UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

"Avaliação da resistência de formas mutantes da enzima L-asparaginase a proteases séricas humanas"

Marcela Valente Pimenta da Fonte

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Monteiro

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

"Avaliação da resistência de formas mutantes da enzima L-asparaginase a proteases séricas humanas"

Marcela Valente Pimenta da Fonte

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Monteiro

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Pimenta, Marcela Valente
P644a Avaliação da resistência de formas mutantes da enzima L-asparaginase a proteases séricas humanas / Marcela Valente Pimenta. -- São Paulo, 2018.
85p. + Anexos

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Monteiro, Gisele

1. Biotecnologia farmacêutica 2. Engenharia genética 3. Enzima biotecnologia I. T. II. Monteiro, Gisele, orientador.

615.1 CDD

Marcela Valente Pimenta da Fonte

"Avaliação da resistência de formas mutantes da enzima L-asparaginase a proteases séricas humanas"

Comissão Julgadora
Da Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Gisele Monteiro
orientadora/presidente

_____

1o. examinador

_____

2o. examinador

_____

3o. examinador

_____

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

AGRADECIMENTOS

Á Profa. Dra. Gisele Monteiro pela oportunidade de tê-la como orientadora, agradeço pela confiança, amizade e paciência. Sua competência e profissionalismo são de minha admiração. Tenho muito orgulho de tê-la participante da minha formação em ciência.

Ao Pesquisador Dr. José Andres Yunes, Dra. Priscila Pinni Zenatti e MSc. Natasha Azussa Migita, pela colaboração e parceria vitais na execução desse trabalho.

Á Profa. Dra. Sandra Farsky e Dr. Christiano Vaz Barbosa pela colaboração e ensinamentos nos ensaios de citotoxicidade.

Á CAPES pela concessão de Bolsa de Doutorado.

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Projeto temático n. 2013/08617-7.

Á Mariane Rodrigues, pela oportunidade de dar continuidade ao seu trabalho, estendo esse agradecimento a todos os colegas de laboratório, e colegas da USP, pelos seus conselhos, auxílios e incentivos, que foram essenciais na execução desse trabalho. Á Iris pela amizade sempre presente, conselhos e conversas.

Ao meu marido Raul, por todo o fundamental apoio, e por acreditar em mim. A minha mãe Valéria e irmã Fernanda, por estarem sempre ao meu lado. Ao meu filho Bruno, por me motivar a ultrapassar meus limites por você. Ao meu pai, pelo legado de amor deixado na minha vida.

“*Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”*

Isaac Newton

RESUMO

PIMENTA, M. V. **Avaliação da resistência de formas mutantes da enzima L-asparaginase a proteases séricas humanas**

O tratamento para a Leucemia Linfoblástica Aguda LLA utiliza, entre outros fármacos, a enzima L-asparaginase (ASNase) proveniente da bactéria *Escherichia coli*. Reações imunológicas estão entre os problemas do tratamento com ASNase, e a formação de anticorpos contra essa proteína pode impedir o sucesso no tratamento. Duas cisteíno proteases lisossomais estão relacionadas com a degradação de ASNase nos seres humanos, a Catepsina B (CTSB) e Asparagina Endopeptidase (AEP). Em estudos prévios do nosso grupo obteve-se mutantes de ASNase resistentes a degradação por CTSB e/ou AEP *in vitro*. Nesse trabalho avaliamos essas mutantes quanto a sua citotoxicidade em linhagens celulares de leucemia e conduzimos estudos *in vivo*, aplicando as proteoformas de ASNases em camundongos Balb C para avaliar a atividade asparaginase sérica das enzimas ao longo do tempo, bem como obter informações sobre a formação de anticorpos contra essas proteoformas. Nos ensaios de citotoxicidade, duas das proteoformas testadas tiveram efeito citotóxico semelhante a forma selvagem, enquanto uma outra proteoforma tem a citotoxicidade sensivelmente reduzida. Já nos ensaios *in vivo*, uma proteoforma demonstrou meia vida sérica maior da atividade asparaginásica, e duas proteoformas causaram reduzida formação de anticorpos. Juntos, esses resultados colaboram para a obtenção de uma nova geração de ASNases com melhor biodisponibilidade, e efeitos adversos reduzidos, gerando a possibilidade de menores doses e frequência de aplicações.

Palavras chave: L-asparaginase, Catepsina B, Asparagina Endopeptidase, Leucemia Linfoblástica Aguda, Melhoramento de Biofármacos.

ABSTRACT

PIMENTA, M. V. **Evaluation of L-asparaginase mutant forms resistance to human serum proteases,**

The Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) includes the biopharmaceutical L-asparaginase (ASNase) from *Escherichia coli.* Immunological reactions are among the problems of treatment using ASNase, and the antibodies formation protein may prevent success in treatment. Lysosomal cysteine proteases are related to ASNase degradation, Cathepsin B (CTSB) and Asparagine Endopeptidase (AEP). In previous studies, ASNase mutants resistant to CTSB and / or AEP degradation in vitro were obtained. In this work, mutants were evaluated in cytotoxicity in ALL cell lines and, *in vivo* studies, applying doses of the wild and mutant ASNases in Balb C mice to evaluate serum asparaginase activity of the enzymes over time, as well as to obtain information on the formation of antibodies against these proteoforms. Regarding to the cytotoxicity, two proteoforms among the tested had similar cytotoxicity than the wild-type. While another proteoform had the cytotoxicity severely reduced. One proteoform have demonstrated greater serum half-life of asparaginase activity, while two other mutants caused reduced antibody formation. Together, these results collaborate to obtain a new generation of ASNases with increased bioavailability and reduced side effects, generating the possibility of lower doses and frequency of applications.

Keywords: L-asparaginase, Cathepsin B, Asparagine Endopeptidase, Acute Lymphoblastic Leukemia, Biopharmaceutical improvement.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação da L-asparaginase.....19

Figura 2 – Sequência de aminoácidos da asparaginase de *E. coli*.....21

Figura 3 – Figura adaptada da dissertação de Rodrigues, M. A. D. (2016). SDS-PAGE com os resultados do ensaio de resistência as cisteíno-proteases CTSB e AEP.....31

Figura 4 – Gel de SDS-PAGE redutor de frações eluídas da cromatografia de Exclusão Molecular.....47

Figura 5 – Gráficos de Sobrevivência de Linhagens Celulares expostas a proteoformas de asparaginase (0,01 – 1 U.I./mL) obtidos através do ensaio MTT. Linhagens Molt 4 e REH.....50

Figura 6 – Gráficos de Sobrevivência de Linhagens Celulares derivadas de T-LLA quando exposta a proteoformas de asparaginase. Linhagens HPB-ALL, CCRF-CEM e Jurkat.....52

Figura 7 – Gráficos de Sobrevivência de Linhagens Celulares derivadas de B-LLA quando exposta a proteoformas de asparaginase. Linhagens RS4;11, Nalm6 e REH.....55

Figura 8 – Avaliação da Atividade Asparaginásica no Plasma de Camundongos.....60

Figura 9 – Comparação entre as atividades de asparaginase medidas no plasma de camundongos na quinta semana de aplicação *versus* a primeira semana do novo grupo de camundongos 62

Figura 10 – Avaliação da Atividade Asparaginase no plasma dos Camundongos –Novo grupo.....68

Figura 11 – Comparação do ensaio de ELISA entre o plasma dos camundongos na segunda semana (525 U.I./kg) e quinta semana (1040 U.I./kg).....70

Figura 12: Análise *in silico* de epítopos da asparaginase de *E. coli*.....73

Figura 13 – Ensaio de ELISA para identificação de anticorpos anti-ASNase – Novo grupo. 74

LISTA DE ABREVIATURAS

AEP	Asparagina Endopeptidase
AGA	Aspartilglucosaminosidase lisossomal
AHA	Ácido L-aspártico β-hidroxamato
ASNase	Asparaginase
asnB	Gene codificador da asparaginase de *E. coli*
ASNS	L-asparagina sintetase
ASPG	Lipofosfolipase humana
CEUA	Comissão de Ética Em Uso de Animais
CTSB	Catepsina B
DTT	Ditiotreitol
*Ec*_ASNase	Asparaginase de *E. coli* tipo II
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
*Erw*_ASNase	Asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* tipo II
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FPLC	Sistema Rápido de Cromatografia Liquida de Proteína (do inglês *Fast Protein Liquid Chromatography*)
hASNase3	Asparaginase humana
INCA	Instituto Nacional de Câncer

IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
K_M	Constante de Michaelis - Menten
LB	*Lysogenic – Broth*
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato)
NC-IUBMB	Comitê Internacional de Nomenclaturas da União de Bioquímica e Biologia Molecular
PDB	*Protein Data Bank*
PDP	Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo
PEG-ASNase	Asparaginase de *E. coli* peguilada
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VC	Volumes de Coluna
WT	Forma selvagem (do inglês *Wild – Type*)

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
E	Glu	Glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

1.1 A ENZIMA L-ASPARAGINASE. 18

1.2 A ENZIMA L-ASPARAGINASE DE *E. coli*. 21

1.3 A ENZIMA ASNase NO TRATAMENTO DA LLA. 22

1.4 A ASPARAGINASE NO CONTEXTO BRASILEIRO. 26

1.5 ASPARAGINASE E SUA RELAÇÃO COM CISTEÍNO-PROTEASES LISOSSOMAIS. 28

1.6 TRABALHOS DESENVOLVIDOS PREVIAMENTE. 30

2. OBJETIVOS 33

3. MATERIAL E MÉTODOS 34

3.1 MEIOS DE CULTURA. 34

3.2 ANTIBIÓTICOS. 34

3.3 MARCADORES DE MASSA MOLAR. 34

3.4 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS. 35

3.5 VETORES PARA EXPRESSÃO DE EC_ASNASE EM *E. coli*. 34

3.6 LINHAGEM DO MICRORGANISMO. 35

3.7 EQUIPAMENTOS. 35

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA. 36

3.9 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS. 37

3.9.1 Cultivo da cepa produtora.

3.9.2 Purificação das enzimas. 38

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE ASPARAGINASE E ENSAIO DE ATIVIDADE POR NESSLER. 39

3.11 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE. 41

3.12 ADMINISTRAÇÃO *in vivo* DE L-ASPARAGINASE. 43

3.12.1 Ensaio de atividade asparaginase no plasma de camundongos. 44

3.12.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). 45

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47

4.1 OBTENÇÃO DAS ASNases. 47

4.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE. 48

4.3 ATIVIDADE DE ASPARAGINASE *in vivo*. 57

4.4 FORMAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ASNase. 69

5. CONCLUSÕES 76

6. PERSPECTIVAS FUTURAS 77

REFERÊNCIAS 78

ANEXO I – VALORES DE IC50 DOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

ANEXO II – VALORES DE ATIVIDADE ESPECÍFICA PARA AS ENZIMAS PRODUZIDAS PARA EXPERIMENTOS *in vivo*.

ANEXO III – AUTORIZAÇÃO CEUA

ANEXO IV – AUTORIZAÇÃO CIBio

ANEXO V – FICHA DO ALUNO

ANEXO VI – INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE TRABALHOS DE MESTRADO/DOUTORADO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A ENZIMA L-ASPARAGINASE.

A enzima L-asparaginase (ASNase) recebe como nomenclatura enzimática o código EC. 3.5.1.1., portanto pertence à classe 3 das enzimas, do grupo das Hidrolases. Dentro desse grupo, a ASNase se classifica entre as que atuam em pontes de carbono-nitrogênio ou outras ligações de peptídeos (grupo 3.5) e na subclasse que atua em amidas lineares (3.5.1), sendo a primeira desse grupo, seguida das L-glutaminases (EC. 3.5.1.2), conforme o Comitê Internacional de Nomenclaturas da União de Bioquímica e Biologia Molecular [1] (NC-IUBMB).

As enzimas ASNases catalisam a reação de hidrólise do grupo amino da cadeia lateral da asparagina (Asn) (Figura 1A) levando à formação de aspartato (Asp) e amônio. Devido à relevância metabólica dos substratos e produtos envolvidos nessa catálise, é possível encontrar ASNases em todos os grupos de seres vivos, incluindo bactérias, fungos, planta e mamíferos (BATOOL, MAKKYL, JALAL, 2016). Assim como outras asparaginases do tipo II, a

---

[1] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html

ASNase de *E. coli* secundariamente possui atividade glutaminásica (Figura 1B) (NARTA *et al*, 2007).

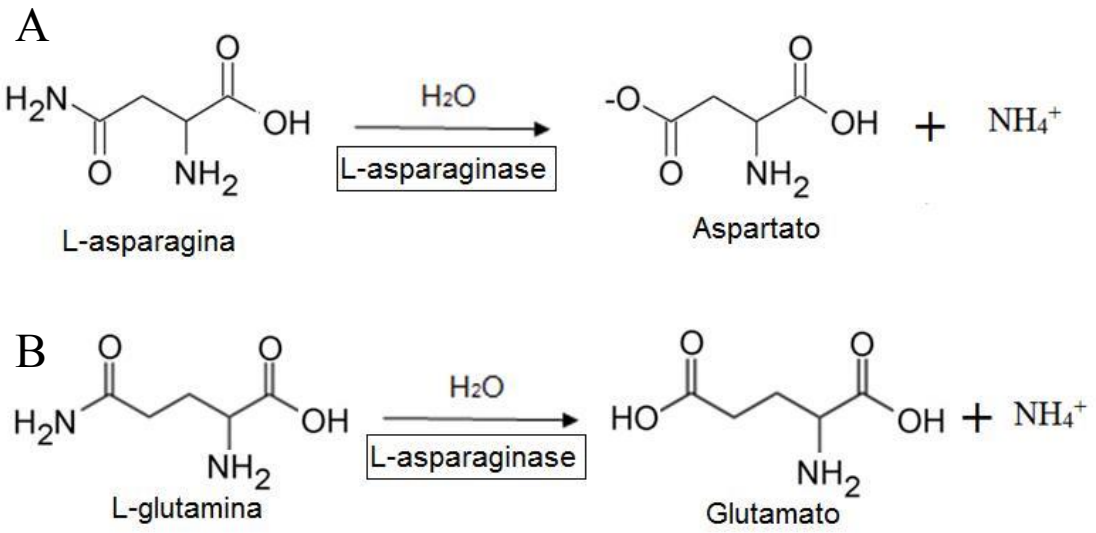

Figura 1: Mecanismo de ação da L-asparaginase – Quadro A - Catálise da hidrólise da cadeia lateral da asparagina gerando aspartato e amônio. – Quadro B - Catálise da hidrólise da cadeia lateral da glutamina gerando glutamato e amônio. Adaptado de NARTA *et al*, 2007.

Em 1953, Kid e colaboradores identificaram a ação anti-tumoral do plasma de porcos da índia (*Cavia porcellus*) frente a linfomas murinos. Bromme e colaboradores (1963), identificaram a enzima L-asparaginase como a responsável por tal atividade, em seguida, a ASNase oriunda de *E. coli* também demonstrou a atividade antitumoral passou a ser utilizada como agente quimioterápico (apud SHRIVASTAVA *et al*, 2016).

Por tais razões históricas, a ASNase oriunda de *E. coli* foi extensivamente estudada. Como esta bactéria apresenta duas enzimas distintas que hidrolisam Asn, as ASNases bacterianas passaram a ser classificadas em Tipo I e Tipo II. Enquanto as enzimas de tipo I são normalmente citoplasmáticas, apresentam alto K_M para Asn e podem variar em estados de oligomerização ativos, as ASNases de tipo II são geralmente secretadas para o periplasma, têm baixos valores de K_M para asparagina e se oligomerizam em tetrâmeros ativos. Apesar das ASNases de tipo II serem tradicionalmente relacionadas às propriedades antileucêmicas devido ao seu baixo K_M, (BOREK, JAKÓLSKI; 2001) nosso grupo demonstrou que a L-asparaginase tipo I de *Saccharomyces cerevisiae* possui baixo $k_{0,5}$ e propriedades citotóxicas em cultura de células de linhagens leucêmicas (COSTA *et al*, 2016). Borek e colaboradores (2001) também caracterizam outro tipo de asparaginases, derivadas de plantas (*plant-type*), que não possuem homologia com as formas bacterianas I e II.

