tween 0,05%, (ix) incubada *overnight* ou por 1 h com anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado à peroxidase 1:10000 (x) lavada novamente com tampão PBS-Tween 0,05%, e (xi) revelada por quimiluminescência, exposta por 3 a 10 min com tampão de tris 1 M, ácido percumárico, luminol e água oxigenada. As imagens foram obtidas no Image Quant LAS4000 (Ge Healthcare).

Quantificação de proteínas e determinação da pureza de PdT. A quantificação das proteínas totais ao longo do processo de purificação foi feita pelo método de Lowry (1951) ou BCA (Smith *assay*, 1985), pois existem reagentes utilizados nos experimentos que são incompatíveis com uma das técnicas, utilizando-se da outra como alternativa. A pureza de PdT foi determinada pela densitometria (BioRad GS-800 *Calibrated Densitometer*) das bandas de SDS-PAGE.

Avaliação e comparação de processos. A avaliação e comparação dos processos foi realizada com base nas análises obtidas das alíquotas recolhidas de cada etapa do processo: (i) homogeneizado, (ii) clarificado, (iii) fração insolúvel, (iv) entrada cromatográfica, (v) *flowthrough*, (vi) frações eluídas e (vii) limpeza da coluna cromatográfica. A quantificação forneceu a quantidade proteica em mg/mL e o volume da amostra apresentado em mL forneceu a quantidade de proteína total em cada amostra através da fórmula:

$$\text{P.T. (mg)} = \text{P.T. (mg/mL)} * \text{Volume (mL)} \quad [\text{Equação 1}]$$

Após a determinação de proteína total em miligramas, 10 µg de proteína total foi aplicado ao gel de poliacrilamida 12%, no qual foi realizada a avaliação por densitometria, que por sua vez forneceu a quantidade relativa em porcentagem da banda de PdT em relação à soma de

todas as demais bandas da canaleta, esta análise permitiu então a quantificação de PdT em miligramas através da fórmula:

$$\text{PdT (mg)} = (\text{P.T. (mg)} * \text{Pureza (\%)}) / 100 \quad [\text{Equação 2}]$$

A determinação de quantidade de PdT específica permitiu o cálculo da PdT recuperada em cada etapa do processo de purificação através da fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{PdT}_{\text{final}} \text{ (mg)} * 100) / \text{PdT}_{\text{inicial}} \text{ (mg)} \quad [\text{Equação 3}]$$

A análise da porcentagem relativa de PdT por densitometria permitiu também a determinação do fator de purificação, ou seja, qual foi o aumento de pureza de PdT na amostra final em relação à pureza na amostra inicial, através da fórmula:

$$\text{F.P.: Pureza}_{\text{final}} \text{ (\%)} / \text{Pureza}_{\text{inicial}} \text{ (\%)} \quad [\text{Equação 4}]$$

A recuperação e o fator de purificação foram calculados em relação ao Homogeneizado (recuperação e FP globais) e em relação à etapa anterior (recuperação e FP por etapa). Dessa forma foi possível montar tabelas de purificação dos processos realizados, cujo objetivo final foi recuperar PdT com $\geq 95\%$ de pureza, no menor número de etapas e com a maior recuperação possíveis.

Resultados

Avaliação da produção de PdT em biorreator para escalonamento industrial

Com o intuito de aumentar a escala de produção proteica feita inicialmente em frascos *Tunair* de 1 L, foi realizado o cultivo da *E. coli* BL21(DE3) com vetor de expressão pET28a+PdT no meio AI (Campani et al. 2016), que possui como fontes de carbono a glicose, o glicerol e a lactose (que também é o indutor de síntese da PdT) e fontes de nitrogênio *Phytone Peptone* (BD-Difco) e extrato de levedura. O pré-inóculo foi preparado a partir de 1 a 2 colônias isoladas em meio LB/Kan e cultivadas em 5 mL de meio em tubo falcon de 50 mL a 250 rpm e 37°C. Esse pré-inóculo foi transferido para um *Tunair* de 300 mL com 100 mL de meio AI sobre as mesmas condições e posteriormente transferido para o biorreator. O cultivo teve duração total de 40 h, a concentração de O₂ dissolvido foi controlada em 30% da saturação, a temperatura foi mantida em 25°C e o pH entre 6,5-7,0. Foi recuperada uma quantidade de 554 g de biomassa úmida (92,3 g/L). A Figura 4 apresenta o consumo das fontes de carbono e do indutor lactose durante o cultivo. Nas primeiras ≈ 24 h do cultivo, a fonte preferencial de carbono da bactéria, a glicose, foi consumida inteiramente, portanto deu-se início ao consumo do glicerol, e logo em seguida o consumo da lactose em ≈ 27 horas.

A formação de ácidos orgânicos também foi avaliada durante o cultivo e verificamos que houve apenas produção muito baixa de ácido acético (Figura 4). Com o intuito de avaliar a produção de PdT do cultivo no biorreator, amostras foram colhidas de 3 em 3 h, lisadas com sonicador a 30 Hz por 2 min, com pulsos de 15 s e centrifugadas a 16.100 g por 1 h. Tanto o sobrenadante (fração solúvel) como o *pellet* (fração insolúvel) foram aplicados ao SDS-PAGE para verificar a formação de corpos de inclusão (com PdT incorretamente enovelada) durante o processo. O SDS-PAGE da Figura 5 confirmou os dados da Figura 4, ou seja, o início de consumo da lactose coincidiu com o início da síntese de PdT (banda de 53 kDa, seta) e mostrou que boas quantidades de PdT foram produzidas na forma solúvel (quantidade relativa $\approx 50\%$ em relação às demais proteínas solúveis), apesar de muita PdT ainda estar sendo agregada na forma de corpos de inclusão (quantidade relativa de $\approx 80\%$ em relação às demais proteínas presentes nos corpos de inclusão).

A Figura 4 ainda apresenta a curva de crescimento de *E. coli* cultivada em biorreator, conforme apresentado, a fase lag finalizou em ≈ 13 h de cultivo, iniciando a fase exponencial, no qual o final do cultivo, em 40 h, deu-se ainda na fase exponencial, caracterizado pela leitura de um pico de oxigênio, representando o fim dos nutrientes disponíveis no meio. A linearização da curva de crescimento ($\ln \text{DO} \times \text{tempo}$) permitiu calcular a velocidade específica máxima de crescimento, que foi de $0,166 \text{ h}^{-1}$.

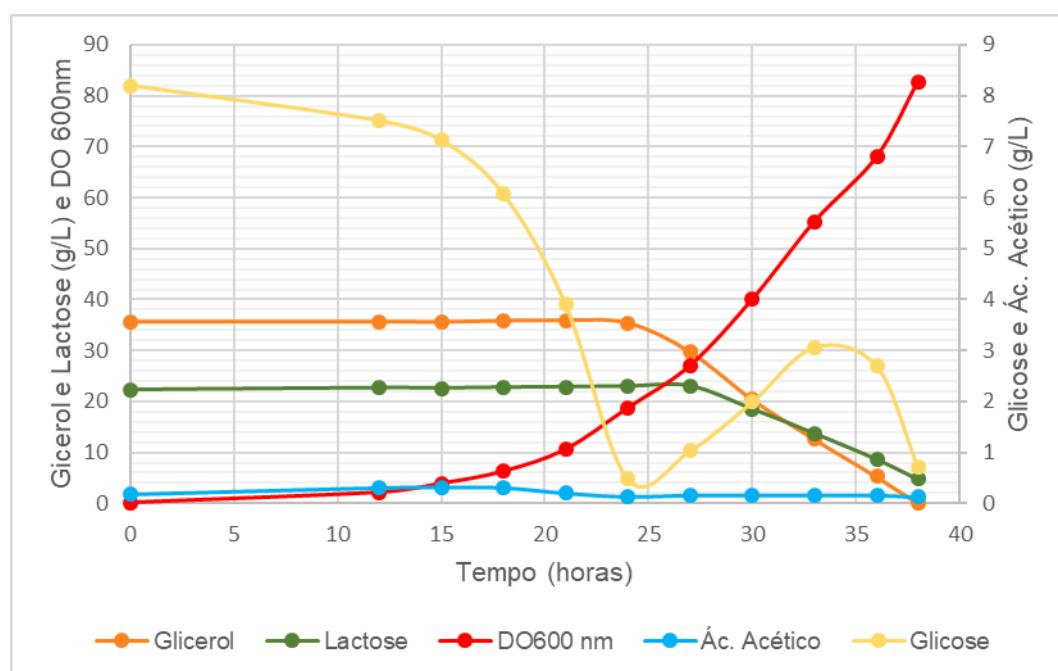


Figura 4. Crescimento celular (DO 600nm), consumo das fontes de carbono e produção de ácido acético do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) feito em biorreator de 10 L com 6 L meio de autoindução (AI) para produção de PdT, a 25 °C, pH 6,5-7,0 e 30% de oxigênio dissolvido.

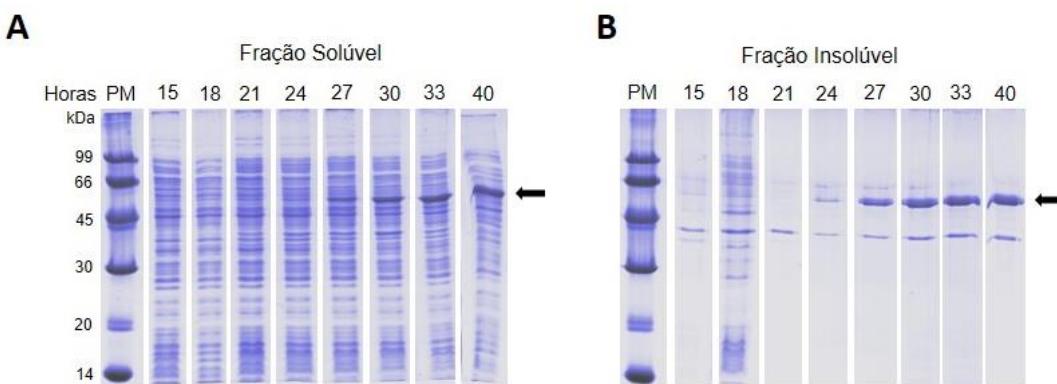


Figura 5. SDS-PAGE das frações (A) solúvel e (B) insolúvel das amostras de 15 a 40 h de cultivo (indicadas acima do gel). Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. PM: Padrão Molecular; a seta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa.

Avaliação da composição de tampões de rompimento celular como etapa de recuperação de PdT de forma solúvel

Os procedimentos de lise celular influenciam na obtenção de proteína solúvel devido a aspectos como temperatura, pH, entre outros. Formação de espuma no lisado, aparecimento de precipitações e outros parâmetros indicam degradação proteica e/ou formação de corpos de inclusão. Portanto, neste trabalho foi avaliada a influência da composição do tampão de lise tanto nesses aspectos de obtenção como na recuperação de PdT de forma solúvel a partir do clarificado. Os seguintes tampões de lise foram escolhidos de acordo com seu pKa: tris-aminometano (Tris) 20 mM pH 8,0; trietanolamina 20 mM pH 7,5; fosfato de sódio 10 mM pH 6,5; e Bis-tris 10 mM pH 7,0.

