UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós – Graduação em Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Efeitos de osmólitos na L- asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi* em
meio aquoso**

Samarina Rodrigues Włodarczyk

Tese para a obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro

Coorientador: Dr. Pedro Madeira

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós – Graduação em Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Efeitos de osmólitos na L- asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi* em meio aquoso

Samarina Rodrigues Wlodarczyk

Versão Original

Tese para a obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro

Coorientador: Dr. Pedro Madeira

São Paulo

2017

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

W836e Wlodarczyk, Samarina Rodrigues
Efeitos de osmólitos na L- asparaginase II de
Erwinia chrysanthemi em meio aquoso / Samarina
Rodrigues Wlodarczyk. - São Paulo, 2017.
108 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: MONTEIRO, GISELE
Coorientador: MADEIRA, PEDRO

1. L- asparaginase. 2. Erwinia chrysanthemi. 3.
osmólito. 4. leucemia linfóide aguda. 5. agregação.
I. T. II. MONTEIRO, GISELE, orientador. III.
MADEIRA, PEDRO, coorientador.

Samarina Rodrigues Wlodarczyk

Efeitos de osmólitos na L- asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi* em meio aquoso

Comissão Julgadora da
Tese para a obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro

Orientadora / Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro pela orientação, apoio durante o desenvolvimento do projeto e momentos de descontração.

À minha família, por sempre apoiar meus sonhos.

Aos amigos e parceiros de trabalho no laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica, pela amizade, auxílio e incentivo. Também, aos amigos dos demais laboratórios da FCF, por me darem dicas e me auxiliarem sempre que tive dúvidas.

A toda equipe de profissionais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela contribuição direta ou indireta na realização deste trabalho.

Ao Flávio, pelo carinho, paciência e companhia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (projetos 2013/24024-6 e temático 2013/08617-7) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Obrigada a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

EPÍGRAFE

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(Charles Chapin)

RESUMO

WLODARCZYK, S.R. **Efeitos de osmólitos na L- asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi* em meio aquoso**. 2017. 108 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A L- asparaginase é uma enzima aplicada no tratamento de Leucemia Linfóide Aguda, que atua na hidrólise da L- asparagina, privando a célula tumoral de um aminoácido essencial para o seu crescimento. A L- asparaginase, como outros biofármacos, deve ser estável, manter sua atividade específica e formar poucos agregados. A fim de manter a integridade do biofármaco, são utilizados adjuvantes nas formulações farmacêuticas, e dentre os mais importantes estão os osmólitos. Essas moléculas protegem a estrutura nativa da proteína, sendo capazes de interferir na formação de agregados e garantir a estabilidade proteica. O presente trabalho teve o objetivo de estudar o efeito dos osmólitos sacarose, sorbitol, arginina e glicina na atividade específica, estabilidade, cinética e caracterização de agregados na solução de L- asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi*. Os resultados mostraram que a maioria dos osmólitos testados aumentou a atividade específica e a estabilidade da enzima, o que pode estar relacionado com o aumento da velocidade máxima e do k_{cat} observados no ensaio cinético realizado com sacarose e sorbitol. Um perfil diferente de agregados foi encontrado para cada tipo de osmólito. A presença de sacarose ou sorbitol resultou na menor quantidade de agregados na faixa de, respectivamente, 100 a 200 e 200 a 300 nm em relação a enzima sem osmólito. Por outro lado, aumento no número total de agregados e presença de moléculas de alto peso molecular (300 a 500 nm) foram observados nas soluções enzimáticas contendo, respectivamente, glicina e arginina. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho poderão auxiliar na produção e escolha da formulação de biofármacos, e, conseqüentemente, melhorar o tratamento medicamentoso de pacientes.

Palavras-chave: L- asparaginase; *Erwinia chrysanthemi*; osmólito; biofármaco; leucemia linfóide aguda, agregação.

ABSTRACT

WLODARCZYK, S.R. **Effects of omolytes in L- asparaginase II from *Erwinia chrysanthemi* in aqueous medium**. 2017. 108 p. Doctoral thesis – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

L L-Asparaginase is an enzyme applied in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia, which acts on the hydrolysis of L- asparagine, depriving the tumor cell of an essential amino acid for its growth. L-asparaginase, as other biopharmaceuticals, must be stable, maintain its specific activity and form few aggregates. In order to maintain the integrity of the biopharmaceutical, adjuvants are used in the pharmaceutical formulations, and among the most importants adjuvants are the osmolytes. These molecules protect the native structure of the protein, being able of interfering in the formation of aggregates and guarantee protein stability. The present work had the objective of studying the effect of the osmolytes sucrose, sorbitol, arginine and glycine in the specific activity, stability, kinetic and aggregates characterization, in L-asparaginase II solution of *Erwinia chrysanthemi*. The results showed that the majority of the tested osmolytes increased the specific activity of the enzyme and its stability, which may be related to the augment of maximum velocity and k_{cat} observed in the kinetic assay performed with sucrose and sorbitol. A different profile of aggregates was found for each type of osmolyte. The presence of sucrose or sorbitol resulted in the least amount of aggregates in the range of, respectively, 100-200 and 200-300nm in relation to the enzyme without osmolyte. On the other hand, increase in the total number of aggregates and the presence of high molecular weight molecules (300 to 500 nm) were observed in the enzymatic solutions containing, respectively, glycine and arginine. Thus, the results obtained in this work may help in the production and choice of the formulation of biopharmaceuticals and, consequently, improve the drug treatment of patients.

Keywords: L-asparaginase; *Erwinia chrysanthemi*; osmolyte; biopharmaceutical; Acute lymphoblastic leukemia, aggregation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel SDS – PAGE (gel 10%) mostrando a fração solúvel do extrato contendo ErA II.....	40
Figura 2 - Efeito dos osmólitos L-arginina, sorbitol , glicina, sacarose e ureia em 5 concentrações diferentes na atividade específica da ErA II (imagens A - E).....	42
Figura 3 - Atividade específica relativa da ErA II na presença dos osmólitos sorbitol, sacarose, glicina e arginina 60 e 90 mM (imagens A e B) em função do tempo de incubação com os osmólitos	47
Figura 4 - Intensidade do espalhamento dinâmico de luz em relação ao diâmetro provável das partículas (nm) nas amostras de ErA II na ausência ou presença arginina, glicina, sorbitol ou sacarose 90 mM (imagens A e B).....	52
Figura 5 - Perfil de agregados encontrados nas amostras de ErA II na ausência ou presença de osmólitos 90 mM (imagens A – F) pela técnica do rastreamento de nanopartículas.....	56
Figura 6 - Caracterização cinética da ErA II na ausência ou presença de sacarose ou sorbitol 90 mM pelo método a espectrofotométrico acoplado à GDH.....	61
Figura 7 - Atividade Específica Relativa da ErA II na ausência ou presença de sacarose ou sorbitol 90 mM obtida pela técnica de ensaio acoplado à GDH...	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do gel de poliacrilamida.....	30
Tabela 2 - Quantidades utilizadas de enzima para o teste de atividade específica pelo método de Nessler.....	33
Tabela 3 - Tamanho de partículas encontradas nas soluções de ErA II na presença ou ausência de sacarose ou sorbitol 90 mM considerando a distribuição por volume (%)......	53
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos da ErA II na ausência ou presença de sacarose ou sorbitol 90 mM.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Atividade Específica
AER	Atividade Específica Relativa
Arg.	Arginina
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CMOS	Câmara de óxido-metal semicondutor (do inglês, <i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>)
D _H	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EcA II	L- Asparaginase II proveniente de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ErA II	L- Asparaginase II proveniente de <i>Erwinia chrysanthemi</i>
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GDH	Glutamato Desidrogenase
Gly	Glicina
GdnHCl	Hidrocloreto de Guanidina
HCl	Ácido Clorídrico
hDHFR	Diidrofolato redutase humana
IPTG	Isopropil- β - D - 1 -Tiogalctopiranosídeo
IgG	Imunoglobulina G
K _M	Constante de Michaelis – Menten
k _{cat}	Número de Renovação
K ₂ [HgI ₄]	Tetraiodo Mercurato de Potássio
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
NaCl	Cloreto de Sódio
NTA	Análise por rastreamento de nanopartículas (do inglês <i>Nanotracking Analysis</i>)
PdI	Índice de Polidispersão

PSA	Persulfato de Amônio
PEG	Polietilenoglicol
pET 15b	Vetor Plasmidial de expressão da Empresa <i>Novagen</i>
pUC57	Vetor Plasmidial da Empresa de clonagem
Sac.	Sacarose
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDA – Page	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Dodecil Sulfato de Sódio
Sorb.	Sorbitol
TEMED	N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina
TMAO	N- óxido de trimetilamina (do inglês <i>Trimethylamine N-oxide</i>)
Tris	2-Amino-2-Hidroximetil-Propano-1,3-Diol
V	Velocidade
$V_{\text{máx.}}$	Velocidade Máxima
[S]	Concentração de Substrato
[E]	Concentração de Enzima

LISTA DE UNIDADES

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µM	Micromolar
cm	Centímetro
η	Viscosidade do solvente
D	Difusão média das partículas
Da	Dalton
g	grama
g	aceleração gravitacional
h	horas
k	Constante de Boltzman
kDa	kilo Dalton
L	Litros
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
rpm	Rotações por Minuto
s	Segundos
T	Temperatura absoluta em Kelvin
U	Unidade
(p / v)	Peso / Volume
(v / v)	Volume / Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Aplicação e mecanismo de ação da L- asparaginase	17
2.2 ESTRUTURA DA L- ASPARAGINASE	18
2.3 REAÇÕES DE IMUNOGENICIDADE	18
2.3 AGREGAÇÃO PROTEICA	19
2.4 PRESENÇA DE AGREGADOS DURANTE A PRODUÇÃO DE L- ASPARAGINASE II	21
2.5 OSMÓLITO E SUA IMPORTÂNCIA NAS FORMULAÇÕES DE L- ASPARAGINASE	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Plásmídeo, linhagens bacterianas e meios de cultivo	25
4.2 Produção de L- Asparaginase II	25
4.2.1 Transformação	25
4.2.2 Solução estoque e ativação das linhagens bacterianas	26
4.2.3 Preparo do Inóculo	26
4.2.4 Expressão da enzima L- Asparaginase II de <i>Erwinia chrysanthemi</i>	27
4.2.5 Análise da expressão proteica	27
4.2.7 Purificação proteica em coluna de afinidade a metais	28
4.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-Page)	29
4.2.9 Purificação em coluna PD - 10	30
4.2.10 Concentração da proteína purificada	31

4.2.11	Quantificação da L- Asparaginase II	31
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA L- ASPARAGINASE II DE <i>E. chrysanthemi</i> QUANTO À ATIVIDADE ESPECÍFICA, ESTABILIDADE E CINÉTICA.....	32
4.3.1	Atividade específica da enzima pelo método do reagente de Nessler	32
4.3.3	Método do reagente de Nessler para análise da atividade específica na presença de osmólitos	33
4.3.4	Método do reagente de Nessler para análise da estabilidade da ErA na presença de osmólitos	34
4.3.5	Atividade específica e cinética enzimática pelo método acoplado à glutamato desidrogenase	34
4.3.6	Atividade específica na ausência e presença de osmólitos pelo método acoplado à glutamato desidrogenase.....	35
4.3.7	Caracterização cinética da ErA na ausência e presença de osmólitos pelo método acoplado à glutamato desidrogenase.....	35
4.3.8	CARACTERIZAÇÃO DE AGREGADOS PROTEICOS DE ErA	36
4.3.8.1	Caracterização de agregados por espalhamento dinâmico de Luz	36
4.3.8.2	Caracterização de agregados por análise de rastreamento de nanopartícula.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Expressão da proteína L- Asparaginase II	39
5.2	Caracterização da atividade específica da enzima na ausência e presença de osmólitos	40
5.2.1	Caracterização da atividade específica da ErA	40
5.2.2	Caracterização da atividade específica da ErA na presença de osmólitos	41
5.2.3	Estabilidade da enzima na presença de osmólitos em função do tempo	46
5.3	Caracterização de Agregados proteicos.....	50
5.3.1	Caracterização de agregados por espalhamento dinâmico de luz (DLS)	51
5.3.2	Caracterização de agregados por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	55
5.4	Efeito dos osmólitos na cinética enzimática	60

6. CONCLUSÕES	66
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

A L- asparaginase é uma enzima utilizada como medicamento para o tratamento de câncer, especialmente da Leucemia Linfóide Aguda (LLA). Seus efeitos antineoplásicos resultam da redução da concentração de asparagina plasmática, a qual é essencial para o metabolismo das células malignas deficientes em sua síntese (SRIKHANTA et al., 2013; BAHREINI, ELHAM et al., 2014; LOPEZ-SANTILLAN et al., 2017).

A formação de agregados proteicos é um desafio a ser superado no desenvolvimento de biofármacos de proteínas (MEZENTSEV et al., 2007). No caso da L- asparaginase, cuja forma ativa é um tetrâmero, a instabilidade da droga produzida pode resultar em monômeros que se agregam (WOLF et al., 2003). Esses agregados podem comprometer a aparência da droga, causar perda da atividade proteica e provocar respostas imunogênicas (WANG, WEI et al., 2012). A administração de L- asparaginase é o tratamento de primeira linha para a maioria dos casos de LLA (EBEID; KAMEL; ALI, 2008), sendo que o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade pode resultar na descontinuidade de seu uso na terapia (ZALEWSKA-SZEWCZYK et al., 2009).

Uma forma de regular a agregação é pela adição de osmólitos à solução enzimática. Essas moléculas são capazes de estabilizar a estrutura nativa da proteína (BAHREINI, E. et al., 2014), e com isso, contribuem para a redução da agregação. O mecanismo dessas moléculas ainda não está bem estabelecido (FERREIRA et al., 2015), mas sabe-se que elas são empregadas na formulação de diversos biofármacos.

Ainda há muito debate quanto à melhor formulação e dosagem da L- Asparaginase II (PIETERS et al., 2011). O objetivo do presente trabalho foi testar o efeito dos osmólitos sacarose, sorbitol, arginina e glicina na L- asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi* (ErA). Para isso, a enzima na ausência ou presença desses osmólitos foi testada quanto a sua atividade específica, estabilidade, cinética e quantidade de agregados. Buscou-se identificar as alterações provocadas pelos osmólitos no comportamento da enzima e avaliar quais são os mais indicados para serem empregados com adjuvantes em formulações de L- Asparaginase II.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 APLICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO DA L- ASPARAGINASE

A L-Asparaginase II é uma enzima mundialmente conhecida por ter propriedades quimioterápicas. Dentre algumas de suas aplicações, destacam-se o tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (LLA - principalmente em crianças) (LOPEZ-SANTILLAN et al., 2017), doença de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica aguda, linfossarcoma e melanossarcoma (STECHEER et al., 1999). As enzimas disponíveis no mercado são obtidas de *E. coli* e *E. chrysanthemi* (EBEID; KAMEL; ALI, 2008; PIETERS et al., 2011; GERVAIS et al., 2013), pois L-Asparaginases produzidas por estes micro-organismos mostraram menor toxicidade quando comparadas a outras enzimas similares com atividade antitumoral conhecida (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). A L- asparaginase também pode ser produzida pela tecnologia do DNA recombinante. PIETERS et al. (2008) estudaram uma enzima recombinante, a qual apresentou propriedades terapêuticas semelhantes à forma nativa encontrada no mercado.

As enzimas L-Asparaginases desempenham um papel importante no metabolismo e utilização de aminoácidos pelos micro-organismos. São enzimas (EC 3.5.1.1) que catalisam a hidrólise da L- asparagina, formando L- aspartato e amônia (MEZENTSEV et al., 2007; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; SRIKHANTA et al., 2013; LOPEZ-SANTILLAN et al., 2017). O L- aspartato pode ser convertido em oxaloacetato, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, ou em fumarato durante o ciclo da ureia (YUN et al., 2007). Em células malignas, principalmente nas linfocíticas, é necessária grande quantidade de asparagina para manter o crescimento celular. Para suprir a alta demanda desse aminoácido, as células não utilizam apenas o proveniente da dieta, mas também o produzem. A enzima L- asparagina sintetase está ausente ou presente em baixa quantidade em linfoblastos leucêmicos e outros tipos de células tumorais. Dessa forma, essas células dependem da L-asparagina presente no soro para sua proliferação e sobrevivência. A administração da L-Asparaginase II resulta em depleção do aminoácido presente no soro e mata a célula tumoral por privá-la de um aminoácido essencial para a síntese proteica (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Células saudáveis biossintetizam esse aminoácido, e por isso, são menos afetadas pela redução de sua concentração plasmática (STECHEER et al., 1999).

2.2 ESTRUTURA DA L- ASPARAGINASE

A enzima L-Asparaginase II proveniente de *E. coli* (EcA II) tem peso molecular de 133 - 141 kDa. É composta por quatro subunidades unidas e aparentemente idênticas, cada uma com peso molecular de 32 kDa (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007) e, contendo 326 resíduos de aminoácidos (KHUSHOO et al., 2004). O seu ponto isoelétrico é 5,66 (<http://web.expasy.org/>).

A L- asparaginase II de *E. chrysanthemi* (ErA II) é um homotetrâmero de 140 kDa na sua forma ativa. É uma proteína básica e com ponto isoelétrico de 8,6. Cada subunidade do tetrâmero possui 327 aminoácidos (GERVAIS; FOOTE, 2014).

A oligomerização da EcA II é essencial para a formação da estrutura de seus sítios catalíticos, pois apenas o tetrâmero é considerado como forma ativa. (MEZENTSEV et al., 2007). Isso ocorre porque resíduos de três monômeros diferentes compõem o sítio catalítico desta enzima, resultando em monômeros inativos (VERMA et al., 2014). Por outro lado, de acordo com o estudo NGUYEN; SU e LAVIE (2016), todos os resíduos do sítio catalítico da ErA II se encontram em um único monômero, o qual, em tese, seria suficiente para a catálise

2.3 REAÇÕES DE IMUNOGENICIDADE

A administração repetida de L-Asparaginase II pode levar ao desenvolvimento de reações de hipersensibilidade, resultando na descontinuidade do tratamento (ZALEWSKA-SZEWCZYK et al., 2009). Os principais sintomas encontrados nesses pacientes são urticária, prurido, erupções, anafilaxia e laringoespasmo (EBEID; KAMEL; ALI, 2008; PIETERS et al., 2011). Sintomas menos frequentes incluem a pancreatite, trombose, hemorragia e distúrbios do metabolismo lipídico. As reações ocorrem quase que exclusivamente nos regimes de pós-indução, quando o paciente ficou sem a medicação por semanas ou meses (PIETERS et al., 2011). O estudo de EBEID, KAMEL e ALI (2008) mostrou que 82% dos pacientes monitorados apresentaram anticorpos anti-asparaginase na 21ª semana do tratamento. Segundo Pieters et al. (2011) os anticorpos formados levam a inativação da enzima de *E. coli* em até 30% dos pacientes.