Seres humanos são capazes de produzir três enzimas capazes de hidrolisar Asn. A primeira delas é a Lisofosfolipase humana (ASPG), uma enzima de 60 kDa, com domínio N-terminal que apresenta homologia as enzimas de *E. coli* tipo I e II. As outras duas enzimas são a Aspartilglucosaminosidase lisossomal (AGA) e a asparaginase humana (hASNase3), que têm homologia com as asparaginases *plant-type*. Todas as formas de ASNases humanas apresentam K_M na faixa de mM, enquanto as asparaginases utilizadas na terapêutica (que serão

apresentadas adiante) têm K_M na faixa de µM (NOMME, SU, LAVIE, 2014). Apesar de ASPG apresentar alto K_M para Asn, Belviso e colaboradores (2017) reportaram a inibição do crescimento de linhagens leucêmicas na presença dessa enzima ativa.

1.2 A ENZIMA L-ASPARAGINASE DE *E. coli*.

A enzima L-asparaginase Tipo 2 de *E. coli* é codificada pelo gene *asnB*, cujo produto leva à formação de uma cadeia polipeptídica de 348 resíduos de aminoácidos, sendo os 22 primeiros referentes à sequência sinal de exportação para o periplasma.

MEFFKKTALAALVMGFSGAALA^{1}LPNITILATG^{11}GTIAGGGDSA^{21}TKSNYTVGK
V^{31}GVENLVNAV**P**^{41}QLKDIANVKG^{51}EQVVNIGSQD^{61}MNDNVWLTLA^{71}KKINT
DCDKT^{81}DGFVITHGTD^{91}TMEETAYFLD^{101}LTVKCDKPVV^{111}MVGAMRPSTS^{121}
MSADGPFNLY^{131}NAVVTAADKA^{141}SANRGVLVVM^{151}NDTVLDGRDV^{161}**T**KTN
TTDVAT^{171}FKSVNYGPLG^{181}YIHNGKIDY**Q**^{191}RTPARKHTSD^{201}TPFDV**S**KLNE^{21}
^{1}LPKVGIVYNY^{221}ANASDLPAKA^{231}LVDAGYDGIV^{241}SAGVGNGNLY^{251}KSVFDT
LATA^{261}AKTGTAVVRS^{271}SRVPTGATTQ^{281}DAEVDDAKYG^{291}FVASGTLNPQ^{301}
KARVLLQLAL^{311}TQTKDPQQIQ^{321}QIFNQY^{326}

Figura 2: Sequência de aminoácidos da asparaginase de *E. coli*. UNIPROT: P00805. Em vermelho a sequência de sinalização para secreção para o periplasma, que não está presente na enzima madura. Os números sobrescritos representam a numeração do resíduo a direita. Em negrito e sublinhado os resíduos de aminoácidos que foram mutados e serão discutidos adiante.

A enzima madura, portanto, é uma cadeia de 326 resíduos, e a numeração de resíduos utilizada nessa tese conta a partir do início dessa sequência (como ilustrado na Figura 2). O código do UNIPROT de acesso é P00805.

A enzima de *E. coli* já teve sua estrutura quaternária cristalográfica resolvida. Existem 8 estruturas cristalográficas depositadas no *Protein Data Bank* - PDB, e dentre estas a mais utilizada em analises é a que recebe o código 3ECA. Os resíduos 1-190 estão localizados no domínio N-terminal, ligados através dos resíduos 191-212 ao domínio C-terminal, formado pelos resíduos 213-326 (LOPES *et al*, 2017).

A atividade específica da enzima para Asn é de 280-400 unidade internacionais por miligrama de proteína pura (I.U./mg), com K_M de 12 µM e ponto isoelétrico 5,0; já o K_M para a glutamina é de 3000 µM (NARTA *et al*, 2007).

1.3 A ENZIMA ASNase NO TRATAMENTO DA LLA.

Segundo dados do INCA (2018), cerca de 580 mil novos casos de câncer são esperados para 2018 no Brasil. O câncer infanto-juvenil mais comum é a leucemia, representando entre 25 a 35% dos canceres desta faixa etária. Para 2018 são esperados mais de 10.000 novos casos. A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) representa a primeira causa de morte por doença na faixa etária de

1 – 19 anos em todas as regiões do país e é o câncer de maior incidência em crianças na faixa de 3 a 5 anos de idade.

O protocolo de tratamento da LLA na primeira fase utiliza entre cinco fármacos a enzima ASNase (INCA, 2001). O sucesso no tratamento com ASNase é devido à baixa ou nenhuma expressão da enzima L-asparagina sintetase (ASNS) nos linfoblastos leucêmicos, levando à incapacidade dessas células produzirem o aminoácido L-asparagina (Asn) *de novo*, requerido em grande quantidade para suportar o rápido crescimento tumoral. Visto que os linfoblastos leucêmicos dependem de Asn presente no sangue, o tratamento com a enzima ASNase depleta o aminoácido existente, levando as células leucêmicas a entrarem em processo apoptótico (NARTA *et al*, 2007; LOPES *et al*., 2017).

Atualmente, três formas de ASNase são comercializadas. A primeira é a forma nativa da enzima de *E. coli* (*Ec*_ASNase), aprovada pelo FDA em 1978 (nome comercial Elspar®; Merck & CO). Contudo, seu alto potencial imunogênico leva os indivíduos tratados a apresentarem reações que vão desde erupções cutâneas, urticária, artralgia, dispnéia até grave anafilaxia aguda. Por se tratar de uma enzima exógena, é frequente a formação de anticorpos anti-asparaginase, o que leva a um rápido declínio dos níveis séricos de atividade enzimática, induzindo a uma depleção de Asn abaixo do ideal. Além dos efeitos adversos, o efeito chamado “inativação silenciosa” pode ocorrer, quando a formação de anticorpos anti-asparaginase ocorre sem outros sintomas, e impede

o adequado reconhecimento clínico da perda de atividade enzimática. (PIETERS, *et al* 2012).

A segunda enzima é também de *E. coli*, comercializada na forma conjugada com metoxi-polietileno glicol (PEG-ASNase) (nome comercial Oncaspar® - Enzon Pharmaceuticals, Inc.), aprovada pelo FDA em 2007 como primeira linha de tratamento para LLA (DINDORF *et al*, 2007). A peguilação é utilizada em diversos biofármacos e pode prolongar o tempo de retenção no plasma, diminuir a proteólise e ocultar antígenos da detecção pelo sistema imune (PASUT e VERONESE, 2012). De fato, a formação de anticorpos em pacientes que recebem a forma peguilada é menor quando comparada à forma nativa, e a meia-vida biológica em dias, aumenta de 1,44±0.35 para 5,73± 3,24 após a modificação. Embora apresente melhorias em relação a formulação nativa, os anticorpos formados contra a ASNase também podem reagir de forma cruzada com a ASNase peguilada, não sendo recomendada a utilização desta em caso de reação imune contra a ASNase nativa de *E. coli* (TONG *et al*, 2014).

A terceira forma comercial da enzima provém da bactéria *Erwinia chrysanthemi* – Erw_ASNase (Erwinaze®; EUSA Pharma Inc), aprovada em 2011 pelo FDA. Esta forma apresenta meia vida biológica menor em comparação com as formulações de *E. coli* (0,65±0,13 dias), sendo necessárias doses maiores e frequência de aplicações. Essa forma de ASNase é recomendada

como segunda linha de tratamento, após reações alérgicas ou formação de anticorpos contra *Ec*_ASNase, nativa ou peguilada (RAETZ e SALZER, 2010).

Dentre os problemas encontrados no tratamento com ASNase estão a hipersensibilidade, que ocorre entre 10 – 30% dos pacientes, pancreatite, tromboembolismo, complicações no sistema nervoso central, hiperglicemia e disfunções hepáticas. O uso de PEG-ASNase pode reduzir a imunogenicidade. Porém, devido a maior meia vida da enzima, mais casos de hiperamonemia, uma vez que as atividades asparaginase e glutaminase liberam amônio como produto, são registrados com o uso dessa formulação, um efeito adverso grave em pacientes com longa expectativa de vida (RAETZ e SALZER, 2010; HEITINK-POLLE *et al*; 2012).

Ainda não é claro o papel da atividade glutaminásica na citotoxicidade da ASNase, especula-se que ela seja necessária para combater linhagens leucêmicas que expressam ASNS. Em contraste, a atividade glutaminásica elevada em ASNases é apontada como a principal causa da hiperamonemia, uma vez que a concentração de Gln no plasma (aproximadamente 500 µmol/L) é 10 vezes mais elevada que Asn (aproximadamente 50 µmol/L) (NGUYEN *et al*, 2018). Apesar deste fato, Tong e colaboradores (2013) não detectaram alteração na concentração de glutamina na medula óssea e sangue periférico em pacientes em tratamento com ASNase, por sua vez a depleção de asparagina ocorre durante o tratamento.

Apesar do uso da ASNase no tratamento de leucemia ocorrer desde a década de 70, estudos vem buscando ampliar seu uso em outros tumores hematológicos (EMADI, ZOKAEE, SAUSVILLE, 2014). A disponibilidade de asparagina tem sido relacionada com maior probabilidade de recidiva metastática em tumores de câncer de mama e outros em camundongos (KNOTT *et al*, 2018); contudo seu potencial uso em tumores sólidos deve ser visto com cautela, uma vez que os efeitos adversos do uso de ASNase em adultos podem ser severos. Um estudo clínico fase II para avaliar o efeito do uso de PEG-ASNase em pacientes em estágio avançado de tumor de ovário foi descontinuado por conta da gravidade dos efeitos adversos (HAYS *et al*, 2013).

Uma nova forma de *delivery* de *Ec*_ASNase, encapsulada em eritrócitos (eriaspase - GRASPA® - Erytech – França) demonstrou meia vida maior e sensível redução de efeitos adversos, quando comparada com a forma nativa de *Ec*_ASNase. Esta forma de ASNase finalizou as três fases de estudos clínicos e aguarda a autorização da agencia regulatória europeia (EMA) (http://erytech.com/ery-asp-all.html, acessado em 14/05/2018).

1.4 A ASPARAGINASE NO CONTEXTO BRASILEIRO

Apesar das vantagens da utilização de PEG-ASNase, o Brasil utiliza *Ec*_ASNase nativa como primeira linha de tratamento de LLA (INCA, 2001). Apesar da data de publicação ser de 2001, ainda é o protocolo de referência do

Instituto Nacional do Câncer, obtido pelo site http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=666, acessado em 01/05/2018.

Como nos países desenvolvidos o uso da enzima nativa já foi substituído pela forma peguilada (de preço mais elevado), (EMA, 2016; SHRIVASTAVA *et al*, 2016), o mercado internacional para a forma nativa vem diminuindo, e com isso as industrias farmacêuticas têm deixado de comercializar esse biofármaco na forma nativa (sem peguilação).

Em 2011 a Merck Sharp & Dohme (MSD) transferiu a tecnologia de produção da ASNase para o laboratório Lundbeck, que terceirizou a produção para o laboratório Oso Biopharmaceutical, que por sua vez, comunicou em 2012 que não iria mais produzir a L-asparaginase nativa, gerando graves problemas de abastecimento do biofármaco no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1A, 2017).

Entre 2013 e 2017 o Brasil foi abastecido com a forma nativa de L-asparaginase Aginasa® produzida pela empresa japonesa Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd. em parceria com o laboratório alemão Medac, que possui registro no FDA e outros países da Europa, Canadá e Nova Zelândia. Em 2017, o Ministério da Saúde passou a importar a ASNase Leuginase® produzida pela empresa chinesa Beijing SL Pharmaceutical, gerando preocupações em especialistas, sobre a procedência e qualidade do biofármaco. Zenatti e colaboradores (2017) relataram que Leuginase® possui a presença de diversos contaminantes, incluindo enzimas de resistência à antibióticos (beta-lactamase), menor

atividade asparaginásica no plasma de camundongos e maior formação de anticorpos anti-ASNase quando comparada à Aginasa®.

Um estudo clínico publicado recentemente por Sluis e colaboradores (2018), comparando a *Ec*_ASNase nativa (asparaginase medac), com a asparaginase recombinante, de mesma sequência de aminoácidos e sem modificações químicas (rASNase - Spectrila®), aplicadas em 199 indivíduos entre 2008 e 2012; ambas se mostraram equivalentes em relação a eficácia, segurança e imunogenicidade.

Com o intuito de não permitir que o abastecimento de produtos estratégicos para a saúde ficasse a mercê de interesses comerciais, o Ministério da Saúde publicou uma lista com 56 fármacos de interesse estratégico para o Brasil, com a finalidade de receber projetos de Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) para iniciar a produção destes no Brasil. Esta lista possui 23 biofármacos, que incluíam a L-asparaginase nativa e sua forma peguilada, porém nenhuma proposta foi recebida para esses dois medicamentos (MINISTÉRIO DA SAUDE, 1B e C, 2017).

1.5 ASPARAGINASE E SUA RELAÇÃO COM CISTEÍNO-PROTEASES LISOSSOMAIS

PATEL e colaboradores (2009) relataram que as cisteíno-proteases, catepsina B (CTSB) e Asparagina Endopeptidase (AEP), são responsáveis pela

degradação da *Ec*_ASNase, sendo o resíduo N24 um dos principais sítios de clivagem por AEP. Por sua vez, a AEP não cliva a *Erw*_ASNase, que tem na mesma posição na estrutura primária um resíduo de glicina. Em um trabalho posterior, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a mutação N24A em *Ec*_ASNase aumenta a atividade da enzima, além de torna-la resistente à clivagem por AEP (OFFMAN *et al*, 2011). Outro grupo atribui a mutação N24S como mais estável termicamente, e com maior citotoxicidade de longo prazo *in vitro* na linhagem celular SD1 de LLA (MAGGI *et al*; 2017).

De fato, a estabilidade proteica é um dos fatores cruciais para a utilização de proteínas como biofármaco. Uma maior estabilidade proteica está associada à maior meia vida *in vivo*, menor necessidade de doses frequentes e por consequência diminuição de efeitos adversos e imunogenicidade (PASUT e VERONESE, 2012).

Em concordância com essa hipótese, foi relatado um paciente pediátrico (VAN DER MEER *et al*, 2014) em tratamento com *Erw*_ASNase que apresentou um quadro inesperado de hiperamonemia. O plasma deste paciente foi analisado e verificou-se que a ASNase apresentava meia-vida superior ao esperado. Após investigação foi constatado que este paciente apresentava uma mutação heterozigótica no gene codificador de CTSB que impedia a função proteolítica normal da enzima catepsina B. Tal relato levou a hipótese de que a enzima CTSB tem importante função na farmacocinética das asparaginases.

Em trabalho posterior o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que camundongos com o gene *CTSB* nocauteado, ao receber ASNase, apresenta uma meia vida sérica maior do biofármaco em relação à camundongos selvagens (VAN DER MEER *et al*, 2017), o que reforça a hipótese de que o fenômeno observado no paciente se deveu de fato à mutação no gene *CTSB* encontrada.

Além de possíveis melhorias na estabilidade sérica da enzima, a resistência a proteases pode levar a uma menor imunogenicidade do biofármaco. Isto porque os produtos da clivagem por proteases podem ser apresentados, na forma de epítopos imunogênicos, a via de apresentação de antígenos do MCH classe II. Ambas as proteases estudadas, CTSB e AEP já foram relacionadas como essenciais para a geração de epítopos imunogênicos e posterior apresentação por essa via em outros estudos (ANTONIOU *et al*, 2000).

1.6 TRABALHOS DESENVOLVIDOS PREVIAMENTE.

No nosso grupo de pesquisa, a aluna MSc. Mariane Augusta Domingues Rodrigues gerou mutações aleatórias no gene *asnB*, codificador da *Ec*_ASNase. Depois da triagem de uma biblioteca de mais de 1000 clones contendo possíveis mutações, seis proteoformas mutantes foram selecionadas para verificar a resistência à clivagem pelas proteases CTSB e AEP.

Destas, as mutantes P40S/S206C e Q190L apresentaram resistência à CTSB e AEP, e a mutante T161I resistência apenas à CTSB. Nenhuma das

mutações afetou significativamente os parâmetros cinéticos em comparação com a enzima selvagem (RODRIGUES, 2016).