Os tampões Tris e Bis-tris foram os que apresentaram menor formação de espuma durante a lise em homogeneizador contínuo de alta pressão quando comparados aos dois outros tampões, e o tampão Bis-tris 10 mM pH 7,0 foi aquele em que a PdT foi recuperada em maior quantidade no clarificado e menor quantidade de forma insolúvel (Tabela 1 e Figura 6).

Amostra	P.T. (mg/mL)	Volume (mL)	P.T. (mg)	Pureza (%)	PdT (mg)	Rec. (%)
Homogeneizado Trietanolamina	14,16	200	2831	48	1368	100
F.I. Trietanolamina	8,85	192	1699	62	1049	76
Clarificado Trietanolamina	5,11	192	980	32	322	24
Homogeneizado Tris-aminometano	11,54	200	2309	48	1112	100
F.I. Tris-aminometano	7,08	183	1295	68	883	69
Clarificado Tris-aminometano	5,20	183	951	42	398	31
Homogeneizado Fosfato de Sódio	36,10	200	7220	54	3942	100
F. I. Fosfato de Sódio	37,42	139	5202	49	2529	64
Clarificado Fosfato de Sódio	23,65	168	3973	35	1412	36
Homogeneizado Bis-Tris	35,78	200	7155	36	2566	100
F. I. Bis-Tris	3,20	110	352	47	166	6
Clarificado Bis-Tris	26,48	208	5508	44	2449	94

Tabela 1. Avaliação da influência do tampão de lise celular na solubilidade e recuperação de PdT. O homogeneizado obtido após a lise celular foi centrifugado e a PdT analisada na fração solúvel e no pellet ressuspensionado em ureia 8 M. A quantificação de proteína total (P.T.) foi feita por Lowry ou BCA e a determinação de pureza através da densitometria do SDS-PAGE das amostras. A recuperação de PdT (Rec.) foi calculada de acordo com a Equação 3.

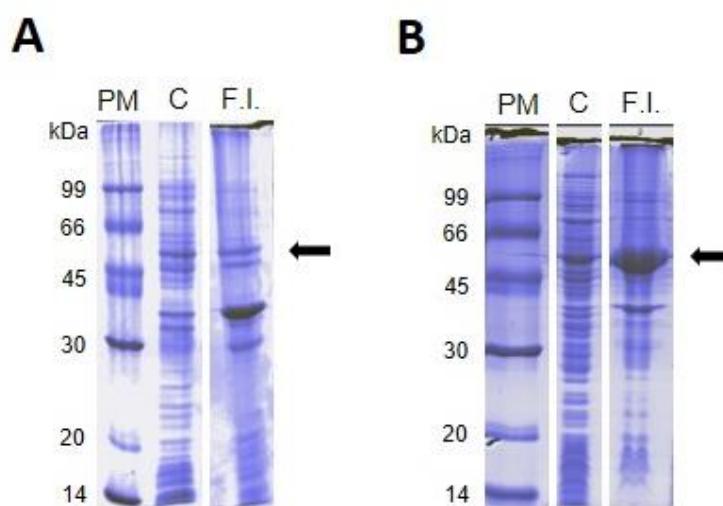


Figura 6. SDS-PAGE para avaliação da influência do tampão de lise na solubilidade e recuperação de PdT, sendo (A) o rompimento celular com tampão bis-tris 10 mM pH 7,0 e (B) o rompimento com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,5. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. PM: padrão molecular; C: clarificado; F.I.: fração insolúvel tratada com ureia 8 M; a seta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa.

Avaliação da terra diatomácea SartoClear como etapa de clarificação

A filtração com o auxiliar de filtração SartoClear foi avaliada como alternativa à centrifugação para separação dos *debris* celular após a lise, uma vez que essa operação é mais barata e mais facilmente escalonável do que a centrifugação. De acordo com o fabricante da SartoClear, a eficiência da separação aumenta com a redução do pH, sendo pH 5,0 recomendado como o mais eficiente, e a quantidade adequada de terra diatomácea também depende do pH da amostra.

Desse modo, avaliamos a solubilidade da PdT presente no Homogeneizado na faixa de pH 5,0 a 7,0. No mesmo experimento, determinamos a concentração de massa úmida, informação necessária para calcular a quantidade de terra diatomácea a ser acrescentada à amostra de acordo com a recomendação do fabricante. A Figura 7 e a Tabela 2 mostram que a diminuição do pH para valores abaixo de 5,5, utilizando ácido acético para o ajuste, e a adição de terra diatomácea ao homogeneizado levam à precipitação de PdT, com diminuição da quantidade no sobrenadante e aumento da quantidade no *pellet*. Portanto, esse método de clarificação através de filtração mostrou-se inviável e o método de centrifugação continua sendo o método mais eficiente avaliado até o momento.

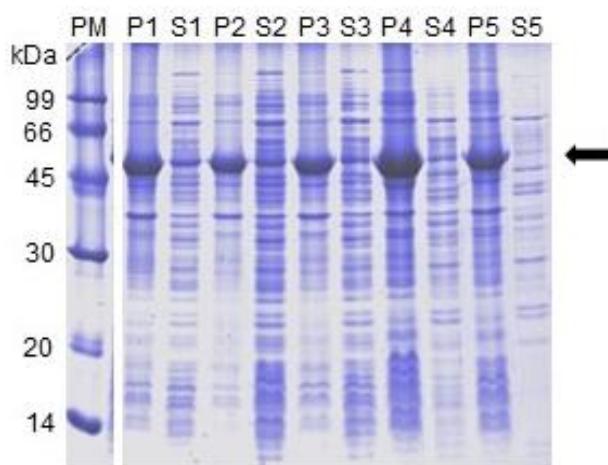


Figura 7. SDS-PAGE da avaliação do SartoClear para clarificar o Homogeneizado com uma faixa de pH de 7,0-5,0. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. PM: Padrão Molecular; P: Pellet; S: Sobreendante; os índices 1 a 5 correspondem aos pH 7,0 a 5,0, respectivamente; a seta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa.

Amostra	pH	Massa úmida (g)	PdT (mg)
Pellet A1	7	0,81	125
Sobrenadante A1	7	-	139
Pellet A2	6,5	3,19	512
Sobrenadante A2	6,5	-	41
Pellet A3	6	3,04	426
Sobrenadante A3	6	-	40
Pellet A4	5,5	3,04	234
Sobrenadante A4	5,5	-	33
Pellet A5	5	2,70	513
Sobrenadante A5	5	-	9,6

Tabela 2. Avaliação do SartoClear para clarificar o Homogeneizado em diferentes pH. O pH de cada amostra foi previamente ajustado com ácido acético antes da centrifugação, a quantificação proteica foi feita por Lowry e a massa úmida foi determinada subtraindo o peso do pellet após a centrifugação em relação ao peso do tubo vazio.

Avaliação da troca aniônica como primeira etapa cromatográfica de purificação de PdT

Como etapa inicial cromatográfica para purificação da PdT, foi avaliada a cromatografia de troca aniônica para captura da molécula, em que se explora a carga eletrostática da proteína. Para a interação com o ligante, a carga eletrostática da proteína deve ser negativa, o que acontece em pH acima de seu ponto isoelétrico (pI).

Como descrito na metodologia, (1) inicialmente foi feito o equilíbrio da coluna com o tampão desejado; (2) foi feita a aplicação da amostra (Entrada), em que as proteínas carregadas negativamente interagiram com a resina; (3) então foi feito o reequilíbrio da coluna, ou seja, todas as proteínas que não interagiram foram removidas na fração não-adsorvida, garantindo que na etapa de eluição somente as que interagiram fossem eluídas; (4) as proteínas ligadas à resina foram eluídas com concentrações crescentes de NaCl (0 a 1M), devido à troca de interação do grupo funcional da resina com a proteína pelo íon Cl⁻, portanto proteínas que interagem mais fortemente com a resina necessitam de uma maior concentração salina para serem eluídas e vice-versa; e (5) como fase final a resina foi submetida a

regeneração com tampões altamente concentrados e soluções de limpeza para não haver interferência nos próximos processos cromatográficos e o armazenamento da coluna foi feito em etanol 20%.

As primeiras cromatografias de troca aniónica foram executadas para avaliar a composição e pH do tampão de equilíbrio, com eluição por gradiente linear crescente de NaCl, e todas apresentaram um padrão de eluições que se assemelhavam entre elas. Como mostrado nas Figura 8, todos os cromatogramas apresentaram dois picos eluídos (P1 e P2) e a leitura de absorbância a 280 nm do *flowthrough* variou de acordo com o pH do tampão de equilíbrio: quanto menor o pH maior a altura, o que está de acordo com o esperado, uma vez que quanto maior o pH, mais negativamente carregadas estão as proteínas e ficam mais fortemente ligadas à resina, resultando em menor quantidade no *flowthrough*.

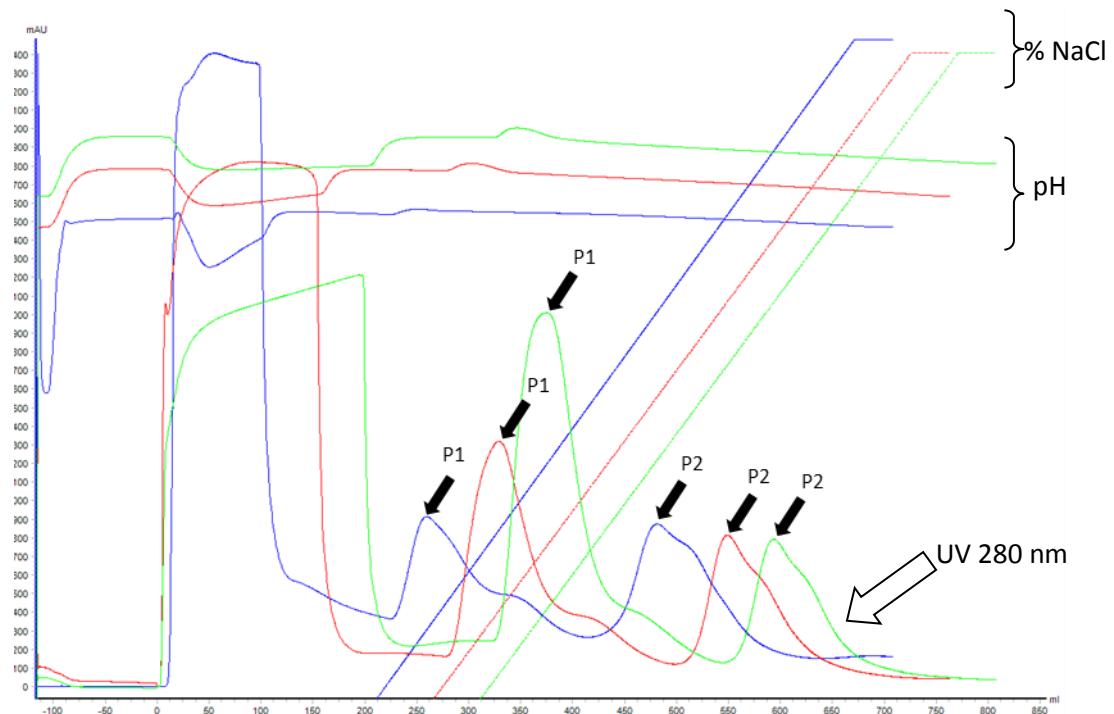


Figura 8. Cromatogramas das cromatografias de troca aniónica em Q-Sepharose FF utilizando os tampões bis-tris propano pH 7,0 (traços azuis), trietanolamina pH 7,5 (traços vermelhos) e Tris-aminometano pH 8,0 (traços verdes). As setas indicam a fração central de cada um dos picos. A absorbância a 280 nm, a % de NaCl e o pH de cada chromatograma estão representados.