Os efeitos colaterais provocados pela administração dessa enzima podem ser causados pela baixa especificidade quanto ao substrato (a L-Asparaginase II também age como glutaminase), alta massa molecular e pela sua estrutura com múltiplas subunidades. Dessa forma, aumentando-se a especificidade e controlando a oligomerização, consequentemente, a formação de agregados, pode-se reduzir esses efeitos (MEZENTSEV et al., 2007).

A modificação química da enzima nativa proveniente de *E. coli* com polietileno glicol (PEG) provou reduzir as reações alérgicas, sendo mais tolerada pelos pacientes (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; ZALEWSKA-SZEWCZYK et al., 2009). A PEG-L-Asparaginase foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em quimioterapia para o tratamento de pacientes com LLA que são hipersensíveis à L-Asparaginase II de *E. coli* (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; PIETERS et al., 2011). Atualmente, nos Estados Unidos, esta formulação está sendo usada como primeira linha de tratamento, e na Europa, continua como segunda linha de tratamento, restrita a pacientes que apresentaram reações alérgicas a forma nativa (SHRIVASTAVA et al., 2015). Entretanto, a troca de medicação pode não ser eficaz. Anticorpos dirigidos contra a L-Asparaginase II nativa de *E. coli* podem formar reação cruzada com a enzima peguilada (PIETERS et al., 2011). Reações imunogênicas estão presentes em 2 a 11% dos pacientes recebendo a forma peguilada da enzima de *E. coli* (CHIEN et al., 2014).

Aprovada em 2011 pelo FDA (NGUYEN; DURDEN; LAVIE, 2017), a ErA tem um papel central em pacientes que desenvolveram reações de hipersensibilidade à L-asparaginase peguilada e nativa de *E. coli*, sendo essencial para dar continuidade ao tratamento (HORVAT et al., 2016; KLOOS et al., 2017). O trabalho de HORVAT et al. (2016) enfatizou a importância desta enzima após o desenvolvimento de reações imunogênicas devido ao tratamento com a L-asparaginase peguilada, e mostrou que todos os pacientes que haviam desenvolvido hipersensibilidade completaram o tratamento sem a recorrência deste efeito. Além disso, de acordo com o mesmo trabalho, os efeitos colaterais com a enzima ErA II foram, em sua maioria, limitados a anomalias laboratoriais com consequências mínimas ao paciente.

2.3 AGREGAÇÃO PROTEICA

A agregação é um fenômeno que pode afetar a conformação proteica. Em animais e humanos, a ocorrência deste fenômeno em proteínas endógenas é frequente causa de doenças, a menos que estas estruturas proteicas apresentem utilidade funcional, como o armazenamento hormonal (THANGAKANI et al., 2012). Além disso, a cinética da agregação pode ser uma ordem de magnitude mais rápida que a de enovelamento, resultando em inativação de uma parcela proteica significativa (BONDOS; BICKNELL, 2003).

In vivo, a formação de agregados pode estar relacionada com regiões específicas da sequência proteica, principalmente as que apresentam regiões amiloidogênicas, as quais tendem a dirigir a agregação. Estas regiões pequenas, chamadas regiões propensas à agregação seguem sequências específicas e motivos estruturais. Por exemplo, o motivo *cross-β* foi encontrado em agregados de mais de 100 tipos de proteína, e também em corpos de inclusão (THANGAKANI et al., 2012).

O tipo de agregação amiloide também está diretamente relacionado com a ocorrência de doenças como a de Alzheimer (BOURDENX et al., 2015) e as do prion (PAN et al., 2015). No caso deste tipo de agregação, o modelo de nucleação é um dos propostos para explicar a incorporação de proteínas. De acordo com este modelo, a agregação inicia por uma etapa lenta, conhecida como *lag phase*, que envolve a associação de proteínas mal enoveladas que formam sementes de nucleação. Uma vez que o processo é completo e estabilizado, sugere-se que as sementes se agrupem a fim de formar estruturas maiores. A etapa secundária, conhecida como fase de alongamento, é uma fase acelerada e parcialmente irreversível que corresponde ao recrutamento de proteínas para o agregado proteico. Uma vez que fibrilas maduras são formadas, supõe-se que oligômeros se desprendem e agem como novas sementes (MORALES; CALLEGARI; SOTO, 2015).

Em biofármacos, a formação de agregados proteicos tem sido extensivamente estudada (WANG, W. et al., 2012). Nestes compostos, a auto associação do estado nativo ou enovelado das proteínas ocorre, principalmente, por interações temporárias ou fracas presentes em alta concentração proteica (ordem de 10^{-3} M ou mais alta). Neste caso, pode-se considerar um arranjo de diferentes espécies de agregados (dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros, etc.) que se intercambiam um pelo outro dinamicamente. Os agregados são revertidos pela redução da concentração proteica e/ ou pela alteração de pH ou força iônica da solução a fim de mudar as interações carga-carga entre os monômeros (AMIN et al., 2014).

Naturalmente, as proteínas podem se autoagregar de diversas maneiras: receptores interagem com ligantes, estados nativos multiméricos podem ser formados

com ou sem complexação metálica e há “maquinarias” multiproteicas como os ribossomos (AMIN et al., 2014).

As forças e interações fundamentais que governam o enovelamento proteico incluem: van der Waals e interações hidrofóbicas entre cadeias laterais e átomos do esqueleto peptídico; maximização das ligações de hidrogênio; minimização dos impedimentos estéricos e ângulos de torção desfavoráveis; maximização da entropia da cadeia; minimização de repulsões ou maximização de atrações eletrostáticas; minimização das interações desfavoráveis entre os aminoácidos e o solvente (água) e seus cossolutos. Estas interações que ocorrem entre aminoácidos da mesma proteína também existem entre aminoácidos de proteínas adjacentes, podendo levar a formação de agregados proteicos (ROBERTS, 2014a).

Do ponto de vista imunogênico, a presença de agregados foi considerada como a mais importante alteração estrutural a aumentar os casos de resposta imune aos produtos proteicos (WANG, W. et al., 2012). Uma das principais características dos agregados proteicos é o fato de não se dissociarem *in vivo* e de manterem algumas frações dobradas da estrutura secundária e terciária. A combinação dessas características contribui na formação de agregados capazes de induzir maior imunogenicidade quando comparados com a sua forma original. As vacinas baseadas em proteínas são um exemplo deste princípio, quando a imunogenicidade é desejável: são muito mais eficazes na indução da resposta imune quando estão presentes como um conjunto de proteínas em uma partícula adjuvante que é similar ao tamanho de agregados proteicos, enquanto a estrutura original induz pouca ou nenhuma resposta imune (ROBERTS, 2014b).

2.4 PRESENÇA DE AGREGADOS DURANTE A PRODUÇÃO DE L- ASPARAGINASE II

O processo de produção da L-Asparaginase II apresenta problemas como a formação de agregados, resultando em uma produção ineficiente da droga. Investigações pré-clínicas apontam a presença de até 20% desses agregados como contaminantes nos fármacos. A L-Asparaginase II é um agente quimioterápico essencial para o tratamento da LLA e estes problemas já levaram a falta do medicamento no mercado e a negação de pedidos de aprovação de formulações por agências de saúde de diversos países (PIETERS et al., 2008). Muito recentemente,

uma nova L- Asparaginase II derivada de *E. coli*, *Spectrila* (www.ema.europa.eu), está disponível no mercado, e o processo de produção comercial desta droga pode ter sido atualizado. Entretanto, não há novas formulação de L- Asparaginase II derivada de *E. chrysanthemi* no mercado.

A produção da ErA II compreende fermentação, lise celular alcalina e extração da enzima, purificação por cromatografia e produção do produto final por liofilização. Entre cada um destes processos, a L-Asparaginase II é mantida congelada até o processo subsequente. As técnicas empregadas para a avaliação da enzima após congelamento mostram a dissociação de alguns dos tetrâmetros em monômeros e a formação de pequenos agregados (GERVAIS et al., 2013).

WOLF et al. (2003) observaram a formação de agregados devido à degradação da L-Asparaginase II. Assim como foi observado por GERVAIS et al. (2013) mostraram que este processo parece ser desencadeado pela dissociação de tetrâmeros em monômeros, resultando na perda de atividade proteica. Os monômeros liberados se agregam, formando massas moleculares maiores que os tetrâmeros nativos. Segundo o autor, a estabilização de drogas proteicas é a principal barreira para uma terapêutica bem sucedida (WOLF et al., 2003).

A L-Asparaginase II pode ser expressa em *E. coli* recombinante. Nesse tipo de produção, é possível encontrar a formação de agregados proteicos no citoplasma ou periplasma do micro-organismo, também chamados de corpos de inclusão. Esse evento é, geralmente, resultado da concentração de cadeias polipeptídicas simples emergindo dos ribossomos, enovelamento ineficiente ou indisponibilidade das chaperonas. A formação dos corpos de inclusão dificulta a purificação da proteína recombinante bioativa. Dessa forma, informações sobre as propriedades físicas e estruturais dos agregados proteicos são importantes para o desenvolvimento de processos de recuperação eficiente da proteína ativa (UPADHYAY et al., 2012).

2.5 OSMÓLITO E SUA IMPORTÂNCIA NAS FORMULAÇÕES DE L- ASPARAGINASE

Osmólitos são moléculas acumuladas pelas células como um mecanismo de adaptação em resposta a estresses ambientais como variações de quantidades de água, sal e temperatura (WAREPAM, MARINA; SINGH, 2015). A célula regula a concentração dessas moléculas em seu interior para prevenir perda ou aumento da osmolaridade (YANCEY, 2005).

Os osmólitos são divididos em dois grupos: protetores e desnaturantes. O primeiro favorece a conformação da proteína nativa, enquanto o segundo implica na prevalência no estado desnaturado (STREET; BOLEN; ROSE, 2006). Açúcares, polióis e aminoácidos são considerados osmólitos protetores, enquanto ureia e, em algumas concentrações, a arginina são desnaturantes (RODRÍGUEZ-ROPERO; VAN DER VEGT, 2014).

É comum que osmólitos sejam empregados como excipientes em formulações proteicas (GENCOGLU; HELDT, 2015). Um dos principais problemas enfrentados durante a formulação proteica é a sua frágil estabilidade devido a sua complexidade molecular e estrutura tridimensional. A formulação final deve garantir a estabilidade proteica durante todo o ciclo biofarmacêutico, no qual estão incluídos a produção, transporte, administração imediata ou armazenamento de curto e longo prazo da mesma (PAVISIC et al., 2010).

A atividade da enzima L- asparaginase depende de sua estrutura quaternária. O rompimento dessa estrutura e a formação de agregados, como já citado anteriormente, é um problema comum na formulação desta enzima, evidenciando a necessidade de estabilizá-la. Na literatura, é encontrado o uso de osmólitos em formulações de L- asparaginase como estabilizadores após a purificação enzimática (BAHREINI, E. et al., 2014) e crioprotetores / lioprotetores durante o processo de liofilização (WARD et al., 1999).

O mecanismo protetor dos osmólitos ainda não está esclarecido, mas se sabe que depende de interações proteína-água, proteína-osmólito e água-osmólito (FERREIRA et al., 2015). O efeito dessas moléculas também pode ser refletido na atividade proteica. O estudo de Warepam et al. (2014) mostrou que os osmólitos atuaram na RNase reenovelada e a atividade enzimática foi maior quando a desnaturação foi induzida por calor, se comparada com a desnaturação induzida por ureia ou cloreto de guanidina. O mesmo estudo utilizou diferentes osmólitos para verificar a influência deles na atividade da RNase. Dessa forma, diversos osmólitos podem ser usados como protetores, devendo ter sua ação testada a fim de verificar o mais apropriado para uso.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Analisar o efeito de diferentes osmólitos na atividade específica, estabilidade, cinética e comportamento de agregação da L- asparaginase II de *E. chrysanthemi*, a fim de identificar os melhores adjuvantes para o desenvolvimento de formulações com o biofármaco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a atividade específica L- asparaginase na presença individual dos osmólitos sacarose, sorbitol, glicina e arginina;
- b) Identificar as concentrações de osmólitos que provocam maior aumento da atividade específica na L- asparaginase;
- c) Estudar a estabilidade da L- asparaginase na presença dos osmólitos pela análise da variação da atividade específica da enzima em função do tempo;
- d) Determinar o perfil de agregação da L- asparaginase na presença de osmólitos por espalhamento dinâmico de luz;
- e) Quantificar o número de agregados enzimáticos por análise de rastreamento de nanopartículas;
- f) Determinar a cinética enzimática na presença dos melhores osmólitos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PLÁSMÍDEO, LINHAGENS BACTERIANAS E MEIOS DE CULTIVO

O vetor pET15b (Novagen, Merck-Millipore, mapa do vetor no anexo A) contendo o gene *ansB* que codifica para proteína madura de *Erwinia chrysanthemi* foi utilizado para a obtenção da enzima L- asparaginase II recombinante em *Escherichia coli*. A construção do vetor com o gene de interesse foi realizada pelo grupo no laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica do FBT / FCF (Universidade de São Paulo, Brasil) e encontrava-se disponível. Em linhas breves, o gene com 1056 pb foi sintetizado pela empresa GenScript com códons otimizados para a expressão na linhagem competente *E. coli* BL21 (DE3) [*F⁻ ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm*] (Life Technologies™) e inicialmente fornecido no vetor de clonagem pUC57. Em seguida, o gene de interesse foi inserido entre os sítios das enzimas de restrição *NdeI* (5' CATATG 3') e *BamHI* (5' GGATCC 3') no pET15b, permitindo a expressão proteica em fusão com cauda N-terminal de histidina. Este vetor também contém o promotor T7, induzido com isopropiltio-β-D-galactosídeo (IPTG), a sequência T7 terminador e marcador de resistência à Carbenicilina. Subsequentemente, os vetores recombinantes foram transformados na linhagem competente de *E. coli* DH5α (transformação descrita no item 4.2.1), e após a amplificação, o vetor foi purificado e estocado a -20°C. A clonagem foi confirmada por sequenciamento do gene.

As linhagens bacterianas contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas no meio estéril Luria-Bertani (LB) (triptona 1%, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,5 %) suplementado com Carbenicilina (*Sigma-Aldrich*) 50 µg/mL. Esta concentração foi adotada em todo o trabalho.

4.2 PRODUÇÃO DE L- ASPARAGINASE II

4.2.1 Transformação

O volume de 1 µl do plasmídeo pET15b + *asnB* foi colocado em contato com 50 µl de suspensão da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) por um minuto. O volume de 50 µl foi transferido para a cubeta e eletroporação em aparelho *Bio-Rad Micropulser* e submetido a 2,5 kV. A suspensão recém-eletroporada foi ressuspendida em 1000 µl de meio LB e incubada por 1 h, 180 rpm a 37 °C. Em seguida, o material foi centrifugado (centrífuga *Eppendorf* 5415) 3200 *g* a 4 °C por 3 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 200 µl do sobrenadante e plaqueado em meio LB sólido (adicionado de 2% ágar) com carbenicilina. As células transformadas foram cultivadas por 16 h a 37 °C. A presença do antibiótico seleciona as células transformadas, pois apenas estas são resistentes ao mesmo.

4.2.2 Solução estoque e ativação das linhagens bacterianas

O inóculo (item 4.2.3) da linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi utilizado para o preparo da solução estoque. O cultivo em meio LB foi armazenado em microtubos com glicerol 8 % a -80 °C, perfazendo o volume final de 100 µL. Para a ativação das cepas, o volume total de cada microtubo foi transferido para 100 mL do meio LB previamente esterilizado e suplementado com Carbenicilina. O cultivo foi mantido em agitador metabólico por 16 h, 180 rpm a 37 °C e, em seguida, utilizado como inóculo.

4.2.3 Preparo do Inóculo

O inóculo pode ser preparado a partir das linhagens recém-transformadas ou de linhagens armazenadas a -80 °C (item 4.2.2). A linhagem utilizada foi a *E. coli* BL21 (DE3).

No caso de linhagens recém-transformadas, uma colônia recombinante isolada, contendo o vetor de interesse, foi escolhida aleatoriamente e cultivada em 100 mL do meio LB suplementado com Carbenicilina. A condição de cultivo foi de 180 rpm, 37 °C por 16 h.

Para as linhagens armazenadas a -80 °C, o volume de 50 µL da solução bacteriana com crioprotetor é dispensado em 100 mL do meio LB suplementado com

Carbenicilina. As condições de cultivo são as mesmas para as duas formas de preparo do inóculo. Para o cultivo da linhagem hospedeira BL21 (DE3) pLysS, o meio de cultura também é suplementado com Cloranfenicol 34 µg/mL.

4.2.4 Expressão da enzima L- Asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi*

Para a expressão da enzima L- asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi*, o volume de cultura de *E. coli* BL21 (DE3) necessário para alcançar a OD₆₀₀ 0,2, obtido na etapa do preparo do inóculo (item 4.2.3), foi inoculado em 1 L de meio LB suplementado com Carbenicilina. As culturas foram, subsequentemente, incubadas em agitador metabólico *New Brunswick Scientific Excella E24* a 37 °C, 180 rpm pelo tempo necessário para alcançar OD₆₀₀ 0,6-0,8. Após, foi adicionado o indutor IPTG na concentração final de 0,5 mM para a expressão da L- Asparaginase II e a incubação continuou por 3 h. As células foram coletadas por centrifugação no aparelho *Eppendorf 5810 R* (3200 *g* por 20 minutos a 4 °C) e tiveram sua massa estimada por gravimetria. Em seguida, foram mantidas refrigeradas a -20 °C até a etapa de lise celular. Durante todo o cultivo, a leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro *Eppendorf Biophotometer plus*.

Para a lise celular da bactéria contendo a proteína com cauda de histidina, foi adicionado de 1 a 5 mL (5 mL para cada um grama de célula) do reagente *Bugbuster Master Mix* (Novagen TM) (reagente de extração proteica com Benzonase, Nuclease e rLisozima) ao pellet, consoante a quantidade celular inicial. O conteúdo armazenado em frasco *Falcon* foi colocado sob agitação constante (*Biomixer TS 2000^a VDRL*) por 20 minutos. Em seguida, o lisado foi centrifugado (centrífuga *Eppendorf 5810 R*) por 30 minutos, 16.000 *g* a 4°C. O resultado foi avaliado pela aplicação de 10 µL de cada sobrenadante obtido, juntamente com 2 µL de DTT 1M em gel SDS_PAGE. O preparo do gel e da amostra está descrito no item 4.2.8.

4.2.5 Análise da expressão proteica

A análise da produção proteica visa verificar se a proteína se encontra na fração celular solúvel ou insolúvel. Este ensaio foi feito a título de confirmação, visto que a

mesma já se encontrava em uso no laboratório, e se tinha conhecimento de sua expressão na fração solúvel. Dessa forma, após a expressão, é necessário separar as proteínas dos detritos celulares. Para isso, as células foram rompidas. O volume de 5 mL da solução *Bugbuster Master mix* (Novagen™) foi adicionado para cada um grama de célula. O conteúdo armazenado em frasco *Falcon* foi colocado sob agitação constante (*Biomixer TS 2000^a VDRL*) por 20 minutos. Em seguida, foi centrifugado (centrífuga *Eppendorf 5810 R*) por 30 minutos, 10000 *g* a 4 °C.