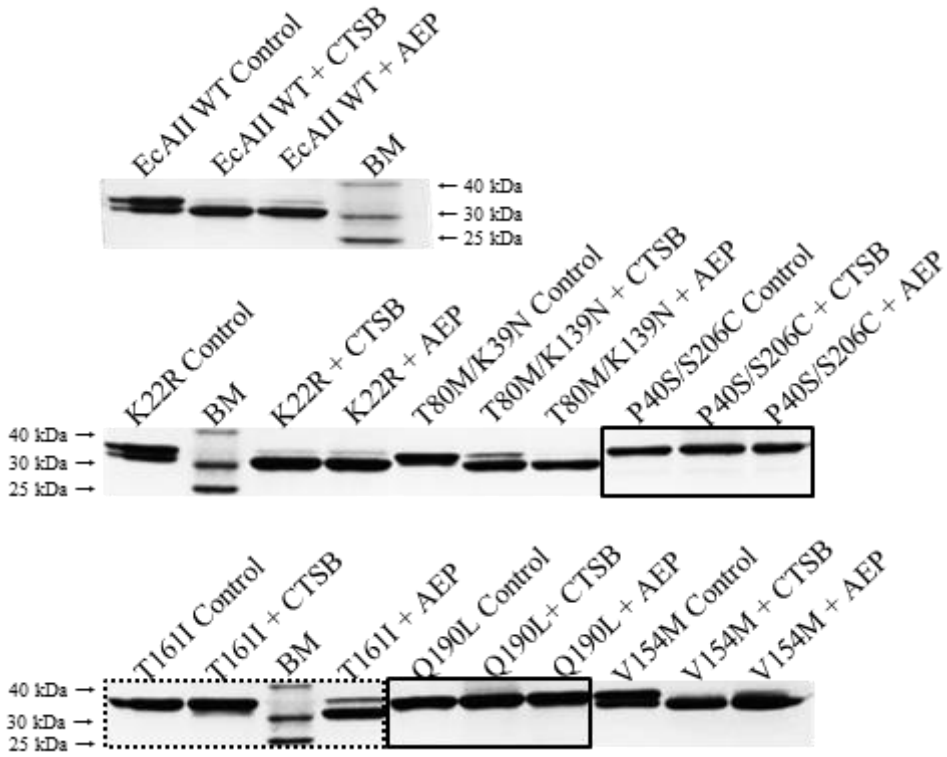

Figura 3. Figura adaptada da dissertação de Rodrigues, M. A. D. (2016). SDS-PAGE com os resultados do ensaio de resistência as cisteíno-proteases CTSB e AEP. BM – Marcador de Massa Molar – *Bench Mark*. O controle indica a ausência de proteases durante a incubação. No quadro superior, a enzima Ec_ASNase selvagem (denominada na figura de EcAII WT). A presença de bandas abaixo de 34 kDa indicam a degradação da proteína. Os quadrados com linhas cheias realçam as mutações que geraram resistência a ambas proteases CTSB e AEP (P40S/S206C e Q190L). O quadrado com linha tracejada indica a mutante resistente apenas à CTSB (T161I).

Visto o potencial de maior estabilidade e de menor imunogenicidade, a caracterização por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* dessas enzimas se torna relevante.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho é caracterizar o efeito das mutações P40S/S206C, T161I e Q190L em comparação com a enzima selvagem (WT) em relação a sua (1) citotoxicidade frente às linhagens leucêmicas *in vitro*, (2) atividade de asparaginase no plasma de camundongos e (3) formação de anticorpos contra ASNase *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MEIOS DE CULTURA

LB (Lysogenic-Broth): 1% Triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,5% NaCl.

LB modificado – adaptado de FLORES-SANTOS, J.C. (2017)

1% Triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,5% NaCl tamponados em 0,1 M de tampão Fosfato de K^+ pH 7,0 + 5 g/L de glicose + sais de metais (0,5 g/L de $MgSO_4$, 0,05 g/L $CaCl_2$, 0,1 mg/L H_3BO_4, 0,1 mg/L $CoCl_2$, 25 mg/L $ZnSO_4$, 4 mg/L $MnCl_2$, 0,1 mg/L $NaMoO_4$, 1,8 mg/L $CuSO_4$, 20 mg/L $FeSO_4$, 0,1 mg/L $NiSO_4$).

Para os meios de cultura sólidos foram adicionados 2% de ágar.

3.2 ANTIBIÓTICOS

Carbenicilina – utilizada na concentração final de 50 µg/mL

3.3 MARCADORES DE MASSA MOLAR

BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies™)

3.4 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences)

DEAE FF 5 mL (GE Life Sciences)

3.5 VETORES PARA EXPRESSÃO DE EC_ASNASE EM *E. coli*

O vetor de expressão de *Ec*_ASNase selvagem utilizado foi construído por Mariana M.S. Leite. Brevemente, possui o gene *asnB* incluindo a sequência que codifica a cauda sinalizadora para o periplasma, sintetizado pela empresa *GeneScript* com códons otimizados para expressão em *E. coli*. O gene foi clonado entre os sítios de *Nde I* e *BamH I* do vetor pET15b.

3.6 LINHAGEM DO MICRORGANISMO

BL21 (DE3): *F– ompT hsdSB(rB–, mB–) gal dcm (DE3)* (Life Technologies™)

3.7 EQUIPAMENTOS

Shaker: Excella e24R (New Brunswick Scientific™)

Centrifuga refrigerada 5810R (Eppendorf™)

Centrifuga de tubos refrigerada 5424R (Eppendorf™)

Fonte para eletroforese PowerPAC™ Universal Power Supply (BioRad™)

Cuba para eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (BioRad™)

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Realizamos as eletroforeses com gel SDS-PAGE 14%

Gel de separação: 528 mM de tampão Tris-HCl pH 8,8; 14% de acrilamida/bis-acrilamida; 0,1% de PSA e 10 µL de Temed em 5,3 mL de volume final.

Gel empacotador: 125 mM de tampão Tris-HCl pH 6,8; 4,6% de acrilamida/bis-acrilamida 0,15% de PSA e 10 µL de Temed, em 3,2 mL de volume final.

As amostras proteicas foram previamente incubadas a 95°C por 5 minutos na presença de tampão de amostra (60 mM de Tris-HCl pH 6,8; 25% de glicerol; 2% de SDS; 1% de β-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol; 0,9 mL de água destilada e 0,5 µL de DTT 1 M). Para análise de corpos de inclusão o pellet com os debris celulares foram dissolvidos em 1 mL de água, uma alíquota de 10 µL foi misturada a 5 µL de *cracking buffer* (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % glicerol, 1% SDS, 0,01 % bromofenol, 1 % β-mercaptoethanol) e incubada a 95°C por 5 minutos.

As eletroforeses foram realizadas a 160 V com tampão Tris-Glicina 1X (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e 0,1% de dodecil sulfato de sódio) em sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad™) em géis medindo 10 x 10,5 x 1mm de espessura, por 1 hora.

O gel foi corado com Coomassie blue R250 (1g de coomassie blue diluído em 450 mL de água destilada, 45% de metanol e 10 % de ácido acético) sob leve agitação por 20 minutos e descorado com solução descorante (10% de metanol;

10% de ácido acético glacial; 80% de água destilada deionizada) sob leve agitação por 16 horas a temperatura ambiente.

3.9 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS.

3.9.1 Cultivo da cepa produtora.

Inicialmente a cepa de expressão (BL21(DE3)) contendo o plasmídeo com o gene codificador das enzimas de interesse (ASNase WT e as mutantes P40S/S206C, T161I e Q190L) foi inoculada em 50 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de carbenicilina e incubada por 16 h à 37ºC e 180 rpm. Em seguida o cultivo da bactéria foi diluído para atingir a densidade óptica – OD_{600nm} 0,2 em um frasco Erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de meio LB modificado e 50 µg/mL de carbenicilina, incubado à 37 ºC e 180 rpm.

Após o consumo da glicose, acompanhado através do uso de teste enzimático colorimétrico (BioLiquid – Glicose; LaborClin - Brasil), 0,1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo - IPTG – Merck, Alemanha (indutor da expressão) foi adicionado; após 22 h o meio foi centrifugado por 30 min a 4000 a 4 ºC, o sobrenadante descartado e o pellet celular congelado (- 20 ºC) para posterior purificação das enzimas.

3.9.2 Purificação das enzimas.

A purificação da enzima ASNase selvagem e mutantes foi realizada como descrito por Rodrigues (2016). A purificação proteica foi separada em três etapas.

Inicialmente foi realizado um choque osmótico na fração celular (pellet celular congelado) para a liberação do conteúdo periplasmático, onde enzima madura se acumula majoritariamente. Para tanto o pellet celular proveniente de um litro de cultura (aproximadamente 6 g) foi ressuspendido em 200 mL de tampão hiperosmótico – Tris-HCl 100 mM, EDTA 0,5 mM e sacarose 500 mM. Após 10 minutos de descanso em gelo as células foram centrifugadas a 4000 g a 4 ºC por 30 minutos. Após o descarte do sobrenadante as células foram ressuspendidas em 60 mL de solução hiposmótica (0,5 mM de $MgCl_2$), etapa onde ocorre a liberação da asparaginase devido ao rompimento apenas da parede externa das bactérias. Após 10 min de descanso em gelo, as células foram centrifugadas da mesma forma que na etapa anterior. O sobrenadante, que contém asparaginase, foi rapidamente separado e tamponado em Tris-HCl pH 8,8 50 mM.

Em seguida, foi realizada cromatografia de troca aniônica fraca na coluna DEAE FF 5 mL (GE Life Sciences) em um sistema Rápido de Cromatografia Liquida de Proteína (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*). Inicialmente, lavamos a coluna com 5 volumes de coluna (VC) de água

deionizada, 5 VC de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,8, 3 vc de Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,8 + 1 M NaCl, e 5 VC de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,8. Carregamos todo o conteúdo do choque osmótico na coluna, após a lavagem com cinco VC em tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8.8), e prosseguimos com um gradiente de 10 VC para atingir 100% do tampão B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM) em fluxo de 0,7 mL/min coletando frações de 1,5 mL de todas as amostras do gradiente linear.

Como etapa final de polimento as amostras contendo ASNase foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular. Para tanto, as amostras obtidas na etapa anterior foram concentradas usando filtros de centrifuga Amicon® Ultra 15 MWCO 10 kDa (Merck Millipore), a 4000 g, 4 ºC pelo tempo necessário para atingir o volume de 0,5 mL, utilizado em cada aplicação de amostra na exclusão molecular. A coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences) foi utilizada em fluxo isocrático de 0,7 mL/min, em tampão Tris-HCl pH 7,4 50 mM com 100 mM de Glicina. Frações de 0,5 mL foram recolhidas por toda a corrida para avaliar a presença de ASNase.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE ASPARAGINASE E ENSAIO DE ATIVIDADE POR NESSLER.

Após a purificação as enzimas foram armazenadas em tampão Tris HCl 7.4 com 100 mM de glicina. Quando necessário, foram concentradas em filtros de centrifuga Amicon® Ultra 15 MWCO 10 kDa (Merck Millipore), a 4000 g, 4

ºC. As amostras foram quantificadas através do seu coeficiente de extinção molar a 280 nm (ε=23505 $M^{-1}.cm^{-1}$), que se mantém o mesmo para a enzima selvagem e as formas mutantes estudadas, usando a lei de Lambert-Beer (Abs = c x ε)

O ensaio de atividade foi realizado utilizando o reagente de Nessler (Merck, Alemanha). Concentrações de enzima variando entre 0,00009 mg/mL a 0,0017 mg/mL foram incubadas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8.8 e L-asparagina 20 mM, a 37 ºC. Após 10 minutos, 37 µL desta reação foram adicionados a 296 µL de uma solução de 70 mM de ácido tricloroacético (TCA). Nessa mesma solução adicionamos 37 µL do reagente de Nessler. O Nessler reage com o amônio produzido pela hidrolise de L-asparagina, produzindo um composto detectável a 440 nm. Uma curva padrão, relacionando concentrações de amônio e a absorbância a 440 nm, com o reagente de Nessler e sulfato de amônio foi realizada, considerando a estequiometria de dissolução deste sal, de 2 amônios por molécula de sulfato de amônio.

Para obter o valor de atividade de cada enzima, os valores de absorbância encontrados foram transformados em µmol NH_4 através da interpolação dos valores na equação da reta da curva padrão. Esses valores são então divididos por 10 (tempo de reação utilizado nesse estudo) para obter a velocidade de formação de amônio em µmol NH_4/min. A média das triplicatas de cada concentração testada é plotada em um gráfico onde X representa as quantidades

(em mg) de ASNase testadas e Y as velocidades encontradas no ensaio (µmol NH_4/min). 1 unidade internacional (UI) de asparaginase é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de amônio por minuto. O valor de "A" da equação linear (y=Ax+b) gerada é o valor da atividade específica da asparaginase em UI/mg.

3.11 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade utilizamos a técnica de redução do MTT (em inglês *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*). Em células vivas o corante tetrazólio MTT é reduzido ao composto Formazan de cor roxa, que pode ser quantificado a 570nm por meio do espectrofotômetro. Como a redução do MTT depende da atividade metabólica celular, mais precisamente de enzimas oxirredutases NAD(P)H – dependentes, é possível quantificar a morte celular em comparação com as células metabolicamente ativas.

Os ensaios foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Sandra H.P. Farsky, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, e com o Pós-Doutorando, Dr. Christiano M. Vaz Barbosa.

2 x 10^4 células (Reh ou Molt-4) foram incubadas em 150 µL de meio RPMI-1640 com 10 % de soro fetal bovino a 37 ºC, a 5 % de CO_2, com seis diferentes concentrações de asparaginase (0,01, 0,05, 0,1, 0,3, 0,6 e 1 U/mL) por

72 horas. Após esse tempo, MTT (0,33 µg/mL) foi adicionado e incubado por 4 horas a 37 ºC. Após esse período, 100 µL de uma solução de SDS 10 % e HCl 0,01 N foi adicionada a cada poço e a mistura foi incubada *overnight* para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância a 570nm foi obtida para o cálculo dos valores de sobrevivência, expressos em porcentagem, na qual consideramos 100% de sobrevivência as células incubadas apenas com o veículo, Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + glicina 100 mM.

Os ensaios de citotoxicidade realizados em colaboração com o Pesquisador Dr. José Andrés Yunes, e as pesquisadoras Dra. Priscila Pini Zenatti e Natasha Azussa Migita, do Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr Domingos A. Boldrini (CIB), Campinas, Brasil, diferem na metodologia descrita acima:

- pela quantidade de células utilizadas por poço, $3x10^4$ células,
- pelo tempo de 48 horas,
- utilizando as linhagens leucêmicas; Nalm6, REH, RS4;11, HPB-ALL, CCRF-CEM, Jurkat.
- Pela utilização da enzima comercial Aginasa® (Kyowa, Japão) como controle.

Os cálculos de IC_{50} foram realizados utilizando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, Estados

Unidos, www.graphpad.com). Os valores de absorbância a 570nm foram plotados em um gráfico, onde X representa o logaritmo das concentrações de asparaginase utilizadas em U.I./mL, e Y os valores de absorbância a 570nm, em triplicata. Os valores de Y então foram normalizados para percentagem de sobrevivência, fixando como 0% o valor 0.0, e como 100% o valor mais alto de cada set de dados, o qual, em todas as amostras, foi obtido das células incubadas com o controle (o tampão no qual estavam diluídas as ASNases, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4).

A seguir, os dados foram ajustados em uma regressão não linear, de dose-resposta de inibição, na opção: log(inibidor) x resposta normalizada – com inclinação variável. Resultados de IC_{50} fora da variação de ASNase utilizada (0,1 a 1,0 U.I./mL), ou com R^2 abaixo de 0,7 foram desconsiderados, por não ser representativo dos experimentos ou possuir significado biológico.

3.12 ADMINISTRAÇÃO *in vivo* DE L-ASPARAGINASE.

Esses estudos foram avaliados pela Comissão de Ética Em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e obtiveram a autorização nº 4556-1/2017. A manipulação dos animais foi feita pela Dra. Priscila Pini Zenatti em biotério da UNICAMP, por tal motivo a autorização do CEUA é pertencente a UNICAMP, e não a FCF-USP. Grupos de cinco camundongos Balb-C com 8 semanas e aproximadamente 20 g foram submetidos à injeções intraperitoneais de 525 U.I./kg ou 1040 U.I. /kg de

asparaginase (conforme indicado). Cada grupo recebeu uma proteoforma de asparaginase (WT, P40S/S206C, T161I e Q190L), além de um grupo que recebeu apenas o veículo, composto de Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e glicina 100 mM, totalizando assim cinco grupos, com cinco animais cada. Após 12 ou 24 horas da injeção, o plasma dos animais foi coletado do plexo retro orbital e a atividade ASNase testada imediatamente, pelo método descrito a seguir. Frações do plasma também foram criopreservadas para posterior análise de presença de anticorpos anti-ASNase (através do ensaio ELISA).