Quando as frações das cromatografias foram analisadas, observou-se que houve perdas de PdT no *flowthrough* de todas elas, com adsorção de PdT apenas em pH $\geq 7,5$ e eluição dela majoritariamente no primeiro pico (Figura 9). Além disso, os picos eluídos quando a amostra foi aplicada tanto em pH 7,5 como pH 8,0 não apresentaram aumento da pureza de PdT em relação à entrada (dados não mostrados).

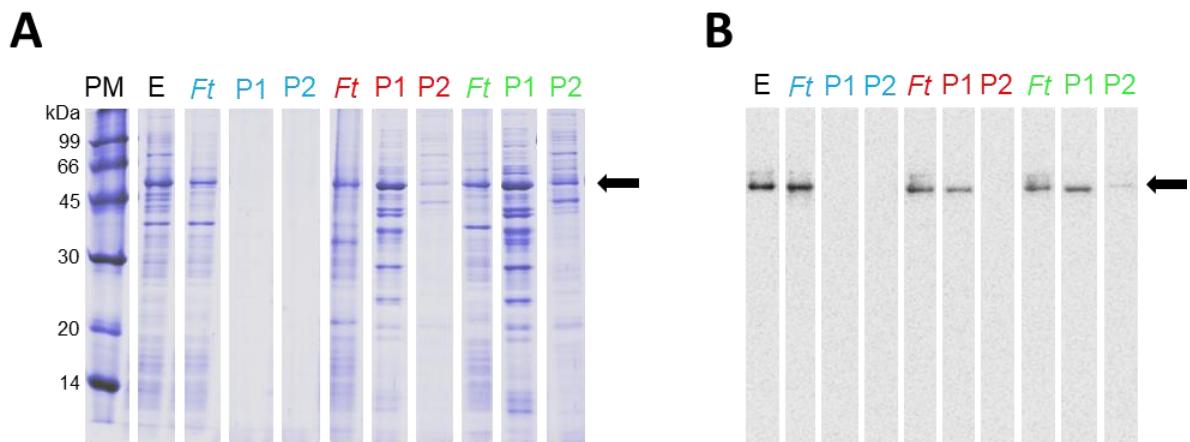


Figura 9. (A) SDS-PAGE e (B) western blot das frações das cromatografias de troca aniônica em Q-Sepharose FF, avaliando os tampões bis-tris propano pH 7,0 (indicado em azul), trietanolamina pH 7,5 (indicado em vermelho) e Tris-aminometano pH 8,0 (indicado em verde). Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 μ g de proteína total e ao western blot a quantidade de 4 μ g de proteína total. PM: Padrão Molecular; E: Entrada; *Ft*: flowthrough; P1/2: fração central de cada um dos picos dos chromatogramas; a seta preta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa.

Assim, um dos aspectos a ser otimizado durante a cromatografia é a adsorção de PdT, evitando perdas no *flowthrough*. Considerando não apenas o pI teórico da PdT, que é 5,18, mas também a curva de titulação (Figura 2), pode-se observar que a carga da proteína varia muito pouco entre os pHs 5,5-8,5, então o equilíbrio da cromatografia foi feito a pH 7,0, mas a amostra foi aplicada a pH 9,5, resultando em drástica diminuição da perda de PdT no *flowthrough*, que caiu de em média 60% para 25%, como apresentado na Figura 10.

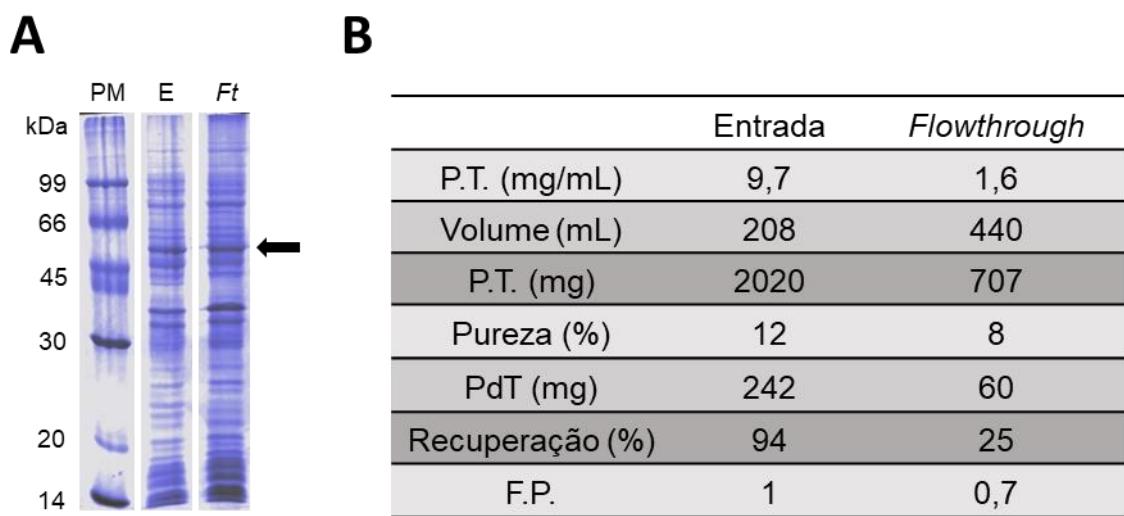


Figura 10. Análise dos resultados da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose FF equilibrada com tampão bis-tris 10 mM pH 7,0 e amostra aplicada a pH 9,5, sendo (A) o SDS-PAGE e (B) a tabela de purificação. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. PM: padrão molecular; E: entrada; Ft: flowthrough; a seta preta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa. P.T.: proteína total; F.P.: fator de purificação.

Em relação à purificação proteica, uma possibilidade explorada para melhor separar a PdT dos contaminantes na eluição foi a diminuição da molaridade final do gradiente linear crescente de 1 M para 0,5 M de NaCl, de forma que os picos no chromatograma ficassem mais bem separados, aumentando a seletividade (Figura 11). Nessas condições, foi possível observar que mesmo com perda de PdT, o primeiro pico (P1), de 3300 mAU, obtido com concentração de NaCl entre 100-300 mM, continha predominantemente os contaminantes, e o segundo pico (P2), de 440 mAU e obtido com concentração 500 mM de NaCl, apresentou a PdT mais pura, conforme apresentado na eletroforese e tabela de purificação da cromatografia (Figura 12).

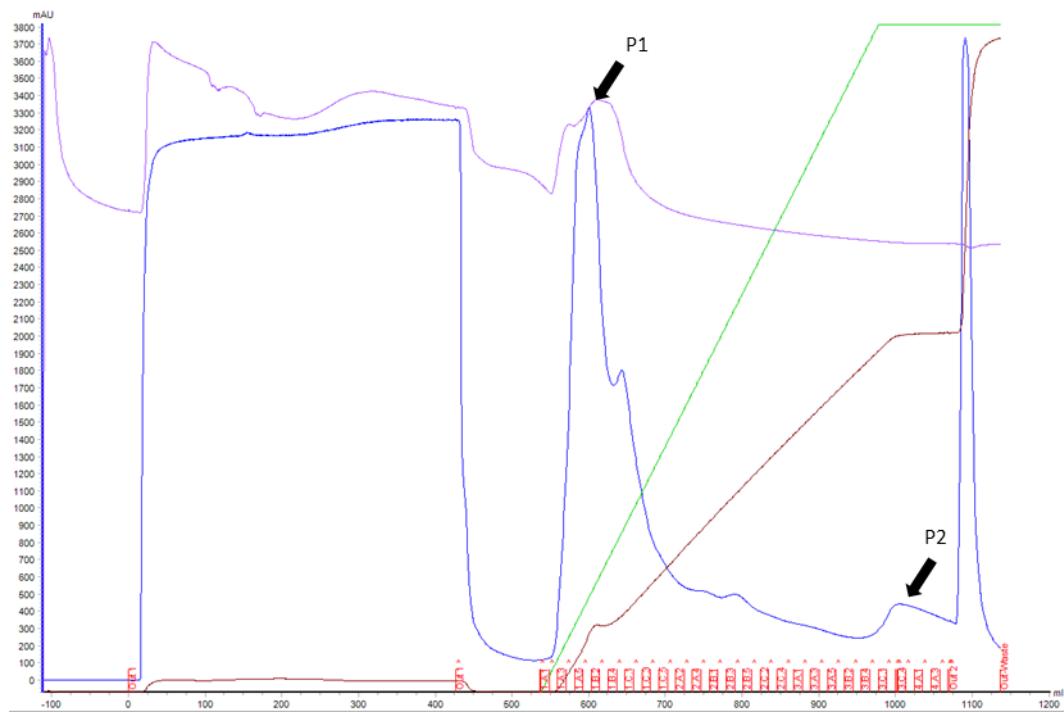
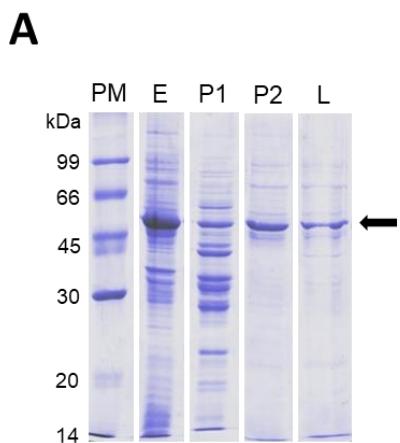


Figura 11. Cromatograma da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose FF equilibrada com tampão bis-tris 10 mM pH 7,0 e eluição com gradiente linear de 0 a 0,5 M de NaCl. Leitura de absorbância a 280 nm – linha azul, pH – linha roxa, porcentagem do tampão de eluição com 0,5 M de NaCl – linha verde, condutividade – linha marrom. A seta indica a fração central dos picos aplicada à eletroforese.