Após a centrifugação, tanto o sobrenadante (fração solúvel) quanto o precipitado (fração insolúvel) foram analisados, e para isso, um foi separado do outro.

Fração solúvel: À fração solúvel, foi aplicado o volume de 10 µL do sobrenadante 2 µL ditioneitol (DTT) 1 M e 3 µL de tampão de amostra 5x (0,6 ml Tris-HCl 1 M pH 6,8, 25 % glicerol, 2 % SDS, 0,5 ml β-mercaptoetanol (14,4 mM), 0,1 % azul de bromofenol e 0,9 ml água).

Fração insolúvel: O volume de 10 mL de água destilada e 5 µL da solução 99:1 *cracking buffer* / β-mercaptoetanol (Tris-HCl 60 mM pH 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 0,01 % bromofenol; 1% β-mercaptoetanol) foram adicionados ao precipitado previamente dissolvido em água.

Ao final do preparo das amostras, a quantidade de 10 µL de cada fração solúvel e insolúvel foram aquecidas por 5 minutos a 95 °C em banho seco (*Labnet International, Inc.*), visando à desnaturação completa e o rompimento das pontes dissulfeto das proteínas. O material resultante foi analisado em gel de poliacrilamida (item 4.2.8).

4.2.7 Purificação proteica em coluna de afinidade a metais

O sobrenadante do item 4.2.5 foi purificado em coluna (*sepharose HisTrap™ HP GE Healthcare*) de volume de 5 mL, lavada com 50 mL de água destilada. A coluna foi carregada com 2,5 mL de solução de NiSO₄ 0,1 M e o excesso de íons foi retirado com 50 mL de água destilada. Em seguida, a coluna foi equilibrada com 50 mL de tampão *start 2* (fosfato de potássio 20 mM, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4) e carregada com a amostra proteica. As proteínas não ligadas à coluna foram lavadas com o tampão *wash* (fosfato de potássio 20 mM, imidazol 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,4). A proteína L- asparaginase II foi eluída com 50 mL de tampão de eluição (fosfato de potássio 20 mM, imidazol 500 mM, NaCl 300 mM, pH 7,4) e coletada em frações de 1,5 mL. Ao final do processo, a coluna foi limpa com 50 mL de solução *cleaning* (tampão

fosfato sódio monobásico e dibásico 20 mM, NaCl 2 M, EDTA 20 mM, pH 7,4) e armazenada a 4 °C.

A concentração proteica foi determinada qualitativamente pelo método de *Bradford* (BRADFORD, 1976). O volume de 5 µL de cada fração coletada na eluição reagiu com 200 µL do reagente de *Bradford* (corante azul brilhante de *Coomassie*, ácido fosfórico e metanol) (*Bio-Rad Laboratories, Inc.*) diluído em água destilada (1:5). A formação de coloração azul ou cobre indicou, respectivamente, a presença ou ausência de proteína.

4.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-Page)

A presença e pureza das proteínas foram verificadas pela análise em gel de poliacrilamida. Este é formado pelo gel de empilhamento e pelo gel de separação. A composição dos mesmos encontra-se na Tabela 1. A polimerização do gel de poliacrilamida ocorreu em placas de vidro dispostas verticalmente. O volume de 10 µL de cada amostra, juntamente com 2 µL de ditioneína (DTT) 1M e 3 µL de tampão de amostra 5x foram aquecidos em banho seco a 95 °C por 5 minutos e aplicados no gel. O volume de 5 µL do padrão de peso molecular *BenchMarck*TM (*Life Technologies*) ou *Amersham ECL Rainbow* (*GE Healthcare Life Sciences*) foi aplicado no gel separadamente. O gel foi colocado em reservatório contendo o tampão de corrida Tris-Glicina-SDS 1x (Tris-base 25 mM; Glicina 189 mM; SDS 3,5 mM).

Tabela 1 - Composição do gel de poliacrilamida

	Gel de Empilhamento 5%	Gel de Separação 10%
Tris-HCl 1 M pH 8,8	-	2800 µL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	400 µL	-
Solução de acrilamida:bis-acrilamida 30:0,8 (m/V)	500 µL	2500 µL
Persulfato de Amônio (PSA) 10%	50 µL	50 µL
*TEMED	10 µL	10 µL
Água destilada	2300 µL	-
Volume final	3360 µL	5360 µL

*A sigla TEMED refere-se ao composto N,N,N,N-tetrametilenodiamina.

A eletroforese das proteínas e do padrão de peso molecular foi realizada no equipamento *Mini Protean Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Inc.)* sob uma tensão de 120 V por 90 minutos. Os géis foram corados com azul de *Coomassie* em meio ácido (0,1 % (p/v) de *Coomassie*, 45 % (v/v) de metanol, 10 % (v/v) de ácido acético glacial em meio aquoso) por 20 minutos sob agitação branda. A solução de ácido acético 10 % (v/v) e metanol 10 % (v/v) foi usada para o descoramento em temperatura ambiente por 16 h. A presença da enzima L- asparaginase II revelou-se por uma banda de, aproximadamente, 37 kDa.

4.2.9 Purificação em coluna PD - 10

Comprovada a pureza da proteína em gel de poliacrilamida, foi realizada a retirada do imidazol. Este último apresenta-se em grande concentração após a purificação pela coluna de afinidade ao níquel, pois é utilizado para a eluição da amostra. É um composto doador de elétrons capaz de formar quelatos com íons metálicos (ex. níquel) presentes na resina e se ligar reversivelmente a coluna (RODRIGUES et al., 2015), provocando a eluição da amostra que estava aderida à coluna. A coluna PD-10 *Ge Healthcare* é lavada com 50 mL de água destilada e equilibrada com 25 mL do tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,4. O volume de 2,5 mL de L- Asparaginase II em solução tampão com imidazol remanescente do processo

de purificação é carregado na coluna. O volume morto é descartado. A eluição da enzima de *Erwinia chrysanthemi* foi realizada com 3,5 mL de tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,4. A coluna foi lavada com 50 mL de água destilada e mantida refrigerada a 4 °C. A proteína eluída é mantida refrigerada a 4 °C até a realização dos próximos testes.

4.2.10 Concentração da proteína purificada

A concentração é realizada em tubos *AMICON Ultra-15 centrifugal filter* previamente lavado com água destilada. A membrana NMWL 10 kDa está contida nos tubos. O volume de amostra de 3,5 mL obtido pela purificação em coluna PD-10 é concentrando por ultracentrifugação a 4 °C, 3200 *g* por 15 minutos ou até a obtenção de 1 mL de amostra nesses tubos. A solução proteica, encontrada na parte acima da membrana, é mantida refrigerada a 4 °C.

4.2.11 Quantificação da L- Asparaginase II

O espectrofotômetro SpectraMax M2 (*Molecular Devices*) foi utilizado para a leitura da absorbância em 280 nm da amostra recém-concentrada. A quantidade de 70 µL da solução proteica imersa em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4 é utilizada para leitura, e somente o tampão é utilizado como branco. O coeficiente de extinção, 19370 M⁻¹ cm⁻¹ foi obtido com o auxílio da ferramenta de bioinformática protparam (<http://www.expasy.org/protparam>). A medida da concentração enzimática se baseia na equação de *Lambert - Beer* (equação 1), que relaciona a absorbância em A_{280nm} e a concentração molar (M) usando o coeficiente de extinção molar da L- Asparaginase II. A relação é expressa em M.

$$A_{280nm} = C \cdot \epsilon$$

Equação 1 – Equação de *Lambert - Beer*

Nota: $A_{280\text{nm}}$: absorvância da solução proteica em 280 nm; c: concentração enzimática expressa em M; ϵ : coeficiente de extinção molar específico ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para cada proteína.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA L- ASPARAGINASE II DE *E. CHRYSANTHEMI* QUANTO À ATIVIDADE ESPECÍFICA, ESTABILIDADE E CINÉTICA

4.3.1 Atividade específica da enzima pelo método do reagente de Nessler

A enzima L- Asparaginase II reage com a L-asparagina, liberando um mol de amônia por mol de substrato asparagina hidrolisada. A atividade específica (AE) da enzima é, então, medida pela reação dos mols de amônia com o reagente de *Nessler* (iodeto de potássio mercúrico) (*Merck Millipore*). O método aqui utilizado é uma adaptação do protocolo estabelecido pela *Sigma-Aldrich*.

4.3.2 Método do reagente de Nessler para análise da atividade específica na ausência de osmólitos

A composição da reação consistiu em tampão Tris – HCl 50 mM pH 8,8, água ultrapura *Mili-Q* e um gradiente crescente de 12 concentrações da enzima L-Asparaginase II. Os valores para a concentração da enzima de *E. chrysanthemi* encontram-se na tabela 2. A reação foi incubada por 12 minutos a 37 °C após a adição de solução de 8,9 mM L- asparagina (*Sigma-Aldrich*). Os brancos foram preparados para cada concentração da enzima da mesma maneira, mas sem a adição do substrato.

O teste foi feito em triplicata. A reação foi interrompida com ácido tricloroacético (TCA) (*Synth*) 1,5 M. A alíquota de 33 μL dessa reação foi diluída em água ultrapura *Mili-Q* (diluição 1:11) e a esta foi acrescentado o reagente de *Nessler*. Diferentes concentrações de sulfato de amônio foram utilizadas na curva padrão por liberar amônia em contato com a água. A quantidade de amônia presente nos microtubos variou de

0,093 μmol até 0,73 μmol . A equação resultante da curva de calibração foi utilizada para calcular a amônia presente nas amostras incubadas com L- Asparaginase II. A leitura dos resultados foi realizada a 440 nm e 15 minutos após a adição do reagente de *Nessler* em espectrofotômetro de placas (*Spectra Max 384 Plus / Molecular Devices*). A atividade específica foi calculada pelo coeficiente angular da reta de ajuste da concentração de L- Asparaginase II em função da velocidade de reação. O resultado foi expresso em U/mg, sendo que uma unidade (U) é definida como a liberação de 1 μmol de amônia por minuto.

Tabela 2 - Quantidades utilizadas de enzima para o teste de atividade específica pelo método de *Nessler*

Número de Concentrações	<i>E. chrysanthemi</i> (mg)
1	0
2	$1,2 \times 10^{-5}$
3	$2,5 \times 10^{-5}$
4	$3,7 \times 10^{-5}$
5	$5,0 \times 10^{-5}$
6	$6,3 \times 10^{-5}$
7	$7,5 \times 10^{-5}$
8	$8,8 \times 10^{-5}$

Nota: Cada uma dessas quantidades foi colocada em um poço de uma microplaca e feita em triplicata (total: 96 poços).

4.3.3 Método do reagente de *Nessler* para análise da atividade específica na presença de osmólitos

Foram adquiridos para o ensaio: arginina (*USB*), glicina (*USB*), sacarose (*LabSinth*), ureia (*LabSinth*) e sorbitol (*Carlo Erba Reagent*). Todos os reagentes empregados eram de grau analítico e utilizados sem purificação prévia. Todas as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema *Milli-Q*.

O teste do efeito do osmólito foi uma adaptação do método de *Nessler* (*Merck*) para a avaliação da atividade específica da ErA. Neste ensaio foi acrescentado 0, 15,

30, 45 ou 60 mM de cada osmólito à solução de L- asparaginase 5 μ M, a qual foi armazenada por 48 h à 4°C. Após a incubação, a solução foi agitada brandamente e dispensada em micropoços de acordo com as quantidades de enzima apresentadas na tabela x.

O branco consistiu na adição do osmólito utilizado juntamente com os demais componentes da reação, exceto o substrato. As demais etapas do ensaio estão descritas no item 4.3.2.

4.3.4 Método do reagente de Nessler para análise da estabilidade da ErA na presença de osmólitos

O ensaio da estabilidade da ErA foi realizado pelo método do reagente de Nessler como descrito nos itens 4.2.2 e 4.3.3. Entretanto, diferente dos demais ensaios que mediram a AE da enzima somente no tempo de 2 dias (48 horas), neste ensaio a atividade também foi avaliada nos tempos de 5, 15 e 30 dias. Para isso, a enzima foi incubada com os osmólitos glicina, arginina, sacarose ou sorbitol 90 mM durante todo o tempo do ensaio.

A estabilidade da enzima foi avaliada pela comparação do valor da AE da enzima no tempo zero (ErA incubada por dois dias à 4°C sem osmólitos), considerada como 100%, com os valores de atividade da ErA obtida na presença de cada um dos osmólitos durante cada dia do ensaio. Dessa forma, os valores obtidos de AE foram divididos pelo valor da AE enzima no tempo zero, e considerados como atividade específica relativa (AER).

4.3.5 Atividade específica e cinética enzimática pelo método acoplado à glutamato desidrogenase

Esta metodologia consiste na detecção da oxidação de NADH à NAD⁺ pela glutamato desidrogenase (GDH), da qual é cofator, ao longo da reação enzimática (SCHALK et al., 2014). A hidrólise da asparagina pela L- asparaginase libera amônia (NH₃⁺), a qual é utilizada juntamente com uma molécula de α -cetoglutarato para a

síntese de glutamato por meio da L- glutamato desidrogenase (GDH), às custas de NADH.

4.3.6 Atividade específica na ausência e presença de osmólitos pelo método acoplado à glutamato desidrogenase

Para o ensaio, os seguintes reagentes foram utilizados: 1 a 6 nM de L- asparaginase, 20 mM de asparagina (*Sigma-Aldrich*), 1 mM α -cetoglutarato (*Sigma-Aldrich*), 400 mU de GDH de soro bovino (*Sigma-Aldrich*) e 131 μ M de β -NADH (*Sigma-Aldrich*). As reações foram realizadas em triplicata no tampão Tris-HCl 50 mM em pH 8,0. A desaminação espontânea da L- asparaginase foi subtraída do resultado de cada uma das triplicatas por meio do controle negativo (solução com todos os reagentes, exceto a ErA).

A reação também foi realizada na presença de sacarose ou sorbitol 90 mM. No caso deste ensaio específico, a ErA foi previamente incubada com as soluções de osmólitos por 48 h a 4 °C. O controle negativo da reação foi adaptado, e o osmólito testado foi adicionado à solução a fim de avaliar a interferência da molécula na reação da GDH.

O monitoramento da reação foi realizado em tempo real pelo decaimento da absorbância à 340 nm no espectrofotômetro (*Spectra Max M2 – Molecular Devices*), relativo ao consumo de NADH ($\epsilon = 6290 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (CUSSIOL et al., 2010) a 37 °C. A atividade específica foi calculada com o auxílio do software *GraphPad Prism 5.0*.

4.3.7 Caracterização cinética da ErA na ausência e presença de osmólitos pelo método acoplado à glutamato desidrogenase

O teste da cinética pelo método acoplado à glutamato desidrogenase apresenta o mesmo princípio do ensaio de atividade específica. Entretanto, o propósito deste ensaio foi determinar os parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Mentes (K_M), velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$), número de renovação (K_{cat}) e eficiência catalítica (K_{cat}/K_M).

A reação difere pela aplicação de 50 nM de ErA, e dez concentrações de asparagina variando de 0,02 a 11 mM. As demais etapas de preparo da reação, incluindo a adição dos osmólitos sacarose ou sorbitol 90 mM, podem ser verificadas no item 4.3.6.

Os parâmetros cinéticos foram calculados com o auxílio do programa *Graphpad Prism* 5.0. As equações relacionando os parâmetros cinéticos são mostradas a seguir:

$$\text{Equação 2. } \frac{dp}{dt} = V(s) = V_{\text{máx}} \frac{s}{K_M + s}$$

$$\text{Equação 3. } k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{máx}}}{[E]}$$

As equações 2 e 3 representam a correlação entre os parâmetros cinéticos velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e número de renovação (k_{cat}), onde p é a concentração do produto, $[s]$ é a concentração de substrato, $[E]$ é a concentração enzimática. $V_{\text{máx}} = k_{\text{cat}} \cdot [E]$ é a maior velocidade para uma dada concentração da enzima na presença de excesso de substrato, e K_M é a constante de meia-saturação ou de Michaelis, sendo a concentração de substrato na qual $V(s) = V_{\text{máx}} / 2$ (VAN DYKEN, 2017).

4.3.8 CARACTERIZAÇÃO DE AGREGADOS PROTEICOS DE ErA

4.3.8.1 Caracterização de agregados por espalhamento dinâmico de Luz

As análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) foram realizadas no laboratório de Eletroquímica e Corrosão no departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP.

O DLS foi utilizado para medir o diâmetro hidrodinâmico (D_H) das partículas pela avaliação da flutuação da intensidade de luz espalhada pelas partículas devido ao movimento browniano (FILIPPE; HAWE; JISKOOT, 2010). O D_H é definido como o raio da esfera hipotética que se difunde com a mesma velocidade que as partículas analisadas pelo DLS. Portanto, é uma indicação do tamanho do coloide (FILIPPE; HAWE; JISKOOT, 2010).

O equipamento utilizado foi o *Malvern Zetasizer Nano ZS 90* (*Malvern Instruments*) equipado com um *laser* vermelho de He-Ne em 633 nm e operando em um ângulo detector de 90°. A análise do D_H das partículas foi medida por meio do *software* Zetasizer 7.11 (*Malvern*). As amostras de ErA 1 mg/ mL em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,4 pré-incubadas por 48 horas com sacarose, glicina, sorbitol ou arginina 90 mM ou na ausência de osmólitos foram utilizadas para análise. A quantidade de 1 mL de cada amostra sem diluição foi analisada em uma cubeta de vidro. As condições utilizadas foram: temperatura 20 °C, tempo de equilíbrio de 60 s e o índice de refração proteica de 1,450. O ensaio foi realizado em triplicata.

O instrumento utilizado mede a flutuação da intensidade de luz espalhada pelas partículas em solução em função do tempo. Em seguida, o *software* analisa o correlograma obtido (função de correlação vs tempo) para o cálculo do D_H , sendo que uma função de correlação é obtida quando duas propriedades dinâmicas se correlacionam por um período. Além disso, o coeficiente de difusão média das partículas em solução (D) pode ser utilizado para obter o D_H da proteína usando a equação de Stokes (equação 4), como mostrado abaixo:

$$\text{Equação 4: } D = \frac{kT}{3\pi\eta D_H}$$

onde k é a constante de Boltzman, T é a temperatura absoluta em Kelvin e η a viscosidade do solvente (CARVALHO et al., 2013).

4.3.8.2 Caracterização de agregados por análise de rastreamento de nanopartículas

As análises de rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês *Nanotracking Analysis*) foram realizadas no laboratório da Pensabio, empresa que, gentilmente, permitiu o equipamento durante o período de ensaio.