3.12.1 Ensaio de atividade asparaginase no plasma de camundongos

O ensaio foi realizado baseando-se nos estudos de Lanvers e colaboradores (2002) em colaboração com o Pesquisador Dr. José Andrés Yunes, e as pesquisadoras Dra. Priscila Pini Zenatti e Natasha Azussa Migita.

Inicialmente uma curva padrão de atividade foi preparada, utilizando diluições conhecidas de U.I. de asparaginase (entre 5-1000 U/L), a partir da asparaginase comercial (medicamento formulado Aginasa, Medac – Alemanha) e o substrato ácido L-aspártico β-hidroxamato (AHA). Os dados foram plotados em um gráfico, relacionando a absorbância em 690 nm e atividade U.I./L de asparaginase.

Em uma placa de 96 poços adicionamos 20 µL do plasma dos camundongos testados a 180 µL do substrato AHA 2 mM; a reação foi incubada

30 minutos a 37 ºC. O AHA é hidrolisado pela asparaginase presente na amostra, liberando ácido L-aspártico e hidroxilamina.

Após essa etapa 5,6% de TCA (concentração final) foi adicionado para parar a reação e a placa foi centrifugada por 5 minutos a 2500 g. Em uma nova placa foi adicionado 50 µL deste sobrenadante a 200 µL de oxina, a qual trata-se de uma mistura recém-preparada de 1 parte de hidroxiquinolona e 3 partes de carbonato de sódio. Essa reação foi incubada por um minuto a 95 ºC e a placa foi resfriada por 10 minutos. A hidroxiquinolona reage com a hidroxilamina formando o composto indoxina detectável a 690 nm. Imediatamente após o resfriamento, a absorbância foi medida a 690 nm e os dados foram interpolados na equação da curva padrão descrita acima.

3.12.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

A presença de anticorpos anti-ASNase foi realizada através do ensaio de ELISA. Uma placa de alta ligação (Corning®, México) foi revestida com 4 UI de cada ASNase testada em tampão de revestimento (carbonato de sódio 200 mM, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 9,6), no volume final de 50 µL por poço e incubada overnight a 4 ºC. Os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem, 0.05% Tween-20 em PBS. Após essa etapa os poços foram lavados com tampão de bloqueio (1% BSA em PBS).

Amostras de plasma foram adicionadas, e após 1 hora de incubação a placa foi novamente lavada. Por fim, o anticorpo secundário (anti - camundongo) conjugado com HRP foi adicionado, e adicionamos a solução com o substrato de HRP. 1N de HCl foi adicionado a reação. A absorbância foi lida a 450nm em uma leitora de placas.

O plasma foi analisado puro, ou diluído 1:1 ou 1:1000, e incubado contra a respectiva ASNase e contra a enzima presente no medicamento comercial Aginasa® (Kyowa, Japão). Cada análise foi realizada em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DAS ASNases.

A purificação das asparaginases foi realizada com a fração periplasmática obtida por choque osmótico; as amostras foram separadas por cromatografia de troca aniônica, na qual a ASNase é eluída no pico entre as frações 8 - 10 (entre 120 e 150 mM de NaCl). Após reunir e concentrar essas amostras, realizamos a cromatografia de exclusão molecular, onde as ASNases foram eluídas entre 11,5 e 13 mL (Frações 23 a 26).

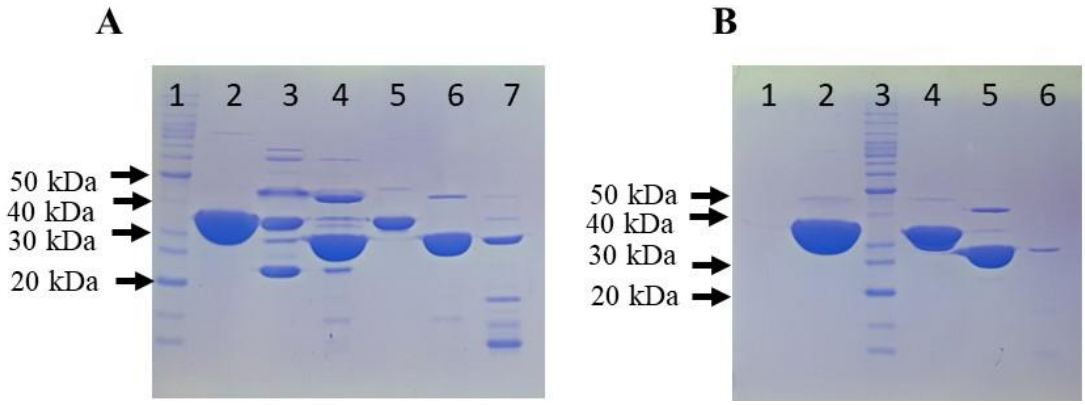

Figura 4 – Gel de SDS-PAGE redutor de frações eluídas da cromatografia de Exclusão Molecular. ASNases produzidas no laboratório. Quadro A: Raia 1: Padrão de Massa Molar Bench Marck Protein Ladder. Raia 2: fração 25 da ASNase WT. Raia 3: Fração 28 da ASNase WT. Raia 4: Fração 31 da ASNase WT. Raia 5: Fração 24 da ASNase P40S/S206C. Raia 6: Fração 31 da ASNase P40S/S206C. Raia 7: Fração 34 da ASNase P40S/S206C. Quadro B: Raia 1: Fração 31 da ASNase T161I. Raia 2: Fração 25 da ASNase T161I. Raia 3: Padrão de Massa Molar Bench Marck Protein Ladder. Raia 4: Fração 25 da ASNase Q190L. Raia 5: Fração 31 da ASNase Q190L. Raia 6: Fração 35 da ASNase Q190L.

A figura 4 mostra um gel redutor SDS-PAGE contendo as ASNases produzidas após a exclusão molecular. Pode-se observar o produto final da purificação da ASNase WT na raia 2 do quadro A, da P40S/S206C na raia 5 do quadro A, da T161I na raia 2 do quadro B, e Q190L na raia 4 do quadro B.

No caso de as enzimas terem sido utilizadas em ensaios com cultura de células, ou *in vivo*, após a purificação foram filtradas a 0,22 µm para esterilização em capela de fluxo laminar. Uma alíquota de cada ASNase foi retirada imediatamente antes dos ensaios para quantificação de sua concentração e atividade, conforme descrito no item 3.10.

4.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Para o estudo do efeito de cada mutação na citotoxicidade da ASNase, realizamos o ensaio MTT com diferentes linhagens celulares provenientes de leucemia. Os resultados estão apresentados nas figuras 5 a 7 e foram normalizados, considerando como 100% de viabilidade celular o crescimento do controle negativo, o qual se trata de células expostas somente ao veículo (tampão) no qual estavam diluídas as ASNases.

Os valores de IC_{50} foram calculados através de um software de análise de dados, GraphPad Prism 5.00. Os valores são matematicamente ajustados para encaixarem em uma equação não linear. Muitas vezes o conjunto de valores utilizados não apresenta os elementos necessários para o programa conseguir

gerar determinados parâmetros. Quando o conjunto de dados apresenta grande variação, a mensagem “interrompido” aparece no campo de resultados. Em outras situações, pode ocorrer dos valores se encaixarem na equação, mas os resultados serem incoerentes com qualquer resposta biológica (PRISM 6 USER GUIDE). Por isso a análise criteriosa dos dados gerados pelo programa deve ser realizada. Por exemplo, valores de IC50 fora da variação de dose da asparaginase utilizada, faixas de 95% de intervalo de confiança muito amplas, ou ainda valores muito baixos de R^2, são indicadores que a resposta dada pelo programa não tem qualquer significado biológico. Por esses motivos, definimos que qualquer parâmetro inconsistente encontrado, anula os resultados encontrados pelo programa e não foram considerados como significativos. Os parâmetros que consideramos necessários para considerar válidos os valores de IC50 encontrados são:

1) Valor de IC50 dentro da variação de asparaginase utilizada (>0,01 e < 1,0).
2) Valor de R^2 acima de 0,7.
3) Intervalo de Confiança de 95% dentro dos valores de asparaginase utilizada no ensaio (>0,01 e < 1,0).

Apresentaremos nas figuras apenas os valores válidos, os demais se encontram na tabela do Anexo I para consulta.

Iniciamos os ensaios de citotoxicidade utilizando a linhagens de células B-LLA REH e T-LLA Molt-4 em 72 h de incubação com as diferentes proteoformas de ASNases (Figura 5).

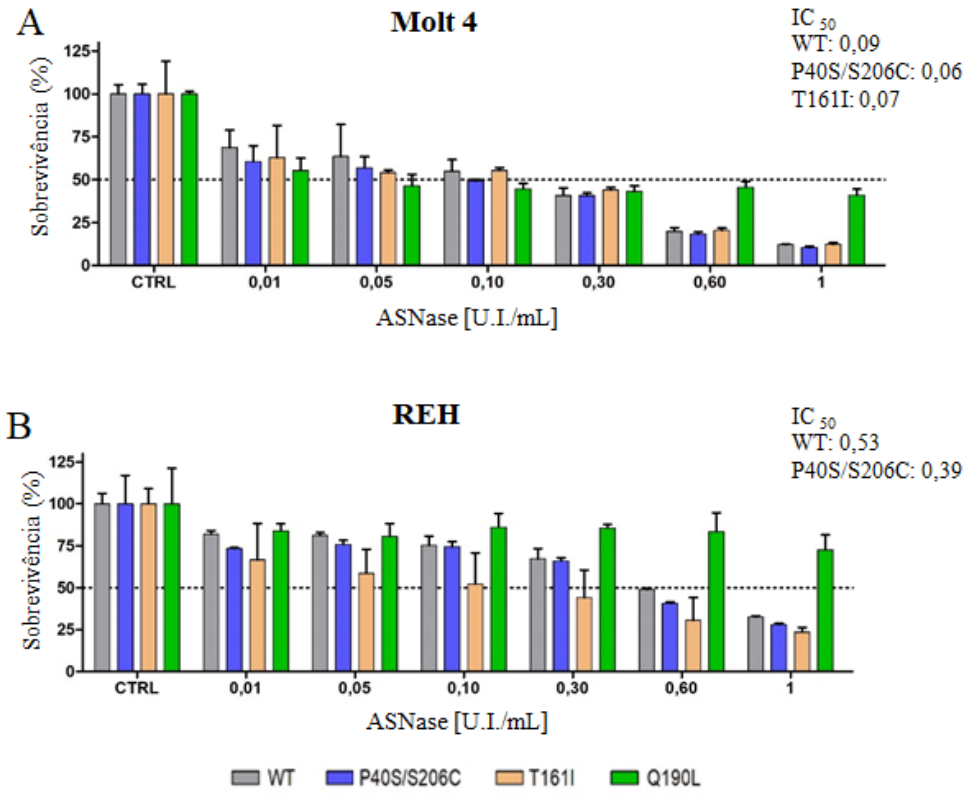

Figura 5 - Gráficos de Sobrevivência de Linhagens Celulares expostas a proteoformas de asparaginase (0,01 – 1 U.I./mL) obtidos através do ensaio MTT. Valores de IC50, quando válidos, estão ao lado direito do quadro. Quadro A: Linhagem celular Molt 4 (T-LLA). Quadro B: Linhagem celular REH (B-LLA).

Comparando os resultados das diferentes linhagens, nota-se que a linhagem Molt 4 é mais sensível ao tratamento com ASNase do que a linhagem REH. De fato, Su e colaboradores (2008) também descrevem a linhagem Molt 4 como mais sensível a ASNase quando comparada a linhagem REH, porém, com

capacidade de gerar subclones resistentes a asparaginase, devido ao acumulo gradativo intracelular de ASNS.

A linhagem Molt 4 (Figura 5 – Quadro A) apresenta curva de dose-resposta, com as enzimas WT, P40S/S206C e T161I, sendo possível calcular valores de IC50 de 0,09; 0,06 e 0,07 respectivamente. A mutante Q190L, além de não apresentar curva de dose-resposta, tem menor efetividade na morte celular. Na concentração de 1 U.I/mL desta proteoforma da enzima, 41% das células sobrevivem, contra, 12%, 10% e 12% das enzimas WT, P40S/S206C e T161I, respectivamente.

A linhagem REH (Figura 5 – Quadro B), ao ser incubada nas mesmas condições, apresentou curva de dose-resposta, permitindo o cálculo de IC50 para WT (IC50: 0,53) e P40S/S206C (IC50: 0,39). Apesar de T161I ter causado uma curva de dose-resposta satisfatória, não foi possível calcular o IC50 devido a uma alta variação nos dados de absorbância, que não permitiram o ajuste adequado dos dados a equação não linear utilizada, gerando um R^2 = 0,44 (Anexo 1), fora dos padrões definidos como coerentes para uma resposta biológica significativa. A proteoforma Q190L novamente não apresentou curva de dose resposta, sendo a menos efetiva de todas as proteoformas estudadas.

Com o intuito de explorar mais profundamente a diferença de citotoxicidade entre as ASNases foram avaliadas diferentes linhagens leucêmicas, derivadas de células T (HPB-ALL, CCRF-CEM, e Jurkat – Figura

6) e derivadas de células B (Nalm-6, RS4; 11, e REH – Figura 7). Nesses ensaios também avaliamos o efeito citotóxico da asparaginase contida no medicamento comercial Aginasa para fins de comparação com nossas preparações.

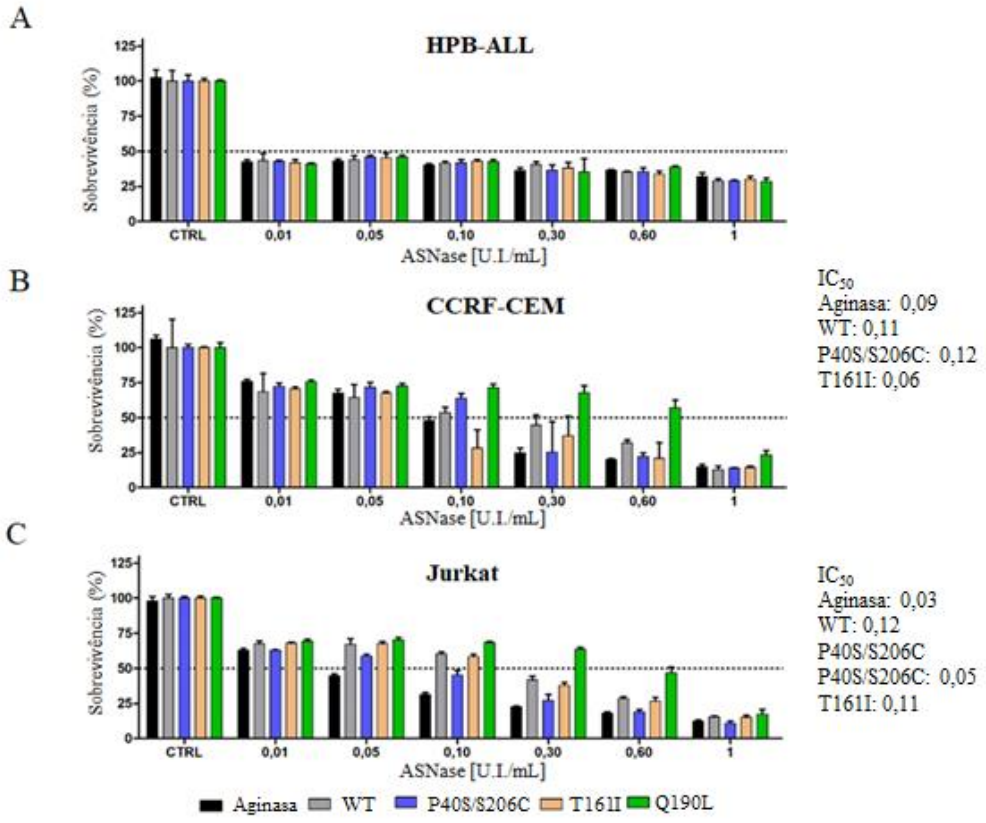

Figura 6 - Gráficos de Sobrevivência de Linhagens Celulares derivadas de T-LLA quando exposta a proteoformas de asparaginase (0,01 – 1 U.I./mL) obtidos através do ensaio MTT. Valores de IC50, quando válidos, estão ao lado direito do quadro. Quadro A: Linhagem celular HPB-ALL. Quadro B: Linhagem celular CCRF-CEM. Quadro C: Linhagem celular Jurkat.