B

	Entrada	Pico 1	Pico 2
P.T. (mg/mL)	6,5	2,3	0,3
Volume (mL)	420	11	11
P.T. (mg)	2745	25	3,5
Pureza (%)	46	16	72
PdT (mg)	1253	4	2,5
Recuperação (%)	100	0,33	0,2
F.P.	1	0,4	1,6

Figura 12. Análise dos resultados da cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose FF equilibrada com tampão bis-tris 10 mM pH 7,0 e eluição com gradiente linear de 0 a 0,5 M de NaCl, sendo (A) o SDS-PAGE e (B) a tabela de purificação. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. PM: padrão molecular; E: entrada; P1/2: picos 1 e 2 presentes na eluição; L: limpeza com ácido acético; a seta preta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa. P.T.: proteína total; F.P.: fator de purificação.

Avaliação de estabilidade de PdT em diferentes pH

Para utilizar técnicas cromatográficas de troca catiônica foi necessário estabelecer quais condições garantiriam a estabilidade da proteína, de forma que esta não degradasse ou precipitasse, e portanto, não interferisse nas análises dos resultados e na recuperação proteica final de forma estável e solúvel. Para isso um dos parâmetros avaliados foi o pH. Assim, a fração contendo PdT eluída da Q-Sepharose em tampão bis-tris foi ajustada a diferentes pH.

Como é possível analisar na Tabela 3, em todas as amostras a quantidade de proteína total variou de 2,41 a 4,28 mg, sendo 0,55 a 0,9 mg de PdT, de pureza média 21,3%. Porém é possível observar que especificamente no pH 5,5 a perda de proteína foi considerável em relação aos outros pH, e no pH 4,0 houve um aumento de pureza de PdT considerável também em relação aos outros pH. A perda de proteína total no pH 5,5 poderia ser resultado da presença de várias proteínas que teriam pI próximo a esse pH, inclusive a PdT (pI 5,18), levando a sua precipitação no *pellet* e remoção na centrifugação. O aumento de pureza relativa de PdT no pH 4,0 poderia ser resultado da presença de proteínas com cargas eletrostáticas provavelmente inversas à carga de PdT, que foram precipitadas e removidas no *pellet* durante a centrifugação, preservando PdT no sobrenadante. Esses resultados apontam que PdT é estável uma grande faixa de pH, como apresentado na Figura 13, portanto a perda de PdT no precipitado após abaixar o pH na etapa de clarificação logo após a lise celular muito provavelmente ocorreu devido ao arraste da proteína juntamente com os *debris* celulares e/ou à interação de PdT com outros compostos do lisado celular que precipitaram em pH abaixo de 5,5.

Amostra	P.T. (mg/mL)	Volume (mL)	P.T. (mg)	Pureza %	PdT (mg)	F.P.
pH 8,0	0,70	6	4,2	19	0,8	1,0
pH 7,5	0,68	6	4,1	19	0,8	1,0
pH 7,0	0,70	6	4,2	21	0,9	1,1
pH 6,5	0,71	6	4,3	20	0,85	1,0
pH 6,0	0,68	6	4,1	18	0,7	0,9
pH 5,5	0,40	6	2,4	23	0,55	1,2
pH 5,0	0,64	6	3,9	22	0,9	1,2
pH 4,5	0,67	6	4,0	19	0,8	1,0
pH 4,0	0,47	6	2,8	30	0,8	1,5

Tabela 3. Avaliação da solubilidade de PdT em diferentes pHs a partir do pool de AEC. P.T.: proteína total; F.P.: fator de purificação calculado de acordo com a Equação 4.

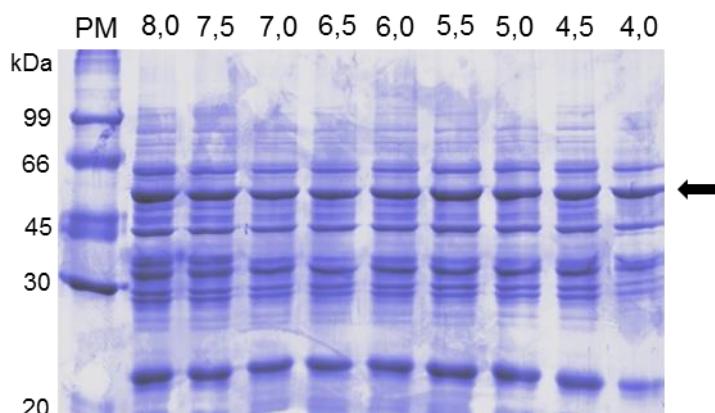


Figura 13. SDS-PAGE para avaliação da solubilidade de PdT em diferentes pHs. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. PM: padrão molecular; a seta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa.

Avaliação da troca catiônica como primeira etapa cromatográfica de purificação de PdT

A segunda abordagem feita para purificação de PdT, tendo como panorama as análises das cromatografias de troca aniônica mostradas acima, foi testar a cromatografia de troca catiônica em modo negativo, ou seja, objetivando que a proteína de interesse fosse recuperada diretamente no *flowthrough*, enquanto os contaminantes ficassem adsorvidos na coluna. Este modo de operação foi escolhido porque o pI teórico da PdT é 5,18 e pH ≤ 4,18 seria

necessário para adsorção da PdT, porém não é possível abaixar o pH do clarificado para valores iguais ou inferiores a 5,0, pois a PdT precipita (Tabela 2 e Figura 7). Três colunas foram testadas nesse experimento: (i) SP-Sepharose Fast Flow; (ii) SP-Sepharose XL e a (iii) CM-Sepharose Fast Flow.

Todas as colunas foram equilibradas com tampão acetato 20 mM em pH 5,5 e eluídas no mesmo tampão em gradiente linear crescente de 0 a 1 M de NaCl. Todos os resultados cromatográficos obtidos apresentaram um padrão semelhante ao do cromatograma obtido na coluna HiTrap SP-Sepharose XL (Figura 14). O volume recolhido do *flowthrough* foi em média 2,5 vezes maior que o da Entrada, portanto a proteína de interesse foi diluída após a aplicação à resina. Além disso, não houve aumento de pureza da PdT (dados não mostrados) e é possível observar também que não houve formação de picos durante a eluição, podendo indicar (i) que as proteínas eventualmente adsorvidas não foram eluídas com 1 M de NaCl ou (ii) que não havia proteínas carregadas positivamente para interagirem com a resina em pH 5,5. Portanto, nessas condições a chromatografia de troca catiônica não foi eficiente.

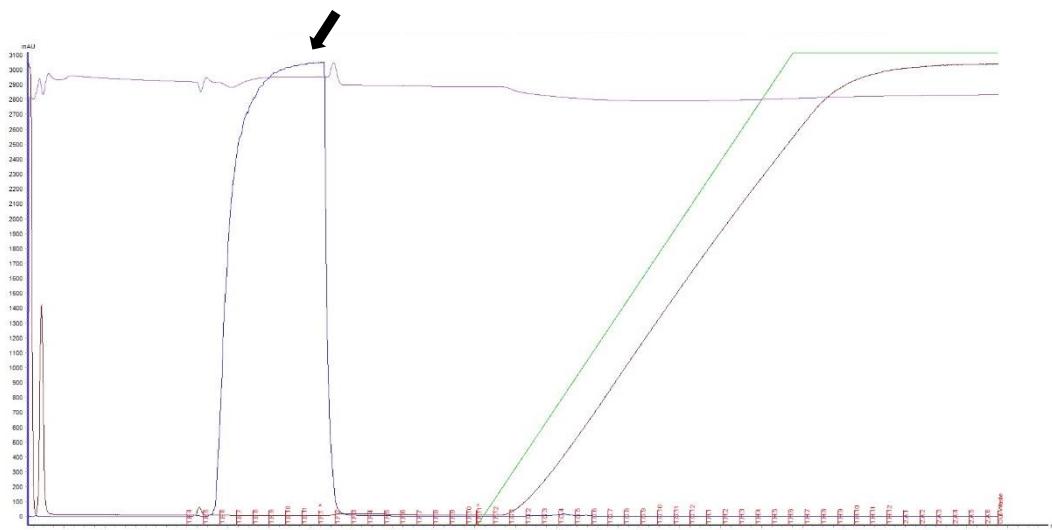


Figura 14. Cromatograma da chromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose XL com eluição em gradiente linear crescente salino. Leitura de absorbância a 280 nm – linha azul, pH – linha roxa, porcentagem do tampão de eluição com 1 M de NaCl – linha verde, condutividade – linha marrom. A seta indica o pico onde esperava-se obter PdT.

Avaliação da interação mista como primeira etapa cromatográfica de purificação de PdT

A cromatografia de modo misto, também conhecida como multi-modal ou de interação mista, explora mais de uma característica da proteína para adsorção. Nesse trabalho, a Capto-MMC foi avaliada como cromatografia negativa para realização da primeira etapa cromatográfica. A resina foi equilibrada com tampão acetato 20 mM pH 5,5 e a amostra de entrada foi ajustada para o mesmo pH com ácido acético, deste modo a PdT fica com carga negativa, o que promoveria sua recuperação no *flowthrough*. A eluição foi feita em gradiente linear crescente de 0 a 1 M de NaCl. A análise dos resultados cromatográficos dessa primeira abordagem experimental é apresentada na Figura 15, onde a eletroforese (A) e a tabela de purificação (B) mostram que houve aumento da pureza de PdT de 7,5% da entrada para 16,7% no *flowthrough* (fator de purificação 2,2), porém a PdT foi recuperada de forma diluída, com aumento de 7% do volume final em relação ao inicial. O cromatograma deste experimento apresentou um pico de absorbância no *flowthrough* de 3000 mAU, porém nenhum pico de eluição (dados não mostrados).

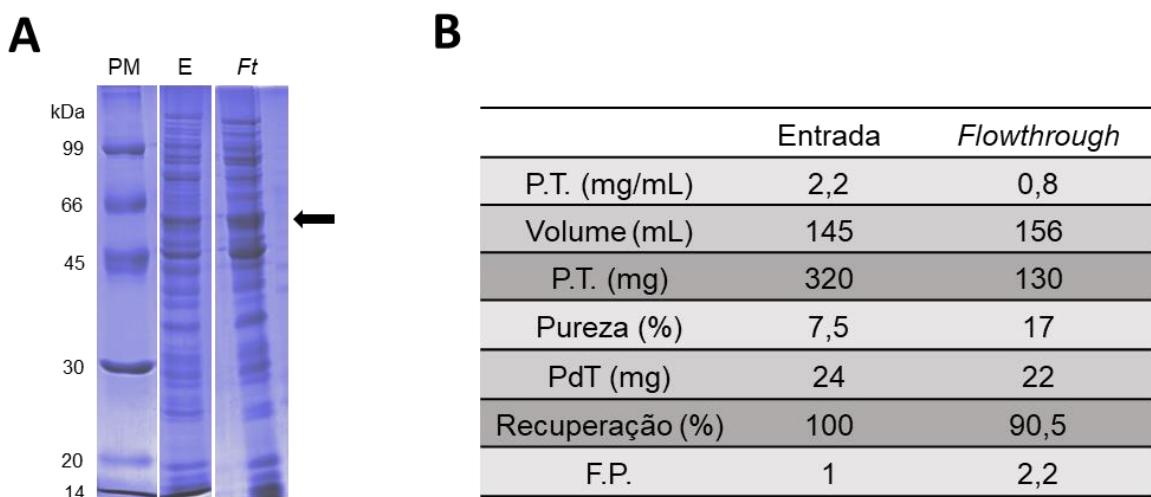


Figura 15. Análise dos resultados da cromatografia multi-modal em Capto-MMC, de modo negativo, sendo (A) o SDS-PAGE e (B) a tabela de purificação. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. PM: padrão molecular; E: entrada; Ft: flowthrough; a seta preta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa. P.T.: proteína total; F.P.: fator de purificação.