O equipamento para a análise de rastreamento de nanopartículas *Malvern NanoSight NS300* (Windows 7, versão 3.1) com a câmera *Complementary Metal Oxide Semiconductor* (CMOS) acoplada foi utilizado para a análise de rastreamento de nanopartículas. Previamente à inserção da amostra, a câmara de leitura foi limpa 1 mL

de água deionizada a fim de evitar contaminação e confirmar a ausência de partículas. As amostras foram introduzidas manualmente por meio de uma seringa de 1 mL. O número de rastreamento do movimento browniano foi determinado pela concentração de partículas e tempo de captura dos dados (BAI et al., 2017). O número e tamanho das partículas foram monitorados individualmente com o auxílio da câmera CMOS e estimados com o NTA *software* 3.1.

O nível da câmera foi ajustado de maneira amostra-dependente, variando de 12 a 14, de acordo com o tamanho das partículas e com a diferença de tamanho entre elas. Foi considerado o intervalo de 3 a 6 para o limite de detecção. Valores acima ou abaixo deste limite resultaram em alta quantidade de ruído. Para cada ensaio, foi considerado o valor mínimo de 1000 rastreamentos (*tracks*). O número de 5 análises foi realizado para cada amostra, e os dados foram coletados em intervalos de 30 s, sendo calculada a média das quintuplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA L- ASPARAGINASE II

A proteína ErA II pode ser expressa na fração do extrato celular solúvel ou insolúvel. A expressão proteica na fração solúvel é uma vantagem, pois proteínas expressas na fração insolúvel são encontradas como corpos de inclusão e, frequentemente, são inativas. Este problema exige o uso de técnicas que levem ao redobramento da proteína e a sua conformação nativa, o que pode ser uma tarefa complexa (UPADHYAY et al., 2014). Como a ErA II se encontrava em uso no laboratório, já se conhecia que a sua expressão se encontrava na fração celular solúvel do extrato celular, a qual pode ser confirmada na figura 1 (coluna 1), apresentando tamanho de, aproximadamente, 37 kDa.

A fração solúvel do extrato celular foi purificada por cromatografia de afinidade ao íon metálico imobilizado. Nesta técnica, é explorada a interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície proteica, no caso a cauda de histidina fusionada à asparaginase, e o íon metálico níquel imobilizado no suporte sólido (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). A figura 1, colunas 2 e 3, mostra que a proteína expressa foi purificada eficientemente. Apenas a banda de, aproximadamente, 37 kDa está presente na etapa de eluição da proteína, mostrando que não há contaminantes ou interferentes na amostra.

Figura 1. Gel SDS – PAGE (gel 10%) mostrando a fração solúvel do extrato contendo ErA (37 kDa) (coluna 1), e proteína eluída com 500 mM de imidazol após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel (5 mL) (colunas 2 e 3), e o marcador de massa molecular *Full - Range Rainbow* (M).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE OSMÓLITOS

5.2.1 Caracterização da atividade específica da ErA

O principal ensaio utilizado atualmente para medir a atividade específica (AE) da enzima L- Asparaginase é baseado no método do reagente de Nessler (KUDRYASHOVA; SUKHOVERKOV, 2016), o qual mede a formação de amônia e foi utilizado neste trabalho. A AE encontrada para a ErA foi de 720 ± 163 U/mg.

Na literatura há vários estudos que quantificam a AE da ErA. O estudo de GERVAIS e FOOTE (2014) encontrou o valor de 908 U/mg para esta enzima por uma técnica que quantifica a redução de ligações de amida da asparagina. KOTZIA e

LABROU (2007) encontraram o valor de 118,7 U/mg para a ErA também pelo método de Nessler. O trabalho de GERVAIS et al. (2015) mostrou o valor de 745 U/mg, utilizando uma técnica baseada na alteração da absorção da ligação da amida em 225 nm. .

O valor da AE encontrada no presente trabalho está de acordo com os dados da literatura com exceção de um estudo. Apesar de usar o método de Nessler, o estudo de KOTZIA e LABROU (2007) encontrou valor de AE aproximadamente 6 vezes menor. Essa diferença pode ser devido ao tipo de purificação utilizado. Os autores purificaram a proteína por cromatografia de troca catiônica e a eluíram no tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,5, enquanto neste trabalho a proteína foi eluída no mesmo tampão, porém no pH 7,4. Sugere-se que o fato da proteína ter sido mantida em pHs diferentes pode ter provocado modificações estruturais e causado a diferença no valor da AE.

5.2.2 Caracterização da atividade específica da ErA na presença de osmólitos

Além da caracterização da atividade específica da ErA, também foi monitorado o efeito da concentração de quatro osmólitos protetores e um desnaturante na sua atividade. Esses dois tipos de osmólitos apresentam efeitos contrários, enquanto o protetor altera o equilíbrio de macromoléculas em favor da conformação proteica nativa, o outro favorece a desnaturação das mesmas (AUTON et al., 2011).

Para testar o efeito de osmólitos na ErA, um gradiente crescente de 5 concentrações (0, 15, 30, 45 e 60 mM) de cada osmólito foi incubado por 48 h com a ErA e avaliado em relação à atividade enzimática. O comportamento da ErA na presença de cada osmólito pode ser visto na figura 2.

Figura 2. Efeito dos osmólitos arginina (A), sorbitol (B), glicina (C), sacarose (D) e ureia (E) com 5 concentrações diferentes (0, 15, 30, 45 e 60 mM) na atividade específica da ErA. O reagente de *Nessler* foi utilizado para as quantificações, no qual é detectada a formação de amônia. A análise foi realizada em triplicata.

Com exceção da glicina, todos os osmólitos protetores aumentaram a atividade específica da ErA em alguma concentração. Os maiores valores de AE foram na presença de sacarose, sorbitol e arginina, sendo que esses dois últimos apresentaram um perfil de efeito mais similar. Os menores valores foram encontrados, majoritariamente, na concentração mais baixa de osmólito, 15 mM. Apenas a glicina e a ureia apresentaram comportamento diferente dos demais como será discutido posteriormente. No trabalho de RASHID; THAPLIYAL e CHAUDHURI (2017) também foi observado o aumento da atividade específica de enzima na presença de osmólitos.

Os autores testaram o efeito de concentrações de 0 a 8 M de glicerol, sorbitol, TMAO, prolina e glicina na atividade da diidrofolato redutase humana (hDHFR) recombinante. Eles encontraram que o maior aumento foi na presença de glicerol 2 M, seguido de sorbitol 2 M, e de, aproximadamente, 4 e 3 vezes maior que a atividade da hDHFR sem adição. Além disso, da mesma forma que o presente trabalho, os autores encontraram que a atividade específica sofre um efeito “dose-dependente”, ou seja, o valor de AE obtido depende da concentração de osmólito utilizada. No caso do estudo em questão, os menores valores de AE foram obtidos na concentração máxima de osmólitos (8 M).

O maior aumento na atividade específica da enzima foi de, aproximadamente, 40% na faixa de concentração de 30 a 60 mM de arginina (figura 2A). Este aminoácido é utilizado rotineiramente para a solubilização de proteínas de corpos de inclusão e para prevenir a agregação durante etapas da purificação por cromatografia. Sugere-se que sua ação provém do aumento da tensão superficial da água e pela sua interação com cadeias laterais de aminoácidos e ligações peptídicas. Seu mecanismo de ação é similar ao do hidrocloreto de guanidina (GdnHCl), um agente desnaturante de proteínas. Entretanto, a ligação deste aminoácido a superfície proteica é limitada, diferindo do GdnHCl, e a supressão da agregação atribuída a esta molécula pode ser uma função da sua ligação à superfície proteica (ARAKAWA, TSUTOMU et al., 2007). No presente trabalho, a alta atividade enzimática pode estar relacionada com o favorecimento da estrutura nativa da enzima em relação à estrutura desnaturada, ou em processo de desnaturação, devido à maior hidratação enzimática. No item 5.3, será discutida a presença ou ausência de agregados nesta condição.

De acordo com PLATTS e FALCONER (2015), a arginina pode agir como um estabilizante ou desnaturante dependendo da sua concentração. Acima de 100 mM, pode agir como desnaturante, enquanto que abaixo desta concentração, foi encontrado a estabilização da albumina de soro bovino (ASB), desestabilização da mioglobina e efeitos neutros na lisozima. Neste trabalho, a arginina manteve a AE da ErA na concentração de 15 mM, e a intensificou na faixa de 30 a 60 mM. Dessa forma, o efeito deste aminoácido em enzimas pode ser modulado pela concentração utilizada e é, claramente, enzima específica.

Na presença de sorbitol 60 mM, foi observado o aumento de cerca de 40% na AE da ErA (figura 2B). Entretanto, assim como na presença de arginina, a AE aumentou a partir da concentração de 30 mM de osmólito. Da mesma forma que a arginina, o sorbitol também pode estar agindo aumentando a solubilização da enzima. ZHOU et al.

(2012) estudaram a solubilidade de quatro enzimas da via deoxilulose fosfato (DXS, ISPG, ISPH e ISPA). Os autores encontraram que no meio hipertônico contendo sorbitol, a solubilidade foi dobrada. Este estudo fortalece a hipótese de que a atividade específica da ErA esteja sendo aumentada pela maior solubilização da enzima. De outra forma, segundo o trabalho de AUTON et al. (2011), o sorbitol age estabilizando proteínas pelo aumento de energia livre tanto no estado nativo quanto no desnaturado. O mesmo mecanismo de ação é proposto pelos autores para a sacarose.

No presente trabalho, o efeito da sacarose na atividade específica apresentou um comportamento não linear com dois picos nas concentrações de 15 e 60 mM (figura 1D), os quais representam um aumento de, respectivamente, $21 \pm 7\%$ e $25 \pm 9\%$ neste parâmetro. Esse resultado é, aproximadamente, 15% menor que o encontrado com a ErA na presença de sorbitol. Se considerarmos que estes dois osmólitos ajam estabilizando a enzima da mesma forma, o aumento de energia livre provocado pela presença de sacarose seria menor que o causado pelo sorbitol.

Outra possibilidade de mecanismo de ação da sacarose na atividade específica da ErA também está envolvida com a solubilidade da enzima. Os autores WU; TENG e LI (2016) estudaram a fibrilação da proteína Tau, a qual está relacionada com doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. Os resultados reportados por este estudo indicam que adição de sacarose inibiu a fibrilação da Tau de maneira concentração-dependente. Os autores propuseram que este efeito pode ocorrer devido à estabilização da Tau em seu estado nativo ao mesmo tempo em que desestabiliza a sua tendência de agregação pelo mecanismo do efeito osmofóbico. Este efeito se refere à habilidade dos osmólitos estabilizarem proteínas contra a desnaturação e a agregação pela interação desfavorável dessas moléculas com a cadeia peptídica, dificultando a exposição da mesma (BOLEN; BASKAKOV, 2001). Dessa forma, no presente trabalho, a sacarose pode estar favorecendo a solubilização da enzima, ao mesmo tempo em que a impede de expor sítios hidrofóbicos que estariam contribuindo para a agregação.

Diferente dos resultados anteriores, a presença da glicina na solução da ErA apresentou um efeito negativo na atividade específica na faixa de concentração entre 30 e 45 mM, e nas concentrações de 15 e 60 mM, a AE foi a mesma da ErA sem osmólito (figura 2C). Segundo PLATTS e FALCONER (2015) a glicina estabiliza proteínas quando está presente acima de 100 mM na solução, e diversos efeitos são encontrados abaixo desta concentração. Na concentração de 50 mM, os autores

encontraram, respectivamente, maior, discreto aumento e redução da estabilidade da proteína albumina de soro bovino, lisozima e mioglobina. O mesmo estudo sugere que a causa desses efeitos são as interações com o esqueleto peptídico da proteína em concentrações abaixo de 100 mM. A glicina tem a capacidade de interagir com a proteína tanto por grupos negativos quanto positivos, por ser um zwitterion. Além disso, por ter pequenas dimensões não sofre impedimento estérico, podendo se ligar a diversas partes da proteína e sofrer diferentes torsões não permitidas em outros aminoácidos. O número potencial de sítios para que ocorram estas interações fracas varia de acordo com a forma e carga da proteína, o que explica os diferentes resultados encontrados com as três proteínas (PLATTS; FALCONER, 2015). No presente estudo, a ErA parece ter um comportamento semelhante ao da mioglobina, entretanto, por terem estruturas distintas, os efeitos observados abaixo de 100 mM podem ter diversas causas.

Acima de 100 mM de glicina, a estabilização de proteínas pela glicina pode ser atribuída à competição pelas moléculas de água entre a proteína desnaturada e os cossolutos, sendo que a hidratação preferencial da proteína favorece sua estabilidade. Isto ocorre porque a proteína precisa competir pela água que está “presa” na camada de hidratação da glicina. Abaixo da concentração de 100 mM, este fenômeno não acontece porque há moléculas de água livre para hidratar a macromolécula. Portanto, seria a competição pela água ligada à glicina a causa da maior estabilidade da proteína (PLATTS; FALCONER, 2015). Dessa forma, esta pode ter sido a causa do efeito reduzido desse osmólito na atividade específica da ErA até 60 mM.

Os osmólitos podem ser divididos em dois grupos: protetores e desnaturantes. Os primeiros favorecem a conformação da proteína nativa, como os citados acima, enquanto o segundo impulsiona o desdobramento da proteína (STREET; BOLEN; ROSE, 2006). Neste último grupo, encaixa-se a ureia. Este osmólito foi utilizado como um controle da reação neste ensaio. Como mostrado na figura 1E, a ureia não alterou a atividade específica na ErA quando presente na concentração de 15 mM. Entretanto, é observada uma queda de 20% na atividade específica na faixa de 15 a 30 mM, a qual é menos acentuada na faixa de 30 a 45 mM, e, então, mantém-se estável até 60 mM. O trabalho de SINGH, LAISHRAM RAJENDRAKUMAR et al. (2007) cita que a ureia é encontrada em compartimentos biológicos de alguns animais marinhos na faixa de 400 a 600 mM e que esta faixa de concentração já é suficiente para desnaturar proteínas. Além disso, o estudo de MASHINO e FRIDOVICH (1987) encontrou que a ureia diminui a estabilidade térmica da catalase, sugerindo que esta molécula torna a estrutura

compacta de proteínas globulares menos rígida. Visto isso, sugere-se que a ErA não foi completamente desnaturada pela ureia por não ter sido utilizada uma concentração desse osmólito suficientemente elevada.

Um dos mecanismos de ação aceitos para a ureia afirma que este osmólito desestabiliza proteínas pela sua interação favorável com o esqueleto peptídico (RAHMAN et al., 2015). Dessa forma, a redução da AE observada no presente trabalho pode ser atribuída a ligação desse osmólito a estrutura proteica, e é proporcional ao aumento de sua concentração. Entretanto, o efeito esperado, ou seja, que a ureia fosse um controle do experimento foi alcançado, confirmando a boa qualidade dos dados discutidos neste ensaio.

5.2.3 Estabilidade da enzima na presença de osmólitos em função do tempo

A atividade específica da ErA na presença ou ausência de osmólitos foi testada ao longo do tempo. A ErA foi incubada com os osmólitos glicina, arginina, sacarose e sorbitol 60 ou 90 mM imediatamente após a etapa da purificação em coluna PD-10, e avaliada nos tempos 2, 5, 15 e 30 dias por comparação da atividade específica relativa (AER). Para isso, a atividade da ErA na ausência de osmólito obtida no tempo de 2 dias após purificação foi considerada como 100% (tempo zero), e as demais foram calculadas com base nesse valor.

As concentrações de osmólitos escolhidas para este ensaio foram baseadas no ensaio anterior e na literatura. No ensaio anterior, os melhores resultados foram obtidos na presença da concentração de 60 mM de osmólitos. Na literatura, são encontrados trabalhos que obtiveram diferentes efeitos de osmólitos em concentrações de 50 e 100 mM. O trabalho de PLATTS e FALCONER (2015) sobre a glicina e a arginina, discutido anteriormente, é um exemplo. A ureia não foi utilizada, pois já havia iniciado a desnaturação enzimática na concentração de 30 mM, não sendo adequada para o teste de estabilidade.

A evolução da estabilidade da ErA na ausência de osmólitos no intervalo de 2 a 30 dias pode ser visualizada na figura 3. Houve um decréscimo de $13,6 \pm 3,8\%$ na

AER no intervalo de tempo de 2 a 5 dias. No tempo de 15 dias, esta redução foi mais acentuada e chegou $37,6 \pm 2,9\%$. Por fim, apenas $35,6 \pm 2,5 \%$ da AE foi mantida ao final de 30 dias de ensaio.

Figura 3. Atividade específica relativa da ErA II na ausência ou presença de sorbitol, sacarose, glicina e arginina 60 (A) e 90 mM, (B) em função do tempo de incubação com os osmólitos (2 a 30 dias) a 37 °C. A atividade da ErA na ausência de osmólito obtida no tempo de 2 dias foi considerada 100% (tempo zero), sendo que as demais foram calculadas com base nesse valor a fim de verificar a estabilidade da enzima.

Como esperado, a ErA II na presença de glicina 60 ou 90 mM apresentou resultados distintos ao longo do tempo. A enzima imersa na solução de 60 mM e 90 mM no tempo de 5 dias resultou em AER de, respectivamente, $61,7 \pm 4,7\%$ e $127,4 \pm 7,4\%$ quando comparada com a ErA II na ausência de osmólitos no tempo zero. No tempo de 15 dias, a AER também foi 2 vezes maior na presença da solução mais concentrada desse osmólito. Dessa forma, a solução com glicina 90 mM conservou a AER da ErA II por 15 dias, enquanto a solução de 60 mM não foi eficaz. Esse resultado está de acordo com os dados discutidos anteriormente sobre os efeitos da glicina em proteínas, pois, a concentração de 90 mM apresentou maior AER, como previsto na literatura.

Já na presença de arginina 60 ou 90 mM, ErA II também mostrou resultados distintos, confirmando a importância da escolha da concentração do osmólito. A solução de ErA II com arginina 60 mM e 90 mM resultou em AER de, respectivamente, $143 \pm 7\%$ e $197,1 \pm 16,5\%$ no tempo de 2 dias em relação à enzima sem osmólito. Essa diferença entre as AERs foi mantida no tempo de 5 dias, entretanto após 15 dias de incubação, a conservação da AER foi a mesma nas duas soluções, aproximadamente, 80%.

As maiores AERs foram observadas na presença de arginina, $197,1 \pm 16,5\%$, e sorbitol, $170,8 \pm 8,5\%$, ambos na concentração de 90 mM e no tempo de dois dias. Também foi observado que o maior efeito dos osmólitos na AER foi no tempo de 2 dias. O estudo de RASHID; THAPLIYAL e CHAUDHURI (2017) cita o aumento da atividade específica da diidrofolato redutase humana na presença de osmólitos, mas não avalia este parâmetro ao longo do tempo. No trabalho de WAREPAM, MARINA e SINGH (2015), os osmólitos foram incubados pelo tempo de uma noite com a RNase- A e foi encontrado o aumento da AE enzimática na presença de TMAO, sarcosina, betaína e sorbitol. No presente trabalho, não foi observada diferença na AE no tempo de 1 dia (dados não mostrados). Dessa forma, sugere-se que há um tempo mínimo de interação entre os osmólitos e a enzima para que estas moléculas apresentem efeito na AE, e este tempo depende de cada enzima.

