República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014023570-8 B1

(22) Data do Depósito: 25/03/2013

(45) Data de Concessão: 15/03/2022

(54) Título: MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DA PROTÉINA CISTATIONINA BETASINTASE (CBS)

(51) Int.Cl.: C12N 9/88.

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2013 US 13/830,494; 26/03/2012 US 61/615,629.

(73) Titular(es): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO.

(72) Inventor(es): RICHARD G. CARRILLO; JAN P. KRAUS; TOMAS MAJTAN; DAVID NAVEH.

(86) Pedido PCT: PCT US2013033716 de 25/03/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/148580 de 03/10/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/09/2014

(57) Resumo: PURIFICAÇÃO DE CISTATIONINA BETA-SINTASE. A presente invenção refere-se a métodos cromatográficos para a purificação de uma proteína cistationina (BETA)-Sintase (CBS), particularmente, variantes truncadas da mesma e composições e composições farmacêuticas preparadas a partir da mesma. Método que compreende as etapas de fornecer uma solução que contém CBS compreendendo impurezas e executar a separação cromatográfica da mesma.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DA PROTÉINA CISTATIONINA BETA-SINTASE (CBS)".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório nº U.S. 61/615.629, depositado no dia 26 de março de 2012 e o Pedido nº U.S. 13/830.494, depositado no dia 14 de março de 2013, a descrição de cada um dos quais é incorporada a título de referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se em geral a métodos para purificação de Cistationina β-Sintase (CBS), particularmente, variantes truncadas da mesma. A presente invenção também se refere a composições de CBS substancialmente pura produzida através dos ditos métodos de purificação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] A cistationina β-sintase (CBS) desempenha um papel essencial no metabolismo da homocisteína (Hcy) em eucariontes (Mudd *et al*., 2001, em *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8 Ed., páginas 2.007 a 2.056, McGraw-Hill, Nova Iorque). A enzima CBS catalisa uma condensação dependente de piridoxal-5'-fosfato (PLP, Vitamina B6) de serina e homocisteína para formar cistationina que é, então, usada para produzir cisteína por outra enzima dependente de PLP, cistationina γ-liase. Em células de mamíferos que possuem a trajetória de transsulforação, a CBS ocupa uma posição regulatória importante entre a remetilação de Hcy em metionina ou seu uso alternativo na biossíntese de cisteína. O fluxo relativo entre essas duas trajetórias concorrentes é quase igual e é controlado por concentrações intracelulares de S-adenosilmetionina (Finkelstein e Martin, 1984, *J. Biol. Chem.* 259:9.508 a 9.513). AdoMet ativa a enzima CBS de mamífero por até 5 vezes com uma constante de dissociação apa-

rente de 15 μM (Finkelstein *et al*., 1975, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66: 81 a 87; Roper *et al*., 1992, *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 514 a 521; Kozich *et al*., 1992, *Hum. Mutation* 1: 113 a 123).

[004] O domínio regulador de C-terminal de CBS humana consiste em aproximadamente 140 resíduos de aminoácidos (Kery *et al*., 1998, *Arch. Biochem. Biophys.* 355: 222 a 232). Essa região é exigida para tetramerização da enzima humana e ativação de AdoMet (Kery *et al*., 1998, *id.).* A região reguladora de C-terminal também abrange os "domínios de CBS" previamente definidos (Bateman, 1997, *Trends Biochem. Sci.* 22: 12 a 13). Essas sequências hidrofóbicas (CBS 1 e CBS 2) que abarcam resíduos de aminoácidos 416 a 468 e 486 a 543 de SEQ ID NO: 1, respectivamente, são conservadas em uma ampla faixa de proteínas de outro modo não relacionadas. A função das mesmas permanece desconhecida, embora a transição aguda de ativação de CBS induzida de forma térmica e a observação de que mutações nesse domínio podem ativar de maneira constitutiva a enzima que indica que as mesmas desempenham um papel na função de autoinibição da região C-terminal (Janosik *et al*., 2001, *Biochemistry* 40: 10. 625 a 33; Shan *et al*., 2001*, Hum. Mol. Genet.* 10: 635 a 643; Miles e Kraus, 2004, *J. Biol. Chem.* 279: 29.871 a 29.874). Os dois domínios de CBS bem conservados estão também presentes na região de C-terminal da CBS de levedura, que tem aproximadamente o mesmo comprimento que a enzima humana.

[005] Em indivíduos normais saudáveis, conversão mediada por CBS de Hcy em cistationina é a etapa intermediária de limitação por taxa de metabolismo de metionina (Met) para cisteína (Cys). A vitamina B_6 é uma coenzima essencial para esse processo. Em pacientes com certas mutações genéticas na enzima CBS, a conversão de Hcy para cistationina é diminuída ou ausente, resultando em elevações nas concentrações de soro do substrato enzimático (Hcy) e uma diminui-

ção correspondente nas concentrações de soro do produto enzimático (cistationina). A condição clínica de um nível de soro elevado de Hcy e sua excreção concomitante dentro da urina é coletivamente conhecida como homocistinúria.

[006] A deficiência de CBS é a causa mais comum de homocistinúria herdada, uma doença séria que ameaça a vida que resulta em níveis de homocisteína severamente elevados em plasma, tecidos e urina. As estimativas sobre a prevalência de homocistinúria variam amplamente. A averiguação por exames neonatais e averiguação clínica indicaram uma prevalência que está na faixa de 1:200.000 para 1:335.000 (Mudd *et al*., 1995, *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*, McGraw-Hill: Nova Iorque, página 1.279). Os problemas de saúde primários associados com homocistinúria por deficiência de CBS (CBSDH) incluem: doença cardiovascular com uma predisposição para trombose, resultando em uma alta taxa de mortalidade em pacientes parcialmente tratados e não tratados; problemas de tecido conjuntivo que afetam o sistema ocular com miopia progressiva e deslocamento de lente; problemas de tecido conjuntivo que afetam o esqueleto caracterizado por hábitos marnafóides, osteoporose e escoliose e problemas de sistema nervoso central que incluem retardação mental e convulsões. Os sintomas incluem lentes óticas deslocadas, distúrbios esqueléticos, retardação mental e arteriosclerose prematura e trombose (Mudd *et al*., 2001, *id.).* A deficiência homozigótica de CBS é associada com uma grande quantidade de sintomas clínicos que incluem retardação mental, osteoporose, cifoescoliose, derrame, infarto do miocárdio, lentes de ectopia e embolia pulmonar. Complicações cardiovasculares da doença, em particular, trombose arterial e venosa, são os principais contribuintes para mortalidade prematura.

[007] A patofisiologia de deficiência de CBS é sem dúvida complexo, mas existe um consenso de que o instigador fundamental de

dano de órgão alvo é uma elevação extrema de soro Hcy, um substrato de CBS que é construído nos tecidos e no sangue devido à ausência da sua condensação catalisada por CBS com serina L para formar cistationina. A toxicidade de elevações profundas em concentrações de sangue e tecido de Hcy pode suceder da reatividade molecular e dos efeitos biológicos de Hcy *por si só* ou de seus metabólitos (por exemplo, Hcy-tiolactona) que afetam inúmeros processos biológicos (Jakubowski *et al*., 2008, *FASEB J* 22: 4.071 a 4.076). Anormalidades em agregação plaquetária crônica, mudanças em parâmetros vasculares e disfunção endotelial foram todas descritas em pacientes com homocistinúria.

[008] Atualmente, três opções de tratamento existem para o tratamento de CBSDH:

[009] Aumento de atividade residual de atividade de CBS com o uso de doses farmacológicas de Vitamina B_6 em pacientes responsivos a Vitamina B_6;

[0010] Redução de soro Hcy por uma dieta com uma restrição rígida da ingestão de Met; e

[0011] Desintoxicação por conversão mediada por betaína de Hcy em Met, desse modo, reduz concentração de soro de Hcy.

[0012] Cada uma dessas três terapias é voltada para a redução de concentração de soro Hcy. O tratamento padrão para indivíduos afetados por CBSDH não responsivo de Vitamina B_6 consiste em uma dieta restringida por Met suplementada com uma fórmula metabólica e Cys na forma de cisteína (que se tornou um aminoácido essencial de maneira condicional nessa condição). A ingestão de carne, produtos derivados de leite e outros alimentos altos em proteína natural é proibida. O consumo diário de uma fórmula metabólica sintética pobremente palatável que contém aminoácidos e micronutrientes é exigida para prevenir subnutrição secundária. A suplementação com betaína (nome

comercial: Cystadane™, sinônimo: trimetilglicina) é também terapia padrão, em que a betaína serve como um doador de metil para a re-metilação de Hcy para Met catalisado por betaína-homocisteína metil-transferase no fígado (Wilcken *et al*., 1983, *N. Engl. J. Med.* 309: 448 a 453). A obediência dietética geralmente é baixa, mesmo nesses centros médicos em que os melhores cuidados e recursos são fornecidos e essa não obediência tem implicações maiores no desenvolvimento de complicações que ameaçam a vida de homocistinúria.

[0013] Para permitir que pacientes com homocistinúria aproveitem uma dieta bem menos restritiva (por exemplo, ingestão diária limitada a 2 g de proteína por kg, que é facilmente atingível) e ter uma diminuição significativa de nível de plasma de Hcy que leva no longo período a aprimoramento clínico, uma estratégia para aumentar atividade enzimática fornece potencial para tratamento conforme apresentado no pedido de patente provisório copendente de número de série U.S. 61/758.138. A estratégia terapêutica mais efetiva é para aumentar atividade enzimática, conforme é evidente quando os pacientes de homocistinúria responsiva por Vitamina B_6 recebem piridoxina. No entanto, essa estratégia não é possível para pacientes não responsivos a Vitamina B_6 devido à natureza das mutações. A Terapia de Reposição Enzimática (ERT) como uma maneira para aumentar atividade enzimática nesses pacientes exige enzima exógina que não está presente na técnica e, desse modo, desperta uma necessidade na técnica por reagentes aprimorados e métodos para produzir CBS em rendimentos maiores de enzima purificada suficientemente para administração terapêutica.

[0014] Kraus e colegas desenvolveram sistemas de expressão e condições de fermentação para gerar CBS humana recombinante ativa e variantes da mesma (Patentes nº U.S. 5.635.375, 5.523.225 e 7.485.307, incorporadas a título de referência no presente documentos em suas totalidades para qualquer propósito). Essas proteínas foram

purificadas por processos relevantes para fins acadêmicos que incluem o uso de compostos-guia de proteína nas proteínas que não são consideradas úteis para preparação de farmacêuticos.

[0015] A fim de empregar métodos de aumentar atividade enzimática de CBS, um método eficiente de purificação de enzima CBS é exigido. Os métodos existentes de purificação para proteína CBS recombinante contam com marcadores de afinidade para facilitar a purificação que não fornece a pureza e eficiência desejada. Portanto, para obter de forma mais eficiente os níveis necessários de CBS exigida para uso terapêutico, existe uma necessidade por purificação a jusante aprimorada de proteína CBS produzida em células microbiais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0016] Esta invenção fornece métodos para purificar cistationina β-Sintase (CBS), em que a dita proteína CBS é uma variante truncada de ocorrência natural ou um trucado quimicamente clivado ou geneticamente projetado da mesma e, particularmente, CBS truncada produzida em células recombinantes. Em modalidades particulares, o método compreende as etapas de: (a) fornecer uma solução que contém CBS na presença de pelo menos uma impureza e (b) executar separação cromatográfica da dita solução que contém CBS com o uso de uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC). Em modalidades particulares adicionais, o método compreende as etapas de: (a) fornecer uma solução que contém CBS na presença de pelo menos uma impureza e (b) executar separação cromatográfica da dita solução que contém CBS com o uso de uma coluna cromatográfica de troca de íon e uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC).

[0017] Em certas modalidades, o método compreende adicionalmente execução de etapas cromatográficas adicionais (conhecidas na técnica como etapas de "polimento"). Em modalidades particulares, os métodos da invenção incluem a etapa de execução de separação

cromatográfica com o uso de uma coluna Cromatográfica de Interação Hidrofóbica (HIC). Em outras modalidades, o método compreende adicionalmente a etapa de execução de separação cromatográfica com o uso de uma resina de hidroxiapatita cerâmica.

[0018] Em certas modalidades, a coluna de troca de íon é um trocador de ânion, preferencialmente, um trocador de ânion fraco. Em modalidades particulares, o trocador de ânion é uma coluna DEAE-Sepharose FF. Em modalidades adicionais, a resina IMAC é carregada com um íon bivalente. Ainda em modalidades adicionais, o íon de metal bivalente é níquel, cobre, cobalto ou zinco. Em modalidades mais específicas, o íon de metal bivalente é zinco.

[0019] Em certas outras modalidades, o método compreende adicionalmente eluir CBS da resina IMAC com um tampão de eluição que compreende imidazol. Em certas modalidades, a solução que contém CBS é uma solução de CBS clarificada, em que resíduos de célula e outras matérias em partículas são removidos de uma suspensão que compreende CBS que inclui, mas não está limitado a supernadante após centrifugação ou filtrar após filtração. Em ainda outras modalidades, a solução que contém CBS é obtida homogeneizando-se células que expressam um construto recombinante que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica CBS. Em certas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos CBS compreende SEQ ID NO. 1 e codifica uma proteína que tem a sequência de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 2. Em outras modalidades, a sequência de ácidos nucleicos é truncada. Em ainda outras modalidades, a sequência de ácidos nucleicos de CBS truncada foi truncada para uma posição final de um dos resíduos de aminoácidos de 382 a 532, 382 a 550 ou 543 a 550 de SEQ ID NO:2.