Avaliação da interação mista como segunda etapa cromatográfica de purificação de PdT

Em seguida a Capto-MMC foi avaliada para adsorção da proteína de interesse por interação hidrofóbica e troca catiônica. Neste caso, a resina foi equilibrada com tampão acetato 20 mM pH 4,2, a amostra de entrada ajustada para o mesmo pH (atribuindo carga positiva à PdT) e a eluição foi feita em gradiente descontínuo com 250 mM, 500 mM, 750 mM e 1 M de NaCl. Os resultados obtidos mostraram absorbância a 280 nm de 1100 mAU no *flowthrough*, porém não foram observados picos durante a eluição em gradiente descontínuo crescente de NaCl. Após o gradiente, dois picos de eluição foram obtidos: um na fração 3A1 obtida com tampão fosfato de sódio 10 mM em pH 7,5 e o outro na fração Out 3 obtida na limpeza da coluna com hidróxido de sódio 0,1 M (Figura 16). Nesses dois picos foi observada a presença de PdT (Figura 17).

A eluição de PdT, ou contaminantes, com elevadas concentrações de NaCl não aconteceu provavelmente porque as interações hidrofóbicas com a resina prevaleceram. Por outro lado, a PdT foi eluída com a mudança do pH de ácido para básico, alterando a carga da proteína, porém PdT ainda foi obtida na limpeza da coluna com NaOH, indicando a necessidade de otimizar a etapa de eluição por pH. Portanto, a resina Capto-MMC mostrou-se um método eficiente tanto como cromatografia negativa como para adsorção da PdT.

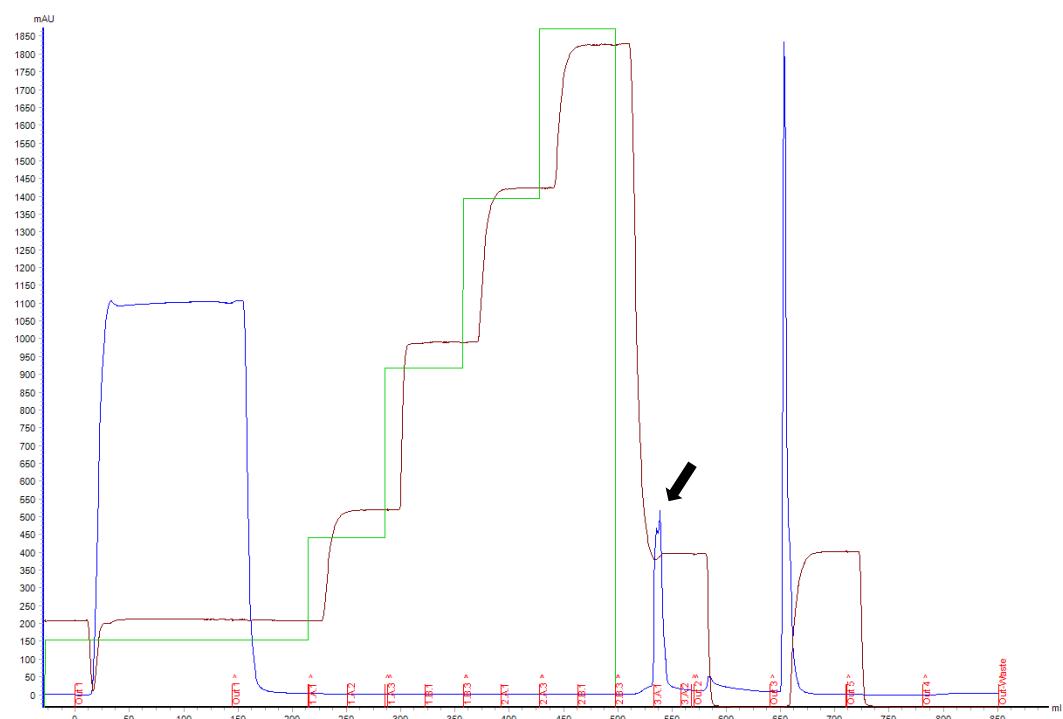


Figura 16. Cromatograma da cromatografia multi-modal em Capto-MMC, de modo adsortivo, equilibrada com tampão acetato 20 mM pH 4,2 e eluição descontínua em degraus de 250 mM, 500 mM, 750 mM e 1 M de NaCl, seguida de eluição com tampão fosfato 10mM pH 7,5 e limpeza com NaOH 0,1 M. Leitura de absorbância a 280 nm – linha azul, porcentagem do tampão de eluição com 1 M de NaCl – linha verde, condutividade – linha marrom. A seta indica o pico onde PdT foi eluída.

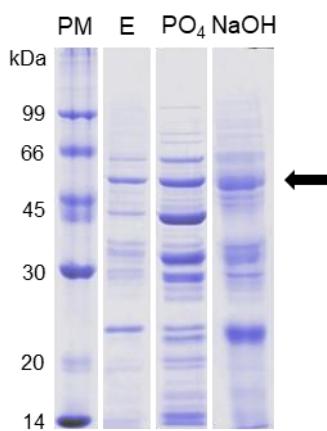


Figura 17. SDS-PAGE das frações da cromatografia multi-modal em Capto-MMC, de modo adsortivo, equilibrada com tampão acetato 20 mM pH 4,2 e eluição descontínua crescente em degraus de NaCl, seguida de eluição com tampão fosfato 10mM pH 7,5 e limpeza com NaOH 0,1M. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. PM: Padrão Molecular; E: Entrada; PO₄: eluição com fosfato de sódio 10 mM pH 7,5; NaOH: limpeza da coluna com hidróxido de sódio 0,1 M; a seta preta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa.

Avaliação da interação hidrofóbica como segunda etapa cromatográfica de purificação de PdT

A cromatografia de interação hidrofóbica foi primeiramente avaliada como etapa seguinte à cromatografia de troca aniônica. Essa cromatografia explora características da proteína diferentes das exploradas pelas cromatografias de troca iônica, trata-se da hidrofobicidade ou hidrofilicidade superficial. Para isso, a resina cromatográfica deve ser equilibrada com um tampão com elevada concentração de sal capaz de gerar um efeito *salting out* para expor os resíduos hidrofóbicos das proteínas e, consequentemente, levar à sua interação com ligante da resina. Durante a cromatografia, a aproximação da proteína ao ligante promoverá uma tensão que para se manter estável depende da reorganização das moléculas de água entre proteína e ligante, mantendo-os unidos. A eluição portanto é realizada em tampão sem sal, que diminuirá a força estrutural criada pela organização das moléculas de água e também influenciará na exposição superficial de aminoácidos hidrofóbicos da proteína. Assim, as proteínas mais hidrofílicas são eluídas primeiro, enquanto as mais hidrofóbicas são eluídas por último ou até mesmo com solventes orgânicos.

Diferentes resinas cromatográficas foram empregadas para avaliação da HIC. Todas elas foram equilibradas e eluídas da mesma forma. As resinas testadas foram (i) Phenyl Sepharose Fast Flow; (2) Phenyl Sepharose High Performance; (3) Py-ISO; (4) Py-C1; e (5) Py-PHE. A composição do *pool* de entrada derivou diretamente da eluição recolhida da cromatografia de troca aniônica. Foram empregados *pools* de eluição das cromatografias executadas em Q-Sepharose com os seguintes tampões: (i) tris 30 mM pH 7,4, (ii) fosfato de sódio 10 mM pH 6,8, (iii) bis-tris 10 mM pH 7,0, (iv) fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 e (v) tris 20 mM pH 8,0. A concentração de sal no tampão de equilíbrio da HIC variou entre 0,5 M de NaCl para PY-C1 e PY-ISO, que são mais hidrofóbicas, e 2 M de NaCl para as 3 resinas Phenyl, para todas as cinco colunas foi empregado tampão fosfato 20 mM em pH 7,0.

Utilizando a resina Phenyl-Sepharose Fast Flow, foi aplicado 186 mg de proteína total e a PdT foi eluída em um pico largo entre as frações 3A1 e 4B1 (Figura 18). A eletroforese (Figura 19, A) e a tabela de purificação (Figura 19, B) mostram que dos 54,3 mg de PdT aplicados na coluna, 32 mg (59%) foram recuperados no pico eluído a partir de 400 mM de NaCl, com aumento da pureza de 29% (da entrada) para 67% (fator de pureza 2,3), porém a capacidade de concentração foi baixa, pois o volume recolhido (188 mL) diminuiu somente 24% em relação ao volume inicial (248 mL).

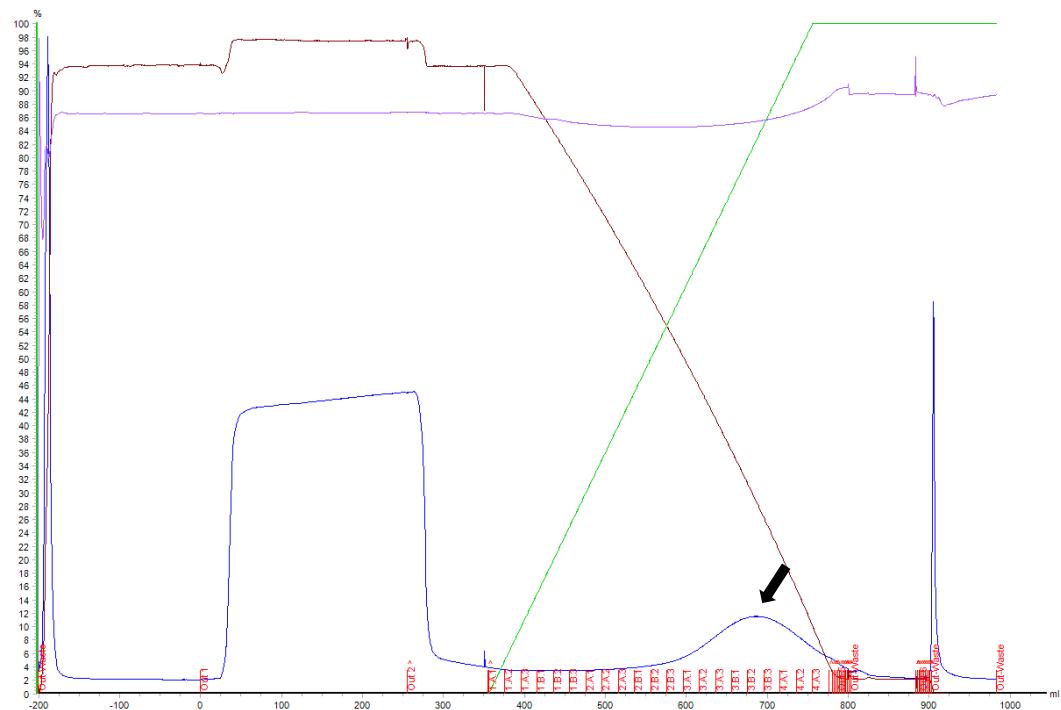


Figura 18. Cromatograma da cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose Fast Flow com eluição em gradiente linear decrescente salino. Leitura de absorbância a 280 nm – linha azul, pH – linha roxa, porcentagem do tampão de eluição sem sal – linha verde, condutividade – linha marrom. A seta indica o pico de eluição de PdT.