Com exceção das soluções contendo glicina 60 ou 90 mM, todos os outros osmólitos conservaram, no mínimo, 80% da AER da ErA II por até 15 dias. Entretanto, apenas as soluções com sacarose ou sorbitol 90 mM mantiveram essa preservação por

30 dias, enquanto a enzima na ausência de osmólitos conservou apenas, cerca de 35% da atividade inicial no final do experimento.

A solução de ErA II contendo sorbitol foi a que melhor preservou a enzima ao longo de 30 dias. O valor da AER foi 70% superior ao da enzima na ausência da molécula. O sorbitol, um poliol, estabiliza proteínas de maneira pH – dependente, agindo em valores de pH abaixo do fisiológico (SINGH, LAISHRAM R. et al., 2011). A RNase-A na presença do pH 2,0 é mais estável que no pH 5,5. Entretanto, o presente trabalho aponta que o poliol também age acima do pH fisiológico, no caso, o pH em que foi realizado o ensaio foi de 8,8.

O estudo de COURTENAY et al. (2000) encontrou que na presença do melhor protetor proteico, no caso, a betaína, a hidratação da proteína do soro bovino apresentou $2,8 \times 10^3$ moléculas de água, valor que é, ligeiramente, menor que o encontrado na monocamada da proteína pura, $3,2 \times 10^3$ moléculas. Dessa forma, sugere-se que o sorbitol e a sacarose 90 mM estejam aumentando a camada de hidratação da ErA II melhor que os demais osmólitos testados e protegendo a estrutura da ErA II.

A estabilidade da proteína por 30 dias na solução com sacarose ou sorbitol 90 mM é importante para a área de biológicos tanto liofilizados como não-liofilizados. As proteínas não-liofilizadas costumam ser instáveis e a liofilização é aplicada para reduzir a degradação química durante o armazenamento (TASCHNER et al., 2001). Entretanto, este é um processo complexo, capaz de danificar as proteínas ou desestabilizar formulações (SOARES et al., 2013). Dentre os problemas que podem ocorrer durante a liofilização e desestabilizar proteínas, estão presentes: estresse devido à baixa temperatura, estresse de congelamento, mudança de pH, separação de fases e estresse de secagem (WANG, 2000). Aditivos podem ser incluídos à formulação a ser liofilizada a fim de conservar a proteína (ADAMS; RAMSAY, 1996). Açúcares são exemplos de crioprotetores utilizados para preservar a estrutura nativa da proteína (SOARES et al., 2013).

No caso dos medicamentos liofilizados, os osmólitos agem como crioprotetores e são essenciais para a preservação da estrutura das moléculas durante esse processo (WARD et al., 1999; TWOMEY et al., 2015). A Erwinase™ é uma L- asparaginase liofilizada de *E. chrysanthemi* aprovada para uso pelo FDA. Na sua composição consta a presença do osmólito glicose monoidratada. Dessa forma, a sacarose e o sorbitol

podem ser uma opção de osmólito para garantir a estabilidade do medicamento durante o processo de liofilização.

Biológicos não-liofilizados também podem ser beneficiados por moléculas estabilizantes. O Anticorpo MMA 383 foi estudado para a imunização contra Lewis Y, um antígeno presente em alguns tipos de células cancerígenas. O resultado do estudo mostrou que a formulação liofilizada produziu taxa de resposta de apenas 10 a 20% após a imunização, enquanto que nos anticorpos não-liofilizados a taxa de respostas foi entre 80 e 100% (TASCHNER et al., 2001). O teste de reatividade na pele mostrou que a preparação liofilizada da vacina xenogênica poliantigênica XVP foi mais imunogênica do que seu análogo não-liofilizado (SELEDTSOVA et al., 2016). No mercado, por exemplo, encontra-se o medicamento Privigen™, uma preparação líquida não-liofilizada de imunoglobulina G humana (IgG). O osmólito prolina consta como seu estabilizador. Esses exemplos mostram a importância de estudos de estabilizadores de biofármacos em preparações líquidas.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE AGREGADOS PROTEICOS

A caracterização de agregados foi feita pela pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). Ambas são baseadas no movimento browniano das partículas, sendo métodos complementares (CHAN et al., 2017; REICHELDT et al., 2017).

O DLS é muito utilizado para medir o tamanho de partículas biológicas. Entretanto, é limitado, pois trabalha com apenas uma variável, sendo que distribuições multimodais e partículas de fundo prejudicam a resolução. Por outro lado, o NTA é um método que analisa tamanho e um grande número de partículas biológicas individualmente, sendo eficiente para quantificar partículas por tamanho e menos suscetível à influência e interferência de poucas partículas de tamanho grande (CHAN et al., 2017; REICHELDT et al., 2017).

A quantificação da concentração de partículas pelo NTA é derivada da extrapolação do número de centros de espalhamento detectados no volume

visualizado. Informação sobre o tamanho individual das partículas é analisado pelo rastreamento da difusão de cada uma delas (GRUIA; PARUPUDI; POLOZOVA, 2015). É um método que vem sendo empregado para a análise de vacinas e proteínas terapêuticas, as quais podem formar partículas que impactam na qualidade do produto final (GRUIA; PARUPUDI; POLOZOVA, 2015).

Os ensaios de DLS e NTA foram realizados nas soluções de ErA II na ausência ou presença de sacarose, glicina, arginina e sorbitol 90 mM. Essas concentrações foram escolhidas por apresentarem maior capacidade de conservação da AER da ErA II.

5.3.1 Caracterização de agregados por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As análises foram realizadas dois dias após a incubação com cada uma das soluções contendo o osmólito. A figura 4 mostra distribuições de tamanho da partícula pela intensidade obtida pela técnica do DLS. Em todas as amostras, é possível observar um pico na faixa de, aproximadamente, 8 nm, e vários picos entre 100 e 10000 nm.

Figura 4. Intensidade do espalhamento dinâmico de luz em relação ao diâmetro provável das partículas (nm) nas amostras de ErA II na ausência de osmólitos ou na presença de arginina ou glicina 90 mM (A) e sorbitol ou sacarose 90 mM (B) obtido após 2 dias de incubação com os osmólitos.

O valor de D_H de $7,9 \pm 1,50$ nm sugere que a ErA II não está agregada. O estudo de KURINOMARU e SHIRAKI (2015) encontrou o diâmetro hidrodinâmico de $10,8 \pm 0,06$ nm para a EcA II, sendo que a literatura carece de dados deste tipo sobre a ErA II. Embora as enzimas sejam provenientes de micro-organismos diferentes, a massa molecular é muito semelhante (ambas têm, aproximadamente 140 kDa) (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; GERVAIS; FOOTE, 2014). Dessa forma é esperado que o D_H seja muito próximo, o que foi confirmado no ensaio.

Considerando o tamanho da partícula, a técnica do DLS foi essencial para confirmar a presença da ErA II nas amostras, pois a técnica de NTA não identifica partículas proteicas menores que 50 nm. Essas partículas apresentam baixo empalhamento de luz e sofrem interferência do espalhamento de partículas grandes, resultando em quantificação ineficiente (BAI et al., 2017).

A agregação é um fenômeno comum nas formulações de L- asparaginases (GERVAIS et al., 2014). Os picos entre 100 e 10.000 nm observados na figura 4 (A e B) podem corresponder à formação desses agregados enzimáticos. Entretanto, não se pode afirmar que estes estão em maior quantidade que a estrutura da uma única enzima (8 nm), visto que a intensidade de espalhamento de luz é proporcional a sexta potência do diâmetro da partícula (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Dessa forma, as partículas registradas como mais intensas e que possuem, majoritariamente, diâmetro hidrodinâmico acima de 100 nm resultam em maior intensidade de espalhamento de luz. A fim de confirmar a proporção dos tamanhos de partículas existentes em cada amostra, também é exposto no presente trabalho a distribuição por volume (tabela 3).

Tabela 3. Tamanho de partículas encontradas nas soluções de ErA II na presença ou ausência de sacarose ou sorbitol 90 mM considerando a distribuição por volume (%)

Tamanho do pico (d.nm)	Volume (%) ErA II	Volume (%) ErA II + Gly	Volume (%) ErA II + Sac.	Volume (%) ErA II + Sorb.	Volume (%) ErA II + Arg.
3,7 ± 0,46	-	33,6	-	-	-
7,9 ± 1,50	99,9	66,3	99,9	99,9	99,9
96,54 ± 19,76	-	0,0			
137,0 ± 27,53	-	-	0,0	-	-
139,1 ± 25,39	-	-	-	0,0	-
257,8 ± 50,65	-	-	-	0,0	-
277,7 ± 102,1	-	-	-	-	0,0
401,2 ± 75,9	0,0	-	-	-	-
649,0 ± 175,3	-	-	0,1	-	-
850,8 ± 236,2	-	-	-	-	0,0
881,5 ± 221,6	0,0	-	-	-	-

Nota: A distribuição por volume da ErA II foi estimada com auxílio do *software Zetasizer Nano 7.12*.

A distribuição por volume considera a contribuição do volume de cada partícula em relação ao volume analisado pelo detector, sendo ideal para analisar a proporção de partículas em relação a cada D_H observado. A tabela 3 mostra que os picos visualizados na figura 4 (A e B) são considerados ausentes na distribuição por volume.

Dessa forma, como a presença de agregados é rara nas amostras, representações estatísticas não seriam válidas para este método, como pode ser observado pelo alto desvio padrão encontrado para tamanhos médios acima de 90 nm. Além disso, a presença de agregados também é confirmada pelo alto valor do índice de polidispersão (Pdl), o qual foi acima de 0,89 para todas as amostras. O valor de Pdl entre 0,1 e 0,7 indica a presença de partículas monodispersas, enquanto que um $Pdl > 0,7$ sugere uma grande distribuição de tamanhos de partículas na solução, sendo que em sistemas biológicos raramente são observados $Pdl < 0,5$ (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016). Por isso, o ensaio DLS foi considerado apenas para uma análise qualitativa das amostras.

A predominância de partículas de ErA II em, provavelmente, sua forma nativa foi confirmada pela análise de distribuição por volume tanto nas amostras de ErA II na ausência de osmólitos como nas que continham essas moléculas. A contribuição do volume ocupado por partículas proteicas não agregadas (7,9 nm) é de, aproximadamente, 99% nas amostras com sacarose, sorbitol ou arginina 90 mM ou somente a ErA II imersa em tampão. Dessa forma, esse resultado confirma que a produção do biofármaco L- Asparaginase até a etapa de purificação em coluna PD-10 é eficaz.

A amostra contendo a ErA II com glicina 90 mM apresentou resultado diferente das demais, visto que a proteína na forma de tetrâmero corresponde a, aproximadamente 66,3% do material analisado. A figura 4 confirma a presença de dois picos próximos na região da proteína tetramérica. Entretanto, não é possível afirmar que o outro pico corresponda a 3,7 nm como determinado na tabela 3. Esse valor não pode ser confirmado porque a capacidade de resolução do aparelho é para amostras com tamanhos que apresentem uma diferença de tamanho de pelo menos 3 vezes. Neste caso, sugere-se que esteja ocorrendo a degradação da proteína, e que estruturas menores, como monômeros e dímeros, estejam sendo formadas.

Apesar da presença de estruturas possivelmente menores que a quaternária estarem presentes na amostra com glicina, a atividade específica da enzima na presença e ausência deste osmólito foi a mesma. Portanto, a presença de partículas menores que a ErA II tetramérica pode ter sido apenas aparente. O estudo de LORBER et al. (2012) cita que o tamanho de partículas no DLS parece diminuir como consequência de interações repulsivas, o que pode ocorrer com algumas biomoléculas em determinadas concentrações proteicas e também na presença de alguns

compostos. Este fenômeno foi observado em soluções diluídas de complexo de ribonucleoproteína. Como no presente trabalho, apenas na solução de glicina 90 mM foi observada o menor tamanho de partícula, sugere-se que a glicina esteja causando algum grau de repulsão entre as partículas proteicas.

A realização do DLS mostrou que os osmólitos sacarose, sorbitol e arginina na concentração 90 mM preservaram a estrutura da molécula no tempo de dois dias. No trabalho de DASGUPTA e KISHORE (2017), foi avaliada a fibrilação / agregação da proteína albumina de soro bovino (*bovine serum protein* - BSA) na presença de hidroxiprolina, sorbitol, sarcosina 1 M em relação à proteína sem osmólitos. Os autores conseguiram observar a evolução da agregação partindo de uma solução proteica monodispersa por DLS. No presente trabalho, a polidispersão era uma característica da amostra, o que dificultou a leitura do ensaio. Dessa forma, este ensaio é analisado em conjunto com os resultados quantitativos do NTA (item 5.3.2), visto que ambas são complementares.

5.3.2 Caracterização de agregados por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Inicialmente, o ensaio do NTA foi realizado no tempo de 2 dias após a incubação com cada osmólito. Entretanto, o número de moléculas foi inferior ao necessário para a análise estatística do aparelho. O intervalo analisado foi de 0 a 1000 nm, reiterando que as partículas proteicas abaixo de 50 nm não são avaliadas com precisão pelo aparelho. Dessa forma, a ausência de partículas confirma os dados expostos pelo método do DLS, indicando a baixa quantidade de agregados nas amostras recém - purificadas.

Para que a análise seja estatisticamente significativa, o número de partículas das amostras submetidas ao NTA deve exceder $1,0 \times 10^7$ partículas/ mL, e, preferencialmente, estar no intervalo de $1,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$ partículas / mL. Concentrações superiores a $5,0 \times 10^9$ / mL são indesejadas, pois podem resultar na interpretação equivocada dos dados devido à proximidade das partículas (BAI et al.,

2017). Dessa forma, o tempo utilizado para a geração de dados foi de 10 dias após a incubação com os osmólitos.

O resultado do teste de NTA mostrou que todas as amostras analisadas apresentaram o número adequado de partículas no tempo de 10 dias após a incubação com os osmólitos, como pode ser visto na figura 5. Considerando os resultados expostos nos itens previamente discutidos e a análise da figura 5, sugere-se que as amostras de ErA II na ausência ou presença de osmólitos iniciem o processo de agregação de forma mais acentuada no intervalo de 2 a 10 dias, o que pode estar relacionado com a redução na atividade específica encontrada no ensaio de estabilidade enzimática (item 5.2.3).

Figura 5. Perfil de agregados encontrados nas amostras de ErA II na ausência de osmólitos (A), tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,4 sem enzima (B), ErA II na presença de glicina (C), arginina (D), sacarose (E) ou sorbitol (F) 90 mM obtidos pela técnica do rastreamento de nanopartículas. O item (1) refere-se ao número total de partículas quantificadas pela técnica para cada amostra, e o item (2) refere-se ao tamanho médio de partículas encontradas em metade da amostra (D₅₀).

A análise da figura 5 mostra que o número total de partículas / mL em todas as amostras foi muito semelhante à da ErA II na ausência de osmólitos ($7,37 \times 10^8 \pm 6,03 \times 10^7$), com exceção da amostra com a enzima na presença de glicina 90 mM ($1,04 \times 10^9 \pm 6,31 \times 10^7$). Entretanto, a ErA II apresentou perfis de agregação diferentes na presença de cada osmólito, como pode ser observado em cada uma das imagens da figura 5. Considerando que este ensaio mediu apenas partículas proteicas entre 50 e 1000 nm, este resultado mostra que, de fato, os osmólitos interferem no padrão de agregação da ErA II.

A ErA II apresentou partículas no intervalo de 0 a 400 nm (figura 5 A), e o D_{50} , valor que indica o tamanho de partículas em metade da amostra, de $142,9 \pm 4,7$ nm. A fim de eliminar erros, essa variação foi comparada com a encontrada no tampão fosfato de potássio. De acordo com as figuras 5 A e 5 B, o intervalo de partículas no tampão fosfato de potássio variou de 0 a 200 nm, e o valor encontrado para o D_{50} foi de $119 \pm 7,2$ nm. Além disso, a concentração total de partículas na amostra com tampão e de tampão contendo ErA II foi de, aproximadamente, $2,68 \times 10^8$ e $7,37 \times 10^8$ partículas / mL. Apesar da concentração de moléculas na solução tampão ser inferior a solução contendo a ErA II, a presença de picos na figura 5B indica a presença de agregados em sua composição.

O tampão fosfato é utilizado em diversos estudos com a ErA II (MOOLA et al., 1994; KOTZIA; LABROU, 2007; GERVAIS et al., 2014). Entretanto, esses autores não relacionam o processo de agregação enzimática a este tampão. O trabalho de KURNIAWAN et al. (2017) relaciona a automontagem da proteína fibrina com o tipo de tampão na amostra, e cita que o tampão HEPES é bioquimicamente mais inerte que o Tris e o fosfato. Dessa forma, os componentes do tampão podem estar se agregando e também induzindo a agregação da ErA II.

Na solução de ErA II contendo arginina (figura 5 D), foi encontrado grande quantidade de agregados, principalmente, na faixa de 300 a 500 nm. O maior pico encontrado neste intervalo corresponde a concentração de moléculas de, aproximadamente, de 5×10^6 partículas / mL, enquanto que nas demais amostras acima de 300 nm a concentração de partículas é muito baixa, sendo menor que a metade desse valor, e acima de 400 nm, é, praticamente, nula. Como já discutido anteriormente (item 5.2.2), a arginina pode agir como um estabilizante ou desnaturante. Esta última condição foi encontrada acima de 100 mM no estudo PLATTS e FALCONER (2015), e

pode ser a causa da presença de agregados de alto peso molecular no presente trabalho, visto que foi utilizada a concentração de 90 mM de arginina no ensaio de NTA.

A solução de ErA II na presença de glicina (figura 5 C) foi a que apresentou o maior número total de partículas / mL ($1,04 \times 10^9 \pm 6,31 \times 10^7$) e a maior concentração de agregados na faixa de 100 a 200 nm (acima de $1,0 \times 10^7$ partículas / mL). Observa-se também um pico em 300 nm maior que $2,5 \times 10^6$ partículas / mL, o qual logo decai ao ultrapassar este tamanho.

O maior número de partículas na solução de ErA II com glicina pode estar relacionado com a presença de estruturas inferiores a 8 nm detectadas no teste do DLS, as quais já indicavam algum tipo de alteração nesta amostra no tempo de 2 dias de incubação com o osmólito.