Pode-se notar que a linhagem HBP-ALL é mais sensível ao tratamento com asparaginase (Figura 6 quadro A), e mesmo a menor concentração testada é

suficiente para inviabilizar 50% das células em cultura. De qualquer forma, não há diferença óbvia de citotoxicidade das diferentes ASNases testadas para essa linhagem. Por sua vez, as ASNases tiveram comportamento semelhante contra as linhagens CEM e Jurkat. Foi possível determinar a IC50 das ASNases Aginasa, WT, P40S/S206C e T161I (Figura 6 quadros B e C). Na linhagem Jurkat a ASNase P40S/S206C apresenta IC50 menor que WT (intervalo de 95% de confiança 0,04-0,07 e 0,09-0,17 respectivamente), porém como o ensaio foi realizado a partir de uma única purificação, pode-se esperar que o intervalo de confiança de 95% seja mais amplo, equiparando-se com o valor de IC50 da WT. A linhagem Jurkat apresenta alta dependência de Gln, mas não Asn (SUGIMOTO, 2015), explicando sua maior resistência a ASNase em comparação com HPB-ALL. A ASNase Q190L não apresentou curva de dose resposta em nenhuma das linhagens.

No caso das linhagens derivadas de células B (Figura 7), nota-se que a linhagem RS4; 11 é a mais sensível, causando inviabilidade em mais de 50% das células com a menor dose testada. As linhagens Nalm 6 e REH, são mais resistentes a asparaginase. A linhagem Nalm 6 apresentou curva de dose resposta compatível com o cálculo de IC50 com as ASNases Aginasa (0,33), WT (0,51), P40S/S206C (0,28), T161I (0,29). A ASNase Q190L claramente apresenta uma menor citotoxicidade quando comparada as outras ASNases testadas. A resistência à asparaginase em linhagens leucêmicas tem sido

relacionada com a presença da enzima ASNS. No entanto, essa relação não é clara, uma vez que a presença da translocação t(12;21) está relacionada a sensibilidade à asparaginase e leva a elevada expressão de ASNS (CHEN, 2015). As linhagens leucêmicas estudadas apresentam diferentes sensibilidades à asparaginase. De forma geral, as linhagens mais sensíveis foram a HPB-ALL (T-LLA), RS4;11(B-LLA), e a linhagem Molt 4 (T-LLA), as quais obtiveram o mesmo padrão de resposta com todas as proteoformas testadas. A menor concentração utilizada (0,01 U.I./mL) inviabiliza mais de 50% do crescimento celular, e o aumento da concentração de asparaginase até 1,0 UI/mL não aumentou a morte celular, não sendo possível calcular um valor de IC50 (Figuras 5A, 6A e 7A).

As linhagens Jurkat (T-LLA) e CCRF-CEM (T-LLA) apresentam resistência intermediária a asparaginase, quando comparadas com as linhagens Nalm6 (B-LLA) e REH (B-LLA) nas quais apenas as maiores concentrações utilizadas são capazes de produzir morte celular em 50% das células.

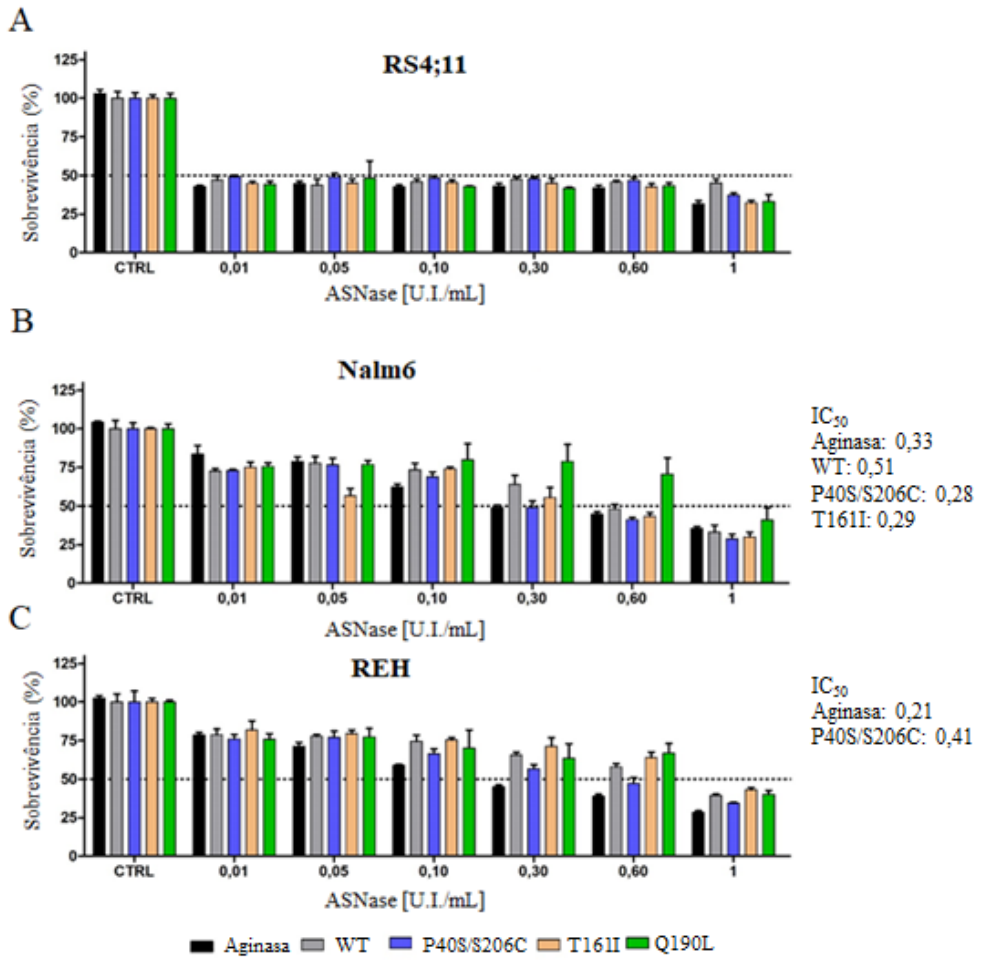

Figura 7 - Gráficos de Sobrevivência de Linhagens Celulares derivadas de B-LLA quando exposta a proteoformas de asparaginase (0,01 – 1 UI/mL) obtidos através do ensaio MTT. Valores de IC50 , quando válidos, estão ao lado direito do quadro. Quadro A: Linhagem celular RS4;11. Quadro B: Linhagem celular Nalm6. Quadro C: Linhagem celular REH.

Chien e colaboradores (2015), também notaram uma maior sensibilidade de RS4; 11 (B-LLA) à asparaginase quando comparada a Nalm6 (B-LLA). Para os autores, a sensibilidade de RS4;11 é causada pela estrita dependência de Asn extracelular e a falta de produção de ASNS. Nalm6, apesar de apresentar baixa produção de ASNS, deve possuir outros fatores envolvidos no mecanismo de

resistência. De forma semelhante ao relatado por Su e colaboradores (2008), REH e Nalm6 são linhagens mais resistentes a ASNase do que Molt-4, e as três linhagens tiveram o crescimento suprimido em doses acima de 1 U.I./mL.

Comparando o desempenho da enzima comercial Aginasa® e a enzima selvagem produzida em nosso laboratório em todas as linhagens testadas, percebemos que ambas apresentam o mesmo padrão de citotoxicidade e um sutil melhor desempenho da enzima Aginasa®. Uma vez que a enzima Aginasa® é um biofármaco utilizado no tratamento de LLA, é possível supor que a enzima comercial passa por rígidos controles de qualidade lote a lote, além de ser liofilizada e formulada para garantir a estabilidade da enzima. A enzima selvagem produzida em nosso laboratório atinge um bom grau de pureza, analisado por SDS-PAGE (figura 4), porém as condições de cultivo e purificação da ASNase certamente não podem ser comparadas com as praticadas pela indústria farmacêutica. Dessa forma, é satisfatória a comparação entre ambas enzimas e tais resultados validam a enzima selvagem como um controle a ser utilizado em comparação com as ASNases que introduzimos mutações.

As ASNases P40S/S206C e T161I seguem o padrão de resposta das enzimas Aginasa® e selvagem, não apresentando diferenças expressivas de citotoxicidade, quando comparadas em um contexto geral nesses ensaios. Isso é indicativo que as mutações que conferem resistência às proteases CTSB e/ou

AEP, no mínimo, não interferem negativamente na capacidade citotóxica dessas asparaginases.

Por sua vez a enzima Q190L teve um desempenho inferior na maioria das linhagens, e não apresenta curva de dose reposta compatível com cálculo de IC50 em nenhuma linhagem.

4.3 ATIVIDADE DE ASPARAGINASE *in vivo*

Inicialmente, cinco grupos com cinco camundongos Balb C de 8 semanas de idade, receberam intraperitonealmente 525 U.I./kg de asparaginase. Cada grupo recebeu uma proteoforma de asparaginase produzida no laboratório (WT, P40S/S206C, T161I, Q190L, além do grupo controle, cujos animais receberam o veículo, tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,4). No anexo 2 estão descritas as concentrações e atividade específica de cada purificação utilizada nesses experimentos. Após 12 ou 24h a atividade asparaginásica foi medida no plasma coletado dos animais.

Uma vez que as asparaginases mutantes apresentam resistência às proteases lisossomais CTSB e/ou AEP, que estão relacionadas com a depuração sérica de ASNase (PATEL *et al*, 2009; VAN DER MEER *et al*, 2017), esperávamos que os animais que receberam estas proteoformas apresentassem maior atividade asparaginásica em comparação com o grupo que recebeu a enzima WT . Para a primeira dose, medimos a atividade asparaginásica após 24h

da injeção, e foi possível detectar atividade apenas no grupo que recebeu a proteoforma P40S/S206C em uma escala muito baixa (Figura 8 – Quadro A).

A partir dessa constatação, reduzimos o tempo para medir a atividade asparaginásica para 12 horas após a injeção nas aplicações subsequentes. Na segunda semana de tratamento, novamente, os animais que receberam a proteoforma P40S/S206C mostraram maior nível de atividade de asparaginase em relação aos outros grupos. A proteoforma T161I apresentou padrão similar ao da atividade da enzima selvagem, enquanto não foi possível detectar atividade no grupo que recebeu proteoforma Q190L (Fig 8).

A proteoforma P40S/S206C nas duas primeiras semanas se comportou conforme nossa hipótese, apresentando atividade asparaginase sérica maior que WT. A proteoforma T161I apresentou atividade similar em relação a WT, e a proteoforma Q190L não apresentou atividade. Na terceira semana, apenas os animais que receberam a asparaginase T161I mantiveram atividade asparaginásica no plasma (Fig 8C).

De forma contrastante, P40S/S206C e Q190L apresentam resistência a CTSB e AEP, e tiveram resultados distintos em citotoxicidade frente a linhagens leucêmicas e atividade asparaginásica *in vivo*. Como a atividade específica e os parâmetros cinéticos *in vitro* não foram afetados em ambas proteoformas (RODRIGUES, 2016), pode-se especular que a mutação Q190L pode acarretar uma instabilidade da estrutura terciária / quaternária que afetou a atividade

antitumoral *in vitro* e a atividade sérica *in vivo.* Vale ressaltar que a posição da mutação Q190L na estrutura quaternária da enzima fica localizada na interface entre dímeros não íntimos da ASNase de *E. coli*, o que pode ter tornado frágil a manutenção do tetrâmero, essencial para a atividade asparaginásica dessa ASNase (LOPES *et al*, 2017). Derst e colaboradores (1994) reportaram que mutações no resíduo Y181, próximo da mutação Q190L, leva a instabilidade no tetrâmero, reforçando a suposição que esta região é importante para a manutenção da estrutura quaternária da enzima.

Conforme o progresso das doses de asparaginase nos animais, percebemos que a atividade asparaginásica sérica diminuía até a quarta semana, momento o qual, nenhum grupo de camundongos apresentou atividade asparaginásica no plasma (Fig 8 D). O grupo que recebeu a mutante Q190L não teve atividade asparaginásica detectada em nenhuma semana (Fig 8 quadros A, B, C e D).

Nossa hipótese para justificar a diminuição da atividade sérica asparaginásica conforme a progressão das injeções seria a formação de anticorpos anti-ASNase pelos animais ao longo do tempo; isso estaria silenciando a atividade asparaginásica no plasma, efeito conhecido como inativação silenciosa (KEEGAN *et al*, 2011; PIETERS *et al* 2012).

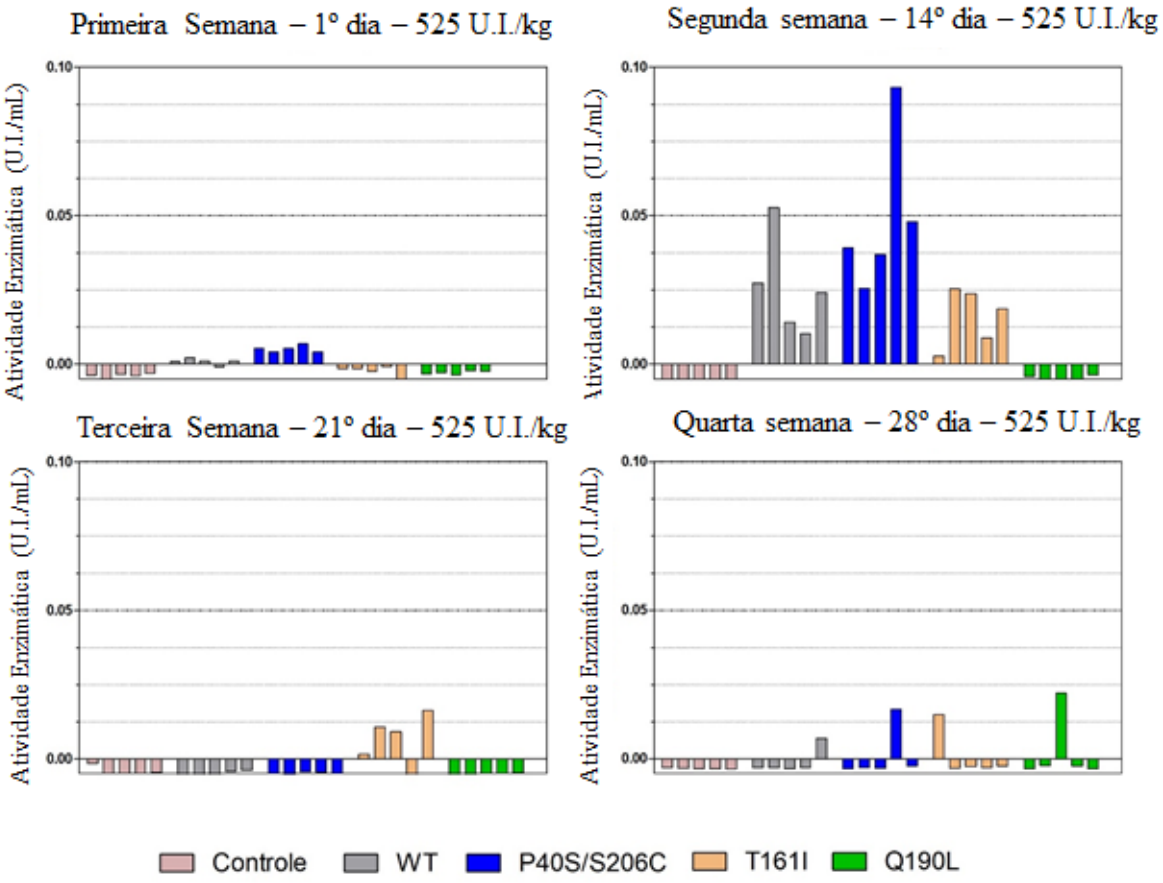

Figura 8 – Avaliação da Atividade Asparaginásica no Plasma de Camundongos. Semanalmente grupos de 5 camundongos receberam 525 U.I./kg de cada asparaginase (WT, P40S/S206C, T161I e Q190L) intraperitonealmente. A atividade asparaginase foi medida no plasma de cada animal, após 12h da aplicação de ASNases, com exceção primeira semana, onde foi medida após 24h. Cada coluna mostra a atividade de cada animal individualmente dentro de cada grupo (separados por cores). Quadro A; Primeira Semana, atividade medida após 24h. Quadro B; Segunda Semana, atividade medida após 12h. Quadro C; Terceira Semana, atividade medida após 12h. Quadro D; Quarta semana, atividade medida após 12h.