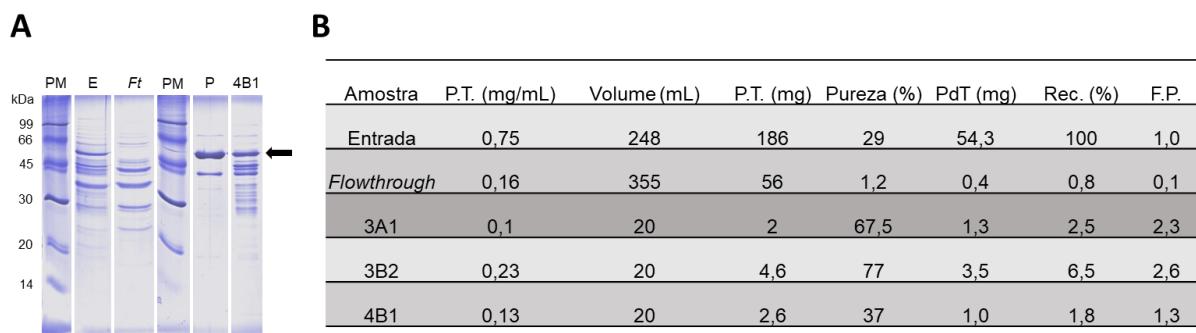


Figura 19. Análise da cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose Fast Flow, sendo (A) SDS-PAGE e (B) a tabela de purificação. PM: padrão molecular; E: entrada; Ft: flowthrough; P: fração central do pico; 4B1: fração final do pico; a seta preta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa. P.T.: proteína total; Rec.: recuperamento de PdT; F.P.: fator de purificação.

A cromatografia em Phenyl-Sepharose High Performance, realizada de maneira semelhante à feita em Phenyl-Sepharose Fast Flow (Figura 20), eliminou um contaminante predominante, de ≈ 44 kDa (seta vermelha), e assim houve aumento de pureza para 74% de PdT na fração de eluição (Figura 21).

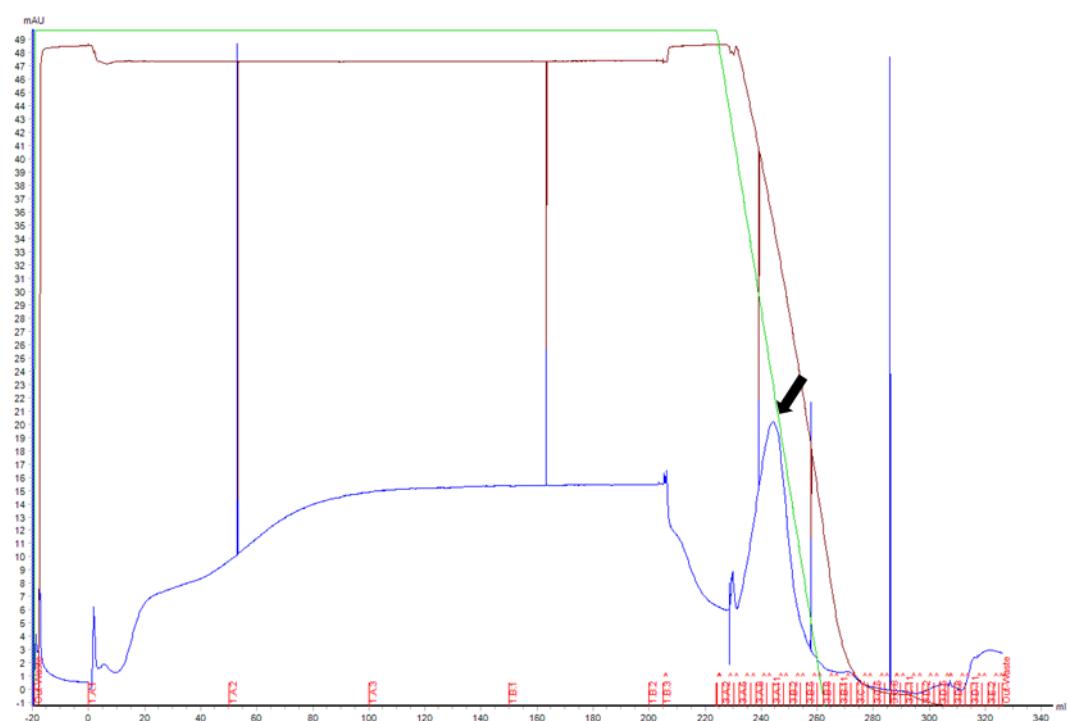


Figura 20. Cromatograma da cromatografia de interação hidrofóbica utilizando a resina Phenyl Sepharose High Performance. Leitura de absorbância a 280 nm – linha azul, pH – linha roxa, porcentagem do tampão de eluição – linha verde, condutividade – linha marrom. A seta indica a fração central do pico.

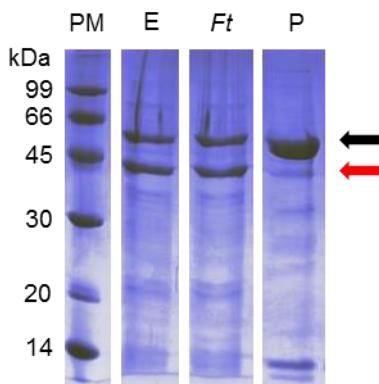


Figura 21. SDS-PAGE das frações da cromatografia de interação hidrofóbica utilizando a resina Phenyl-Sepharose High Performance. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 μg de proteína total. PM: Padrão Molecular; E: Entrada; Ft: flowthrough; P: fração central do pico no cromatograma; a seta preta à direita indica a banda de PdT de 53 kDa; a seta vermelha à direita indica a banda de um contaminante de ≈ 44 kDa.

As resinas cromatográficas Py-ISO, Py-C1 e Py-PHE, conforme Figura 22, mostraram-se ineficientes como etapa de purificação para PdT, pois não apresentaram picos de eluição por gradiente linear decrescente de NaCl. Talvez para essas resinas maior concentração de NaCl no tampão de equilíbrio fosse necessária para permitir a adsorção da PdT ou a matriz em sílica tenha poros demasiadamente pequenos impedindo a interação com a resina. Desse modo, é possível concluir que a Phenyl-Sepharose FF ou HP foram as resinas que apresentaram maior capacidade dinâmica de interação com PdT, enquanto a PY-Phe, PY-ISO e PY-C1 não ligaram PdT nas condições empregadas. Como Phenyl-Sepharose HP foi a única que eliminou a banda de ≈ 44 kDa, é possível concluir que ela foi a melhor opção para a cromatografia de interação hidrofóbica.

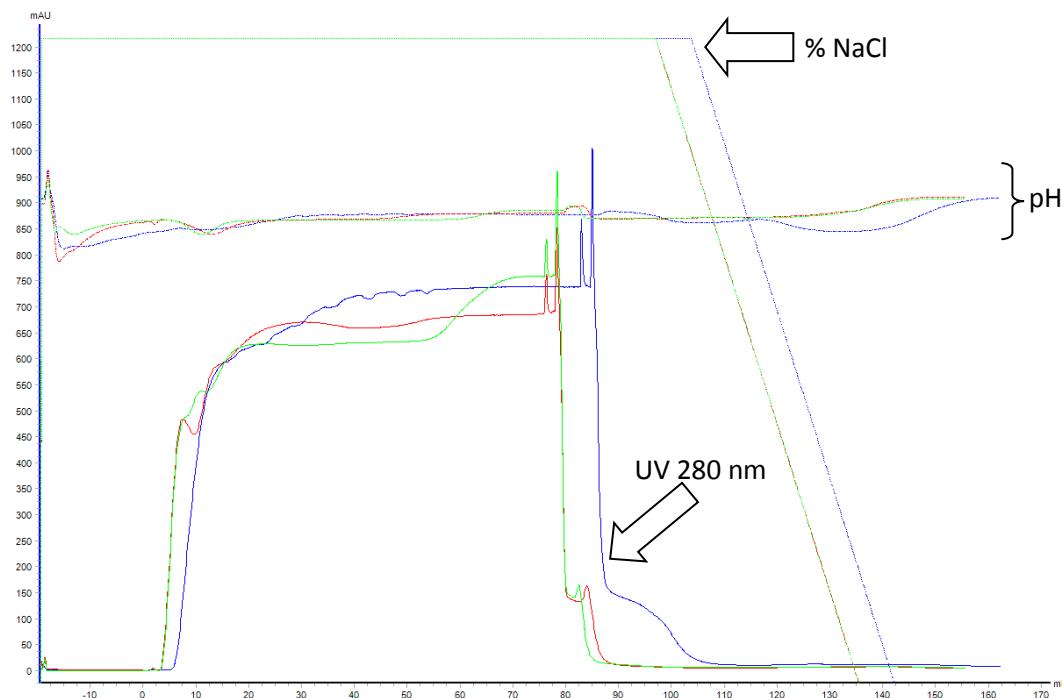


Figura 22. Cromatogramas das cromatografias de interação hidrofóbica utilizando as resinas PY-Phe, PY-ISO e PY-Cl, representadas nas cores azul, vermelho e verde, respectivamente. A absorbância a 280 nm, a % de NaCl e o pH de cada chromatograma estão representados.