[0020] Em outras certas modalidades, as células recombinantes são células microbiais, particularmente células bacterianas. Em moda-

lidades particulares, as células bacterianas são células de *E. coli*, particularmente células de *E. coli* recombinantes que são produzidas por um mamífero, preferencialmente humano, proteína CBS. Em certas modalidades particulares, a dita proteína humana CBS tem uma sequência de aminoácidos conforme apresentado na SEQ ID NO:3 ou uma sequência de ácidos nucleicos truncada CBS que foi truncada para uma posição final de um dos resíduos de aminoácidos de 382 a 532 ou 543 a 550 da SEQ ID NO:2. Em outras modalidades particulares, a sequência de ácidos nucleicos truncado CBS é otimizada para a expressão em *E. coli*, identificada por SEQ ID NO: 4.

[0021] Em outro aspecto, uma solução de CBS substancialmente purificada é fornecida com o uso de um método que compreende as etapas de: a) fornecer uma solução que contém CBS na presença de pelo menos uma impureza, em que a dita proteína CBS é uma variante truncada de ocorrência natural, ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente projetado da mesma, e particularmente truncada e (b) executar separação cromatográfica da dita solução que contém CBS com o uso de uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC). Em modalidades particulares adicionais, uma solução de CBS substancialmente purificada é fornecida com o uso de um método que compreende as etapas de: (a) fornecer uma solução que contém CBS na presença de pelo menos uma impureza e (b) executar separação cromatográfica da dita solução que contém CBS com o uso de uma coluna cromatográfica de troca de íon e uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC).

[0022] Em certas modalidades da invenção, a solução de CBS substancialmente purificada é formulada em um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0023] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos para produzir uma solução de CBS enriquecida, em que o método compreende:

(a) fornecer uma solução que contém CBS na presença de pelo menos uma impureza, em que a dita proteína CBS é uma variante truncada de ocorrência natural ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente elaborado da mesma e particularmente truncada e (b) executar separação cromatográfica da dita solução que contém CBS com o uso de uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC) imobilizada carregada com um íon de metal bivalente.

[0024] Em outro aspecto, uma solução de CBS enriquecida é fornecida com o uso de um método que compreende as etapas de: a) fornecer uma solução que contém CBS na presença de pelo menos uma impureza, em que a dita proteína CBS é uma variante truncada de ocorrência natural, ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente projetado da mesma, e particularmente truncada e (b) executar separação cromatográfica da dita solução que contém CBS com o uso de uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC) imobilizada carregada com um íon de metal bivalente.

[0025] É uma vantagem particular dessa invenção que a purificação de CBS truncada, de comprimento total ou recombinante, particularmente CBS humana, pode ser alcançada sem modificações adicionais da proteína, por exemplo, ao incorporar uma molécula "marcadora" conhecida na técnica (poli-HIS, FLAG, etc.). O uso dos métodos cromatográficos revelados na presente invenção vantajosamente torna esses marcadores desnecessários e, desse modo, evita manipulação recombinante adicional e quaisquer desvantagens (em imunogenicidade, in vivo meia vida ou atividade bioquímica) que possam ser introduzidas em qualquer preparação de CBS recombinante que contém um marcador.

[0026] Modalidades preferenciais específicas da invenção se tornarão evidentes a partir da descrição mais detalhada a seguir de certas modalidades preferenciais e das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0027] A descrição detalhada seguinte das modalidades da presente invenção pode ser mais bem entendida quando lida em conjunto com os desenhos seguintes.

[0028] A Figura 1 é um sumário de série de purificação de execução de geração escalonada que usa um método de cromatografia de múltiplas etapas que inclui cromatografia de DEAE-Sepharose-FF, Zn-IMAC e HIC.

[0029] A Figura 2 é um sumário de purificação de experimentos de purificação com o uso de uma coluna DEAE-Sepharose-FF e CBS purificada com o uso do construto de expressão bacteriana "não otimizado". As fases móveis incluíam 10% de etilenoglicol adicionalmente aos outros componentes, conforme apresentado nos Exemplos.

[0030] A Figura 3 é um sumário de série de purificação de execução de geração escalonada que usa um método de cromatografia de múltiplas etapas que inclui DEAE-Sepharose-FF, Zn-IMAC, resina de hidroxiapatita cerâmica e cromatografia de HIC.

[0031] A Figura 4 é uma foto-imagem de um gel de SDS-PAGE que mostra as quantidades relativas de proteína CBS e impurezas para cada estágio da etapa de purificação com o uso de uma coluna DEAE.

[0032] A Figura 5 é uma fotoimagem de um gel de SDS-PAGE que mostra as quantidades relativas de proteína CBS e impurezas para um método de purificação de 3 colunas que inclui: uma coluna DEAE, uma coluna Zn-IMAC e uma coluna HIC.

[0033] A Figura 6 é uma fotoimagem de um gel de SDS-PAGE que mostra as quantidades relativas de proteína CBS e impurezas para um método de purificação de 4 colunas que inclui: uma coluna DEAE, uma coluna Zn-IMAC, uma resina de hidroxiapatita cerâmica e uma coluna HIC.

[0034] A Figura 7 são cromatografias que demonstram os compo-

nentes da mistura separada que segue a purificação com o uso de Zn-IMAC.

[0035] A Figura 8 é um sumário de purificação de execução de desenvolvimento que usa uma coluna Ni-IMAC.

[0036] A Figura 9 é uma tabela-sumário que demostra a proteína total que segue um método de purificação com o uso de uma coluna Ni-IMAC.

[0037] A Figura 10 é uma fotoimagem de um gel de SDS-PAGE que mostra as quantidades relativas de proteína CBS e impurezas para cada estágio da etapa de purificação com o uso de uma coluna Ni-IMAC.

[0038] A Figura 11 é um sumário de purificação de execução de geração escalonada que usa uma coluna Cu-IMAC.

[0039] A Figura 12 é uma tabela-sumário que demostra a proteína total que segue um método de purificação com o uso de uma coluna Zn-IMAC.

[0040] A Figura 13 é uma foto-imagem de um gel de SDS-PAGE que mostra as quantidades relativas de proteína CBS e impurezas para cada estágio da etapa de purificação com o uso de uma coluna Zn-IMAC.

[0041] A Figura 14 é um esquema do método de purificação que usa etapas de purificação de cromatografia de múltiplas etapas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0042] Esta invenção fornece métodos para purificação de proteína CBS, em que a dita proteína CBS é uma variante truncada de ocorrência natural ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente projetado da mesma e, particularmente, uma proteína CBS truncada produzida em célula recombinantes. Em particular, a invenção fornece métodos para a purificação de uma proteína CBS que incluem as etapas de (a) fornecer uma solução que contém CBS na presença de pelo

menos uma impureza e (b) executar separação cromatográfica da dita solução que contém CBS com o uso de uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC). Em modalidades particulares adicionais, o método compreende as etapas de: (a) fornecer uma solução que contém CBS na presença de pelo menos uma impureza e (b) executar separação cromatográfica da dita solução que contém CBS com o uso de uma coluna cromatográfica de troca de íon e uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC).

[0043] Uma etapa de separação cromatográfica particular nas certas modalidades dos métodos fornecidos por essa invenção compreende uma coluna cromatográfica de troca de íon. Em uma modalidade, a coluna cromatográfica de troca de íon é um trocador de ânion, preferencialmente um trocador de ânion fraco. Vários tipos de resinas de troca de ânion podem ser usados, incluindo DEAE-Sephadex, QAE-Sephadex, DEAE-Sephacel, DEAE-celulose e DEAE-Sepharose-FF. De acordo com uma modalidade, a resina de troca de ânion é DEAE-Sepharose-FF.

[0044] Outra etapa de separação cromatográfica particular na certeza dos métodos fornecidos por essa invenção compreende uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC) que tem pH e condutividade apropriados como para permitir que a proteína se ligue à coluna enquanto lavagens intermediárias seletivas são usadas para remover proteínas de ligação mais fraca e outra espécie molecular. Em certas modalidades, concentrações variantes de imidazol foram usadas para modular a separação durante a cromatografia. Resinas de afinidade a metal adequadas incluem colunas de afinidade a metal imobilizadas carregadas com um íon de metal bivalente que inclui níquel, cobre, cobalto ou zinco. Em certas modalidades dos métodos da invenção, a coluna de cromatografia de afinidade a metal (IMAC) é usada seguindo cromatografia de troca de íon. Em tais modalidades, a coluna

IMAC é preferencialmente carregada com zinco como um cátion bivalente. Em outras modalidades dos métodos inventivos, a coluna IMAC é usada como uma etapa cromatográfica inicial. Em tais modalidades, cátions bivalentes de níquel ou cobre são preferencialmente usados para carregar a coluna IMAC.

[0045] Etapas cromatográficas adicionais fornecidas em certas modalidades dos métodos dessa invenção para purificar CBS a partir de uma solução que contém CBS incluída sem limitação de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). HIC é útil para remover impurezas que têm propriedades cromatográficas relacionadas relativamente próximas que são eluídas junto com a proteína-alvo durante a etapa de captura.

[0046] Etapas cromatográficas adicionais fornecidas em certas modalidades dos métodos dessa invenção para purificar CBS a partir de uma solução que contém CBS inclui sem limitação uma resina de cerâmica hidroxiapatita. "Cerâmica hidroxiapatita" ou "CHAP" se refere a um fosfato de cálcio hidroxilado insolúvel da fórmula ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), que foi sinterizada a altas temperaturas em uma forma de cerâmica macroporosa esférica. Os métodos da invenção também podem ser usados com resina hidroxiapatita que está não compactada ou compactada em uma coluna. A escolha de dimensões de coluna pode ser determinada pelo artesão versado na técnica.

[0047] Matrizes cromatográficas úteis no método da invenção são materiais que têm capacidade para ligar compostos bioquímicos, preferencialmente proteínas, ácidos nucleicos e/ou endotoxinas, em que a afinidade dos ditos compostos bioquímicos para a dita matriz de cromatografia é influenciada pela composição de íon da solução adjacente (tampão). Controlar a composição de íon da dita solução permite usar os materiais de cromatografia da invenção tanto em modo subtrativo (CBS passa através da dita matriz de cromatografia, pelo menos

certos contaminantes se ligam à dita matriz de cromatografia) quanto, preferencialmente, em modo absorvente (CBS se liga à matriz de cromatografia).

[0048] Em modalidades particulares, o método para purificação compreende uma etapa de homogeneizar células hospedeiras, particularmente células recombinantes e, em certas modalidades, células recombinantes que produzem proteína CBS de mamíferos, preferencialmente humana, em que o dito construto recombinante codifica uma proteína CBS que é uma variante truncada de ocorrência natural ou uma truncada geneticamente elaborada da mesma e, particularmente, em que o dito construto foi otimizado para expressão de célula recombinante. Em modalidades particulares, as ditas células recombinantes são células microbiais e, particularmente, células bacterianas. Em certas modalidades particulares, as células bacterianas são células de *E. coli* e a sequência de CBS foi elaborada no construto de expressão recombinante para ser otimizada para a expressão nas ditas células; uma modalidade específica de uma sequência de ácidos nucleicos otimizada para expressão de CBS em *E. coli* é apresentada na SEQ ID NO: 4. Nos ditos métodos, as células são ceifadas, por exemplo, por centrifugação e, opcionalmente, armazenadas a -80 graus ˚C. A homogeneização de células hospedeiras é executada rompendo-se as células hospedeiras com o uso de meios físicos, químicos ou enzimáticos ou por uma combinação dos mesmos. Vantajosamente, para purificação de fontes bacterianas a homogeneização é executada rompendo-se a parede celular da dita hospedeira bacteriana por sonicação. Alternativamente ou adicionalmente, a homogeneização é executada desestabilizando-se a parede de célula bacteriana da hospedeira expondo-se a uma enzima degradante de parede celular tal como lisozima.

[0049] Os métodos da invenção podem compreender adicional-

mente uma CBS homogeneizada e clarificada, em que resíduos de célula são removidos do homogeneizado tanto por filtração quanto por centrifugação. Em certas modalidades, a clarificação é executada centrifugando-se o homogeneizado a uma velocidade rotacional efetiva. O tempo de centrifugação exigido depende entre outros do volume do homogeneizado, que pode ser determinado empiricamente para obter um pélete suficientemente sólido. Para obter um homogeneizado clarificado de célula essencialmente livre de resíduos, uma combinação de centrifugação e filtração pode ser executada no homogeneizado.

[0050] O termo "célula recombinante" conforme usado no presente documento se refere a células adequadas (incluindo progenitura de tais células) de qualquer espécie as quais foram introduzidas a um construto de expressão recombinante que tem capacidade para expressar uma proteína CBS que codifica ácido nucleico, preferencialmente, proteína humana CBS e mais particularmente uma proteína humana CBS que é uma variante truncada de ocorrência natural ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente projetado da mesma. Em modalidades específicas, a proteína CBS truncada codificada pelo dito construto de expressão recombinante tem uma sequência de aminoácidos conforme apresentado na SEQ ID NO: 3.