Na literatura são encontrados diversos estudos citando o efeito de glicina em proteínas. O retardamento na formação de corpos de inclusão e o aumento da eficiência na produção extracelular de proteínas são alguns exemplos dos efeitos encontrados em meios de cultura suplementados com glicina (ZAMANI; NEZAFAT; GHASEMI, 2016). De outra forma, o estudo de SU et al. (2013) mostrou que a glicina age seletivamente acelerando a clivagem da L- asparaginase humana 3 tanto *in vitro* quanto em células humanas. Além disso, mostrou que outros aminoácidos como a alanina, serina e arginina não tem o mesmo efeito, não sendo capazes de promover a autoproteólise da enzima. No estudo de LIAO et al. (2017), foram investigados os efeitos dos osmólitos TMAO, betaína e glicina no colapso hidrofóbico do peptídeo semelhante à elastina (ELP – *Elastin like polypeptide*). Os autores mediram a habilidade desses três osmólitos em estabilizar o estado colapsado do biopolímero e encontraram que a glicina e a betaína foram o mais e o menos efetivo, respectivamente.

Ao fazer a correlação do resultado dos ensaios NTA e atividade específica da ErA II na presença de glicina 90 mM, é observada uma redução na atividade específica de, aproximadamente, 38,5 % no tempo 2 a 15 dias, sendo semelhante à da enzima na ausência de osmólitos neste período, 43%. Esta redução indica que a glicina não está protegendo a ErA II da desnaturação, podendo estar induzindo este estado, estabilizando-o, ou não apresentando nenhum efeito na estabilização do estado nativo da ErA II.

Apesar da possível relação da glicina com a degradação do biofármaco, 48,6 mg desse osmólito está presente na formulação da Kidrolase™ (EUSA Pharma SAS), EcA II disponível no mercado. Considerando a recomendação do fabricante de diluir em 2,5

mL de água para injeção, a concentração utilizada é de 250 mM, superior a utilizada no presente trabalho (90 mM). Apesar de semelhantes, a ErA II e a EcA II apresentam diferenças como número de aminoácidos em cada subunidade (a ErA II apresenta um aminoácido a mais que a enzima de EcA II) (KHUSHOO et al., 2004; GERVAIS; FOOTE, 2014) e ponto isoelétrico (5,66 e 8,6 para, respectivamente, para a EcA II e A ErA II) (GERVAIS; FOOTE, 2014) (<http://web.expasy.org/>). Dessa forma, sugere-se que o efeito protetor ou não do osmólito depende do biofármaco utilizado e também da concentração utilizada.

Ao analisar a figura 5, é possível verificar que os melhores resultados foram obtidos para a enzima na presença de sacarose ou sorbitol 90 mM. A ErA II com sorbitol apresenta um perfil de agregados semelhante ao da enzima na ausência de osmólitos na região de 100 a 200 nm. Entretanto, na faixa de 200 a 300 nm, o número de agregados na solução com sorbitol é menor que $2,5 \times 10^6$, enquanto na solução da ErA II sem o osmólito é mais que dobro deste valor. Este resultado mostra que o sorbitol parece proteger a ErA II da formação de agregados maiores que 200 nm.

A sacarose também parece proteger a ErA II da formação de agregados. Na faixa de 100 a 200 nm, o pico mais alto de agregados tem, aproximadamente, 5×10^6 e $1,0 \times 10^7$ partículas / mL na presença de, respectivamente, ErA II (figura 5 A), e ErA II com sacarose (figura 5 E).

A sacarose e o sorbitol são moléculas que pertencem às classes de carboidratos e polióis, os quais são solutos não iônicos, e, apresentam alto número de ligações de hidrogênio e grupos hidroxilas. No caso dos carboidratos, é sugerido que a posição dos seus grupos hidroxilas equatoriais afeta a camada de hidratação proteica (EDELMAN et al., 2015). O mecanismo de ação dos osmólitos não está claro, mas sabe-se que esta camada de hidratação é importante para o efeito protetor dos osmólitos. O trabalho de Timasheff e outros encontrou que os osmólitos promovem a hidratação da proteína (ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, 1985; SILVERS; MYERS, 2013).

O aumento na camada de hidratação proteica também é citado no estudo de BAEK et al. (2017). Os autores encontraram expansão no raio hidrodinâmico de um anticorpo monoclonal com o aumento da concentração de sacarose, e sugeriram que isso pode ser devido ao aumento da camada de hidratação da proteína. De forma similar, a proteína recombinante diidrofolato humano redutase apresenta alta tendência de agregação, mas sua solubilidade aumentou 2,8 vezes na presença de sorbitol (RASHID; THAPLIYAL; CHAUDHURI, 2017).

O estudo de KIM; KREBS e TROUT (2017) utilizou a simulação de dinâmica molecular para avaliar a interação de excipientes na formulação de três anticorpos monoclonais. Dentre os excipientes testados, estavam a sacarose e o sorbitol. Os resultados mostraram que estes dois excipientes apresentaram coeficiente de interação negativa, ou seja, promoveram a hidratação proteica. Dessa forma, o aumento na atividade específica da ErA II na presença de sacarose ou sorbitol pode estar relacionado com a redução na quantidade de agregados de diversos tamanhos moleculares e com o aumento da camada de hidratação proteica.

A literatura referencia o papel de osmólitos como estabilizadores e redutores da agregação proteica (CHI et al., 2012; INAYATHULLAH; RAJADAS, 2016). No presente trabalho, este efeito foi melhor observado na ErA II presença de sorbitol ou sacarose 90 mM. Entretanto, a glicina e a arginina não parecem ter agido da mesma forma, e pareceram induzir a formação de agregados. Visto isso, as reações imunogênicas resultantes da agregação enzimática podem não estar ligadas somente à enzima, mas também aos adjuvantes da formulação e podem ser intensificadas pelo efeito causado na enzima devido ao tipo de osmólito escolhido para compor o medicamento.

5.4 EFEITO DOS OSMÓLITOS NA CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática foi realizada com a ErA II na ausência de osmólitos ou na presença após pré-incubação por 48 horas com sacarose ou sorbitol 90 mM. Estes osmólitos foram escolhidos dentre os demais por resultarem em um conjunto de características mais desejáveis como maior atividade específica, maior estabilidade da enzima ao longo do tempo e menor presença de agregados (itens 5.2.3 e 5.3.2). Os resultados encontrados podem ser visualizados na figura 6 e tabela 4.

Figura 6. Caracterização cinética da ErA na ausência (●) ou presença de sacarose (▲) ou sorbitol (■) 90 mM pelo método espectrofotométrico que mede a oxidação do NADH à NAD⁺ pela GDH para a síntese de glutamato. A hidrólise da asparagina libera amônia, que na presença de α-cetoglutarato e GDH, resulta em glutamato. O perfil cinético michaeliano foi encontrado em todas as condições. Ensaio realizado em triplicata. Os valores de R², indicando a adequação dos dados experimentais ao modelo michaeliano, foram: ErA II 0,96; ErA II + Sorb. 0,97 e ErA II + Sac. 0,95.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da ErA II na ausência ou presença de sacarose ou sorbitol 90 mM

Amostra	K _M (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	V _{máx.} (M.s ⁻¹)	k _{cat} / K _M (M ⁻¹ .s ⁻¹) ¹
ErA II	0,282 ± 0,032	1,74 ± 0,05	8,68 x 10 ⁻⁰⁸ ± 2,3 x 10 ⁻⁰⁹	6,2 x 10 ³
ErA II + Sorb.	0,304 ± 0,033	1,93 ± 0,05	9,64 x 10 ⁻⁰⁸ ± 2,4 x 10 ⁻⁰⁹	6,3 x 10 ³
ErA II + Sac.	0,332 ± 0,052	2,08 ± 0,08	10,4 x 10 ⁻⁰⁸ ± 3,8 x 10 ⁻⁰⁹	6,3 x 10 ³

¹ O valor de k_{cat} / K_M refere-se à eficiência catalítica da enzima.

Notas: O programa *GraphPad Prism* 5.0 foi utilizado para calcular os parâmetros cinéticos por análise de regressão não-linear dos dados experimentais. Os valores de R², indicando a adequação das amostras ao modelo Michaeliano, foram de, 0,96; 0,97 e 0,95, para as amostras de, respectivamente, ErA II sem osmólitos, ErA II com sorbitol (90 mM), e ErA II com Sacarose (90 mM).

Pela análise da figura 6 e da tabela 4, verifica-se que a ErA II apresenta o perfil michaeliano, visto que o coeficiente de determinação, R^2 , apresenta valor superior a 0,95 em todos os ensaios cinéticos. Este perfil cinético está de acordo com os trabalhos de GERVAIS e FOOTE (2014), KOTZIA e LABROU (2007) e SCHALK et al. (2014).

O efeito dos osmólitos nos parâmetros cinéticos da ErA II pode ser visto na figura 6. Verifica-se que a velocidade máxima da reação é influenciada por essas moléculas, as quais alteraram a velocidade de acordo com seguinte ordem decrescente: sacarose > sorbitol > ErA II. Dessa forma, a ErA II apresentou consumo de substrato mais rápido na presença dos osmólitos.

Diferente do resultado de velocidade máxima, o K_M da enzima nas três situações testadas permanece constante como pode ser visto na tabela 4, indicando que não há mudança da afinidade da ErA II pelo substrato. Da mesma forma, a eficiência catalítica (k_{cat} / K_M) da enzima na presença ou ausência de osmólitos não variou neste ensaio. Entretanto, o k_{cat} foi maior nas amostras com osmólitos, sendo de, respectivamente, $1,74 \pm 0,05$, $1,93 \pm 0,05$ e $2,08 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$ para a ErA II na ausência de osmólito, e na presença de sorbitol e sacarose.

Considerando os resultados descritos acima, a ErA II gera maior quantidade de produtos por tempo de reação na presença de osmólitos. Diversos estudos da literatura confirmam a influência dessas moléculas nos parâmetros cinéticos (GULOTTA et al., 2007; OLSEN; RAMLØV; WESTH, 2007). Entretanto, como esses parâmetros são compostos por múltiplas constantes é difícil determinar quais e como os eventos elementares estão sendo afetados pelos osmólitos. Geralmente, sais e o osmólito orgânico ureia aumentam o K_M de enzimas, enquanto osmólitos protetores, como o TMAO, reduzem este parâmetro (GULOTTA et al., 2007). Por outro lado, o estudo de OLSEN; RAMLØV e WESTH (2007) mostrou que o TMAO aumentou tanto o K_M quanto o $V_{m\acute{a}x.}$ da hexoquinase, enquanto o glicerol reduziu os dois parâmetros.

O estudo de SHARMA e SINGH (2017) com o redobrimento da ribonuclease – A mostrou que polióis não só induziram a formação da estrutura terciária proteica, bem como aumentaram a sua eficiência catalítica quando comparado com o redobrimento na ausência desses osmólitos. Portanto, os efeitos dessas moléculas nos parâmetros cinéticos parecem ser específicos para cada tipo de proteína estudada.

Apesar das variações nos parâmetros cinéticos encontradas no presente trabalho, pelo resultado obtido nos testes de atividade específica e estabilidade (itens 5.2.2 5.2.3), esperava-se um maior efeito dos osmólitos nos parâmetros cinéticos da

ErA II. Essa diferença entre os valores encontrados podem ter relação como o tipo de teste feito em cada um dos ensaios.

A cinética foi realizada pelo método espectrofotométrico acoplado à GDH que quantifica o NADH oxidado (SCHALK et al., 2014). O NADH é uma coenzima importante que apresenta ação catalítica em mais de 300 processos enzimáticos (BARTHUS; MAZO; POPPI, 2005). Na reação cinética, o NADH é oxidado para NAD^+ com a perda de dois elétrons, e este último é quantificado no ensaio. A GDH oxida uma molécula de NADH para sintetizar glutamato, a partir de uma molécula de α -cetoglutarato e uma de amônia. Esta última provém da hidrólise da L- asparagina pela ErA II (BALCÃO et al., 2001).

A atividade específica (item 5.2.2) foi feita pela técnica que utiliza o reagente de Nessler. Este reagente é uma solução alcalina de tetraiodo mercurato de potássio ($\text{K}_2[\text{HgI}_4]$), e sua reação com a amônia proveniente da hidrólise da asparagina à aspartato resulta na formação de uma coloração amarela com absorbância em 440 nm (KHUSHOO et al., 2004; SANTOS; AFONSO, 2012; VIDYA; USHASREE; PANDEY, 2014). Visto que as duas técnicas apresentam metodologias distintas, o método pelo ensaio acoplado à GDH, utilizado na cinética, também foi utilizado para medir a AE da ErA II na presença de sorbitol e sacarose 90 mM, a fim de complementar a interpretação de resultados.

O resultado da AE mostrou um aumento de $9,2 \pm 1,2\%$ e $12 \pm 3,1\%$ % (figura 7) na atividade específica da enzima na presença de, respectivamente, sacarose e sorbitol no tempo de 48 horas de incubação pelo ensaio acoplado à GDH. Esse valor difere do encontrado no ensaio realizado pelo método de Nessler, o qual apresentou um aumento de, aproximadamente, 53 e 70% na AE da ErA II para, respectivamente, sacarose e sorbitol.

Figura 7. Atividade Específica Relativa da ErA II na ausência ou presença de sacarose ou sorbitol 90 mM obtida pela técnica de ensaio acoplado à GDH após 2 dias de incubação com os osmólitos. Esta técnica consiste na detecção da oxidação de NADH à NAD⁺ pela GDH, da qual é cofator, ao longo da reação enzimática, como já descrito neste trabalho.

Uma possibilidade do efeito reduzido de osmólitos na AE na técnica de reação acoplada à GDH pode ser devido à presença de duas enzimas neste ensaio: a própria glutamato desidrogenase e a L- asparaginase.

O efeito de osmólitos, dentre estes a betaína e a ureia, nos parâmetros cinéticos da enzima hexoquinase antes e após a adição de outra proteína, a BSA, foi estudada por OLSEN; RAMLØV e WESTH (2007). A betaína aumentou o $V_{máx}$ e o K_M da enzima. Entretanto, o efeito da betaína no $V_{máx}$ foi reduzido após a adição de BSA. A ureia, um desnaturante, aumentou significativamente o $V_{máx}$ e o K_M da hexoquinase. Na presença da enzima e de BSA, o efeito da ureia no $V_{máx}$ não foi significativo, mas o K_M aumentou com o acréscimo da proteína. Dessa forma, o comportamento dos osmólitos no ensaio acoplado à GDH pode ter sido alterado pela presença de mais uma enzima quando comparado com a técnica de Nessler. Assim, sugere-se que a ação dos osmólitos é dependente da quantidade e diversidade proteica. O tipo de alteração dos parâmetros cinéticos também parece estar relacionado com o tipo de osmólito, visto que o $V_{máx}$ e o k_{cat} apresentaram valores maiores na presença de sacarose que na presença de sorbitol. Dessa forma, a escolha do osmólito e sua concentração em relação à

quantidade proteica são essenciais para o alcance das propriedades desejadas em um biofármaco.

Por fim, diante dos problemas envolvendo a redução do fornecimento do medicamento L- asparaginase no Brasil, este trabalho traz um avanço na produção deste biológico no país, descrevendo técnicas e sugerindo a inclusão de adjuvantes na formulação que poderão aumentar a qualidade deste biofármaco.

6. CONCLUSÕES

A sacarose e o sorbitol 90 mM foram os osmólitos que apresentaram os melhores efeitos na ErA II. Diferente dos demais osmólitos, não induziram a produção de agregados de alto peso molecular, aumentaram a AE e a preservaram por 30 dias. Este resultado pode auxiliar na melhoria de biofármacos, principalmente, ao evidenciar que determinadas concentrações de osmólitos, como a glicina, podem aumentar a produção de agregados, e possivelmente, agravar as reações imunogênicas em pacientes.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho caracterizou a influência positiva da sacarose e do sorbitol na atividade específica, cinética e propriedade de agregação da ErA II. Além dessas, outras vantagens dos osmólitos como aumento da temperatura de desnaturação de enzimas, a estabilidade de biomoléculas frente à liofilização e o auxílio para o redobramento de proteínas desnaturadas podem ser exploradas em trabalhos futuros.

Além dos ensaios citados acima, seria importante a realização do teste do efeito da ErA II com sacarose ou sorbitol em células leucêmicas *in vitro* e *in vivo* em modelos animais. Esses ensaios poderão responder se a atividade específica da enzima também é aumentada em nível celular, o que poderá implicar na redução da dose do medicamento aplicada no paciente, além de informar sobre a resposta imunogênica provocada no organismo vivo na presença desses osmólitos.

Outra perspectiva futura é testar a expressão de proteínas na presença de osmólitos. Durante a expressão proteica, é comum encontrar a formação de corpos de inclusão e a expressão de enzimas com baixa atividade específica. A adição de osmólitos nessa fase da produção proteica poderia eliminar essas dificuldades.

O efeito sinérgico dos osmólitos sacarose e sorbitol também pode ser testado. O uso de mais de um osmólito pode potencializar os seus efeitos e beneficiar a produção de biomoléculas e biofármacos.

O leque de opções de osmólitos é imenso, e outras moléculas, como a trealose e TMAO, bastante citadas na literatura, podem ser exploradas. Por fim, o uso dessas moléculas possibilitará não só a produção de proteínas mais estáveis, mas também a produção biofármacos que possam ser aplicados em menores doses e, consequentemente, reduzam as reações imunogênicas de pacientes.

REFERÊNCIAS

- AMIN, S. et al. Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n.5, p. 438-449. 2014.
- ARAKAWA, T. et al. Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. **Biophysical Chemistry**, v. 127, n.1–2, p. 1-8. 2007.
- ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. The stabilization of proteins by osmolytes. **Biophysical Journal**, v. 47, n.3, p. 411-414. 1985.
- AUTON, M. et al. Osmolyte effects on protein stability and solubility: a balancing act between backbone and side-chains. **Biophysical Chemistry**, v. 159, n.1, p. 90-99. 2011.
- BAEK, Y. et al. Effects of Histidine and Sucrose on the Biophysical Properties of a Monoclonal Antibody. **Pharm Res**, v. 34, n.3, p. 629-639. 2017.
- BAHREINI, E. et al. An optimized protocol for overproduction of recombinant protein expression in Escherichia coli. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 44, n.5, p. 510-28. 2014.
- BAHREINI, E. et al. Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n.1, p. 340-340. 2014.
- BAI, K. et al. Interference from Proteins and Surfactants on Particle Size Distributions Measured by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). **Pharm Res**, v. 2, n.10, p. 017-2109. 2017.
- BALCÃO, V. M. et al. Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. **Biotechnology Progress**, v. 17, n.3, p. 537-542. 2001.
- BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. **Eclética Química**, v. 30, p. 51-58. 2005.
- BOLEN, D. W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding¹. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, n.5, p. 955-963. 2001.
- BONDOS, S. E.; BICKNELL, A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. **Anal Biochem**, v. 316, n.2, p. 223-31. 2003.

BOURDENX, M. et al. Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. **Progress in Neurobiology**, v. p. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n.1, p. 248-254. 1976.

CARVALHO, J. W. P. et al. Sodium dodecyl sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 561-570. 2013.

CHAN, M. Y. et al. Particle Sizing of Nanoparticle Adjuvant Formulations by Dynamic Light Scattering (DLS) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). In: FOX, C. B. **Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2017. p.239-252.

CHI, M. C. et al. Sorbitol counteracts temperature- and chemical-induced denaturation of a recombinant alpha-amylase from alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, n.12, p. 1779-88. 2012.