Avaliação da interação hidrofóbica como primeira etapa cromatográfica

Como alternativa à troca aniónica, avaliamos a possibilidade de empregar a cromatografia de interação hidrofóbica como primeira etapa cromatográfica, uma vez que as perdas de PdT no *flowthrough* da Q-Sepharose FF foram relativamente elevadas. Para essa avaliação aproveitamos uma das fração *flowthrough* da Q-Sepharose que ainda continha grande quantidade de PdT, devido a sua alta similaridade com o Clarificado. Esta fração foi separada em duas amostras de 75 mL cada para ajustar a concentração salina em 0,5 M e 2 M de NaCl. Após a adição de NaCl sob agitação, observou-se a formação de precipitado em ambas amostras. Com o objetivo de avaliar se havia PdT no precipitado formado, alíquotas de ambas amostras foram recolhidas, centrifugadas por 1 h a 16.100 g, o *pellet* formado foi ressuspensido em água destilada e tanto o sobrenadante quanto o *pellet* foram submetidos a eletroforese. A Figura 23 mostra que o precipitado formado tanto com 0,5 M quanto 2,0 M de NaCl contém predominantemente de PdT. Portanto, devido a precipitação de PdT em altas concentrações salinas, não é possível realizar a cromatografia de interação hidrofóbica como primeira etapa cromatográfica.

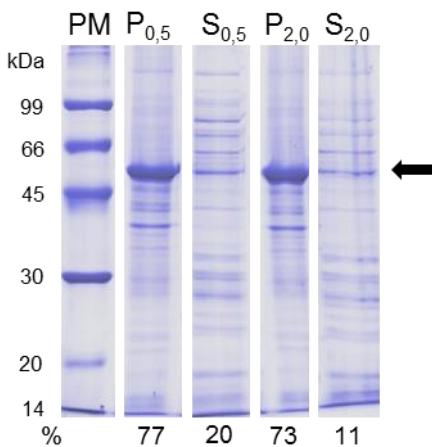


Figura 23. SDS-PAGE das amostras ajustadas com 0,5 M ou 2,0 M de NaCl para entrada como primeira etapa cromatográfica na HIC. Aplicou-se ao gel de poliacrilamida 12% a quantidade de 10 µg de proteína total. Os valores inferiores no gel referem-se à pureza relativa (%) de PdT medida por densitometria. PM: Padrão Molecular; $P_{0,5/2,0}$: pellet das amostras ajustadas para 0,5 M e 2,0 M de NaCl, respectivamente; $S_{0,5/2,0}$: sobrenadante das amostras ajustadas para 0,5 M e 2,0 M de NaCl, respectivamente; a seta preta a direita indica a banda de PdT de 53 kDa.

Discussão

O processo de produção se baseou inicialmente no cultivo da bactéria *E. coli* BL21(DE3), portando o plasmídeo pET28a com o gene para síntese da proteína PdT sem qualquer tag de afinidade, em biorreator utilizando 6 L de meio de autoindução, no qual houve uma produção de biomassa úmida de 554 g, com PdT representando cerca de 50% do total de proteínas solúveis. Entretanto, PdT também formou corpos de inclusão, cujo conteúdo proteico tinha cerca de 80% de PdT. Para diminuir a formação de corpos de inclusão, o cultivo em biorreator foi feito a 25 °C, porém essa temperatura ainda não foi o suficiente, portanto temperaturas mais baixas poderiam ser avaliadas. Essa possibilidade é sustentada na literatura como demonstram Overton et al., em sua publicação de 2014, em que a variação para 20 °C do cultivo de *E. coli* em biorreator aumentou significativamente a solubilidade de proteínas recombinantes.

A composição do tampão de lise empregado para ressuspender a biomassa antes do rompimento celular interferiu na recuperação de PdT de forma solúvel, dentre as composições dos tampões testados o bis-tris pH 7,0, na concentração 10 mM, mostrou-se o mais eficiente, com 94% de PdT recuperada na forma solúvel e somente 6% na forma insolúvel. Neste trabalho fizemos o rompimento celular combinando técnicas mecânicas e químicas, aumentando assim a eficiência de lise, como sugerido por Islam et al. em sua revisão

publicada em 2017, apresentando técnicas de rompimento celular de macro e micro escala. A leitura da DO 600nm do homogeneizado pré e pós lise foi de 69,2 e 5,6, respectivamente.

A clarificação, processo de separação dos *debris* celulares através da centrifugação, trata-se de um método eficiente desde que o *pellet* formado após a centrifugação caracterize-se como firme, rígido, pois na separação deste do sobrenadante (vertendo o frasco) pode ocorrer a mistura entre eles, sendo necessária uma segunda centrifugação para certificação de separação do clarificado corretamente, ou aumento da rotação para melhor compactação do *pellet*, o que em escala industrial representaria aumento considerável do custo da centrífuga. Como este projeto pretende desenvolver um processo de produção e purificação escalonável, um método alternativo para a clarificação foi avaliado: filtração com SartoClear Dynamics, sistema originalmente desenvolvido para produtos obtidos em células de mamíferos que é composto por uma membrana filtrante e terra diatomácea, um auxiliar de filtração que confere maior rigidez à torta de filtração. A eficiência da separação por SartoClear depende do pH, sendo que $\text{pH} \leq 5,0$ é recomendado, e da concentração de terra diatomácea. Os nossos resultados mostraram que a diminuição de pH do homogeneizado para 5,0 promoveu a agregação e consequente precipitação de PdT, enquanto a pH 7,0 a terra diatomácea não melhorou a filtração, tornando o processo inviável. Portanto, dentre os métodos de clarificação avaliados, a centrifugação foi o mais eficiente.

Como a análise de cada uma das etapas do processo, tanto *upstream* quanto *downstream*, requerem cada um deles uma média de 2 a 3 dias, a preservação da estabilidade da proteína nesses intervalos precisa ser garantida, e para isso foram avaliados parâmetros como o pH no qual as amostras contendo PdT seriam armazenadas. Os resultados mostraram que PdT permaneceu solúvel na faixa de pH 4,0 a 8,0 após a eluição da primeira cromatografia, porém precipitou juntamente com outras proteínas quando o clarificado foi ajustado para $\text{pH} \leq 5,5$. Além disso, amostras contendo PdT foram ajustadas para pH 9,5 para aplicação à cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose FF e não foi observada a formação de precipitados de PdT nesse pH. Assim, é possível concluir que cromatografias de troca catiônica só podem ser empregadas no processo após uma etapa prévia de purificação que remova os compostos do homogeneizado responsáveis pela precipitação de PdT em pH ácidos.

O primeiro método cromatográfico de purificação de PdT avaliado foi a cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose FF. Inicialmente, as cromatografias realizadas em pH 7,0 a

8,0 foram caracterizadas pela presença de dois picos predominantes, grande quantidade de PdT perdida no *flowthrough* e a PdT eluída não se apresentava mais pura do que quando comparada com a pureza da Entrada. Os parâmetros ajustados do processo cromatográfico que corrigiram de forma substancial os problemas apresentados foram (i) o ajuste da amostra de entrada para pH 9,5, o que aumentou a quantidade de aminoácidos carregados negativamente, a interação de PdT com os grupos funcionais e a eficiência de adsorção de PdT na resina; (ii) a diminuição da molaridade do gradiente de eluição de 1 M para 0,5 M, que tornou mais seletiva a separação entre os contaminantes e PdT, que foi eluída com 0,5 M de NaCl e pureza de 72%, quando comparada com a pureza de 45% da entrada. Uma abordagem ainda a ser testada seria a eluição em gradiente descontínuo, que promoveria a recuperação da fração mais pura de PdT de forma mais concentrada, já que o volume de tampão com a concentração de NaCl desejada seria pré-determinado. Portanto, como etapa cromatográfica inicial, a cromatografia de troca aniónica mostrou-se uma técnica eficiente, sendo necessário investir em sua otimização.

A cromatografia de troca catiônica, que permite a separação de moléculas carregadas positivamente, mostrou-se ineficiente para purificação de PdT quando executada como cromatografia negativa, onde a proteína de interesse seria recolhida diretamente no *flowthrough*, e os contaminantes deveriam ser adsorvidos à resina. Não somente PdT não foi recuperada com pureza superior à entrada, assim como não houve adsorção de contaminantes na resina, analisados pela ausência de picos na eluição e ausência de bandas na eletroforese. Essa cromatografia poderia ser realizada com a diminuição do pH da amostra de entrada para um pH ácido a fim de carregar PdT positivamente e promover sua adsorção à resina, porém a diminuição do pH do Clarificado levou à precipitação da molécula de interesse, tal como explicado acima.

A interação mista para realização da primeira etapa cromatográfica com a resina CAPTO-MMC foi empregada como cromatografia negativa e mostrou-se eficiente para purificação de PdT, com fator de purificação de 2,2 da PdT recolhida no *flowthrough*, muito embora tenha havido diminuição da concentração proteica e os contaminantes eventualmente adsorvidos não foram identificados, pois não foram observados picos na eluição.

Quando a Captō-MMC foi utilizada como segunda etapa cromatográfica para adsorção da PdT por interação mista hidrofóbica e troca catiônica, não foi possível eluir PdT em gradiente de sal, porém a PdT foi eluída quando o pH aumentou de 4,2 para 7,0, apresentando-se

portanto como uma metodologia eficiente. Acredita-se que a PdT tenha sido adsorvida na resina sobretudo devido a interação hidrofóbica, característica ausente nas resinas que são somente de troca catiônica, e que a eluição tenha ocorrido devido à troca catiônica, pois a pH 7,0 a PdT passa a ter a mesma carga da resina. Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Holstein et al. em 2012, utilizando de ambas eluições (salina e pH), para purificação de uma mistura de proteínas. Esses autores sugeriram que uma maneira para melhorar a separação empregando essa resina seria realizar a eluição por pH e eliminar a etapa de eluição por NaCl.

Também como segunda etapa cromatográfica, cinco diferentes resinas de interação hidrofóbica foram avaliadas, porém apenas Phenyl-Sepharose Fast Flow (FF) e High Performance (HP) adsorveram PdT nas condições empregadas. Essas resinas têm o mesmo grupo funcional e diferem somente no diâmetro médio das partículas: 90 µm da FF e 34 µm da HP. O tamanho da partícula influencia no número de pratos teóricos da coluna, quanto menor a partícula maior o número de pratos e melhor a resolução. Assim, a pureza obtida com a utilização da Phenyl-Sepharose HP foi maior devido à remoção de um contaminante de cerca de 44 kDa.

A preparação das amostras para avaliação da cromatografia de interação hidrofóbica como primeira etapa cromatográfica resultou em formação de um precipitado que, quando avaliado, mostrou ser composto majoritariamente por PdT com pureza relativamente alta (\approx 73-77%), portanto PdT precipitou em elevadas concentrações salinas apenas quando em presença de grande quantidade de proteínas do hospedeiro, pois nenhuma precipitação foi observada nas frações de eluição da cromatografia de troca aniônica empregadas para realização da interação hidrofóbica como segunda etapa cromatográfica. Apesar de não estar claro porque isso aconteceu, essa precipitação poderia tanto dificultar como facilitar o uso da interação hidrofóbica como primeira etapa cromatográfica, uma vez que esta exige que seja adicionado sal à amostra. Portanto, iremos explorar a capacidade de precipitação de PdT em altas concentrações de NaCl e sulfato de amônio, processo *salting out*, para avaliar a purificação de PdT a partir do clarificado (Wingfield et al. 2001; Shumway et al. 1971), e caso seja possível solubilizar a PdT a partir desse precipitado, a amostra será aplicada na resina de interação hidrofóbica.