[0051] O termo, "célula bacteriana", conforme usado no presente documento se refere à bactéria que produz uma proteína CBS de mamíferos, preferencialmente humana, entre outros, com o uso de métodos genéticos recombinantes que incluem progenitura da dita célula recombinante, em que a dita proteína CBS é uma variante truncada de ocorrência natural ou uma truncada geneticamente elaborada da mesma.

[0052] O termo "construto de expressão recombinante" conforme usado no presente documento se refere a um ácido nucleico que tem uma sequência de nucleotídeos de uma proteína CBS de mamíferos,

preferencialmente humana e sequências suficientes para direcionar a síntese de proteína CBS em culturas de células nas quais o construto de expressão recombinante é introduzido e a progenitura da mesma.

[0053] Conforme usada no presente documento, a referência à proteína ou polipeptídeo CBS, preferencialmente, inclui uma variante truncada de ocorrência natural ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente elaborado da mesma ou proteínas de fusão ou qualquer homólogo (variante, mutante) da mesma e, especificamente CBS de mamífero e, preferencialmente, CBS humana. Uma proteína CBS pode incluir, mas não é limitada a, proteína CBS purificada, proteína CBS produzida de maneira recombinante, proteína CBS solúvel, proteína CBS insolúvel e proteína CBS isolada associadas com outras proteínas. Adicionalmente, uma "proteína humana CBS" se refere a uma proteína CBS de um humano *(Homo sapiens)* que inclui preferencialmente uma variante truncada de ocorrência natural ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente projetado da mesma. Como tal, uma proteína humana CBS pode incluir proteínas purificadas, parcialmente purificadas, recombinantes, mutantes/modificadas e sintéticas. Conforme revelado no presente documento e nas Patentes relacionadas de U.S. nº 8.007.787 e U.S. nº 7.485.307, os truncados de proteína CBS são vantajosamente proteínas CBS solúveis que são produzidas em bactéria sem a criação de corpos de inclusão insolúveis.

[0054] Conforme usado no presente documento, o termo "homólogo" (ou variante ou mutante) é usado para se referir a uma proteína ou peptídeo que se difere de uma proteína ou peptídeo de ocorrência natural (*isto é*, a proteína do "tipo selvagem" ou "protótipo") por modificações à proteína ou peptídeo de ocorrência natural, mas que mantém a proteína básica e estrutura de cadeia lateral da forma de ocorrência natural. Tais mudanças incluem, mas não estão limitadas a: mudanças em uma, algumas ou mesmo em várias cadeias laterais de aminoáci-

do; mudanças em um, alguns ou vários aminoácidos, que inclui deleções (por exemplo, uma versão truncada da proteína ou peptídeo), inserções e/ou substituições; mudanças na esteroquímica de um ou de alguns átomos e/ou derivações menores que incluem, mas não estão limitadas a: metilação, glicosilação, fosforilação, acetilação, miristoilação, prenilação, palmitação, amidação e/ou adição de glicosilfosfatidilinositol. Um homólogo pode ter propriedades aprimoradas, diminuídas, modificadas ou substancialmente similares conforme comparado à proteína ou peptídeo de ocorrência natural. Um homólogo pode incluir um agonista de uma proteína ou um antagonista de uma proteína.

[0055] Homólogos podem ser o resultado de mutação natural ou variação alélica natural. Uma variante alélica de ocorrência natural de um ácido nucleico que codifica uma proteína é um gene que ocorre essencialmente no mesmo local (ou locais) no genoma como o gene que codifica tal proteína, mas que devido a variações naturais causadas por, por exemplo, mutação ou recombinação, tem uma sequência similar, mas não idêntica. As variantes alélicas tipicamente codificam proteínas que tem atividade similar àquela da proteína codificada pelo gene para o qual serão comparadas. Uma classe de variantes alélicas pode codificar a mesma proteína, mas tem sequências de ácidos nucleicos diferentes devido à degeneração do código genético. As variantes alélicas podem também compreender alterações nas regiões não traduzidas 5' ou 3' do gene (por exemplo, em regiões de controle reguladoras). As variantes alélicas são vem conhecidas por aqueles versados na técnica.

[0056] Homólogos podem ser produzidos com o uso de técnicas conhecidas na técnica para a produção de proteínas que incluem, mas não estão limitadas a, modificações diretas à proteína isolada de ocorrência natural, síntese de proteína direta ou modificações à sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína com o uso de, por exem-

plo, técnicas de DNA recombinantes ou clássicas para efetuar mutagênese almejada ou aleatória. As variantes de CBS são descritas na Patente de U.S. nº 8.007.787, que é incorporada no presente documento a título de referência em sua totalidade; em particular e em modalidades preferenciais, os reagentes e métodos da invenção apresentada no presente documento preferencialmente incluem uma variante truncada de ocorrência natural ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente projetado de proteína humana CBS. Formas truncadas particulares de SEQ ID NO: 3 de acordo com a presente invenção incluem variantes de deleção de N-terminal, variantes de deleção de C-terminal e variantes que tem tanto deleções de N-terminal quanto deleções de C-terminal.

[0057] Conforme usado no presente documento, "substancialmente puro" se refere a uma pureza que permite o uso efetivo da proteína *in vitro, ex vivo* ou *in vivo*. Para uma proteína ser útil *in vitro, ex vivo* ou *in vivo* é, preferencialmente, substancialmente livre de contaminantes, outras proteínas e/ou substâncias químicas que podem interferir ou que iriam interferir com seu uso ou que pelo menos seriam indesejáveis para inclusão com uma proteína CBS (que inclui homólogos da mesma).

[0058] Conforme usada no presente documento, uma solução de CBS enriquecida é uma solução submetida a uma ou mais etapas de purificação.

[0059] A pureza de proteína pode ser determinada calculando-se purificação em vezes, *isto é,* uma fórmula que fornece uma medição de quanto mais uma solução purificada é comparada a uma solução menos purificada ou extrato bruto. A purificação em vezes é calculada com o uso de a seguinte fórmula:

[0060] *Fração final de atividade específica/Fração bruta de atividade específica.*

[0061] Outra medição para avaliar a pureza é a "atividade específica" que mede a pureza de uma enzima. A atividade específica pode ser medição com o uso de a seguinte fórmula:

$$\frac{Unidades}{ml} \times \frac{ml}{mg} = \frac{Unidades}{mg}$$

[0062] As composições de proteína CBS fornecidas por essa invenção são úteis para regular processos biológicos e, particularmente, processos associados com a catálise da condensação dependente de piridoxal-5'-fosfato (PLP) de serina e homocisteína para formar cistationina. Em particular, as composições da presente invenção são úteis para produzir cistationina e cisteína in vitro ou para tratar um paciente que se beneficiará de atividade de CBS aumentada (por exemplo, um paciente com homocistinúria). Em certas modalidades, a invenção fornece as ditas composições de proteína CBS, preferencialmente proteína humana CBS, em que a dita proteína CBS é uma variante truncada de ocorrência natural ou um truncado quimicamente clivado ou geneticamente projetado de proteína humana CBS, como composições farmacêuticas que compreendem a dita proteína CBS e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0063] Conforme usado no presente documento, um "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui excipientes farmaceuticamente aceitáveis e/ou veículos de entrega farmaceuticamente aceitáveis, adequados para uso em administração adequada da composição *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Administração adequada *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* que compreende preferencialmente qualquer localização em que é desejável regular atividade de CBS. Veículoes farmaceuticamente aceitáveis adequados são capazes de manter uma proteína CBS conforme fornecida por essa invenção em uma forma que, no momento da chegada da proteína na célula ou tecido-alvo em uma cultura ou em paciente, a proteína tem sua atividade biológica desejada ou esperada. Exemplos de veículo farmaceuticamente aceitáveis incluem, porém,

sem limitação, água, salina tamponada por fosfato, solução de Ringer, solução de dextrose, soluções que contêm soro, solução de Hank, outras soluções aquosas fisiologicamente balanceadas, óleos, ésteres e glicóis. Os transportadores aquosos podem conter substância auxiliares adequadas exigidas para aproximar as condições fisiológicas do recipiente, por exemplo, aumentando-se estabilidade química e isotonicidade. As composições da presente invenção podem ser esterilizadas por métodos convencionais e/ou liofilizados.

[0064] Cada referência descrita e/ou citada no presente documento é incorporada a título de referência em sua totalidade.

[0065] Os exemplos seguintes são fornecidos com o propósito de ilustração e são não têm a intenção de limitar o escopo da presente invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: PRODUÇÃO DE PROTEÍNA CBS TRUNCADA EM BACTÉRIAS

[0066] Uma variante de CBS humana truncada carente de porções específicas das regiões não conservadas (r-hCβSΔC; SEQ ID No: 3) foi construída e expressada de maneira exaustiva com o uso de o sistema de expressão baseado em *E. coli* previamente descrita (Kozich e Kraus, 1992, *supra).* Na modificação desse sistema revelado no presente documento (isto é, que expressa o truncado ao invés da proteína CBS de comprimento total), a CBS truncada codificada por SEQ ID NO: 3 foi expressa sem qualquer parceiro de fusão sob o controle do promotor *tac*. Construtos que codificam a variante de CBS proteína humana truncada r-hCβSΔC (SEQ ID NO: 4) foram gerados por uma modificação do construto de expressão pHCS3 descrito anteriormente (Kozich e Kraus, 1992, Hum. Mutat. 1.113 a 1.123) que contém a sequência de codificação de CBS de comprimento total (SEQ ID NO: 1) clonado em pKK388.1. Nesse construto, a expressão de CBS foi ad-

ministrada pelo promotor *lac* induzível por IPTG. Para gerar construções de deleção de C-terminal, os fragmentos de cDNA de CBS abarcam os resíduos de nucleotídeos desejados foram ampliados com o uso de iniciadores que incorporam os sítios Sph I e Kpn I às extremidades respectivas 5' e 3' do produto de PCR. Todos os produtos de PCR foram, então, seccionados com Sph I e Kpn I e clonados por ligação no vetor digerido pHCS3 com Sph I e Kpn I. Uma localização Sph I ocorre naturalmente no cDNA de CBS apenas a montante da localização de hibridização de iniciador antessentido (posição de pare de base 1012, de acordo com a numeração de cDNA de CBS, ref. 25). Produtos de PCR gerados desse modo foram, então, digeridos com Nco I e Sph I e unido na plasmida pHCS3 seccionada com as mesmas enzimas.

[0067] pKK CBS Δ414-551

[0068] senso: CGTAGAATTCACCTTTGCCCGCATGCTGAT (SphI)(SEQ ID NO: 5)

[0069] antissenso:TACGGGTACCTCAACGGAGGTGCCACCACC AGGGC (KpnI)(SEQ ID NO: 6)

[0070] Finalmente, o construto foi transformado em *E. coli* BL21 (Stratagene). A autenticidade do construto foi verificada sequenciando-se DNA com o uso de um kit de sequenciamento Thermo Sequenase Cy5.5 (Amersham Pharmacia Biotech) e o sequenciador de DNA Visible Genetics Long-Read Tower System-V3.1 de acordo com as instruções do fabricante.

[0071] *Análises de Expressão Bacteriana de Crescimento de Mutantes de Deleção de CBS* de *E. coli.* As células BL21 sustentam o construto mutante de truncamento de CBS, a indução de expressão e a geração de células lisadas brutas foram executadas conforme descrito anteriormente (Maclean *et al*., 2002, *Hum. Mutat. 19(6),* 641 a 55). Brevemente, a bactéria foi cultivada a 37° C de maneira aeróbica

em meio de 1 L de NZCYMT (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) que contém 75 µg/ml de ampicilina e 0,001% de tiamina na presença ou ausência de 0,3 mM δ-aminolevulinato (δ-ALA) até que tenham alcançado turvação de 0,5 a 600 nm. IPTG foi, então, adicionado a 0,5 mM e a bactéria foi adicionalmente cultivada. A fração insolúvel foi preparada conforme segue: após a centrifugação dos homogeneizados sonicados, os resíduos de célula granulados foram lavados profundamente com salina tamponada com Tris Ix resfriada de pH 8,0. Os granulados foram, então, resuspendidos em1ml do tampão de lise (Maclean *et al.*, *ibid.)* seguido por uma breve sonicação a fim de homogeneizar a fração insolúvel.

[0072] *Ensaio de Atividade de CBS* – a atividade de CBS foi determinada por um exame radioisótopo previamente descrito com o uso de serina [^{14}C] como o substrato rotulado (Kraus, 1987, *Methods Enzymol.* 143,388 a 394). As concentrações de proteína foram determinadas pelo procedimento Lowry (Lowry *et al.*, 1951, *J. Biol. Chem.* 193, 265 a 275) com o uso de albumina de soro bovino (BSA) como um padrão. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de CBS que catalisa a formação de 1 µmo1 de cistationina em 1 hora a 37 °C.

[0073] *Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturada e Nativa e Western Blotting* - Análise por Western blot de lisatos de célula bruta tanto sob condições desnaturadas quanto em condições nativas foi executada conforme descrito anteriormente (Janosik, 2001, supra) com algumas modificações. Frações solúveis de lisato de *E. coli* que contêm a proteína mutante expressa foram misturadas com tampão de amostra e execução em um PAGE 6% nativo sem um gel de empilhamento. A composição final do tampão de amostra foi: 50 mM de Tris-HCl, pH 8,9, 1 mM de DTT, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol. A detecção de heme foi executada com o uso de um método

descrito anteriormente que conta com atividade de peroxidasse de heme (Vargas *et al*., 1993, *Anal. Biochem.* 209(2), 323 a 326).

