

Separação e Purificação de Produtos Biofarmacêuticos

Carga horária: 45 horas

Objetivo:

Capacitar o aluno a desenvolver processos de purificação, desde etapa de separação de células do sobrenadante de cultivo celular até a purificação final (polimento), garantindo a capacidade de remoção de vírus e demais contaminantes considerados críticos na indústria biofarmacêutica.

Ementa:

Etapas de um processo de separação e purificação. Propriedades de biomoléculas (proteínas, vírus, DNA) e sua influência no processo de purificação. Técnicas de purificação de proteínas: precipitação fracionada, extração em sistemas de duas fases aquosas e processos de cromatografia líquida. Processos de remoção viral. Aumento de escala. Sistemas de uso único ("single use").

Programa:

Teórico (30 horas)

Introdução. Processos de fabricação de bioprodutos: processamento "upstream" e "downstream". Estrutura geral de processos de purificação para bioprodutos intracelulares e extracelulares. Requerimentos de pureza para produtos biofarmacêuticos. Etapas de um processo de purificação na indústria biofarmacêutica e suas características. Propriedades bioquímicas, físico-químicas e de estabilidade de produtos e contaminantes e sua influência no processo. Atributos críticos de qualidade do produto, contaminantes críticos relacionados ao produto e ao processo e requisitos regulatórios associados ao processamento "downstream" (5 h).

Técnicas analíticas para desenvolvimento e monitoramento de processos de purificação. Dosagem de proteínas totais, eletroforese (SDS-PAGE), "Western blot", imunoenaios do tipo ELISA, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), ensaios de atividade biológica, ensaios para avaliação da estrutura proteica e para monitoramento da estabilidade do produto ao longo do processo (dicroísmo circular, técnicas baseadas em fluorescência e outras) (3 h).

Técnicas de separação de células e de processamento de produtos intracelulares. Técnicas de separação de células por centrifugação, filtração convencional e com membranas, sedimentação e outras. Métodos físicos, químicos e enzimáticos de rompimento celular. Processos de solubilização e renaturação de produtos recombinantes intracelulares expressos na forma de corpos de inclusão (5 h).

Técnicas de purificação de baixa resolução e alta capacidade. Precipitação fracionada de proteínas. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. Diafiltração (2 h).

Técnicas de purificação de alta resolução. Princípios gerais da cromatografia líquida de proteínas. Processos cromatográficos com finalidade preparativa. Tipos de suporte: resinas, membranas e monolitos. Capacidade adsorptiva estática (em equilíbrio) e dinâmica. Técnicas de cromatografia baseadas em exclusão molecular, troca iônica, hidrofobicidade e afinidade bioespecífica. Técnicas multimodais. Processos em modo de cromatografia de adsorção-dessorção ("bind-elute mode") e em modo de cromatografia negativa ("flow-through mode"). Processos cromatográficos pseudo-contínuos e contínuos (5 h).

Remoção viral. Processos de inativação viral. Processos de filtração viral. Validação da remoção ("clearance") viral em modelos miniaturizados segundo as normas regulatórias internacionais (ICH) (3 h).

Avaliação de desempenho de processos de purificação. Resolução de separação. Capacidade de processamento. Fator de concentração. Fator de purificação. Rendimento/recuperação. Remoção de contaminantes críticos. Número de etapas versus desempenho do processo (2 h).

Estabelecimento de processos em larga escala. Aumento de escala de processos de separação e purificação: etapas de separação de células, extração em sistemas de duas fases aquosas, precipitação fracionada de proteínas e cromatografia líquida. Princípios gerais relacionados ao projeto e operação das etapas de processamento "downstream" em plantas biofarmacêuticas sob condições de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Emprego de sistemas de uso único ("single use") para preparo de soluções e técnicas de purificação (5 h).

Prático (15 horas)

Comparação de técnicas de separação celular: sedimentação e microfiltração. Processos cromatográficos: empacotamento de colunas, determinação da capacidade adsorptiva dinâmica de diferentes tipos de adsorventes (resinas e membranas) a diferentes vazões, emprego de sistema em microplacas para comparação de técnicas e condições cromatográficas, purificação cromatográfica em sistema preparativo, eluição em gradiente e em degraus. Análise de amostras por SDS-PAGE e HPLC.

Análise de resultados utilizando o software Excel e elaboração de tabela com o desempenho do processo de purificação.

Bibliografia:

Referências principais:

1. Scopes RK (1994), Protein Purification: Principles and Practice. 3ª ed. Berlim: Springer.
2. Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (2008), Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica. São Paulo: Editora Roca.
3. Carta G, Jungbauer A (2010), Protein Chromatography: Process Development and Scale-up. Nova Iorque: Wiley.

Referências complementares:

4. Behme S (2009), Manufacturing of Pharmaceutical Proteins: from Technology to Economy. Nova Iorque: Wiley.
5. Pessoa Jr A, Kilikian B (2005), Purificação de produtos biotecnológicos. São Paulo: Manole.
6. Janson J (2011), Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods and Applications. 3ª ed. Nova Iorque: Wiley.
7. Rathore AS, Velayudhan A (2003), Scale-up and Optimization in Preparative Chromatography: Principles and Biopharmaceutical Applications. Nova Iorque: Marcel Dekker.
8. Walsh G (2003), Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology. Chichester: Wiley-Blackwell.