Conclusões

Este trabalho teve como objetivo desenvolver o processo de produção e purificação de uma proteína intracelular da *Streptococcus pneumoniae*, a toxina pneumolisina, que se trata de uma proteína cuja variação entre os sorotipos é de somente 3,3%, por isso foi gerada uma variante geneticamente destoxicificada, denominada PdT, para que pudesse ser futuramente empregada como antígeno em uma nova vacina, de administração pulmonar, que oferecesse proteção duradoura e independente de sorotipos.

Para atingir esse objetivo foi necessário primeiramente realizar o cultivo de *Escherichia coli* em biorreator para produção da PdT. Os resultados mostraram que é necessário realizar o cultivo em temperaturas mais baixas para aumentar a solubilidade de PdT. O processo de purificação que melhores resultados apresentou é composto das seguintes etapas: (i) rompimento celular em tampão bis-tris 10 mM pH 7,0; (ii) clarificação através de centrifugação a 17.000 g por 2 h; (iii) a cromatografia de troca aniónica em Q Sepharose Fast Flow com aplicação da amostra em pH 9,5 e eluição por gradiente crescente de NaCl e (iv) a cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose High Performance por gradiente decrescente de NaCl. Para alcançar pureza acima de 95% a fim de usar essa proteína na formulação de nanopartículas para administração pulmonar, cada uma das etapas cromatográficas ainda precisa ser otimizada.

Alternativamente, os resultados também indicam que um segundo processo de purificação seria viável: (i) rompimento celular e clarificação idênticos ao anterior; (ii) precipitação da PdT por *salting out*; (iii) solubilização da PdT e aplicação em Phenyl Sepharose High Performance e caso necessário (iv) uma cromatografia de troca iônica.

Esse trabalho reitera a importância do desenvolvimento de processos para produção de novas vacinas, pois inutiliza-se um antígeno potente caso não seja possível alcançar sua produção com a pureza adequada em um processo escalonável e economicamente viável, e retoma a necessidade de investimentos e inovações nessa área como formas de auxiliar no desenvolvimento de vacinas para prevenção de doenças e para a melhoria da saúde da população em geral.

Referências Bibliográficas

- ALEXANDER JE, et al. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 62:5683-8, 1994.
- ALONSO de VELASCO E, et al. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev*. 1995 Dec;59(4):591-603.
- AMARAL FE, et al. Rational manipulation of mRNA folding free energy allows rheostat control of pneumolysin production by *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0119823 March 23, 2015.
- ANDERSON R, et al. Multifaceted Role of Pneumolysin in the Pathogenesis of Myocardial Injury in Community-Acquired Pneumonia. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr; 19(4): 1147.
- ANDRÉ M, et al. Upper respiratory tract infections in general practice: diagnosis, antibiotic prescribing, duration of symptoms and use of diagnostic tests. *Scand J Infect Dis*. 2002;34(12):880-6.
- BERRY AM, et al. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57: 2037–2042, 1989.
- BERRY AM, et al. Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1995 May; 63(5): 1969–1974.
- BEVERLEY PC, et al. Harnessing local and systemic immunity for vaccines against tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2014.
- BRUGGER SD, et al. Polysaccharide Capsule Composition of Pneumococcal Serotype 19A Subtypes Is Unaltered among Subtypes and Independent of the Nutritional Environment. *Infect Immun*. 2016 Nov; 84(11): 3152–3160.
- CAMPANI G, et al. Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. *Chem. Eng. and Processing: Process Intensification*, v. 103, p. 63–69, 2016.
- CHIU FF, et al. Domain 4 of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* is a multifunctional domain contributing TLR4 activating and hemolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Oct 1;517(4):596-602. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.07.063. Epub 2019 Aug 5, 2019.
- COCKERAN R, et al. Characterization of the interactions of the pneumolysoid, Δ6 PLY, with human neutrophils in vitro. *Vaccine* 29:8780-2, 2011.
- CORLESS CE, et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. Apr;39(4):1553-8, 2001.
- DOUCE G, et al. Novel mucosal vaccines generated by genetic conjugation of heterologous proteins to pneumolysin (PLY) from *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 28:3231-7, 2010.

FENOLL A, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 36(12):3447-54, 1998.

GENO KA, et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev* 28(3):871-99, 2015.

GIL-SETAS A, et al. Antibiotic sensitivity and treatment recommendations for *Streptococcus pneumoniae*. *An Sist Sanit Navar*. 2004 Jan-Apr;27(1):37-43.

HENRICHSEN J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 33(10):2759-62, 1995.

HOLSTEIN MA, et al. Improving selectivity in multimodal chromatography using controlled pH gradient elution. *J Chromatogr A*. 2012 Apr 13;1233:152-5. doi: 10.1016/j.chroma.2012.01.074. Epub Feb 1 2012.

HOULSWORTH S, et al. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 62: 1501–1503, 1994.

HU X, et al. Type I IFN expression is stimulated by cytosolic MtDNA released from pneumolysin-damaged mitochondria via the STING signaling pathway in macrophages. *FEBS J*. 2019 Jul 17. doi: 10.1111/febs.15001, 2019.

IBGE, Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil 2009. Edição 25, 2009.

JEFFERIES JM, et al. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J Infect Dis* 196:936-44, 2007.

KADIOGLU A, et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Publishing Group, Nature Review, Microbiology, v6, pag.288-301 april 2008.

KADIOGLU A, et al. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun* 68: 492–501, 2000.

KIRKHAM LS, et al. Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express non-hemolytic pneumolysin. *J Clin Microbiol* 44(1):151–159, 2006.

KORZ DJ, et al. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 39, p. 59–65, 1995.

LAWRENCE SL et al. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation. *Sci Rep.*; 5: 14352, 2015.

LEE CJ, et al. Immunogenicity in mice of pneumococcal glycoconjugate vaccines using pneumococcal protein carriers. *Elsevier/Vaccine* 19:3216-3225, 2001.

LEE J, et al. Structural Characteristics of Pneumolysin and Its Domains in a Biomimetic Solution. <http://pubs.acs.org/journal/acsodf>. *ACS Omega*, 3, 9453–9461, 2018.

- LEROUX-ROELS G, et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a novel pneumococcal protein-based vaccine in adults: a phase I/II randomized clinical study. *Vaccine* 32:6838-46, 2014.
- LINÁRES J, et al. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 16(5):402-10, 2010.
- LITTMANN M, et al. *Streptococcus pneumoniae* evades human dendritic cell surveillance by pneumolysin expression. *EMBO Mol Med* (2009)1:211-222, 2009.
- LI Z, et al. Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, p. 1203–1213, 2011.
- LOSEN M, et al. Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnol Prog*. 2004 Jul-Aug;20(4):1062-8.
- MALLEY R, et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1966-71, 2003.
- MANTESE OC, et al. Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas do *Streptococcus pneumoniae*. *J Pediatria* 79: 537-42, 2003.
- MANN B, et al. Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein. *J Infect Dis* 209:1116-25, 2014.
- MARINI G, et al. Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process. *BMC Biotechnol*. 2014 Jan 9;14:1. doi: 10.1186/1472-6750-14-1.
- MARSHALL JE, et al. The Crystal Structure of Pneumolysin at 2.0 Å Resolution Reveals the Molecular Packing of the Pre-pore Complex. *Sci. Rep.* 5, 13293; doi: 10.1038/srep13293 (2015).
- MCNEELA EA, et al. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog* 6: e1001191, 2010.
- MICHON F, et al. Multivalent pneumococcal capsular polysaccharide conjugate vaccines employing genetically detoxified pneumolysin as a carrier protein. *Vaccine*. 16:1732-41, 1998.
- ISLAM MS, et al. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* (Basel); 8(3): 83; Mar 2017.
- MONGENSEN TH, et al. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *Send to J Leukoc Biol*. 2006 aug;80(2):267-77. Epub 2006 May 26.
- NEL JG, et al. Pneumolysin Mediates Platelet Activation In Vitro. *Send to Lung*. 2016 Aug;194(4):589-93. doi: 10.1007/s00408-016-9900-5. Epub 2016 May 18.

NERLICH A, et al. Pneumolysin induced mitochondrial dysfunction leads to release of mitochondrial DNA. *Sci Rep.* 2018; 8: 182.

NUMMINEN E, et al. Climate induces seasonality in pneumococcal transmission. *Scientific Reports* volume5, Article number: 11344 (2015).

OGUNNIYI AD, et al. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68:3028-33, 2000.

OGUNNIYI AD, et al. Protection against *Streptococcus pneumoniae* elicited by immunization with pneumolysin and CbpA. *Infect Immun* 69:5997-6003, 2001.

OGUNNIYI AD, et al. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 75:350-7, 2007.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. OPS; Washington, DC: 2013. Informe anual de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos [Annual report of the Latin American Network for Surveillance of Antibiotic Resistance].OPS/HSD/IR/AMR/003/12, 2010.

OVERTON TW, et al. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*_Volume 19, Number 5_ May 2014.

PATON JC, et al. Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* 43: 1085-7, 1984.

PATON JC, et al. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect Immun* 59:2297-304, 1991.

PICHON B, et al. Changes in molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis following introduction of pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales. *J. Clin. Microbiol* 51:820-827. doi:10.1128/JCM.01917-12, 2013.

PRICE KE, et al. Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 194:3651-60, 2012.

ROSSJOHN J, et al. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 284(2):449-61, 1989.

SAMBROOK J, et al. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SHUMWAY CN, et al. Purification of Pneumolysin. *INFECTION AND IMMUNITY*, Vol. 4, No. 4, p. 388-392, Oct. 1971.

SUBRAMANIAN K, Henriques-Normark B, Normark S. Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. *Cellular Microbiology*. 2019;e13077.

SUBRAMANIAN K, et al. Pneumolysin binds to the mannose receptor C type 1 (MRC-1) leading to anti-inflammatory responses and enhanced pneumococcal survival. *Nature Microbiology* volume 4, pages62–70 (2019).

VARMAN M, MD. Pediatric Pneumococcal Infections Clinical Presentation. Drugs & Diseases > Pediatrics: General Medicine. Updated: Dec 12, 2017.

VÖGELE M, et al. Membrane perforation by the pore-forming toxin pneumolysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jul 2;116(27):13352-13357. doi: 10.1073/pnas.1904304116. Epub 2019 Jun 17, 2019.

WEISER JN, et al. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. *Nature Reviews | Microbiology*, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION site. WHO-MCEE methods and data sources for child causes of death 2000-2016. http://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/. Dados obtidos em 2018.

WINGFIELD, et al. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Curr Protoc Protein Sci*. Appendix-3F, 2001.