[0074] *Análise Quantitativa de Varredura de Densitometria* - Análise de densitometria foi executada com o uso de o software Imagemaster ID (versão 2.0) (Pharmacia). Para construir uma curva de calibragem, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 ng de proteína CBS do tipo selvagem purificada foram executados em um SDS-PAGE junto com células lisadas brutas dos mutantes individuais. Após a eletroforese, a imunoanálise por Western blot foi conduzida com o uso de soro de anti-CBS de coelho. Os sinais que correspondem às subunidades de mutante de CBS experimentalmente observadas estavam todas dentro da faixa linear da curva de calibragem construída com CBS humana purificada.

EXEMPLO 2: PREPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO BRUTA

[0075] Extratos que contém proteína CBS bruta foram preparados para uso nas etapas de cromatografia a jusante. Granulados congelados (células) obtidos a partir da fermentação de bactéria recombinante que produz variante de CBS humana truncada (r-hCβSΔC; SEQ ID No: 3) foram lisados, em que a dita bactéria expressou CBS humana truncada codificada por SEQ ID NO: 4. O tampão de lise para isolamentos iniciais continha 1 mM de DTT, 1% de Triton X-100 e Inibidor de Protease. Esses componentes foram, eventualmente, removidos do tampão. O tampão usado para os isolamentos finais que produziu material para execução escalonada consistiu em 20 mM de Fosfato de Sódio, 50 mM de NaCl, 0,1 mM de PLP (pH 7,2), com lisozima adicionada a uma concentração de 2 mg/ml após a homogeneização. Após a mistura com lisozima por 1 hora a 4 °C, o homogeneizado foi sonicado até a viscosidade fosse reduzida e, então, submetida à centrifugação a 20.000 rpm (48.000 x *g*) durante 30 minutos. O supernadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -70 °C até seu uso. Geralmente, o extrato bruto é descongelado a 37 °C antes da purificação cromatográ-

fica.

EXEMPLO 3: CROMATOGRAFIA DE DEAE-SEPHAROSE FF

[0076] DEAE-Sepharose FF foi usada nesse Exemplo dos métodos de purificação para CBS devido ao fato de que possui boa capacidade e propriedades de fluxo e foi produzido de maneira consistente durante vários anos. Essa etapa empregou uma coluna de gotejamento/gravidade que continha aproximadamente 6 ml de resina. A coluna foi equilibrada em tampão de Fosfato de Sódio com 50 mM de NaCl, pH 7,0. O carregamento do extrato bruto foi direcionado em aproximadamente 20 mg total de resina de proteína/ml. Após carregar a coluna, a cor vermelha da carga ficou concentrada próxima ao topo da coluna. Ao seguir com uma lavagem com tampão de equilíbrio, a coluna foi lavada com um tampão que contém 150 mm de NaCl, no qual a maioria de eluido de cor da coluna (todas as etapas foram executadas a pH 7,0). Essencialmente, todas as cores foram removidas da coluna com uma lavagem de 300 mM de NaCl. Com base nesses resultados, uma coluna que foi compactada poderia ser operada em modo de fluxo. As condições empregaram equilíbrio/carregamento a uma concentração de 50 mM de NaCl com eluição a 250 mM de NaCl. As condições finais exigiram diluição da carga de coluna com H_2O para se aproximar da intensidade iônica do tampão de equilíbrio/lavagem (50mM de NaCl) e eluição com 137 mM de NaCl (Figuras 1, 2 e 3). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE para determinar as quantidades relativas de proteína CBS e impurezas (Figura 4). As tabelas seguintes representam parâmetros operacionais de coluna e dados da execução escalonada que as empregou.

TABELA 1. PARÂMETROS OPERACIONAIS PARA ETAPA DE CAPTURA DE DEAE

Etapa de Processo	Alvo de carga de coluna (proteína total mg/ml)	Concentração de NaCl (com 20 mM de Na_3PO_4 e pH 7,0)	Volumes de Coluna (ml)	Coluna de tempo de contato vol./taxa de fluxo (min.)
Equilíbrio	N/A	50 mM	3 a 5	10
Carga	20 a 25 mg/ml	Aprox. 50 mM	Variável	15
Lavagem	N/A	50 mM	3	10
Eluição	N/A	137 mM	Variável*	15
Tira de 2 M de NaCl	N/A	2 M	3	10

[0077] * Nota: A coleta de eluato começa em aproximadamente 0,4 AU e termina em aproximadamente 0,55 AU. O volume vazio é tipicamente de aproximadamente 1 volume de coluna.

TABELA 2. DADOS DE EXECUÇÕES ESCALONADAS (N=6)

Entrada		Saída		
Carregamento de Coluna (por ml de Resina)				
Proteína Total (mg)	Unidades	Recuperação (%)	Purif. em Vezes (Por S.A.)	
14,5 a 19,8	3.275 a 5.443	79,3 a 93,0	2,5 a 3,3	*Faixa*
18,2	4.451	86	2,8	*Média*

EXEMPLO 4: CROMATOGRAFIA DE IMAC

[0078] A habilidade para uma coluna de afinidade a metal imobilizada (IMAC) para separar proteína CBS de impurezas e outros contaminantes de uma fonte biológica, tal como um homogeneizado de célula bacteriana recombinante, foi demostrada. Devido ao desejo de evitar

condições de PH baixo (< 5, anedótico), concentrações variantes de imidazol foram usadas para modular separação durante a cromatografia.

[0079] Cobre (Cu^{++}) foi testado como uma espécie candidata de coluna IMAC com base em suas características de ligação relativamente fortes. Antes de ser aplicada à coluna IMAC, a solução de CBS foi ajustada a 0,4 M de NaCl. Os resultados indicaram que a captura foi quase completa com uma recuperação de atividade aceitável (70 a 80%). A recuperação de CBS foi obtida com o uso de 100 mM de imidazol que resultou em precipitação significante sob descongelamento de armazenamento a -70° C. (Figura 11). Em adição, havia apenas um pequeno aumento na pureza relativa à carga. Desse modo, experimentos que empregam Ni^{++}IMAC foram conduzidos como o metal de escolha. Nesses experimentos, a amostra de CBS foi executada através de uma coluna G-25 para remover ditiotreitol (DTT) antes de carregar a solução na coluna IMAC. O aprimoramento de pureza permaneceu baixo e a seletividade foi similar a Cu^{++}, conforme evidenciado por um pico relativamente pequeno de A_{280} na alta fração de tira de imidazol. (Figuras 8, 9 e 10).

[0080] A ligação relativamente fraca de Zn^{++} também foi testada. Embora condições de captura, lavagem e eluição exijam concentrações de imidazol significativamente baixas, o potencial para aprimoramento de pureza forneceu resultados positivos devido ao tamanho significante dos picos de A_{280} na lavagem após carga e alta fração de tira de imidazóis. 0,4 M de NaCl e 0,01% de Triton X-100 foram adicionados ao equilíbrio e tampões de lavagem para minimizar ligações não específicas. (Figuras 1 e 3). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE para determinar as quantidades relativas de proteína CBS e impurezas (Figura 13). Os resultados dos experimentos de IMAC são apresentados na Figura 7. As tabelas seguintes representam parâmetros operacionais de coluna e dados da execução escalonada que os

empregou.

TABELA 3. PARÂMETROS OPERACIONAIS PARA ETAPA DE ZN-IMAC

Etapa de Processo	Alvo de carga de coluna (proteína total mg/ml)	Concentração de Imidazol (com 20 mM de Na_3PO_4 e pH 7,0)	Volumes de Coluna (ml)	Coluna de tempo de contato vol./taxa de fluxo (min.)
Equilíbrio	N/A	1 mM	3	10
Carga	10	0	Variável	10
Lavagem	N/A	1 mM	3	10
Eluição	N/A	11 mM	Variável*	10
Tira	N/A	100 mM	3	10

[0081] * Nota: A coleta de eluato começa em aproximadamente 0,25 AU e termina em aproximadamente 0,16 AU. O volume vazio é tipicamente de aproximadamente 1,5 volumes de coluna.

TABELA 4. DADOS DE EXECUÇÕES ESCALONADAS (N=5)

Entrada		Saída		
Carregamento de Coluna (por ml de Resina)				
Proteína Total (mg)	Unidades	Recuperação (%)	Purif. em Vezes (Por S.A.)	
6,5 a 9,3	4.414 a 7.038	71,8 a 84,6	1,3 a 1,6	*Faixa*
8,1	5.687	80	1,4	*Média*

EXEMPLO 5: CROMATOGRAFIA DE HIC

[0082] Experimentos múltiplos foram conduzidos para identificar os parâmetros para cromatografia de HIC. Os experimentos de coluna co-

letora iniciais que foram conduzidos empregaram uma resina com um ligante de ligação relativamente forte (fenila) com um eluato de IMAC como material/carga inicial. Esse experimento resultou em ligação empiricamente completa a 1,3 M de $(NH_4)_2SO_4$. No entanto, havia evidência de retenção significante de CBS na coluna mesmo após a lavagem com um tampão de baixa intensidade iônica. Com base nesses resultados, uma resina com um ligante de ligação mais fraco (butil) foi estada. Experimentos iniciais com essa resina não mostraram captura aparente a 0,5 M de $(NH_4)_2SO_4$. O fluxo de não ligação através desse experimento de coluna foi coletado e ajustado a 1,25 M de $(NH_4)_2SO_4$, e recarregado a uma coluna equilibrada para a mesma concentração de $(NH_4)_2SO_4$. Nesse caso, havia evidência de ligação significante para a coluna. Uma eluição de gradiente de volume de 20 colunas de $(NH_4)_2SO_4$ foi executada de 1,25 M a 0,25 M de $(NH_4)_2SO_4$ com frações coletadas. A análise de SDS-PAGE das frações indicou que havia potencial significante para clarificação de impureza na extremidade mais baixa do gradiente. Experimentos que utilizam lavagens de gradiente de etapa a concentrações variantes de $(NH_4)_2SO_4$ determinaram os parâmetros de operação final. (Figuras 1 e 3). Esses parâmetros e os dados de execução escalonada são resumidos nas tabelas abaixo.

TABELA 5. PARÂMETROS OPERACIONAIS PARA ETAPA DE HIC (N=6)

Etapa de Processo	**Alvo de carga de coluna (proteína total mg/ml)**	**Concentração de $(NH_4)_2SO_4$ (com 20 mM de Na_3PO_4 e pH 7,0)**	**Volumes de Coluna (ml)**	**Coluna de tempo de contato vol./taxa de fluxo (min.)**
Equilíbrio	N/A	1,4 M	3	10
Carga	5 a 10	1,4 M	Variável	10
Lavagem	N/A	1,4 M	3	10

Eluição	N/A	1,1 M	Variável*	10
Tira	N/A	0,05 M de NaCl	3	10

[0083] * Nota: A coleta de eluato começa em aproximadamente 0,25 AU e termina em aproximadamente 0,15 AU. O volume vazio é tipicamente de aproximadamente 1,4 volumes de coluna.

TABELA 6. DADOS DE EXECUÇÕES ESCALONADAS (N=5)

Entrada		**Saída**		
Carregamento de Coluna (por ml de Resina)				
Proteína Total (mg)	**Unidades**	**Recuperação (%)**	**Purif. em vezes (Por S.A.)**	
5,1 a 7.2	5.375 a 9.248	77,8 a 92,7	1,0 a 1,3	*Faixa*
6,3	7.638	85	1,2	*Média*

EXEMPLO 6: CROMATOGRAFIA DE CHAP

[0084] Cerâmica hidroxiapatita é uma resina que tem uma química de modo de ligação potencialmente misturado única que foi utilizada em um método de purificação de CBS. CBS exibiu características de ácido e, então, investigação inicial focada em usar separação modulada por fosfato. Os experimentos iniciais utilizaram eluato de HIC que teve o tampão trocado por um tampão de NaCl de 0,05 M e Fosfato de Potássio de 0,005 M (pH 6,8). Um cartucho de cerâmica hidroxiapatita de 5 ml (Tipo 1) foi equilibrado no mesmo tampão e o eluato condicionado de HIC foi carregado na coluna. Não havia penetração visível de proteína (conforme medido por A_{280}) durante a carga e a lavagem subsequente com tampão de equilíbrio/lavagem. Um gradiente linear (5%) de 0,005 M a 0,5 M de Fosfato de Potássio foi, então, executado e frações foram coletadas. Baseado nas cromatografias, amostras foram analisadas por SDS-PAGE para determinar as quantidades relativas de proteína CBS e impurezas. Em experimentos subsequentes (base-

ado em análise dos resultados de experimentos anteriores), lavagens de etapa com níveis variantes de fosfato foram empregadas para determinar boas condições para etapas de carregar, lavar e eluir. Em adição, a composição de sais de tampão foi transferida de Potássio para Fosfato de Sódio. (Figura 3). As tabelas seguintes representam parâmetros operacionais de coluna e dados das execuções escalonadas que foram empregados.