Com o objetivo de testar essa hipótese, a dose de asparaginase na quinta semana foi aumentada para 1.040 U.I./kg nos grupos de animais testados até

então, bem como se adicionou um novo grupo de animais (grupo virgem) que foi injetado com 1.040 U.I./kg de asparaginase pela primeira vez. Utilizamos um mesmo lote de cada asparaginase nos animais do grupo inicial e do grupo virgem. Ou seja, mesmo lote indica que as asparaginases vieram de uma mesma purificação e quantificação (Anexo II). O grupo virgem apresentou alta atividade no plasma de todos os camundongos, em contraste com o grupo que recebeu pela quinta vez essa maior dose de asparaginase, o qual só foi possível detectar atividade residual da proteoforma T161I, sugerindo inativação no grupo inicial de animais (Figura 9).

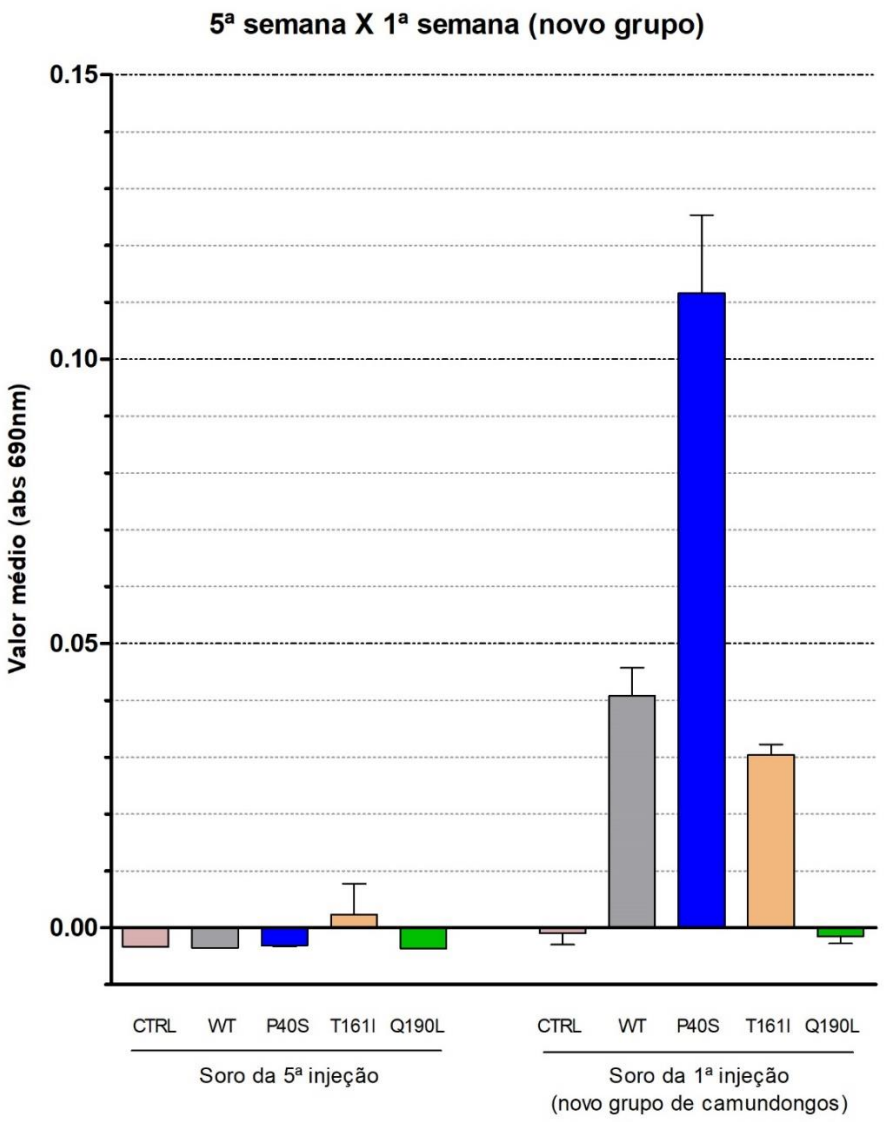

Figura 9 – Comparação entre as atividades de asparaginase medidas no plasma de camundongos na quinta semana de aplicação *versus* a primeira semana do novo grupo de camundongos. A dose recebida via intraperitoneal foi de 1.040 U.I./kg. A esquerda no gráfico estão as médias das atividades encontradas em cada grupo de camundongos que recebeu as injeções na quinta semana consecutiva. A direita estão as médias das atividades encontradas em cada grupo de camundongos que não foram previamente injetados com as ASNases (virgens). Os grupos "controle" receberam apenas o veículo em que se encontrava a asparaginase, tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4, glicina 100 mM.

Os resultados da figura 9 reafirmam que a mutante P40S/S206C mantém a atividade sérica aumentada quase três vezes em relação às demais asparaginases testadas no novo grupo de animais. Outro fator interessante, é que a T161I foi a única proteoforma a apresentar atividade residual após a quinta injeção. Apesar do experimento não ter sido desenhado para determinação de meia-vida da asparaginase, os resultados de atividade no plasma de animais virgens, com diferentes doses de ASNase (525 U.I./kg e 1040 U.I./kg) indicam que as mutações P40S/S206C têm o efeito de prolongar a meia vida sérica, o que está de acordo com a hipótese de que a aumentada resistência à CTSB e à AEP, atrase a depuração *in vivo* desta mutante.

Em 2014, Van der Meer e colaboradores identificaram em um paciente pediátrico em tratamento para LLA com ASNase, uma mutação heterozigota no gene codificador de CTSB, que levava a alteração de um códon, e uma provável CTSB inativa. Este indivíduo apresentou sintomas anormais de hiperamonemia durante o uso de L-asparaginase, e uma prolongada atividade sérica desta enzima, em relação à meia vida esperada de L-asparaginase em humanos.

A partir daí reforçou-se a hipótese desta protease lisossomal ser relevante para a depuração sérica de asparaginase. Em 2017, o mesmo grupo de trabalho acompanhou a asparaginase marcada com Indío-111 em camundongos e notou que duas horas após a injeção da asparaginase, houve um acúmulo desta em tecidos ricos em macrófagos, como fígado, baço e medula óssea. No mesmo

trabalho, o grupo demonstra que; (1) O tratamento prévio de camundongos com lipossomos de clodronato, o qual promove a depleção de macrófagos *in vivo*, levou ao aumento da meia vida da asparaginase, (2) o *knock-down* de CTSB por shRNA em culturas de células murínicas e humanas também leva ao atraso na degradação de ASNase e, (3) em camundongos knockout para CTSB a meia vida do biofármaco é aumentada (VAN DER MEER *et al*, 2017).

Esse conjunto de dados indica que a protease lisossomal CTSB é um determinante crítico da meia vida de asparaginase. Portanto, atribuímos a maior atividade sérica da mutante P40S/S206C, pelo menos em parte à maior resistência a degradação pela CTSB *in vivo*.

As proteases lisossomais podem ser divididas quanto à família ou função. Dentre as famílias, existem as Cisteíno-Catepsinas (a qual se encontra a CTSB, e outras 10 catepsinas), as aspartil catepsinas (D e E) e as serino catepsinas (A e G), além da asparagino-peptidase AEP, uma cisteíno-protease (TURK *et al*, 2012). Nosso foco de estudo nesse trabalho foram as proteases AEP e CTSB, por já terem sido relacionadas com a degradação de ASNase de *E. coli* por Patel e colaboradores (2009), e posteriormente confirmadas por van der Meer e colaboradores (2017). Ambas são cisteíno-proteases, sintetizadas como precursores inativos (zimógenos) e possuem como sitio ativo a tríade Cys-His-Asn. As proteases também podem ser classificadas quanto seu mecanismo de clivagem do peptídeo. As endopeptidases clivam porções internas da cadeia

peptídica, enquanto as exopeptidases degradam os peptídeos a partir das extremidades (C ou N terminal) (VERMA, DIXIT, PANDEY, 2016). A AEP tem função apenas de endopeptidase, clivando especificamente após resíduos de asparagina e aspartato (PATEL, 2009). A CTSB possui ambas as atividades (endopeptidase e exopeptidase) dependentes de pH. Em pH abaixo de 5,5 a atividade exopeptidase é evidenciada, agindo na extremidade C-terminal, removendo duplas de aminoácidos (carboxidipeptidase), enquanto em valores de pH acima de 5,5 a atividade endopeptidase é mais evidente (POLGAR, CSOMA, 1987).

Essa enzima se encontra predominantemente no compartimento lisossomal, onde se especula que, pelo pH acidificado, a atividade carboxidipeptidase seja mais pronunciada. No entanto CTSB pode ser encontrada em menores concentrações no núcleo, citoplasma, membrana plasmática e meio extracelular, apesar de não estar claro quais seriam seus substratos quando fora do lisossomo. É possível especular que nesses ambientes de pH mais neutro, a CTSB possua mais pronunciada a atividade endopeptidase. O seu sitio preferencial de clivagem nos peptídeos não é tão claro quanto o da AEP.

Sabe-se que o sítio ativo está localizado em uma fenda, e que a clivagem depende de um correto ajuste tridimensional do peptídeo substrato nessa fenda, e que peptídeos básicos tendem a se ligar preferencialmente, mas não é possível

prever com precisão o local da clivagem em um substrato peptídico (TURK *et al*, 2012)

As outras ASNases testadas, T161I e Q190L também apresentam resistência à CTSB *in vitro*, porém em ensaios *in vivo* não apresentam maior atividade sérica em comparação com a WT. O motivo para tal diferença pode estar no fato que o teste *in vitro* foi realizado com CTSB humana (ab151914 Abcam – Reino Unido) (RODRIGUES, 2016) e o ensaio *in vivo* foi realizado em camundongos. Embora ambas CTSB possuam 80% de identidade de sequência primária[2] (ALTSCHUL *et al*, 1997), é possível que existam diferenças em seus substratos preferenciais. Em camundongos a meia vida da forma nativa de asparaginase de *E. coli* é de aproximadamente 2,6 horas, significativamente menor que em humanos (REIFF, 2001 apud PARK, 1981).

Além disso, evidências observadas *in vitro* nem sempre são confirmadas em ensaios *in vivo*, devido ao incontável número de possíveis variáveis, tais como outras proteases envolvidas no processo de degradação de asparaginase. O aumento da expressão de AEP em linfoblastos leucêmicos está relacionado com um pior prognóstico em indivíduos com LLA (PATEL *et al*, 2009).

---

[2] Valor de identidade obtido através do programa BLASTP, entre a CTSB humana (UNIPROT: P07858) e CTSB de camundongos (P10605).

Ainda, a proteoforma Q190L não resultou em atividade detectável no plasma dos camundongos, mesmo com a maior dose injetada (1040 U.I/kg), o que está de acordo com a baixa atividade antitumoral observada nos ensaios *in vitro*.

Com o novo grupo de camundongos prosseguiu-se com as aplicações de asparaginase até a quarta aplicação, utilizando a mesma dose de 1.040 U.I./kg que foi iniciada nestes. Porém, não conseguimos realizar as aplicações semanalmente conforme previsto, porque não conseguimos produzir ASNase suficiente em tempo hábil. Os camundongos receberam a segunda dose quinze dias após a primeira, a terceira dose no 24º dia e a quarta e ultima dose no 31º dia. Como não detectamos atividade *in vivo* da mutante Q190L nos ensaios anteriores, o grupo que testa essa mutante foi constituído por apenas três animais, em contraste com os cinco utilizados nos outros grupos.

A mutante P40S/S206C permaneceu com atividade elevada na segunda aplicação de asparaginase, quando comparada com a WT e T161I (Figura 11 Quadros A e B). Na terceira e quarta aplicação (dias 24 e 31) não foi possível detectar atividade asparaginase em nenhum dos grupos de animais, com exceção de um único animal do grupo que recebeu a enzima P40S/S206C na quarta semana, que apresentou uma atividade residual (dados não mostrados).

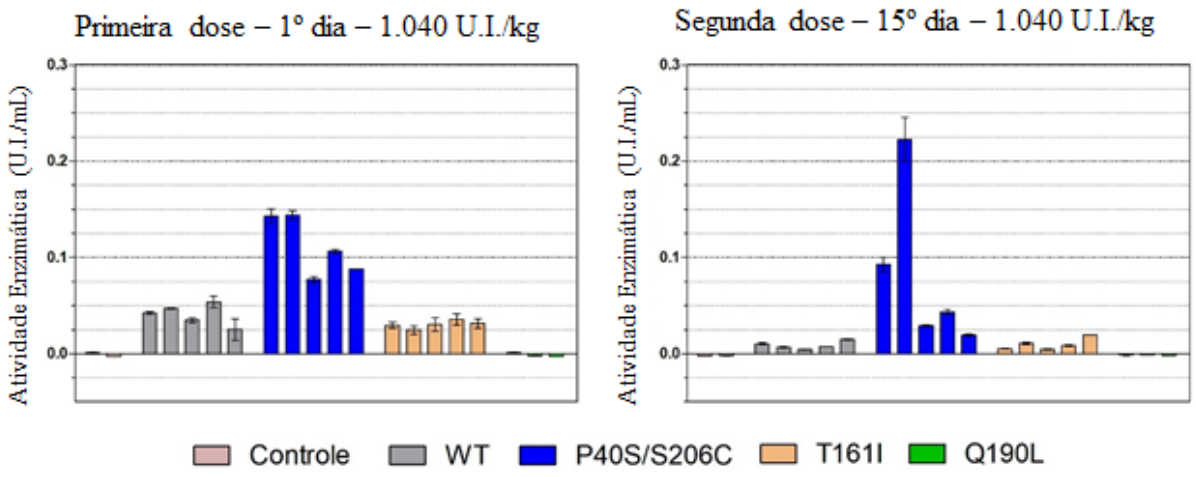

Figura 10 – Avaliação da Atividade Asparaginase no Plasma dos Camundongos – Novo grupo. Grupos de camundongos receberam 1040 UI/kg de cada asparaginase (WT, P40S/S206C, T161I e Q190L) intraperitonialmente. Após 12h, a atividade asparaginase foi medida no plasma. Cada coluna representa o resultado de cada animal individualmente. Quadro A; Primeira dose no primeiro dia. Quadro B; Segunda dose no décimo quinto dia.

No décimo quinto dia no novo grupo de animais, a proteoforma P40S/S206C apresentou elevada atividade asparaginásica sérica em relação as outras asparaginases testadas, da mesma forma que na segunda injeção do grupo anterior (dados não apresentados). Nessa injeção ainda é possível detectar atividade das proteoformas WT e T161I. Como nos dois ensaios após a quarta aplicação não foi possível detectar atividade das ASNases no plasma e essa queda se deu ao longo das semanas, após seguidas exposições, sugerimos que estaria ocorrendo inativação das enzimas devido à formação de anticorpos anti-ASNase.

Com o objetivo de testar essa hipótese, realizamos ensaios para verificar e quantificar comparativamente a formação de anticorpos nesses animais.

4.4 GERAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ASNase

Para verificar a formação de anticorpos Anti-ASNase nos camundongos testados, ensaios de ELISA foram realizados com um pool do plasma dos camundongos de cada grupo separadamente, comparando o plasma da segunda dose aplicada (525 U.I./kg) com o plasma da quinta dose (1.040 U.I./kg). Importante ressaltar que foram detectados especificamente anticorpos anti-ASNase e não IgGs totais. A formação de anti-ASNase contra a mutante T161I foi expressivamente menor quando comparada às asparaginases WT e P40S/S206C (Fig 11). A mutante T161I atingiu 0.3 UA enquanto P40S/S206C 1,4 UA.