COURTENAY, E. S. et al. Vapor Pressure Osmometry Studies of Osmolyte-Protein Interactions: Implications for the Action of Osmoprotectants in Vivo and for the Interpretation of "Osmotic Stress" Experiments in Vitro†. **Biochemistry**, v. 39, n.15, p. 4455-4471. 2000.

CUSSIOL, J. R. et al. Ohr (organic hydroperoxide resistance protein) possesses a previously undescribed activity, lipoyl-dependent peroxidase. **J Biol Chem**, v. 285, n.29, p. 21943-50. 2010.

DASGUPTA, M.; KISHORE, N. Selective inhibition of aggregation/fibrillation of bovine serum albumin by osmolytes: Mechanistic and energetics insights. **PLoS One**, v. 12, n.2, p. e0172208. 2017.

EBEID, E. N.; KAMEL, M. M.; ALI, B. A. Detection of anti-asparaginase antibodies during therapy with *E.coli* asparaginase in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 20, n.2, p. 127-33. 2008.

EDELMAN, R. et al. Sugar stereochemistry effects on water structure and on protein stability: The templating concept. **Food Hydrocolloids**, v. 48, n.0, p. 27-37. 2015.

FERREIRA, L. A. et al. Effects of osmolytes on protein-solvent interactions in crowded environments: study of sucrose and trehalose effects on different proteins by solvent interaction analysis. **RSC Advances**, v. 5, n.34, p. 27154-27162. 2015.

FILIPPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n.5, p. 796-810. 2010.

GENCOGLU, M. F.; HELDT, C. L. Enveloped virus flocculation and removal in osmolyte solutions. **Journal of Biotechnology**, v. 206, n.0, p. 8-11. 2015.

GERVAIS, D. et al. Measurement of subvisible particulates in lyophilised *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase and relationship with clinical experience. **Aaps J**, v. 16, n.4, p. 784-90. 2014.

GERVAIS, D.; FOOTE, N. Recombinant Deamidated Mutants of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase Have Similar or Increased Activity Compared to Wild-Type Enzyme. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n.10, p. 865-877. 2014.

GERVAIS, D. et al. Structural Characterisation of Non-Deamidated Acidic Variants of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase Using Small-Angle X-ray Scattering and Ion-Mobility Mass Spectrometry. **Pharm Res**, v. 4, p. 4. 2015.

GERVAIS, D. et al. Control of process-induced asparaginyl deamidation during manufacture of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Process Biochemistry**, v. In press, n.0, p. 0. 2013.

GRUIA, F.; PARUPUDI, A.; POLOZOVA, A. Practical Considerations for Detection and Characterization of Sub-Micron Particles in Protein Solutions by Nanoparticle Tracking Analysis. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 69, n.3, p. 427-439. 2015.

GULOTTA, M. et al. Effects of cell volume regulating osmolytes on glycerol-3-phosphate binding to triosephosphate isomerase. **Biochemistry**, v. 46, n.35, p. 10055-10062. 2007.

HORVAT, T. Z. et al. The use of *Erwinia* asparaginase for adult patients with acute lymphoblastic leukemia after pegaspargase intolerance. **Leuk Res**, v. 50, p. 17-20. 2016.

INAYATHULLAH, M.; RAJADAS, J. Conformational dynamics of a hydrophobic prion fragment (113–127) in different pH and osmolyte solutions. **Neuropeptides**, v. 57, p. 9-14. 2016.

KHUSHOO, A. et al. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. **Protein Expression and Purification**, v. 38, n.1, p. 29-36. 2004.

KIM, J.; KREBS, M. R. H.; TROUT, B. L. Molecular characterization of excipients' preferential interactions with therapeutic monoclonal antibodies. **J Pharm Pharmacol**, v. 4, n.10, p. 12787. 2017.

KLOOS, R. Q. H. et al. A cost analysis of individualized asparaginase treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 2, n.10, p. 26651. 2017.

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. I-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n.4, p. 657-669. 2007.

KUDRYASHOVA, E. V.; SUKHOVERKOV, K. V. "Reagent-free" L-asparaginase activity assay based on CD spectroscopy and conductometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 408, n.4, p. 1183-9. 2016.

KURINOMARU, T.; SHIRAKI, K. Noncovalent PEGylation of L-asparaginase using PEGylated polyelectrolyte. **J Pharm Sci**, v. 104, n.2, p. 587-92. 2015.

KURNIAWAN, N. A. et al. Buffers Strongly Modulate Fibrin Self-Assembly into Fibrous Networks. **Langmuir**, v. 33, n.25, p. 6342-6352. 2017.

LIAO, Y.-T. et al. Trimethylamine N-oxide stabilizes proteins via a distinct mechanism compared with betaine and glycine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n.10, p. 2479-2484. 2017.

LOPEZ-SANTILLAN, M. et al. Review of pharmacogenetics studies of L-asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia points to variants in the *GRIA1* gene. **Drug Metab Pers Ther**, v. 32, n.1, p. 1-9. 2017.

LORBER, B. et al. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 40, n.6, p. 372-382. 2012.

MASHINO, T.; FRIDOVICH, I. Effects of urea and trimethylamine-N-oxide on enzyme activity and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 258, n.2, p. 356-360. 1987.

MEZENTSEV, Y. V. et al. Oligomerization of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 1, n.1, p. 58-67. 2007.

MOOLA, Z. B. et al. *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. **Biochemical Journal**, v. 302, n.3, p. 921. 1994.

MORALES, R.; CALLEGARI, K.; SOTO, C. Prion-like features of misfolded Abeta and tau aggregates. **Virus Res**, v. 6, n.14, p. 00545-0. 2015.

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, n.3, p. 208-221. 2007.

NGUYEN, H. A.; DURDEN, D. L.; LAVIE, A. The differential ability of asparagine and glutamine in promoting the closed/active enzyme conformation rationalizes the *Wolinella succinogenes* L-asparaginase substrate specificity. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41643. 2017.

NGUYEN, H. A.; SU, Y.; LAVIE, A. Structural Insight into Substrate Selectivity of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase. **Biochemistry**, v. 55, n.8, p. 1246-1253. 2016.

OLSEN, S. N.; RAMLØV, H.; WESTH, P. Effects of osmolytes on hexokinase kinetics combined with macromolecular crowding. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n.2, p. 339-345. 2007.

PAN, K. et al. Zinc significantly changes the aggregation pathway and the conformation of aggregates of human prion protein. **Biochim Biophys Acta**, v. 8, p. 907-18. 2015.

PAVISIC, R. et al. Recombinant human granulocyte colony stimulating factor pre-screening and screening of stabilizing carbohydrates and polyols. **Int J Pharm**, v. 387, n.1-2, p. 110-9. 2010.

PIETERS, R. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. **Blood**, v. 112, n.13, p. 4832-8. 2008.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. **Cancer**, v. 117, n.2, p. 238-49. 2011.

PLATTS, L.; FALCONER, R. J. Controlling protein stability: Mechanisms revealed using formulations of arginine, glycine and guanidinium HCl with three globular proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n.1–2, p. 131-135. 2015.

RAHMAN, S. et al. A current perspective on the compensatory effects of urea and methylamine on protein stability and function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 119, n.2, p. 129-136. 2015.

RASHID, N.; THAPLIYAL, C.; CHAUDHURI, P. Osmolyte induced enhancement of expression and solubility of human dihydrofolate reductase: An in vivo study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1044-1053. 2017.

REICHELT, W. N. et al. High throughput inclusion body sizing: Nano particle tracking analysis. **Biotechnol J**, v. 12, n.6, p. 28. 2017.

ROBERTS, C. J. Protein aggregation and its impact on product quality. **Curr Opin Biotechnol**, v. 30, p. 211-7. 2014a.

ROBERTS, C. J. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n.7, p. 372-380. 2014b.

RODRIGUES, E. S. et al. Purification of coagulation factor VIII by immobilized metal affinity chromatography. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 62, n.3, p. 343-8. 2015.

RODRÍGUEZ-ROPERO, F.; VAN DER VEGT, N. F. A. Direct Osmolyte–Macromolecule Interactions Confer Entropic Stability to Folded States. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n.26, p. 7327-7334. 2014.

SANTOS, V. D. M. D.; AFONSO, J. C. Recuperação de compostos de iodo de reagentes e soluções laboratoriais. **Química Nova**, v. 35, p. 398-402. 2012.

SCHALK, A. M. et al. Identification and structural analysis of an L-asparaginase enzyme from guinea pig with putative tumor cell killing properties. **J Biol Chem**, v. 289, n.48, p. 33175-86. 2014.

SELEDTSOVA, G. V. et al. Xenogeneic cell-based vaccine therapy for colorectal cancer: Safety, association of clinical effects with vaccine-induced immune responses. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1247-1252. 2016.

SHARMA, G. S.; SINGH, L. R. Polyols Have Unique Ability to Refold Protein as Compared to Other Osmolyte Types. **Biochemistry**, v. 82, n.4, p. 465-473. 2017.

SILVERS, T. R.; MYERS, J. K. Osmolyte Effects on the Self-Association of Concanavalin A: Testing Theoretical Models. **Biochemistry**, v. 52, n.51, p. 9367-9374. 2013.

SINGH, L. R. et al. Testing the paradigm that the denaturing effect of urea on protein stability is offset by methylamines at the physiological concentration ratio of 2:1 (urea:methylamines). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1774, n.12, p. 1555-1562. 2007.

SINGH, L. R. et al. Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin. **Life Sciences**, v. 88, n.3, p. 117-125. 2011.

SRIKHANTA, Y. N. et al. Distinct physiological roles for the two L-asparaginase isozymes of *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. In Press, n.0, p. 0. 2013.

STECHER, A. L. et al. Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 74, n.1, p. 1-9. 1999.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n.4, p. 409-427. 2016.

STREET, T. O.; BOLEN, D. W.; ROSE, G. D. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n.38, p. 13997-14002. 2006.

SU, Y. et al. Free glycine accelerates the autoproteolytic activation of human asparaginase. **Chem Biol**, v. 20, n.4, p. 533-40. 2013.

TASCHNER, N. et al. Modulation of antigenicity related to changes in antibody flexibility upon lyophilization¹¹ Edited by W. Baumeister. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, n.1, p. 169-179. 2001.

THANGAKANI, A. M. et al. How do thermophilic proteins resist aggregation? **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 80, n.4, p. 1003-1015. 2012.

TWOMEY, A. et al. Microheterogeneity in Frozen Protein Solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 487, n.0, p. 91-100. 2015.

UPADHYAY, A. K. et al. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in Escherichia coli. **PLoS One**, v. 7, n.3, p. 29. 2012.

VAN DYKEN, J. D. Noise slows the rate of Michaelis–Menten reactions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 430, p. 21-31. 2017.

VERMA, S. et al. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of E. coli asparaginase II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n.7, p. 1219-1230. 2014.

VIDYA, J.; USHASREE, M. V.; PANDEY, A. Effect of surface charge alteration on stability of I-asparaginase II from Escherichia sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 56, p. 15-19. 2014.

WANG, W. et al. Immunogenicity of protein aggregates--concerns and realities. **Int J Pharm**, v. 431, n.1-2, p. 1-11. 2012.

WANG, W. et al. Immunogenicity of protein aggregates—Concerns and realities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 431, n.1–2, p. 1-11. 2012.

WARD, K. R. et al. Protection of the enzyme I-asparaginase during lyophilisation—a molecular modelling approach to predict required level of lyoprotectant. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, n.2, p. 153-162. 1999.

WAREPAM, M. et al. Structural characteristic of the initial unfolded state on refolding determines catalytic efficiency of the folded protein in presence of osmolytes. **PLoS One**, v. 9, n.10, p. 2014.

WAREPAM, M.; SINGH, L. R. Osmolyte mixtures have different effects than individual osmolytes on protein folding and functional activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 573, p. 77-83. 2015.

WOLF, M. et al. Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, n.1-2, p. 141-52. 2003.

WU, Y.; TENG, N.; LI, S. Effects of macromolecular crowding and osmolyte on human Tau fibrillation. **Int J Biol Macromol**, v. 90, p. 27-36. 2016.

YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **J Exp Biol**, v. 208, n.Pt 15, p. 2819-30. 2005.

YUN, M.-K. et al. Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic Escherichia coli L-Asparaginase I. **Journal of Molecular Biology**, v. 369, n.3, p. 794-811. 2007.

ZALEWSKA-SZEWCZYK, B. et al. The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different L-asparaginase preparations. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n.2, p. 113-6. 2009.

ZAMANI, M.; NEZAFAT, N.; GHASEMI, Y. Evaluation of Recombinant Human Growth Hormone Secretion in E. coli using the L-asparaginase II Signal Peptide. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, n.4, p. 182-187. 2016.

ZHOU, K. et al. Enhancing solubility of deoxyxylulose phosphate pathway enzymes for microbial isoprenoid production. **Microb Cell Fact**, v. 11, n.148, p. 1475-2859. 2012.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA

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

Of.CIBio/0182016/FCF

São Paulo, 13 de setembro de 2016

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada no dia 17 de agosto p.p., o Projeto "Efeitos de interações proteína-meio aquoso em modificações estruturais da L-Asparaginase II de *Escherichia coli*" foi aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. GISELE MONTTIRO DE SOUZA

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF-USP

NESIA

ANEXO B – ACEITE SOBRE MUDANÇA DE TÍTULO DO PROJETO

E-mail de Universidade de São Paulo - Resultado da CCP-FBT/USP... <https://mail.google.com/mail/u/1/?ui=2&ik=d160be952e&jsver=H>

Gisele Monteiro de Souza <smgisele@usp.br>

Resultado da CCP-FBT/USP sobre sua solicitação, de 29.05.17

1 mensagem

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica/FCF/USP 29 de maio de 2017
 <ccpfbt@gmail.com> 15:35
 Para: SAMARINA <samawlad@gmail.com>
 Cc: Gisele Monteiro de Souza <smgisele@usp.br>

Samarina / Profa. Gisele,

Informamos que foi aceito seu pedido sobre mudança do título do Projeto de Pesquisa, atual 'Efeitos de interações proteína-meio aquoso em modificações estruturais da L-asparaginase II de *Escherichia coli*' para Efeitos de osmólitos na L-asparaginase II de *Erwinia chrysanthemi* em meio aquoso'.

Att.

ROSE CLÉLIA DEDIVITIS

Secretária

Department of Pharmaceutical and Biomedical Technology
 School of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16 - Cidade Universitária
 05508-000 - São Paulo, SP, Brazil
 Phone: +55 11 3091.3659

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-FARMACÊUTICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA USP

Coordenadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui - e-mail: corange@usp.br
 Vice-Coordenadora: Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza - e-mail: smgisele@usp.br

ANEXO C- FICHA DO ALUNO

23/08/2017

FANUS - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9134 - 8779275/1 - Samarina Rodrigues Włodarczyk

Email: samawlod@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
 Data de Nascimento: 05/02/1986
 Cédula de Identidade: RG - 91318822 - PR
 Local de Nascimento: Estado do Paraná
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Paraná - Paraná - Brasil - 2011
 Mestrado: Mestre em Ciências Farmacêuticas (1) - Universidade Federal do Paraná - Paraná - Brasil - 2013

Curso: Doutorado
 Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
 Área: Tecnologia de Fermentações
 Data de Matrícula: 27/08/2013
 Início da Contagem de Prazo: 27/08/2013
 Data Limite para o Depósito: 28/08/2017
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Gisele Monteiro de Souza - 27/08/2013 até o presente. Email: smgisele@usp.br
 Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Pedro Antonio Palma Madeira - 12/08/2015 até o presente. Email:
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 27/08/2013
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/10/2015
 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 27/08/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/08/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2017

Impresso em: 23/08/2017 20:55:29

FANUS - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

ANEXO C – FICHA DO ALUNO (CONTINUAÇÃO)

23/08/2017

9134 - 8779275/1 - Samarina Rodrigues Włodarczyk

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5786-3/1	Metodologias e Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos	17/09/2013	18/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5704-6/2	Controle Terapêutico	02/10/2013	05/11/2013	75	5	90	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
FBT5733-5/6	Uso Industrial de Enzimas	03/02/2014	06/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
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	100	A	N	Concluída
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
FBT5773-7/5	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	02/03/2015	10/05/2015	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	60	0	-	-	N	Pré-matricula Indeferida
FBA5728-3/11	Aprimoramento Didático	14/04/2015	11/05/2015	60	0	-	-	N	Pré-matricula Indeferida
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	38
Estágios:			
Total:	0	25	38

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012..

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 14/07/2017

Impresso em: 23/08/2017 20:55:29

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9134 - 8779275/1 - Samarina Rodrigues Włodarczyk

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3435230	Gisele Monteiro de Souza	FCF - USP	Presidente

Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance

Graziele Fonseca de Sousa, Samarina Rodrigues Wlodarczyk, Gisele Monteiro*

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Carboplatin is a derivative of cisplatin; it has a similar mechanism of action, but differs in terms of structure and toxicity. It was approved by the FDA in the 1980s and since then it has been widely used in the treatment of several tumor types. This agent is characterized by its ability to generate lesions in DNA through the formation of adducts with platinum, thereby inhibiting replication and transcription and leading to cell death. However, its use can lead to serious inconvenience arising from the development of resistance that some patients acquire during treatment, limiting the scope of its full potential. Currently, the biochemical mechanisms related to resistance are not precisely known. Therefore, knowledge of pathways associated with resistance caused by carboplatin exposure may provide valuable clues for more efficient rational drug design in platinum-based therapy and the development of new therapeutic strategies. In this narrative review, we discuss some of the known mechanisms of resistance to platinum-based drugs, especially carboplatin.

Uniterms: Carboplatin/mechanisms of resistance. Cisplatin/mechanisms of resistance. Drugs/resistance. Molecular targets. Antitumors/platinum-based.

A carboplatina é um derivado da cisplatina, possuindo mecanismo de ação similar, diferindo em estrutura e toxicidade. Este fármaco foi aprovado pelo FDA em meados de 1980 e, desde então, tem sido amplamente usado no tratamento de diversos tipos de tumores. Este agente é caracterizado por sua habilidade em gerar lesões no DNA através da formação de adutos com a platina, inibindo a replicação e a transcrição, levando à morte celular. Entretanto, seu uso pode levar a graves inconvenientes, advindos do desenvolvimento de resistência que alguns pacientes adquirem durante o tratamento, limitando o alcance de seu potencial. Até então, os mecanismos bioquímicos relacionados ao problema da resistência não são precisamente conhecidos. Dessa forma, o conhecimento das vias associadas à resistência causada pela exposição à carboplatina pode prover valiosas informações para o planejamento racional de fármacos com base em platina mais eficiente e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesta revisão narrativa, serão discutidos alguns mecanismos de resistência a fármacos com base em platina, especialmente ao antitumoral carboplatina.

Unitermos: Carboplatina/mechanismos de resistência. Cisplatina/mechanismos de resistência. Fármacos/resistência. Alvos moleculares. Antitumorais/baseados em platina.