TABELA 7. PARÂMETROS OPERACIONAIS PARA ETAPA CHAP

Etapa de Processo	Alvo de carga de coluna (proteína total mg/ml)	Concentração de Na_3PO_4 (com 50mM NaCl, pH 7,0)	Volumes de Coluna (ml)	Coluna de tempo de Contato vol./taxa de fluxo (min.)
Equilíbrio	N/A	10 mM	3	6
Carga	10 a 15	10 mM	Variável	6
Lavagem	N/A	30 mM	3	6
Eluição	N/A	90 mM	Variável*	6
Tira	N/A	150 mM	3	6

[0085] * Nota: A coleta de eluato começa em aproximadamente 0,20 AU e termina em aproximadamente 0,16 AU. O volume vazio é tipicamente de aproximadamente 1,0 de volumes de coluna.

TABELA 8. DADOS DE EXECUÇÕES ESCALONADAS (N=5)

Entrada		Saída		
Carregamento de coluna (por ml de Resina)				
Proteína Total (mg)	Unidades	Recuperação (%)	Purif. em Vezes (Por S.A.)	
9,9 a 12,2	11.205 a 12.297	84,6 a 92,4	1,1 a 1.2	*Faixa*
11,1	11.751	89	1,2	*Média*

EXEMPLO 7: RESULTADOS DE PROCESSOS INTEGRADOS

[0086] O método particular de múltiplas etapas descrito nesses Exemplos foi avaliado na escala de uma coluna de captura de 60 ml. Todas as séries de purificação utilizaram material inicial (extrato bruto) obtido a partir de fermentações que foram disseminadas com células recombinantes que compreendem um construto que compreende uma variante truncada de CBS humana codificada por um ácido nucleico que tem códons otimizados para expressão em *E. coli*. Esse construto resultou em material inicial que foi aproximadamente 2 vezes mais alto em atividade específica e impactou se maneira significante a pureza final alcançada do método de purificação integrado. Os resultados gerais de purificação com o uso de o método de múltiplas etapas foram medidos por SDS-PAGE e Atividade Específica (Figuras 5 e 6). Os resultados demonstraram que a pureza e a atividade específica coincidiram ou excederam aqueles da CBS truncada, marcada e purificada. Todas as Atividades Específicas dos eluatos da coluna final obtidas pela mais escala atualmente possível excederam 1.200 U/mg de proteína total. As tabelas seguintes resumem os resultados de purificação geral da execução escalonada.

TABELA 9. RESULTADOS GERAIS DE EXECUÇÕES ESCALONADAS

	Recuperação Total (%)		**Purificação em Vezes**	
	Faixa	**Média**	**Faixa**	**Média**
Série de 3 Colunas (n=3)	57 a 60	58	5,7 a 6,2	5,9
Série de 4 Colunas (n=2)	47 a 52	50	4,6 a 5,4	5,0

Atividade Específica de Eluato de Coluna Final = 12.06 a15.09.

[0087] Tendo-se descrito a invenção em detalhe e a título de refe-

rência a modalidades específicas da mesma, será aparente que modificações e variações são possíveis sem se afastarem do escopo da invenção definida nas reivindicações anexas. Mais especificamente, embora alguns aspectos da presente invenção estejam identificados no presente documento como particularmente vantajosos, é contemplado que a presente invenção não está necessariamente limitada a esses aspectos particulares da invenção.

TABELA 10: SEQUÊNCIAS DE CBS

Molécula	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de ácidos nucleicos de CβS humana nativa	**1**	Atgccttctgagacccccaggcagaagtggggcc- cacaggctgcccccaccgctcagggccacactcggc- gaaggggagcctggagaaggggtccccagaggataa- ggaagccaaggagcccctgtggatccggcccgatg- ctccgagcaggtgcacctggcagctgggccggcctgc- ctccgagtccccacatcaccacactgccccggcaaa- atctccaaaaatcttgccagatattctgaagaaaatcg- gggacacccctatggtcagaatcaacaagattggga- agaagttcggcctgaagtgtgagctcttggccaagtg- tgagttcttcaacgcgggcgggagcgtgaaggaccg- catcagcctgcggatgattgaggatgctgagcgcga- cgggacgctgaagcccggggacacgattatcgagccg- acatccgggaacaccgggatcgggctggccctggct- gcggcagtgaggggctatcgctgcatcatcgtgatgc- cagagaagatgagctccgagaaggtggacgtgctgcg- ggcactgggggctgagattgtgaggacgcccaccaa- tgccaggttcgactccccggagtcacacgtgggggtg- gcctggcggctgaagaacgaaatccccaattctcaca- tcctagaccagtaccgcaacgccagcaacccccctgg- ctcactacgacaccaccgctgatgagatcctgcagcagt- gtgatgggaagctggacatgctggtggcttcagtggg- cacgggcggcaccatcacgggcattgccaggaagctg- aaggagaagtgtcctggatgcaggatcattggggtgga- tcccgaagggtccatcctcgcagagccggaggagct- gaaccagacggagcagacaacctacgaggtggaagg- gatcggctacgacttcatccccacggtgctggacagg- acggtggtggacaagtggttcaagagcaacgatgagga- ggcgttcacctttgcccgcatgctgatcgcgcaagaggggg- ctgctgtgcggtggcagtgctggcagcacggtggcggtg-

Molécula	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de ácidos nucleicos de CβS humana nativa	**1**	gccgtgaaggctgcgcaggagctgcaggagggccag- cgctgcgtggtcattctgcccgactcagtgcggaacta- catgaccaagttcctgagcgacaggtggatgctgca- gaagggctttctgaaggaggaggacctcacggagaa- gaagccctggtggtggcacctccgtgttcaggagctg- ggcctgtcagccccgctgaccgtgctcccgaccatcacctg- tgggcacaccatcgagatcctccg- ggagaagggcttcgaccaggcgcccgtggtggatgagg- cgggggtaatcctgggaatggtgacgcttgggaacatg- ctctcgtccctgcttgccgggaaggtgcagccgtcagac- caagttggcaaagtcatctacaagcagttcaaacagatccg- cctcacggacacgctgggcaggctctcgcacatcctgga- gatggaccacttcgccctggtggtgcacgagcagatccag- taccacagcaccgggaagtccagtcagcggcagatggtg- ttcggggtggtcaccgccattgacttgctgaacttcgtggccg- cccaggagcgggaccagaagtga
Sequência de Polipeptídeo de CβS humana nativa	**2**	MPSETPQAEVGPTGCPHRSGPHSAKGS- LEKGSPEDKEAKEPLWIRPDAPSRCTWQL- GRPASESPHHHTAPAKSPKILPDILK- KIGDTPMVRINKIGKKFGLKCELLAK- CEFFNAGGSVKDRISLRMIEDAERDGTLK- PGDTIIEPTSGNTGIGLALAAAVRGYR- CIIVMPEKMSSEKVDVLRALGAEIVRTPT- NARFDSPESHVGVAWRLKNEIPNSHILD- QYRNASNPLAHYDTTADEILQQCDGKLD- MLVASVGTGGTITGIARKLKEKCPGCRIIGV- DPEGSILAEPEELNQTEQTTYE- VEGIGYDFIPTVLDRTVVDKWFKSNDEEAF- TFARMLIAQEGLLCGGSAGSTVA- VAVKAAQELQEGQRCVVILPDSVRNYMTK- FLSDRWMLQKGFLKEEDLTEKKPWWWHL- RVQELGLSAPLTVLPTITCGHTIEILREKG- FDQAPVVDEAGVILGMVTLGNMLSSL- LAGKVQPSDQVGKVIYKQFKQIRLTDTLGR- LSHILEMDHFALVVHEQIQYHSTGKSSQR- QMVFGVVTAIDLLNFVAAQERDQK

Molécula	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de Polipeptídeos de CβS Humana Truncada	**3**	MPSETPQAEVGPTGCPHRSG-PHSAKGSLEKGSPED KEAKEPLWIRPDAPSRCTWQLGRPA-SESPHHHTAP AKSPKILPDILKKIGDTPMVRINKIGKK-FGLKCEL LAKCEFFNAGGSVKDRISLRMIE-DAERDGTLKPGD TIIEPTSGNTGIGLALAAAVRGYR-CIIVMPEKMSS EKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDS-PESHVGVAWRL KNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDT-TADEILQQCD GKLDMLVASVGTGGTITGIARKLKEK-CPGCRIIGV DPEGSILAEPEELNQTEQTTYE-VEGIGYDFIPTVL DRTVVDKWFKSNDEEAFTFARMLIA-QEGLLCGGSA GSTVAVAVKAAQELQEGQRCVVILP-DSVRNYMTKF LSDRWMLQKGFLKEEDLTEKK-PWWWHLR
Sequência de ácidos nucleicos de CβS Humana Otimizada e Truncada	**4**	ATGCCGTCAGAAACCCCGCAGGCA-GAAGTGGGTCCGACGG GTTGCCCGCACCGTAGCGGTCCG-CATTCTGCAAAAGGCAG TCTGGAAAAAGGTTCCCCGGAAGA-

Molécula	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de ácidos nucleicos de CβS Humana Otimizada e Truncada	**4**	TAAAGAAGCCAAAGAA CCGCTGTGGATTCGTCCGGACG-CACCGTCACGCTGTACCT GGCAGCTGGGTCGTCCGGCAAG-CGAATCTCCGCATCACCA TACGGCTCCGGCGAAAAG-TCCGAAAATTCTGCCGGATATC CTGAAGAAAATTGGTGACAC-CCCGATGGTTCGTATCAACA AAATCGGCAAAAAATTCGGTCTGAA-ATGCGAACTGCTGGC TAAATGTGAATTTTTCAATGCGGG-CGGTTCCGTGAAAGAT CGTATCTCACTGCGCATGATTGAA-GATGCTGAACGCGACG GCACCCTGAAACCGGGTGATA-CGATTATCGAACCGACCTC TGGCAACACGGGTATCGGTCTGG-CACTGGCGGCGGCAGTC CGTGGTTATCGCTGCATTATCG-TGATGCCGGAAAAAATGA GCTCTGAAAAAGTTGATGTCCTG-CGTGCTCTGGGCGCGGA AATTGTTCGTACCCCGACGAATG-CCCGCTTCGACAGTCCG GAATCCCATGTGGGTGTTGCATGG-CGCCTGAAAAACGAAA TCCCGAATTCGCACATTCTGGATCA-GTATCGTAACGCTAG CAATCCGCTGGCGCATTACGATAC-CACGGCCGACGAAATC

Molécula	SEQ ID NO	Sequência
Sequência de ácidos nucleicos de CβS Humana Otimizada e Truncada	**4**	CTGCAGCAATGTGATGGCAAACTG-GACATGCTGGTCGCTT CTGTGGGTACCGGCGGTACCAT-TACGGGCATCGCGCGTAA ACTGAAAGAAAAATGCCCGGGCTG-TCGCATTATCGGTGTG GATCCGGAAGGCAGTATTCTGGCG-GAACCGGAAGAACTGA ACCAGACCGAACAAACCACGTA-TGAAGTTGAAGGCATCGG TTACGATTTTATTCCGACCGTCCTG-GATCGCACGGTGGTT GACAAATGGTTCAAAAGCAATGA-CGAAGAAGCCTTTACCT TCGCACGTATGCTGATCGCTCAG-GAAGGTCTGCTGTGCGG TGGTTCAGCAGGTTCGACGGTCG-CAGTGGCAGTTAAAGCT GCGCAGGAACTGCAAGAAGGT-CAACGTTGTGTCGTGATTC TGCCGGATTCTGTTCGCAACTACA-TGACCAAATTTCTGAG TGACCGTTGGATGCTGCAAAAAGG-CTTCCTGAAAGAAGAA GATCTGACCGAGAAAAAACCGTGG-TGGTGGCACCTGCGCT AA

REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificar proteína cistationina β-Sintase (CBS), caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer uma solução que contém proteína CBS que compreende uma ou uma pluralidade de impurezas;

(b) executar a separação cromatográfica da solução que contém proteína CBS com o uso de uma resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC) carregada com um íon de metal divalente, em que um ou uma pluralidade de impurezas são removidas através das mesmas; e

(c) realizar pelo menos uma etapa adicional de purificação selecionada do grupo que consiste em: cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de cerâmica de hidroxiapatita (CHAP); e cromatografia de troca iônica,

em que a proteína CBS compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 3 e é isenta de um marcador de purificação.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a coluna cromatográfica de troca de íon é um trocador de ânion fraco.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o trocador de ânion fraco é uma coluna DEAE-Sepharose FF.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o cátion de metal bivalente é níquel, cobre, cobalto ou zinco.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o íon de metal bivalente é zinco.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente eluir CBS da resina cromatográfica de afinidade a metal (IMAC) com um

tampão de eluição que compreende imidazol.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a solução que contém proteína CBS é uma solução de CBS clarificada.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a proteína CBS é produzida em uma célula recombinante.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a célula recombinante é uma célula bacteriana.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a solução que contém proteína CBS é obtida homogeneizando-se células bacterianas recombinantes que expressam um construto recombinante que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica CBS.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácidos nucleicos de CBS compreende a SEQ ID NO. 4.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que as células recombinantes são células de *E. coli*.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína CBS truncada é otimizada para expressão em células de *E. coli*.