Analisando esse resultado em conjunto com os resultados de atividade nesse primeiro grupo de animais, é possível explicar que a mutante T161I foi a única a manter atividade asparaginase detectável no plasma dos camundongos na terceira semana de aplicação e residual na quinta semana (respectivamente, Figuras 8 e 9), possivelmente por ter atrasado o efeito de inativação silenciosa, causado pela menor imunogenicidade e uma formação mais lenta de anticorpos anti-ASNase. Houve também menor formação de anticorpos durante a exposição à proteoforma Q190L, a qual apesar de não ter atividade asparaginásica sérica, também apresentou menor imunogenicidade.

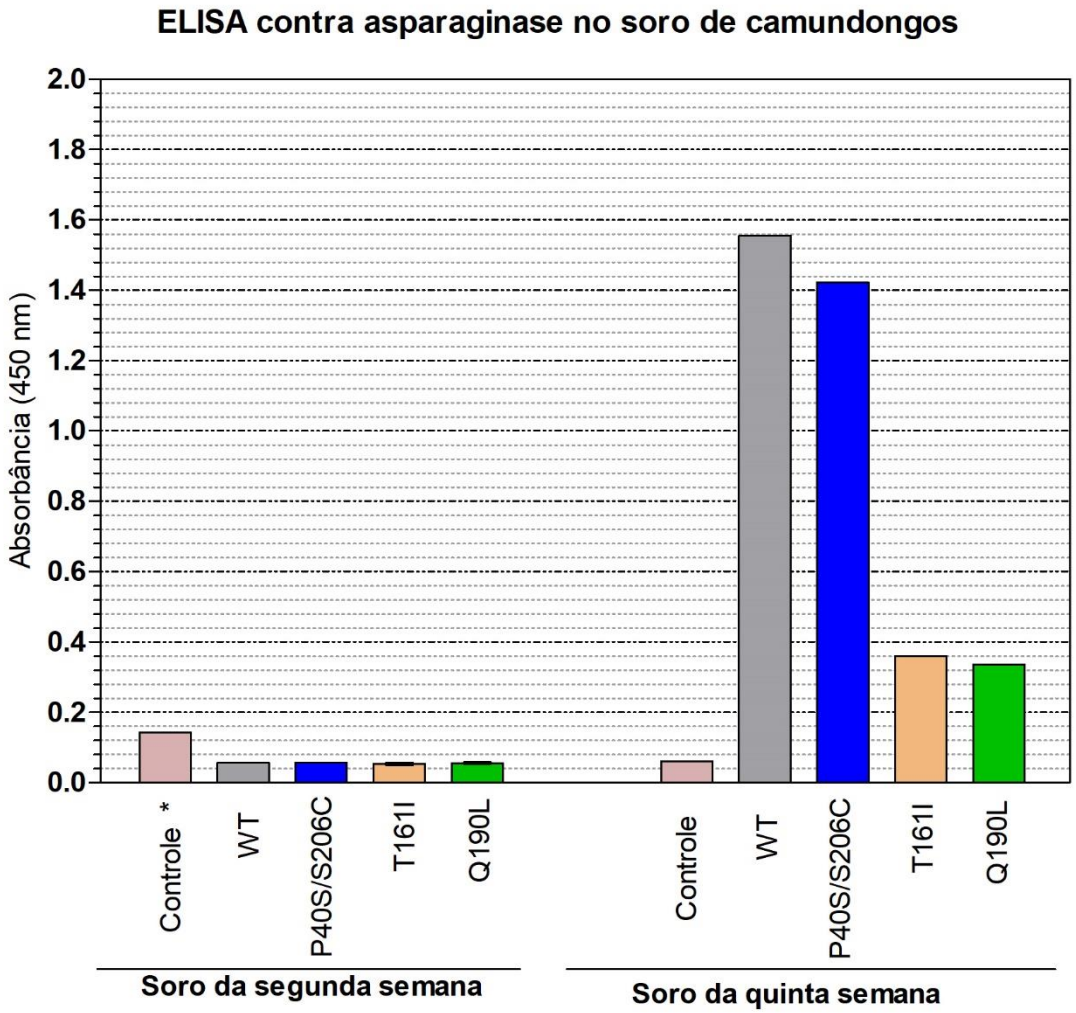

Figura 11 – Comparação do ensaio de ELISA entre o plasma dos camundongos na segunda semana (525 U.I./kg) e quinta semana (1040 U.I./kg). As ASNases T161I e Q190L apresentaram menor formação de anticorpos anti-ASNase em relação as enzimas WT e P40S/S206C.

Já foi relatado que a depleção de macrófagos em camundongos, leva ao aumento da meia vida de asparaginase (VAN DER MEER *et al*, 2017).

Macrófagos são células apresentadoras de antígeno, de MHC classe II. A asparaginase, uma vez endocitada por essas células, pode ser levada ao lisossomo, onde sofrerá a ação de proteases lisossomais, como CTSB e AEP, entre outras. Os peptídeos gerados serão apresentados na superfície celular em conjunto com o MHC de classe II às células T efetoras, gerando a produção de anticorpos. As proteases AEP e CTSB já foram relacionadas a formação de epítopos imunogênicos da toxina tetânica (ANTONIOU *et al*, 2000).

O papel das proteases no processamento de antígenos pode ocorrer de duas formas; (1) liberando o antígeno para a sua posterior apresentação em células apresentadoras de antígenos (CAA), ou ainda (2) participando da destruição do antígeno pelo efeito da própria protease, o que pode regular a duração da resposta imune. Sendo assim, a resistência a uma protease pode levar ao aumento ou a diminuição do seu papel imunogênico (preservando epítopos imunogênicos ou destruindo-os) (KASTEREN, 2014).

De fato, ao comparar a analise *in silico* de potenciais epítopos imunogênicos da enzima WT e da mutante T161I geradas pelo site www.tools.immuneepitope.org/bcell, nota-se que o epítopo predito ^{155}LDGRDV**T**KTNTTDVA^{169} passa a ser menor com a mutação ^{160}V**I**KTNTTDVA^{169}. Dessa forma, o potencial de imunogenicidade para a região que compreende o resíduo de aminoácido 161 contendo a Treonina cai de 1,214 para 0,603 com substituição pela Isoleucina nessa posição. De maneira

semelhante, a posição 190 com a Glutamina tem um potencial imunogênico de 0,838 para o peptídeo ^{187}IDY**Q**RTPARKHTSDTPFDV^{205} e passa a não ser mais considerado um epítopo com a troca pela Leucina na posição 190, diminuindo o potencial imunogênico para 0,175. As posições P40 e S206 não estão em regiões potencialmente imunogênicas e possuem valores de potencial imunogênico de 0,209 e 0,297 respectivamente (Figura 12).

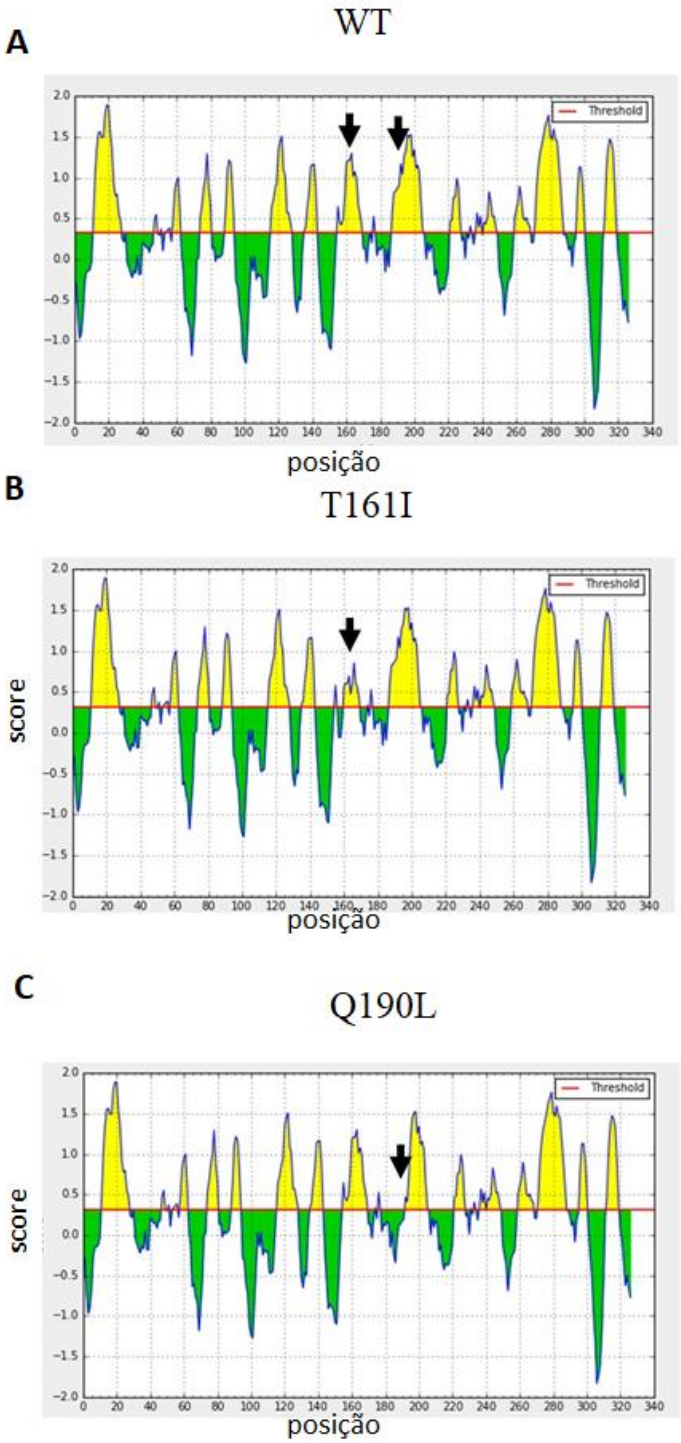

Figura 12: Análise *in silico* de epítopos da asparaginase de *E. coli*. Análise usando a ferramenta tools.immuneepitope.org.br/bcell sobre potenciais epítopos imunogênicos de asparaginase. A opção *Bepipred Linear Epitope Predition* foi a selecionada. Quadro A – enzima WT Quadro B – T161I Quadro C – Q190L. As setas nos gráficos indicam as regiões alteradas pela mutação.

Por fim, realizamos um novo ensaio de ELISA com o plasma dos camundongos do segundo grupo, os quais receberam a dose de 1.040 U.I./kg, após o 31º dia (quarta dose). Nesse momento nenhum dos animais apresentava atividade de asparaginase. Pode-se notar na Figura 13 que a enzima WT apresenta maior titulo de anticorpos quando comparada as outras três mutantes testadas.

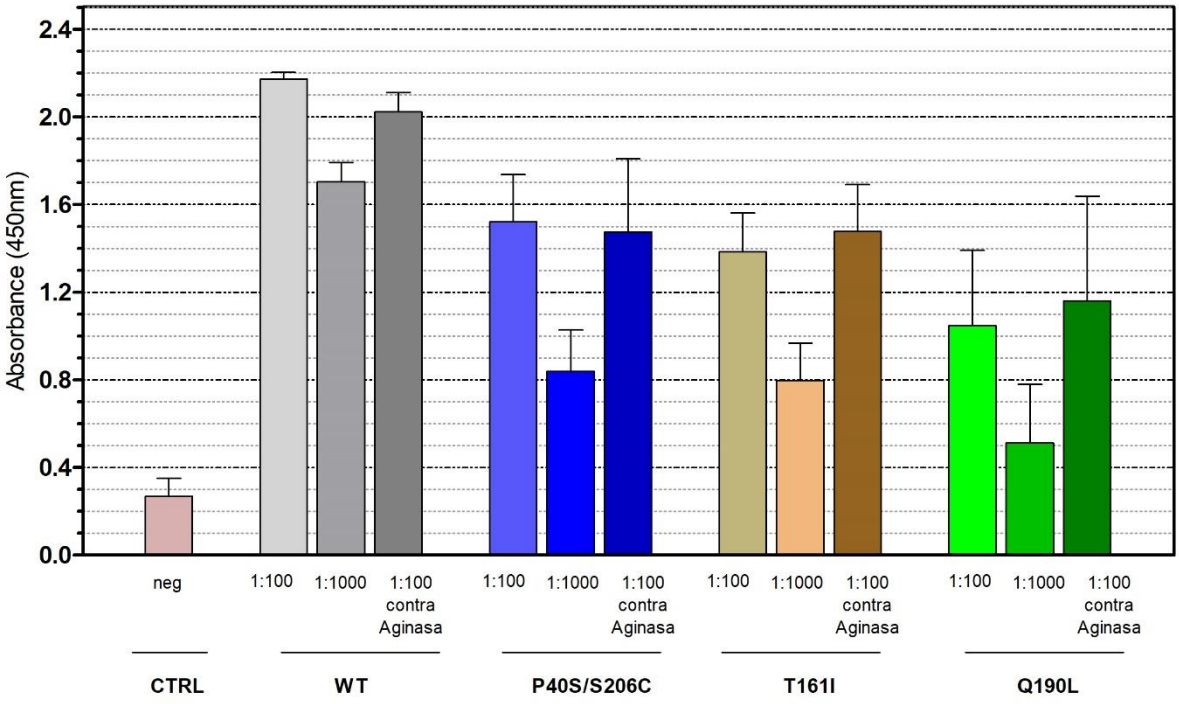

Figura 13 – Ensaio de ELISA para identificação de anticorpos anti-ASNase - Novo grupo. A primeira coluna dentro de cada grupo mostra diluição de 1:100 do plasma e o ensaio realizado contra a própria asparaginase testada. A segunda coluna mostra a diluição de 1:1000 do plasma contra a própria asparaginase testada. Já a terceira coluna mostra a diluição de 1:100 do plasma contra a enzima comercial Aginasa.

Além disso, os anticorpos gerados reconhecem igualmente as proteoformas e a formulação comercial Aginasa; comparação na mesma diluição (1:100) do plasma contra a própria enzima (WT, P40S/S206C, T161I ou Q190L) ou contra Aginasa; o que nos leva a crer que os epítopos gerados contra as proteoformas reagiriam de forma cruzada com a ASNase de *E. coli* comercial.

De toda forma, todas as mutantes caracterizadas como resistentes às proteases apresentaram menor formação de anti-ASNase. O ensaio ELISA realizado com o primeiro grupo de animais (Fig 11) exibiu a proteoforma P40S/S206C com a formação de anticorpos semelhante a WT, e mais imunogênica que T161I e Q190L. Isso contrasta com ensaio de ELISA realizado com o segundo grupo de animais (Fig. 13), no qual todas as proteoformas testadas apresentaram menor formação de anticorpos. Assim, observarmos que a diferença na frequência e a dose aplicada em cada grupo de animais levou a respostas imunes diferentes nos animais testados com a proteoforma P40S/S206C. Outros ensaios de caracterização da resposta imune a essa mutante precisam ser realizados para compreender essas diferenças. De qualquer maneira, as mutações pelo menos não a tornaram mais imunogênica do que a proteína WT.

5. CONCLUSÕES

A análise do nosso conjunto de dados nos leva a concluir que as mutações que conferem resistência a cisteíno-proteases P40S/S206C (CTSB e AEP) e T161I (CTSB), não interferem negativamente na capacidade citotóxica de ASNase frente as linhagens leucêmicas *in vitro*, enquanto a mutação Q190L traz prejuízos à capacidade antitumoral dessa enzima. A proteoforma P40S/S206C tem maior atividade asparaginásica no plasma de camundongos quando comparada a WT, nas primeiras exposições dos animais a ASNase. Por sua vez a proteoforma T161I tende a manter atividade sérica em camundongos já expostos a asparaginase. A mutação Q190L leva a perda de atividade asparaginásica *in vivo* nas condições testadas. As proteoformas P40S/S206C, T161I e Q190L geram um menor título de anticorpos anti-ASNase quando comparados a WT.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS:

Como o biofármaco asparaginase é de extrema importância para o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda, os estudos com os mutantes P40S/S206C e T161I, que apresentam melhor potencial, devem ser continuados.

O papel das mutações presentes em P40S/S206C deve ser elucidado, formando mutantes simples P40S e S206C. Pode-se submeter esses mutantes à ensaios de resistência as proteases estudadas e avaliar se apenas uma das mutações é responsável pela resistência à ambas as proteases, ou se existe um sinergismo entre as duas mutações que causa essa característica.