FIG. 1A

Série de purificação de CBS

DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph. FF) → HIC (Butil-S Seph)

Lot No. RC-1-99

		Peso	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de atividade
CE	Pré-rotação	88.6	1.0	2655	235202	12.4	1099	214	100.0%
	Pós-rotação	85.2	1.0	2459	209498	11.3	963	218	89.1%

Rendimento de atividade (Pré-rotação e pós-rotação)		89.1%
Purificação em vezes (X)	1.0	

DEAE-FF	Col. Vol. =	61 mL	Carga de coluna /mL	Resina
			Proteína total	Unidades
			14.5	3275

	Peso	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de atividade
Carga	102.6	1.0	1947	199762	8.6	882	226	100.0%
FT	105.2	1.0	4	427	1.9	200	2	0.2%
Lavagem	159.7	1.0	1	197	0.8	128	2	0.1%
Vazio	57.6	1.0	12	716	0.2	12	62	0.4%
Eluato	47	1.0	3671	172551	6.5	306	565	86.4%
Cauda de eluato	33.7	1.0	472	15912	1.7	57	278	8.0%
2M NaCl	140.8	1.0	67	9417	2.0	282	33	4.7%
Purificação em vezes (X)	2.5					Contabilização de proteína total		Contabilização de unidades totais
						111%		100%

FIG. 1B

Série de purificação de CBS

DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph. FF) → HIC (Butil-S Seph)

Zn-IMAC	Col. Vol. =	40 mL

Carga de coluna /mL Resina	
Proteína total	Unidades
6.5	4414

	Weight	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de atividade
Carga	47.3	1.0	3733	176573	5.5	260	679	100.0%
FT	156	1.0	13	1998	0.43	67	30	1.1%
Lavagem/Vazio	54.8	1.0	22	1186	0.07	4	309	0.7%
Eluato PK1	39.4	1.0	941	37071	0.91	36	1034	21.0%
Eluato PK2	50.5	1.0	2158	108961	2.10	106	1027	61.7%
Eluato COMB PKS	88	1.0	1681	147928	1.50	132	1121	83.8%
100 mM Tira	86	1.0	64	5517	0.58	50	111	3.1%

Purificação em vezes (X)	1.5

Contabilização de proteína total	Contabilização de unidades
97%	89%

FIG. 1C

Série de purificação de CBS
DEAE-FF →Zn-IMAC (Chel. Seph. FF) →HIC (Butil-S Seph)

HIC	Col. Vol.=	23 mL

Carga de coluna /mL Resina	
Proteína total	Unidades
6.5	6745

	Peso	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de atividade
Carga	103.9	1.1	1357	155143	1.58	149	1040	100.0%
FT/Lavagem	85	1.1	26	2470	0.080	6	400	1.6%
Vazio	30.5	1.1	34	1133	0.060	2	681	0.7%
Eluato	41.1	1.1	2671	120762	2.50	93	1293	77.8%
Tira	43.8	1.0	282	13591	0.87	38	357	8.8%

Purificação em vezes (X)	1.2

Contabilização de proteína total	Contabilização de unidades
93%	89%

Recuperação de proteína total da primeira carga de coluna	Recuperação de unidades totais da primeira carga de coluna	Purificação em vezes total (X)
10.6%	60%	5.7

FIG. 2

RC-1-64 DEAE FF Série de processo de DEAE-IMAC-HIC

Data	04/21/11
Identidade de Coluna	RC-3-10

Exp. No.	RC-1-64

Col Vol =	30
Proteína total/ml de resina carregada	26 mg/mL

Identidade de fração	Peso ou Volume (g or mL)	CONV.	Proteína (mg/mL)	Proteína total em fração (mg)	Cistationina de exame (nmol.mL.hr)	Fator de diluição de exame	Unidades totais em fração	Fração S.A.	Unidades rec. (%)	% Rec. Proteína total (%)
CE Pré-rotação	37.6	1.0	20.9	784.3	46423	40	69820	89.0	100.0%	100.0%
CE Pós-rotação	36.3	1.0	20.7	752.9	52427	40	76124	101.1	109.0%	96.0%
Carga de DEAE	49.8	1.0	15.4	766.8	36740	40	73186	95.4	96.1%	101.8%
DEAE FT	49.7	1.0	3.0	151.0	3403	1	169	1.1	0.2%	20.1%
Vazio de DEAE	31	1.0	0.3	8.8	10298	1	319	36.4	0.4%	1.2%
Eluato de DEAE	24.9	1.0	5.2	130.0	63422	40	63168	485.8	83.0%	17.3%
Cauda de eluato de DEAE	18.9	1.0	1.9	35.16	69389	5	6557	186.5	8.6%	4.7%
Lavagem de DEAE	89.3	1.0	1.6	143.16	5519	1	493	3.4	0.6%	19.0%
DEAE 2M NaCl	76	1.0	3.2	241.44	13935	5	5295	21.9	7.0%	32.1%

Equilíbrio de massa	
Unidades	99.8%

Unidades de equilíbrio de massa (da carga)	Proteína de equilíbrio de massa
103.8%	94.2%

Unidades de recuperação (da carga)
86.3%

Tampões:

Equilíbrio	0.02 M Na3PO4, 0.05 M NaCl, 10% Etilenoglicol , pH 7.0
Lavagem	0.02 M Na3PO4, 0.05 M NaCl, 10% Etilenoglicol pH 7.0
Eluição	0.02 M Na3PO4, 0.137 M NaCl, 10% Etilenoglicol , pH 7.0
Tira	2 M NaCl
Higienizar	1.0 M NaOH

FIG. 3

Série de purificação de CBS

DEAE-FF →Zn-IMAC (Chel. Seph. FF) →HAP (Tipo de cerâmica) **→HIC** (Butil-S Seph)

Lot No. RC-1-103

		Peso	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de atividade
CE	Pré-rotação	87.1	1.0	3369	293422	13.9	1211	242	100.0%
	Pós-rotação	100.4	1.0	3050	306270	11.7	1175	261	**104.4%**

Rendimento de atividade (Pré-rotação e pós-rotação)	**104.4%**
Purificação em vezes (X)	**1.1**

DEAE-FF Col. Vol = 60 mL

Carga de coluna /mL	Resina
Proteína total	Unidades
19.6	5105

	Peso	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de Atividade
Carga*	100.4	1.0	3050	306270	11.7	1175	261	100.0%
FT	102.6	1.0	6	585	2.3	236	2	0.2%
Lavagem	164.6	1.0	2	410	1.0	165	2	0.1%
Vazio	56.3	1.0	11	644	0.3	17	38	0.2%
Eluato	52.6	1.0	4976	261744	7.2	379	691	**85.5%**
Cauda de eluato	30.6	1.0	441	13488	1.3	40	339	4.4%
2M NaCl	115.4	1.0	75	8635	3.0	346	25	2.8%
						Contabilização de proteína total		Contabilização de unidades totais
						101%		**93%**

Purificação em vezes (X)	**2.7**

*Mesma carga que a pós-rotação

Diluição ocorrida durante o balanceamento de tubos para centrifugação

FIG. 3 Cont.

Série de purificação de CBS

DEAE-FF →Zn-IMAC (Chel. Seph. FF) →HAP (Tipo de cerâmica 1) **→HIC** (Butil-S Seph)

Zn-IMAC Col. Vol.= 40 mL

Carga de coluna /mL Resina	
Proteína total	Unidades
9.3	6337

	Peso	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de atividade
Carga	52.9	1.0	4792	253492	7.0	370	685	100.0%
FT/Lavagem	144.9	1.0	23	3388	0.65	94	36	1.3%
Vazio	52.3	1.0	64	3355	0.16	8	401	1.3%
Eluato COMB PKS	82.6	1.0	2457	202919	2.67	221	920	**80.0%**
100 mM Tira	89	1.0	19	1689	0.15	13	127	0.7%
						Contabilização de proteína total		Contabilização de unidades
Purificação em vezes (X)	1.3							
*Precipitação observada em amostra de tira						**91%**		**83%**

HAP Col. Vol.= 18 mL

Carga de coluna /mL Resina	
Proteína total	Unidades
12.2	11205

	Peso	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de atividade
Carga	82.1	1.0	2457	201691	2.67	219	920	100.0%
FT/Lavagem	132.2	1.0	26	3383	0.08	11	320	1.7%
Eluato	37.5	1.0	4552	170694	4.34	163	1049	**84.6%**
Tira	34.5	1.0	348	12013	0.55	19	633	6.0%
						Contabilização de proteína total		Contabilização de unidades
Purificação em vezes (X)	1.1							
						88%		**92%**

FIG. 3 Cont.

Série de purificação de CBS

DEAE-FF →Zn-IMAC (Chel. Seph. FF) →HAP (Tipo de cerâmica 1) **→HIC** (Butil-S Seph)

HIC	Col. Vol.=	21 mL

Carga de coluna /mL Resina	
Proteína total	Unidades
7.2	8447

	Peso	CONV.	U/mL	Total U	mg/mL	Total mg	S.A.	Rec. de atividade
Carga	43.8	1.1	3682	177384	3.82	152	1166	100.0%
FT/Lavagem	105.7	1.1	1	96	0.020	2	50	0.1%
Vazio	28.7	1.1	4	126	0.020	1	241	0.1%
Eluato	44.9	1.1	3251	160544	3.26	***133***	***1206***	**90.5%**
Tira	40.2	1.0	325	14375	0.54	22	662	8.1%
Purificação em vezes (X)	**1.0**					Contabilização de Proteína Total		Contabilização de unidades
						103%		**99%**

Recuperação de proteína total da primeira carga de coluna	Recuperação de unidades totais da primeira carga de coluna	Purificação em vezes total (X)
11.3%	**52%**	**4.6**

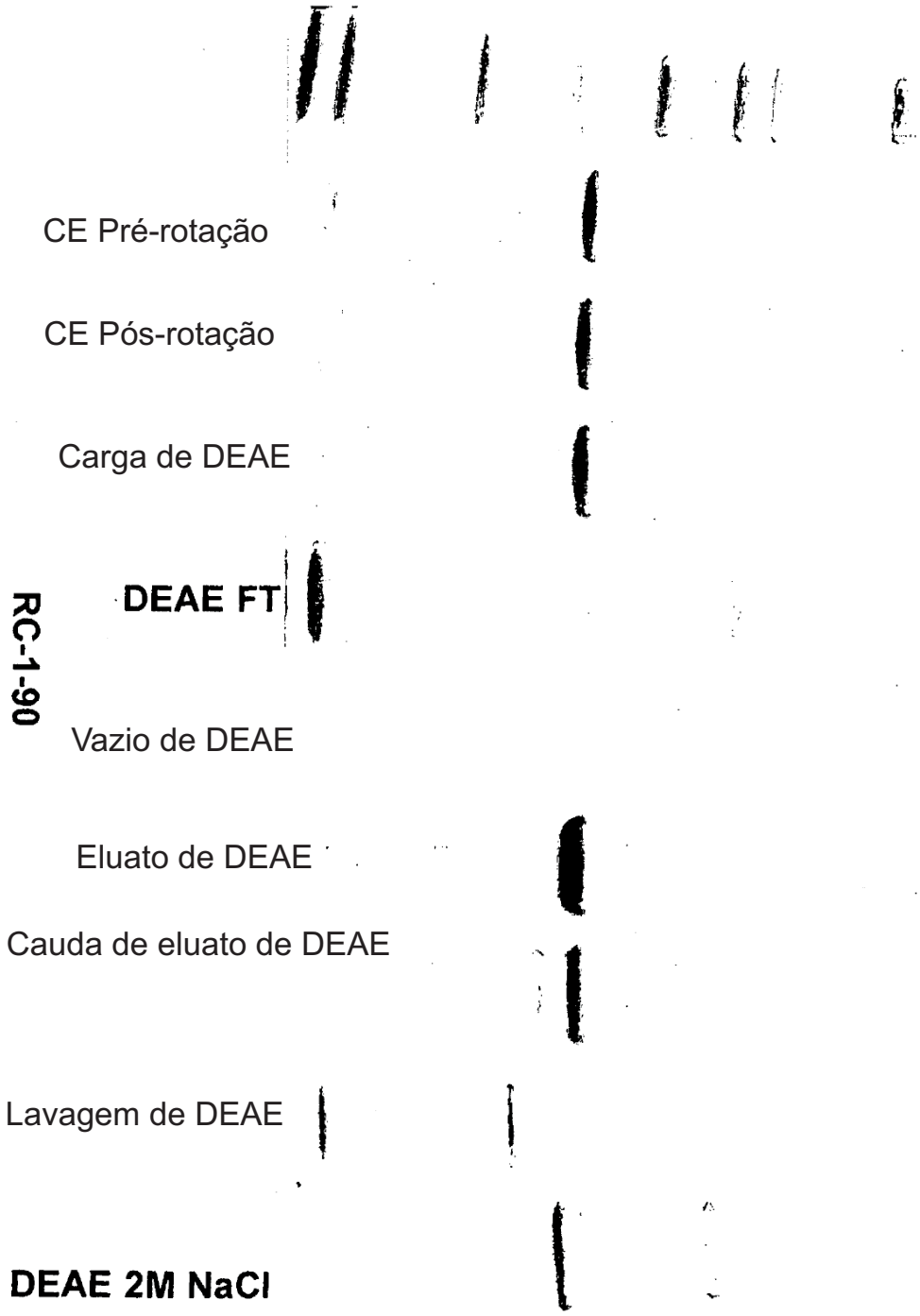

CE Pré-rotação
CE Pós-rotação
Carga de DEAE
DEAE FT
RC-1-90
Vazio de DEAE
Eluato de DEAE
Cauda de eluato de DEAE
Lavagem de DEAE
DEAE 2M NaCl

FIG. 4

FIG. 5

FIG. 6

FIG. 7A

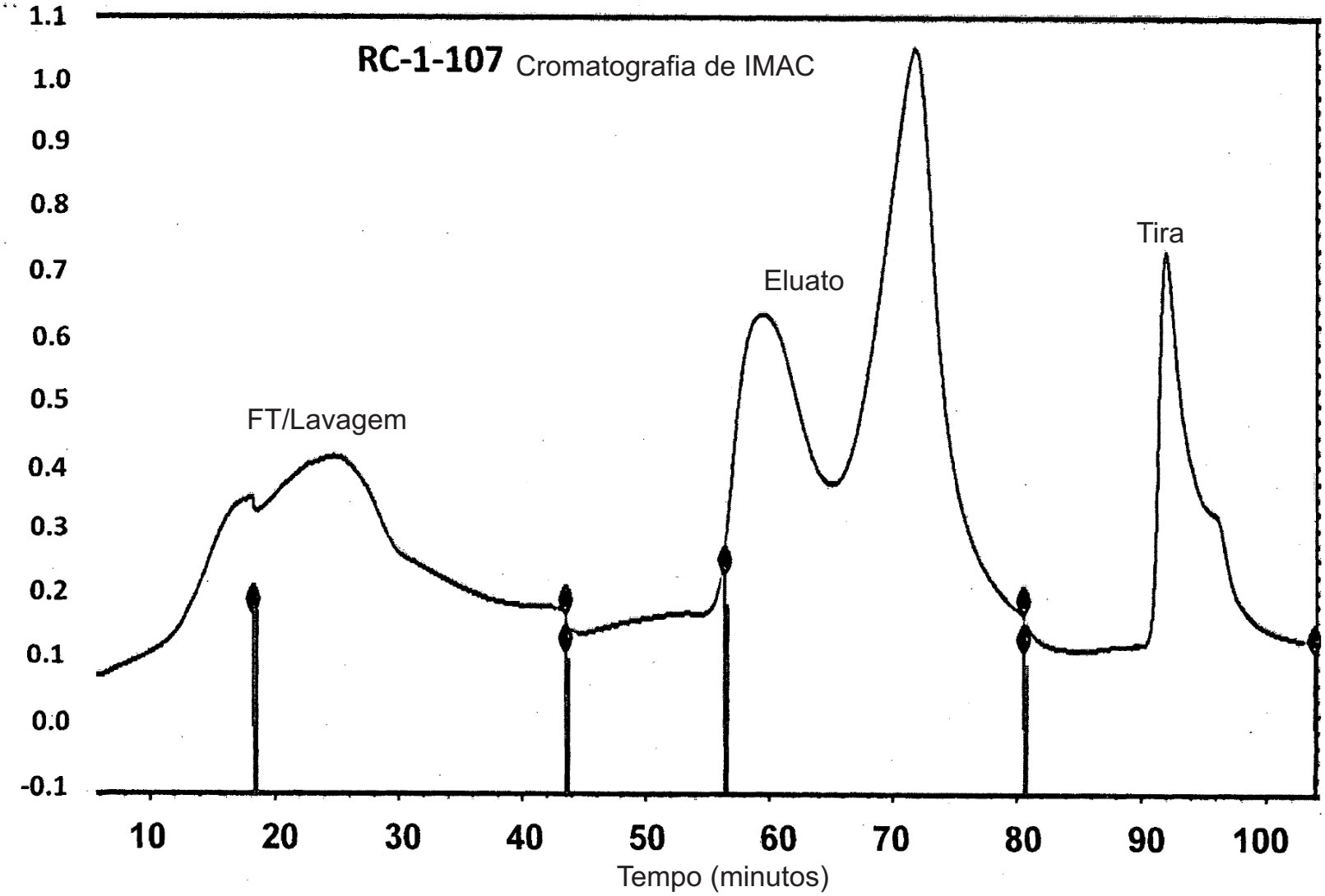

RC-1-107 Cromatografia de IMAC
FT/Lavagem
Eluato
Tira
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Tempo (minutos)

FIG. 7B

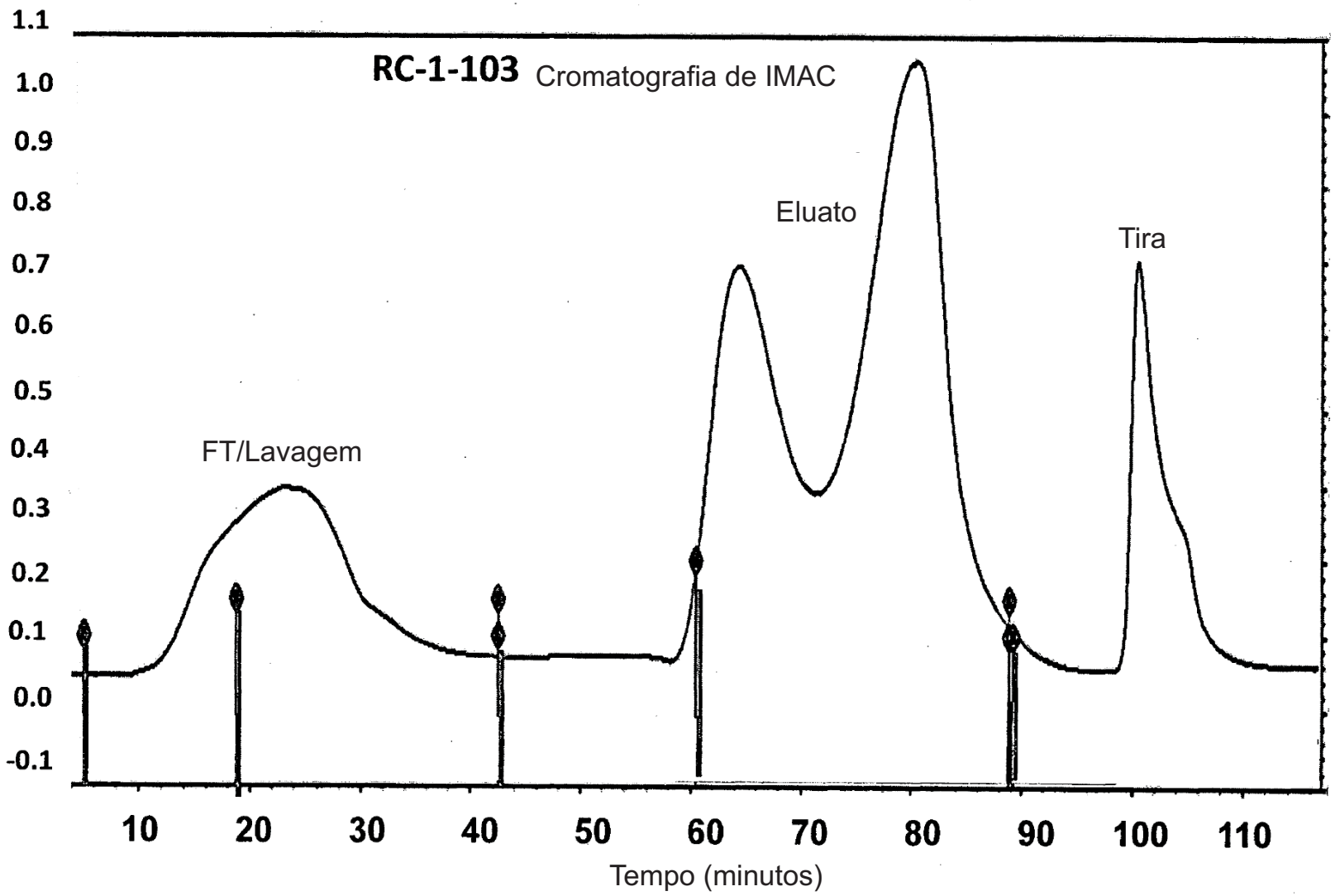

RC-1-103 Cromatografia de IMAC
FT/Lavagem
Eluato
Tira
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Tempo (minutos)

FIG. 8

Data	04/06/11
Identidade de coluna	RC-3-

Exp. No.	RC-1-57 IMAC

Col Vol =		9
Proteína total/ml de resina carregada	29	mg/mL

Identidade de fração	Peso ou Volume (g ou mL)	CONV.	Proteína (mg/mL)	Proteína total na fração (mg)	Cistationina de exame (nmol.mL.hr)	Fator de diluição de ensaio	Unidades totais em fração	Fração de S.A.	Unidades rec. (%)	Proteína total de rec (%)
CE	16	1.0	15.3	244.1	76039	20	24332	100	100.0%	100.0%
Carga IMAC	34.7	1.0	7.6	264.7	40808	20	28321	107	116.4%	108.5%
IMAC FT	34.3	1.0	2.3	77.9	50	20	34	0	0.1%	31.9%
Lavagem Equil IMAC	32.6	1.0	2.8	91.6	4111	1	134	1	0.5%	37.5%
IMAC 5mM Imid.	34.3	1.0	0.6	19.2	9211	1	316	16	1.1%	7.9%
Vazio IMAC	6.9	1.0	0.4	3.0	3813	1	264	89	0.9%	1.2%
Parte frontal de eluato IMAC	14	1.0	0.7	9.8	77625	1	1087	110	3.8%	4.0%
Eluato IMAC	16.6	1.0	4.6	77.2	75941	20	25212	327	89.0%	31.6%
Cauda de eluato IMAC	6.7	1.0	1.4	9.3	40388	5	1353	145	4.8%	3.8%
IMAC 100mM Imid.	38	1.0	0.4	16.7	29197	1	1109	66	3.9%	6.8%

Unidades de equilíbrio de massa	Proteína de equilíbrio de massa
104.2%	115.1%

Tampões

Carga	50 mM NiSO4
Equilíbrio	0.02 M Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.002 M Imidazole, 0.01%Triton, pH 7.0
Lavagem	0.02 M Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.005 M Imidazole, 0.01%Triton, pH 7.0
Eluição	0.02 M Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.050 M Imidazole, 0.01%Triton, pH 7.0
Tira	100 mM Imidazole
Higienizar	1 M NaOH
Armazenamento	0.001 M NaOH

Ensaio Bradford (proteína total)

RC-1-57 IMAC

FIG. 9

Data: 4/7/2011

Curva padrão: Estoque de BSA: 2000 ug/mL

Nº de cavidade	ug/mL BSA	BSA (uL)	Água (uL)
1	0	0	40
2	50	1	39
3	125	2.5	37.5
4	250	5	35
5	500	10	30
6	750	15	25
7	1000	20	20

Para 10 ml por padrão executar em triplicata

Amostras

Número de amostras que não inclui triplicatas: **10**

Quantidade de reagente Bradford necessária: **19**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Padrão 1	Padrão 1	Padrão 1	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 9	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 17	Amostra 17
B	Padrão 2	Padrão 2	Padrão 2	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 18	Amostra 18
C	Padrão 3	Padrão 3	Padrão 3	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 11	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 19	Amostra 19
D	Padrão 4	Padrão 4	Padrão 4	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 12	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 20	Amostra 20
E	Padrão 5	Padrão 5	Padrão 5	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 21	Amostra 21
F	Padrão 6	Padrão 6	Padrão 6	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 22	Amostra 22
G	Padrão 7	Padrão 7	Padrão 7	Amostra 7	Amostra 7	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 15	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 23	Amostra 23
H				Amostra 8	Amostra 8	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 16	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 24	Amostra 24

1 Remover quantidade apropriada de reagentes e deixá-los chegar à TA
2 Adicionar 10 ul de padrão ou amostra para cada cavidade
3 Adicionar 300 ul de reagente para cada cavidade com o uso de pipetas de canais múltiplos
4 Incubar em TA
5 Ler em VersaMax

		Diluição	Proteína (uL)	Água (uL)	**Bradford (ug/mL)**	ug/uL
1	**CE**	100	2	198	**15255.9**	15.2559
2	Carga IMAC	50	4	196	**7629.2**	7.6292
3	**IMAC FT**	50	4	196	**2270.7**	2.2707
4	Lavagem de equil IMAC	25	8	192	**2810.3**	2.8103
5	**AC 5mM** Lavagem de Imidazol	10	20	180	**559.3**	0.5593
6	Vazio de IMAC	10	20	180	**432.3**	0.4323
7	Parte frontal de eluato de IMAC	10	20	180	**702.7**	0.7027
8	Eluato IMAC	50	4	196	**4649.2**	4.6492
9	Cauda de eluato IMAC	25	8	192	**1389**	1.389
10	**IMAC 100mM** Imidizol	10	20	180	**439.3**	0.4393

FIG. 10A

Gel 1

Via	Amostra	TP Conc. (ug/ul)	Conc. Para gel (ug)	Diluição (X)	Tampão de amostra (ul)	Proteína (para 10 ug/25 ul)	ddH2O (ul)	
1	Padrão BIORAD	--	--	1	12.5	1.00	11.50	
2	CE	15.256	10	1		0.66	11.84	
3	Carga IMAC	7.6292	10	1		1.31	11.19	
4	IMAC FT	2.2707	10	1		4.40	8.10	
5	Lavagem de equil IMAC	2.8103	10	1		3.56	8.94	
6	Lavagem de 5 mM de imidizol de IMAC	0.5593	10	1		12.50	0.00	Apenas 7 ug carregados