Pode-se sugerir também a construção de uma asparaginase que contenha todas as mutações com melhor potencial e estuda-las para avaliar o impacto dessas mutações na cinética, citotoxicidade *in vitro* e meia-vida sérica e imunogenicidade *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Res**. v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANTONIOU, A.N., BLACKWOOD, S., MAZZEO, D., WATTS, C. Control of Antigen Presentation by a Single Protease Cleavage Site **Immunity**, v. 12, p. 391–398, 2000.

BATOOL, T., MAKKYL, E. A., JALAL, M. Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 178, p. 900–923, 2016.

BELVISO, S. *et al*. The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. **PLoS ONE**. v. 12, n. 15, 2017.

BOREK, D., JASKÓLSKI, M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity, **Acta Biochimica Polonica** v. 48, n. 4, p. 893–902, 2001.

CHEN, S. Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistence. **Pediatrics and Neonatology**, v. 56, p. 287-293, 2015.

CHIEN, W. W., et al. Differential mechanisms of asparaginase resistance in B-type acute lymphoblastic leukemia and malignant natural killer cell lines. **Scientific Reports** v. 5, n. 8068 doi: 10.1038/srep08068, 2015.

COSTA, I.M., et al. Recombinant L-asparaginase 1 from Saccharomyces cerevisiae: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports** vol. 6 n. 36239, 2016.

DERST, C., et al, States and functions of tyrosine residues in Escherichia coli asparaginase II. **Eur J Biochem,** v. 224, p. 533–40, 1994.

DINDORF, P. A., GOOTENBERG, J., COHEN, M. H., KEEGAN P., FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Oncologist** v. 12. n. 8, p. 991-8, 2007.

EMA (EUROPEIAN MEDICINE AGENCY), 2016. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/003789/WC500200735.pdf>. Acessado em: 15/05/2018.

EMADI, A. ZOKAAE, H. SAUSVILLE E.A., Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies **Cancer Chemother Pharmacol** v. 73, p. 875–883, 2014.

HAYS, J. L., et al. A phase II clinical trial of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced ovarian cancer: Early closure for safety. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 1, p. 565-569, 2013.

HEITINK-POLLE, K. J. M., et al. High Incidence of Symptomatic Hyperammonemia in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Receiving Pegylated Asparaginase **JIMD Reports** v. 7, p 103-108, 2013.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER), Condutas do INCA/MS – Leucemias Agudas na Infância e Adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 43 n. 3. p. 245-257, 2001.

INCA 2017 Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017

KASTEREN, S. I., OVERKLEEFT, H.S. Endo-lysosomal proteases in antigen presentation **Current Opinion in Chemical Biology** v. 23, p. 8-15, 2014.

KNOTT, S. R. V., et al. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. **Nature** v. 554 n. 10 p. 1038, 2018.

LANVERS, C., PINHEIRO, J. P. V., HEMPEL, G. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. **Analytical Biochemistry** v. 309, p. 117–126, 2002.

LOPES, A. M., et al. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Crit Rev Biotechnol**, v. 37 n. 1, p. 82–99, 2017.

MAGGI, M. et al. A protease-resistant *Escherichia coli* asparaginase with outstanding stability and enhanced antileukaemic activity *in vitro*. **Scientific Reports** v. 7 n. 14479, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 1a, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Secretaria de Atenção a Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática – Nota Informativa Conjunta nº 01/2017 Brasília 21 de fevereiro de 2017 Assunto: L-asparaginase. Disponivel em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/07/Nota%20Informativa%20Conjunta%2001-2017%20DAF-DAET.pdf> Acesso em 15/05/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 1b. Portaria n º 704 Diário Oficial da União (DOU) 08 mar 2017; 33; Seção 1 Disponivel em : <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10574&Itemid=574>. Acesso em 15/05/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 1c. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde, Informe Técnico 02/2017 Assunto: Informações sobre as novas propostas de Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo para o ano de 2017.

NARTA, U.K.; KANWAR, S.S.; AZMI, W.; Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** v. 61, p. 208–221, 2007.

NGUYEN, H. A., et al, A novel l-asparaginase with low l-glutaminase coactivity is highly efficacious against both T and B – cell acute lymphoblastic leukemias in vivo. **Cancer Research** v. 78, n. 6, 2018.

NOMME, J., SU, Y., LAVIE, A. Elucidation of the Specific Function of the Conserved Threonine Triad Responsible for Human L-asparaginase Autocleavage and Substrate Hydrolysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, p. 2471-2485, 2014.

OFFMAN, M. N., et al. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood Journal** v. 117 p. 1614-1621, 2011.

Prism 6 User Guide, GraphPad Software Inc. 2016, Disponível em: https://www.graphpad.com/support/faq/pdf-files-of-graphpad-help-and-manuals/. Acessado em: 10/02/2018.

PARK YK, et al. Pharmacology of E. coli L-asparaginase polyethylene glycol adduct. **Anticancer Res** v. 1 p. 373-6, 1981.

PASUT, G.; VERONESE, F. M.; State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research; **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 461–472, 2012.

PAZDUR R.. FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Oncologist**. v. 12, n. 8, p. 991-998, 2007.

PATEL, N., et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. **J Clin Invest** v. 119 n. 7 p. 1964–1973, 2009.

PIETERS, R.; HUNGER, S. P.; BOOS, J.; RIZZARI, C.; SILVERMAN, L; BARUCHEL, A.; GOEK, N.; SCHRAPPE, M.; PUI, C.H.; L-Asparaginase Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer**, v. 117, p. 238-249; 2012.

POLGAR, L., CSOMA, C. Dissociation of Ionizing Groups in the Binding Cleft Inversely Controls the Endo and Exopeptidase Activities of Cathepsin B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262:30, n.25, p. 1444-1445, 1987.

RAETZ, E.A.; SALZER, W.L. Tolerability and Efficacy of L-Asparaginase Therapy in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia; **J Pediatr Hematol Oncol** v. 32, p. 554–563, 2010.

REIFF, A., et al. Treatment of collagen induced arthritis in DBA/1 mice with L-asparaginase **Clinical and Experimental Rheumatology**; v.19 p. 639-646. 2001

RODRIGUES, M. A. D. Avaliação da Atividade e Resistência à Clivagem Proteolítica de L-asparaginases Recombinantes Obtidas por Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SANTOS, J. C. F. Cultivo de Escherichia coli BL21 (DE3) para produção de L-asparaginase II. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SQUIBAN, B., AHMED, ST., FRAZER, JK. Creation of a human T-ALL cell line online database. **Leukemia & Lymphoma**. v. 58, n. 11, p. 2728–2730, 2017.

SUGIMOTO, K. et al. A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines. **Cancer Sci** v. 106 p. 1534–1543, 2015.

SHRIVASTAVA, A., et al. Recent Developments in L-asparaginase Discovery and its Potential as Anticancer Agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** v. 100, p. 1-10, 2016.

SU, N., et al. Correlation between Asparaginase Sensitivity and Asparagine Synthetase Protein Content, but not mRNA, in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines **Pediatr Blood Cancer** v. 50 p. 274–279, 2008.

SUGIMOTO, K. et al. A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines **Cancer Sci** v.106 p. 1534–1543 2015.

SLUIS, IM. et al. Efficacy and safety of recombinant E. coli asparaginase in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: A randomized multicenter study of the Dutch Childhood Oncology Group. **Pediatr Blood Cancer**. e.27083 doi: org/10.1002/pbc.27083 2018

TONG, W.H. et al. No Evidence of Increased Asparagine Levels in the Bone Marrow of Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia During Asparaginase Therapy. **Pediatr Blood Cancer** v. 60, p. 258–261, 2013.

TONG, W. H., et al. A prospective study on drug monitoring of PEGasparaginase and Erwinia asparaginase and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood** v. 27, n. 13, 2014.

TURK, V., et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1824 p. 68–88, 2012.

VAN DER MEER, L.T., et al. A germ line mutation in cathepsin B points toward a role in asparaginase pharmacokinetics. **Blood** v. 124, n. 9. p. 3027-3029, 2014.

VAN DER MEER LT, et al. In vivo Imaging of Antileukemic Drug Asparaginase Reveals a Rapid Macrophage-Mediated Clearance from the Bone Marrow. **J Nucl Med**. v. 58: p. 214-220, 2017.

VERMA, S., DIXIT, R., PANDEY, K. Cysteine Proteases: Modes of activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. **Frontiers in Pharmacology** v. 7, n. 107, 2016.

ZENATTI, P. P., et al. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of E. coliL-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine** v. 30 p. 158–166, 2018.

ANEXO I

HPB	AGINASA®	WT	P40S/S206C	T161I	Q190L
IC50	0,001**	0,003**	0,003**	0,002**	0,001**
R^2	0,72	0,59**	0,64**	0,57**	0,36**
IC50 95%[1]	0.0001 a 0.01	0.0004 a 0,02	0,001 a 0,02	0,0003 a 0,02	0,0001a 0,05
RS4; 11	**Aginasa®**	**WT**	**P40S/S206C**	**T161I**	**Q190L**
IC50	interrompido	interrompido	0,02	0,003**	0,003**
R^2	-	-	0,43**	0,35**	0,24**
IC50 95%[1]	-	-	0,004 a 0,09	0,0001 a 0,06	0,0001 a 0,14
NALM6	**Aginasa®**	**WT**	**P40S/S206C**	**T161I**	**Q190L**
IC50	0,33	0,51	0,28	0,29	2,70**
R^2	0,95	0,73	0,86	0,71	0,33**
IC50 95%[1]	0,27 a 0,40	0,30 a 0,87	0,20 a 0,39	0,17 a 0,51	0,34 a 21,15
CEM	**Aginasa®**	**WT**	**P40S/S206C**	**T161I**	**Q190L**
IC50	0,09	0,11	0,12	0,06	0,49
R^2	0,95	0,79	0,81	0,73	0,62**
IC50 95%[1]	0,07 a 0,10	0,07 a 0,17	0,07 a 0,18	0,04 a 0.11	0,25 a 0,97
JUKART	**Aginasa®**	**WT**	**P40S/S206C**	**T161I**	**Q190L**
IC50	0,03	0,12	0,05	0,11	0,3
R^2	0,99	0,86	0,91	0,88	0,63**
IC50 95%[1]	0,02 a 0,03	0,09 a 0,17	0,04 a 0,07	0,08 a 0,15	0,16 a 0,55
REH	**Aginasa®**	**WT**	**P40S/S206C**	**T161I**	**Q190L**
IC50	0,21	0,85	0,41	1,33**	1,32**
R^2	0,97	0,81	0,88	0,75	0,53**
IC50 95%[1]	0,18 a 0,24	0,52 a 1,38**	0,30 a 0,57	0,67 a 2,6	0,40 a 4,3
MOLT 4 72H*	**WT**	**P40S/S206C**	**T161I**	**Q190L**	
IC50	0,09	0,06	0,07	0,03	
R^2	0,7902	0,7917	0,7227	0,44**	

IC50 95%[1]	0,06 a 0,15	0,03 a 0,09	0,04 a 0,12	0,01 a 0,1
REH 72H*	**WT**	**P40S/S206C**	**T161I**	**Q190L**
IC50	0,53	0,39	0,17	Interrompido
R^2	0,86	0,75	0,54**	-
IC50 95%[1]	0,38 a 0,74	0,25 a 0,62	0,04 a 0,22	-

ANEXO II

Valores de concentração e atividade específica das enzimas produzidas no laboratório e utilizadas nos experimentos *in vivo*.

	WT	P40S/S206C	T161I	Q190L	
23/06/2017	2,1	1,4	2,5	3,5	mg/mL
1ª Semana	62	49	80	52	U/mg
	130,2	68,6	200	182	U/mL
30/06/2017	4,1	2,7	1,9	3,5*	mg/mL
2ª Semana	110	53	65	62	U/mg
	453	143	123	217	U/mL
07/07/2017	4,1	2,41	2,5	3,9	mg/mL
3ª Semana	79,2	47,3	60,7	95	U/mg
	324	114	151,7	370	U/mL
14/07/2017	5,1	9,5	9,3	9,5	mg/mL
4ª Semana	91,6	90,7	97,3	87,1	U/mg
	476	861	904	827	U/mL
21/07/2017	5,1*	9,5*	9,3*	9,5*	mg/mL
5ª Semana (Primeiro Grupo)	91,6	90,7	97,3	87,1	U/mg
1ª Semana (Grupo novo)	476	861	904	827	U/mL
04/08/2017	1,1	9,5*	9,3*	9,5*	mg/mL
	60	76	78	87,1	U/mg
	66	725	725	827	U/mL
11/08/2017	1,82	1,62	1,76	9,5*	mg/mL
	77,5	56	53	76	U/mg
	141,5	90	93,3	722	U/mL
25/08/2017	4,8	6,4	6,7	9,5*	mg/mL
	65	42	57	76	U/mg
	312	268	382	722	U/mL
* Utilizamos lotes de purificação anterior					

ANEXO III

UNICAMP

CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da atividade de L-Asparaginases recombinantes obtidas por PCR propensa a erro**, registrada com o nº **4556-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Fábio Papes, Prof. Dr. José Andrés Yunes e Priscila Pini Zonatti**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da Universidade **Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **11 de maio de 2017**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	**15/05/2017 -15/05/2018**
Vigência da autorização para manipulação animal:	**15/05/2017 -16/06/2018**
Espécie / linhagem/ raça:	**Camundongo isogênico / BALB/cJ**
No. de animais:	**64**
Peso / Idade:	**06 semanas / 20g**
Sexo:	**fêmeas**
Origem:	**CEMIB/UNICAMP**

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 11 de maio de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Afonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO IV

UNVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0932018/FCF

São Paulo, 11 de maio

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "***Avaliação da resistência de formas mutantes da enzima L-asparaginase e proteases séries humanas***".

Cordialmente,

Prof. Dr. **JOÃO CARLOS MONTEIRO DE CARVALHO**
Presidente da CIBio - FCF

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **GISELE MONTEIRO**

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP

NESTA

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone/fax: (011) 3091-3678 - e-mail: atadfcf.usp.br

ANEXO V

15/05/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 6566872/1 - Marcela Valente Pimenta da Fonte

Email:	marcelavpimenta@yahoo.com.br (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento:	04/10/1986
Cédula de Identidade:	RG - 43.916.339-0 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Ciências Biológicas - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo - Brasil - 2009
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Biologia (Genética) - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso:	Doutorado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula:	22/07/2013
Início da Contagem de Prazo:	22/07/2013
Data Limite para o Depósito:	18/05/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Gisele Monteiro - 22/07/2013 até o presente. Email: smgisele@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 22/07/2013
Licença(s) Maternidade:	180 dias Período de 24/08/2015 até 19/02/2016
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 18/01/2018 até 18/05/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 07/07/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 22/07/2013 Licença Maternidade em 24/08/2015 Prorrogação em 24/11/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018
Impresso em: 15/05/2018 18:36:51

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 68668721 - Marcela Valente Pimenta da Fonte

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5733-5/5	Uso Industrial de Enzimas	12/08/2013	13/10/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5776-4/9	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	07/10/2013	20/10/2013	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5102-4/1	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2014	20/04/2014	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BTC5721-4/4	Tópicos Avançados em Química de Proteínas e Peptídeos para Aplicação Biotecnológica (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	14/04/2014	75	5	92	A	N	Concluída
QBQ5602-4/2	Metodologias em Bioquímica e Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	21/04/2014	60	4	95	A	N	Concluída
ICB5731-1/1	Ferramentas de Bioinformática para Análise de Estruturas de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/05/2014	15/06/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BTC5782-2/1	Enzimologia Básica e Aplicações em Processos Industriais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	02/06/2014	15/06/2014	60	4	100	A	N	Concluída
ODO5700-1/1	Docência Universitária e Estratégias de Ensino-Aprendizagem (Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo)	04/08/2014	24/11/2014	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
AGG5900-12/3	Preparação Pedagógica (Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas - Universidade de São Paulo)	12/08/2014	24/11/2014	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MPT5760-4/4	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	15/08/2014	16/10/2014	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
QBQ5605-9/5	Prática de Ensino de Química e Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	18/08/2014	30/11/2014	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5726-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
AUT5833-2/3	Pedagogia Aplicada à Arquitetura e ao Urbanismo (Faculdade de Arquitetura e Urbanismo - Universidade de São Paulo)	21/08/2014	18/12/2014	135	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5709-6/2	Ensaios Pedagógicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/11/2014	07/12/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBT5773-7/5	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	02/03/2015	10/05/2015	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da tese	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018
Impresso em: 16/05/2018 01:36:14

ANEXO VI

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br