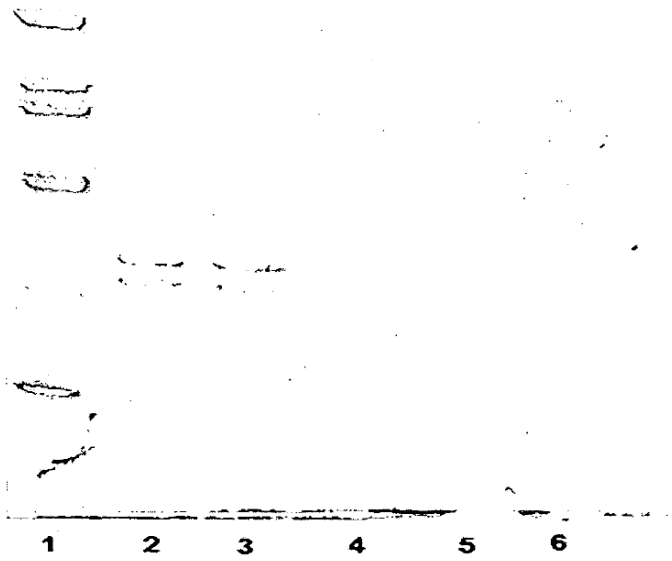


FIG. 10B

Gel 1:

Via	Amostra	TP Conc. (ug/ul)	Conc. Para gel (ug)	Diluição (X)	Tampão de amostra (ul)	Proteína (para 10 ug/25 ul)	ddH2O (ul)	
1	Padrão BIORAD	--	--	1	12.5	1.00	11.5	
2	Carga IMAC	0.4323	10	1		12.50	0.00	Apenas 5,4 ug carregados
3	Eluato anterior IMAC	0.7027	10	1		12.50	0.00	Apenas 8,78 ug carregados
4	Eluato IMAC	4.6492	10	1		2.15	10.35	
5	Cauda de eluato IMAC	1.389	10	1		7.20	5.3	
6	IMAC 100mM Imidizol	0.4393	10	1		12.50	0.00	Apenas 5,49 ug carregados

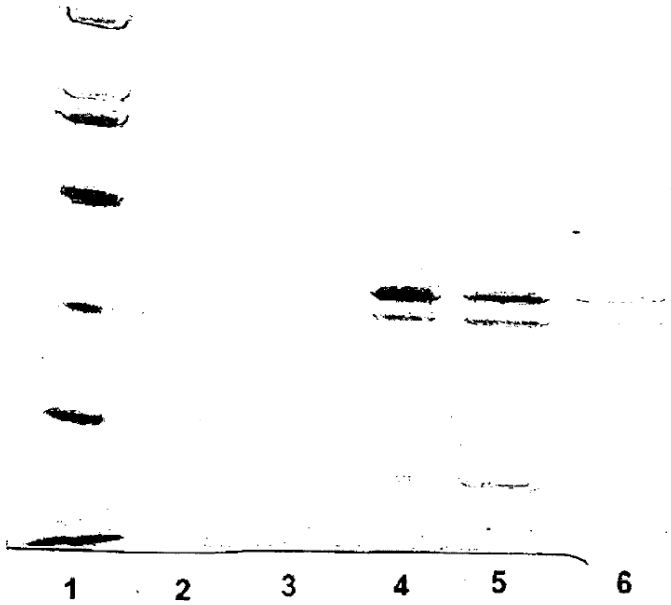


FIG. 11

Extrato bruto de CBS em Sepharose FF quelante

Data	02/18/11
Identidade de coluna	RC-3-2 Quelante Seph. FF

Exp. No.	RC-1-39

Col Vol.= 6.2 mL

Note: Nota: coluna carregada a 6,2 ml

Proteína total/ml de resina carregada 14 mg/mL

ID de fração	Peso ou volume (g ou mL)	CONV.	Proteína (mg/mL)	Proteína total em fração	Cistationina de ensaio (nmol.mL.hr)	Fator de diluição de ensaio	Unidades totais em fração	Fração de S.A.	Unidades rec. (%)	Proteína total de rec. (%)
CE	11	1.0	8.0	88.0	74067	10	8147	92.6	100.0%	100.0%
Carga	11.4	1.0	8.1	92.3	82223	10	9373	101.5	115.0%	104.9%
Vazio	16	1.0	0.3	4.8	7	1	0	0.0	0.0%	5.5%
FT/lavagem	62	1.0	1.2	74.4	5939	1	368	4.9	4.5%	84.5%
Eluato	25	1.0	2.1	52.5	56851	5	7106	135.4	87.2%	59.7%
500 mM Tira de imidizol	36	1.0	0.2	7.2	1152	1	41	5.8	0.5%	8.2%

Recuperação em eluato (da carga) 75.8%

Unidades de equilíbrio de massa (de CE)	Proteína de equilíbrio de massa
92.3%	152.4%

Unidades de equilíbrio de massa (de carga) 80.2%

Tampões

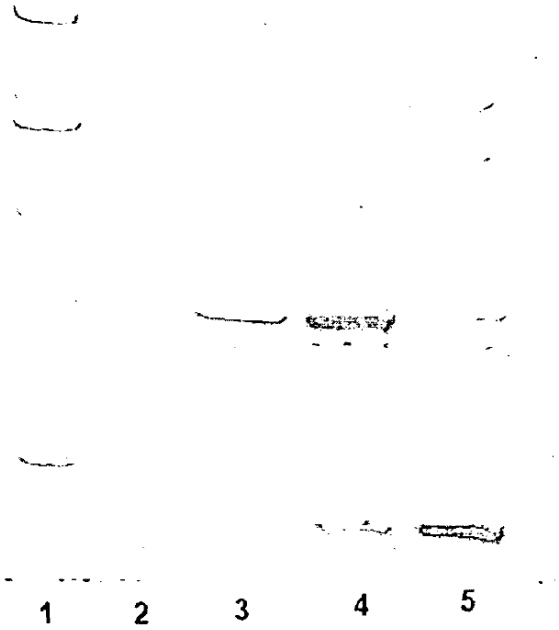
Equilíbrio	0.02 Fosfato , 0.002 M Imidazol , 0.4 M NaCl, pH 7.0
Lavagem	0.02 Fosfato , 0.002 M Imidazol , 0.4 M NaCl, pH 7.0
Eluição	0.02 Fosfato , 0.1 M Imidazol , 0.4 M NaCl, pH 7.0
Tira	0.5 M Imidazol
Higienizar	1.0 M NaOH
Armazenamento	0.001 M NaOH

FIG. 12

Ensaio Bradford (proteína total)					RC-1-63							
Data:	4/18/2011											
Curva padrão:			BSA Stock:	2000	ug/mL		Amostras:					
		Nº de cavidade	ug/mL BSA	BSA (uL)	Água (uL)		Número de amostras (não inclui triplicatas)				6	
		1	0	0	40							
		2	50	1	39		Quantidade de reagente Bradford necessária				15.4	
		3	125	2.5	37.5							
		4	250	5	35							
		5	500	10	30							
		6	750	15	25							
		7	1000	20	20							
		Para 10 ul por padrão executar em triplicata										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Padrão 1	Padrão 1	Padrão 1	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 9	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 17	Amostra 17
B	Padrão 2	Padrão 2	Padrão 2	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 18	Amostra 18
C	Padrão 3	Padrão 3	Padrão 3	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 11	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 19	Amostra 19
D	Padrão 4	Padrão 4	Padrão 4	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 12	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 20	Amostra 20
E	Padrão 5	Padrão 5	Padrão 5	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 21	Amostra 21
F	Padrão 6	Padrão 6	Padrão 6	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 22	Amostra 22
G	Padrão 7	Padrão 7	Padrão 7	Amostra 7	Amostra 7	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 15	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 23	Amostra 23
H				Amostra 8	Amostra 8	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 16	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 24	Amostra 24
1	Remover quantidade apropriada de reagentes e deixá-los chegar à TA											
2	Adicionar 10 ul de padrão ou amostra para cada cavidade											
3	Adicionar 300 ul de reagente a cada cavidade com o uso de pipetas de canais múltiplos											
4	Incubar em TA											
5	Ler em VersaMax											
Nº de amostra			Diluição	Proteína (uL)	Água (uL)	Bradford (ug/mL)	ug/uL					
1	Carga de CE pós-rotação		100	2	198	32187.209	32.187209					
2		Lavagem de equil	20	10	190	11830.182	11.830182					
3		FT	10	20	180	3310.385	3.310385					
4		5mM Lavagem	10	20	180	252.568	0.252568					
5		8mM Lavagem	10	20	180	670.278	0.670278					
6		20mM Lavagem	10	20	180	524.895	0.524895					

FIG. 13

Via	Amostra	TP Conc. (ug/ul)	Conc. para gel (ug)	Diluição (X)	Tampão de amostra (ul)	Proteína (para 10 ug/25 ul)	ddH2O (ul)	
1	Padrão BIORAD	--	--	1	12.5	1.00	11.50	
2	Lavagem de equil	11.83	10	1		0.85	11.65	
3	5mM Lavagem	0.2526	10	1		12.50	0.00	3,16 ug de proteína carregada
4	8mM Lavagem	0.6703	10	1		12.50	0.00	8,38 ug de proteína carregada
5	20mM Lavagem	0.5249	10	1		12.50	0.00	6,56 ug de proteína carregada



Fluxograma de processo

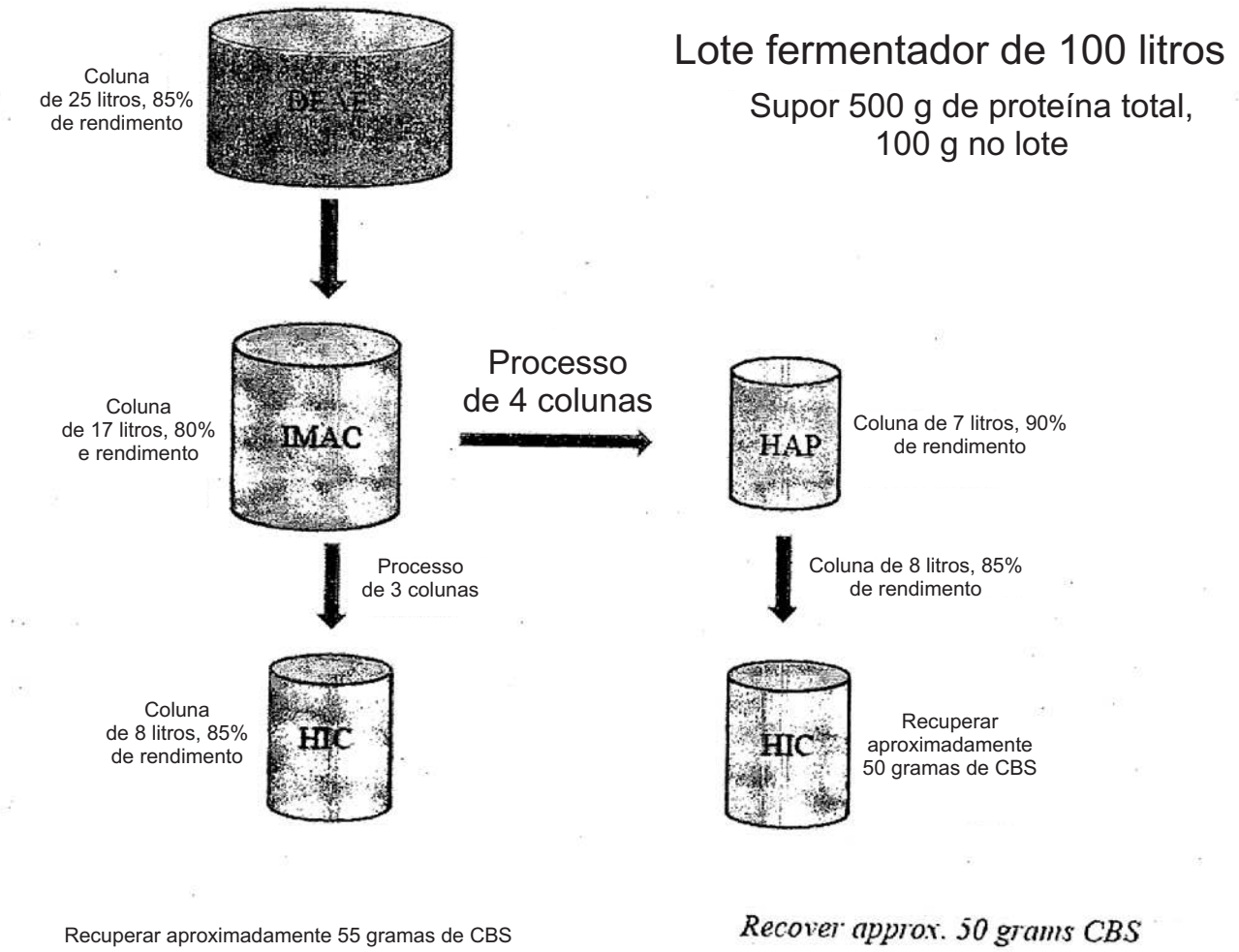



FIG. 14