INTRODUCTION

Carboplatin is a derivative of cisplatin and has a similar mechanism of action, differing only in terms of structure and toxicity. The anticancer activity of cisplatin

was discovered in the early 1960s by Professor Barnett Rosenberg at the University of Michigan (Rosenberg, Vancamp, Krigas, 1965; Rosenberg *et al.*, 1969). He was interested in studying the effects of electric fields on bacterial growth, by establishing their involvement in the process of cell division. It was noted that after applying an electric field through a set of platinum electrodes immersed in a solution containing *Escherichia coli*, the cells not divided in a normal manner, and demonstrated filamentous growth of up to 300 times above normal

*Correspondence: G. Monteiro. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av. Lineu Prestes, 580, Bloco 16 - Semi Industrial, 1º. andar, sala 135, Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira, 05508-000 - São Paulo-SP, Brasil. E-mail: smgisele@usp.br

(Rosenberg, Vancamp, 1970). This effect was found to be unrelated to the electric field, but related to the products of electrolysis of the platinum electrodes. Subsequent detailed chemical analysis identified several platinum complexes which induce this behavior, and that while the bivalent complex $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ was active, the trans isomer was much less active (Rosenberg, Vancamp, Krigas, 1965; Jamieson, Lippard, 1999).

After testing bacteria, Rosenberg started working on the possibility of using cisplatin in cancer treatment due to its anti-proliferative ability. Initial tests were performed on mice with malignant tumors, such as Kaposi 180. After the application of appropriate amounts of cisplatin, it was found that the drug was an effective antitumor agent, but at higher doses, cisplatin produced side effects such as kidney damage, discomfort, dizziness, nausea, and vomiting (Carozzi *et al.*, 2009). According to Choudhary, Sood and Wang (2013), this drug has been proven to be effective for medical use in the treatment of several human cancers, including testis, ovary, brain, bladder, and lung.

After the pioneering work of Rosenberg, a huge number of metal complexes were studied, most of which were platinum-based. Since 1979, 1,055 platinum compounds have been tested, of which 185 were active. Considerable research worldwide has been triggered and more than 3,000 analogous compounds have been synthesized. Some of these new compounds are less toxic than cisplatin, but only five other compounds have been approved for commercialization: oxaliplatin, nedaplatin, lobaplatin, heptaplatin (the marketing of latter three is restricted to Japan, China and Korea, respectively), and carboplatin (McWhinney, Goldberg, McLeod, 2009; Wheate *et al.*, 2010).

Carboplatin (1,1-cyclobutyldicarboxylate) is one of the main platinum-based drug used as an antitumor

drug. It is intended specifically for the treatment of cancer of the testis, ovary, head, neck, and small cell lung cancer (Fuentes, Alonso, Perez, 2003). The main target of carboplatin is DNA, to which it binds efficiently, thereby inhibiting replication and transcription and inducing cell death (Brabec, Kasparkova, 2005). The nature of these DNA adducts affects a number of transduction pathways and triggers apoptosis or necrosis in tumor cells. The adducts formed by this compound can be monoadducts or intra and interchain diadducts (Hah *et al.*, 2006) (Figure 1).

The development of resistance to platinum-based chemotherapy is a major clinical challenge in cancer treatment, since the cellular response which confers resistance to carboplatin is multifactorial and poorly understood (Wernyj, Morin, 2004; Shahzad, Berestein, Sood, 2009). It has been observed that the intracellular mechanisms by which cells become resistant to carboplatin include increased drug detoxification by the thiol groups in metallothionein and glutathione, repair, and improved tolerance to nuclear damage, leading to a concomitant reduction in apoptosis and reduced accumulation of intracellular carboplatin (Wang, Lippard, 2005; Stewart, 2007). Thus, inducing greater damage to DNA, impairing mechanisms of DNA repair, or activating and preventing apoptosis may lead to decreased tumor cell viability and could overcome resistance (Shahzad, Berestein, Sood, 2009; Burger *et al.*, 2011).

Because of the low toxicity of carboplatin in clinical treatment, its association with other antitumor drugs has been tested in different types of cancer. Table I shows some of these associations and clinical outcomes in order to examine whether the combination therapy is favorable or not to the patient and which types of tumors (Kang *et al.*, 2006; Honing *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014; Angioli *et al.*, 2013; Strauss *et al.*, 2008;

FIGURE 1 - Formation of adducts between DNA and carboplatin.

TABLE I - Combination therapy with carboplatin

Combination therapy	Dosage	Tumor	Favorable	References
Carboplatin/Paclitaxel	AUC 5 e 175 mg/m ²	Epithelial Ovarian Cancer	Yes	Kang <i>et al.</i> (2006)
Carboplatin/Paclitaxel	AUC 2 e 50 mg/m ²	Cancer of Esophagus	Yes	Honing <i>et al.</i> (2014)
Carboplatin/Paclitaxel	AUC 5,5 e 175 mg/m ²	Lung Cancer	Yes, in stage IB patients who have tumors ≥ 4.0 cm	Chang <i>et al.</i> (2014)
Carboplatin/Paclitaxel	AUC 6 e 175 mg/m ²	Cancer of the Cervix	Yes	Angioli <i>et al.</i> (2013)
Carboplatin/Paclitaxel	AUC 6 e 200 mg/m ²	Lung Cancer	Yes, in stage IB patients who have tumors ≥ 4.0 cm	Strauss <i>et al.</i> (2008)
Carboplatin/Paclitaxel	AUC 1 e 40 mg/m ²	Cancer of the head and neck	Yes	Semrau <i>et al.</i> (2011)
Carboplatin/Docetaxel	AUC 6 e 60 mg/m ²	Cancer of the Cervix	No	Ukita <i>et al.</i> (2013)
Carboplatin/Docetaxel	AUC 6 e 75mg/m ²	Breast Cancer	Yes, in patients with metastatic breast cancer	Perez <i>et al.</i> (2005)
Carboplatin/Docetaxel	AUC 5,5 e 75mg/m ²	Lung Cancer	Yes	Zhi <i>et al.</i> (2013)
Carboplatin/Gemcitabine	AUC 5 e 1000 mg/m ²	Lung Cancer	Yes	Lim <i>et al.</i> (2013)
Carboplatin/Pemetrexed	AUC 5 e 500 mg/m ²	Lung Cancer	Yes	Pereira <i>et al.</i> (2011)
Carboplatin/Paclitaxel + Bevacizumab	AUC 6, 200 mg/m ² e 15mg/kg	Lung Cancer	Yes	Twelves <i>et al.</i> (2014)
Carboplatin/Vinorelbine	AUC 2,5 e 25mg/m ²	Lung Cancer	Yes	Masters <i>et al.</i> (2003)

AUC, area under the concentration-time curve

Semrau *et al.*, 2011; Ukita *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2005; Zhi *et al.*, 2013; Lim, Li, Song, 2013; Pereira *et al.*, 2011; Twelves *et al.*, 2014; Masters *et al.*, 2003).

The aim of this narrative review was to discuss some of the known molecular mechanisms involved in the absorption, metabolism, detoxification, and resistance to platinum-based drugs, especially carboplatin.

MECHANISM OF ACTION

To be activated, carboplatin must cross the cell membrane. Inside the cell, the molecule undergoes hydrolysis of 1,1-cyclobutanedicarboxylate, becoming positively charged. This allows carboplatin to interact with nucleophilic molecules (Figure 2) within the cell, including DNA, RNA and protein, generating the formation of adducts of platinum (McWhinney, Goldberg, McLeod, 2009). This process occurs through covalent binding of carboplatin to the N7 site of purine bases, forming DNA-protein or DNA-DNA interactions (Eastman, 1987; Amptoulach, Tsavaris, 2011).

Due to the pharmacodynamics of carboplatin, it has fewer side effects than its precursor cisplatin, although less potency, which might be due to differences in rates of adduct formation with DNA. These toxicity differences

FIGURE 2 - Hydrolysis of carboplatin inside the cell. Ctr1 is the high affinity copper transporter (further described in Figure 4).

are probably due to the low reactivity rate of carboplatin with nucleophiles, since 1,1-cyclobutanedicarboxylate is a poorer leaving group than chloride (Figure 3) (Hah *et al.*, 2006).

The linkage between DNA and carboplatin can produce lesions in DNA. Crosslinking between strands of DNA (interstrand cross-linking; ISC) is the most cytotoxic effect, because it inhibits the process of DNA replication,

FIGURE 3 - Molecular structure of platinum-based drugs. The respective leaving groups are highlighted.

causing changes that generate errors in replication, with the accumulation of cells in G2/M phase and the induction of apoptosis (Shi *et al.*, 1994)1994. Alkylation of a single strand of DNA can be repaired easily, but cross-linked inter strands such as those produced by bifunctional alkylating agents require more complex mechanisms of repair (Rabik, Dolan, 2007).

Inside the cell, recognition of the damage caused by platinum occurs through the repair machinery. In the context of chromatin, the repair system may require exposure of the damaged double-stranded DNA outwards from the nucleosome, which is the fundamental building block of chromatin. It is the configuration of the DNA rotation on the surface of histone octamer which defines nucleotides that are directed into the solvent and which are occluded by histones (Kornberg, Lorch, 1999). Therefore, determining the connections between platinum in the DNA are located within the nucleosome is an important step in understanding the process of cell recognition. A key question is whether the adduct of platinum or the DNA sequence determines the configuration of the rotation of a DNA segment into the nucleosome and therefore how the platinum lesion is presented to the replication machinery, thereby affecting transcription and repair of the cell (Danford *et al.*, 2005).

The system of DNA mismatch repair (MMR) is an important mechanism of replication which avoids errors caused by mutations (Fink *et al.*, 1996). MMR is based on the recognition of DNA distortion caused by the presence of 6-thioguanine and adducts produced by carboplatin, generating an injury signal which might contribute to the initiation of apoptosis. This mechanism suggests that MMR proteins serve to detect DNA damage caused by these agents (Rabik, Dolan, 2007). Therefore, the loss of this repair mechanism can cause carboplatin resistance due to the inability to recognize the complex formed by DNA adducts with platinum drugs (Fink *et al.*, 1996). Some studies have provided evidence that the loss of MMR proteins is associated with drug resistance in ovarian tumors. Additionally, methylation in the MLH1 promoter (the regulatory part of one MMR gene) performs

an important role in the resistance to cisplatin in ovarian cancer cells grown *in vitro* (Zeller *et al.*, 2012; Xiao, Melton, Gourley, 2014). Nucleotide excision repair (NER) is highly conserved and plays a key role in mediating resistance to drugs based on platinum (Rabik, Dolan, 2007). Injuries that result in changes to the helical structure of DNA and interfere with the mechanism of replication and transcription are repaired by this route. One important protein in the repair pathway of nucleotide excision repair is cross-complementation group 1 (ERCC1), which is postulated to play an important role in the efficacy of the drug (McWhinney, Goldberg, McLeod, 2009).

The repair of caudate adducts by platinum agents mainly occurs through the NER pathway. Although all three types of intra-strand crosslinks (1,2-d (ApG), 1,2-d (GPG) and d-1.3 (GpNpG)) are recognized by the NER mechanism, the first two intra-chain crosslinks are repaired less efficiently than 1.3 intra-chain crosslinks, supporting the hypothesis that 1.2 intra-strand crosslinks in DNA cause cytotoxic lesions (Rabik, Dolan, 2007). Two important molecules involved in the synthesis and damage repair of DNA, ERCC1 and RRM1, have been associated with the efficacy of treatment with platinum-based drugs. According to the work of Selvakumaran *et al.* (2003), ovarian cancer cell lines known to be resistant to platinum compounds show increased sensitivity after the silencing of ERCC1 protein expression using RNA interference, thereby demonstrating the association between NER and the clinical outcome of chemotherapy. Furthermore, studies evaluating the mRNA levels of ERCC1 in tumors from patients in clinical trials of non-small cell lung (Lord *et al.*, 2002), colorectal (Shirota *et al.*, 2001), and ovarian cancers (Kang *et al.*, 2006) also showed an inverse association with survival or response to platinum compounds (Reynolds *et al.*, 2009; Bowden, 2014; Moxley *et al.*, 2013; Vilmar, Sørensen, 2009). Lower *ERCC1* expression, evaluated based on mRNA expression or protein levels, is related to better outcomes in several cancers after platinum-based treatment (De Castro *et al.*, 2011). Da Costa Miranda *et al.* (2014) evaluated the prognostic and predictive role of the immunohistochemical expression of ERCC1 on the tumor response in patients with advanced biliary tract cancer. According to these authors, this expression was not either predictive or prognostic. However, the authors cite some drawbacks of the study, as the sample group was small and the study was conducted in a single center in Brazil. The manner whereby platinum drugs enter cells has traditionally been attributed to simple passive diffusion. However, some studies suggest that a number of mechanisms of uptake and efflux are active in the process,

and altered regulation of these transporters is responsible for the reduced accumulation of drugs in resistant cells (Hall *et al.*, 2008). Anticancer drugs based on platinum, such as cisplatin, oxaliplatin and carboplatin, are captured by cells, followed by binding to DNA and cytotoxicity (Wang, Lippard, 2005). Platinum uptake varies widely among different cell types and different types of tissues, and is a factor in the sensitivity and resistance of tumors (Liu *et al.*, 2013).

Transporters of metals such as copper transporters, i.e. CTR1, ATP7A and ATP7B, have been of particular interest in the study of drugs based on platinum. A significant influence of the carrier CTR1 has been observed in mediating the influx of carboplatin, while ATP7B and ATP7A are known to be mediators of copper removal from the cell. ATP7A is expressed in the epithelium of the intestine and other tissues, except the liver, whereas ATP7B is expressed in liver, kidney, and to a lesser extent in the brain (Sprowl, Ness, Sparreboom, 2013). The ATP7B transporter, an ATP-binding cassette, sub-family C2 (ABCC2, also known as MRP2 or cMOAT) has been reported to be important in the efflux of carboplatin (Cui *et al.*, 1999; Katano *et al.*, 2003; Samimi *et al.*, 2004b). The uptake and efflux of carboplatin are apparently linked to the metabolism of copper; this pathway leads to the hypothesis that copper and carboplatin can interfere with their mutual transport, thereby reducing the absorption of each other (Ohashi *et al.*, 2003). One of the main efflux pathways associated with copper, and apparently also associated with carboplatin efflux, is the detoxification mechanism mediated by glutathione and metallothionein (Figure 4).

According to McWhinney, Goldberg and McLeod (2009), the exclusion of the *CTR1* gene in yeast results in a significant accumulation of three clinically available platinum analogs, including carboplatin. Forced overexpression of *CTR1* in human ovarian cancer cells increases the absorption of platinum-based drugs, indicating that *CTR1* plays a key role in the cellular accumulation of these drugs.

Studies in patients with Menkes disease, or in patients that express neither ATP7A nor ATP7B, demonstrated greater accumulation of copper than cells transfected with vectors containing ATP7A or ATP7B (Samimi *et al.*, 2004a), indicating that these carriers have higher levels of expression in platinum-resistant cells (Katano *et al.*, 2003). Furthermore, high levels of ATP7A and ATP7B are associated with a poor response in patients with ovarian cancer receiving cisplatin or carboplatin-based chemotherapies (Martinez-Balibrea *et al.*, 2009). Li *et al.* (2012) demonstrated that overexpression ATP7A

FIGURE 4 - Mechanism of detoxification of carboplatin within the cell.

in non-small cell lung cancer cells conferred resistance to platinum-based chemotherapy.

CONCLUSION

Resistance to carboplatin is a major problem in cancer therapy and has attracted the attention of researchers. Hopefully, further investigations will be carried out so that we can identify the causal mechanisms of resistance to carboplatin, allowing more effective use of this highly effective product. The DNA repair pathway increases cell resistance to carboplatin, and activation of the NER or MMR pathway in addition to the detoxification mechanisms of carboplatin (cytoplasmic mechanisms) are known to be involved in resistance. New observations have pointed to metal transporters as a mechanism of resistance to carboplatin, including the copper transporters CTR1, ATP7A and ATP7B. Determining the causative mechanism of resistance to platinum agents in tumors and reducing the toxic side effects of these drugs in patients will be beneficial to a large number of cancer patients who receive these drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank FAPESP (grants 2009/01303-1 and 2011/04173-1) and CAPES for financial support.

* The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- AMPTOULACH, S.; TSAVARIS, N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemother. Res. Pract.*, v.2011, p.1-5, 2011.
- ANGIOLI, R.; PLOTTI, F.; LUVERO, D.; ALOISI, A.; GUZZO, F.; CAPRIGLIONE, S.; TERRANOVA, C.; NARDONE, C.C.; PANICI, P.B. Feasibility and safety of carboplatin plus paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced cervical cancer: a pilot study. *Tumour Biol.*, v.35, p.2741-2746, 2013.
- BOWDEN, N.A. Nucleotide excision repair: Why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Lett.*, v.346, p.163-171, 2014.
- BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist. Updat.*, v.8, p.131-46, 2005.
- BURGER, H.; LOOS, W.J.; EECHOUTE, K.; VERWEIJ, J.; MATHIJSEN, R.H.; WIEMER, E.A. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist. Updat.*, v.14, p.22-34, 2011.
- CAROZZI, V.; CHIORAZZI, A.; CANTA, A.; OGGIONI, N.; GILARDINI, A.; RODRIGUEZ-MENENDEZ, V.; AVEZZA, F.; CRIPPA, L.; CERESA, C.; NICOLINI, G.; BOSSI, M.; CAVALETTI, G. Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat model of peripheral neurotoxicity. *Eur. J. Cancer*, v.45, p.656-665, 2009.
- CHANG, W.J.; SUN, J.M.; LEE, J.Y.; AHN, J.S.; AHN, M.J.; PARK, K. A retrospective comparison of adjuvant chemotherapeutic regimens for non-small cell lung cancer (NSCLC): Paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin. *Lung Cancer*, v.84, p.51-55, 2014.
- CHOUDHARY, S.; SOOD, S.; WANG, H.C. Synergistic induction of cancer cell death and reduction of clonogenic resistance by cisplatin and FK228. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.436, p.325-330, 2013.
- CUI, Y.; KONIG, J.; BUCHHOLZ, J.K.; SPRING, H.; LEIER, I.; KEPPLER, D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.*, v.55, p.929-937, 1999.
- DA COSTA MIRANDA, V.; BRAGHIROLI, M.I.; FARIA, L.D.; SIQUEIRA, S.A.; SABBAGA, J.; HOFF, P.M.; RIECHELMANN, R.P. ERCC1 in advanced biliary tract cancer patients treated with chemotherapy: prognostic and predictive roles. *J. Gastrointest. Cancer*, v.45, p.80-86, 2014.
- DANFORD, A.J.; WANG, D.; WANG, Q.; TULLIUS, T.D.; LIPPARD, S.J. Platinum anticancer drug damage enforces a particular rotational setting of DNA in nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, p.12311-12316, 2005.
- DE CASTRO, G.JR.; PASINI, F.S.; SIQUEIRA, S.A.; FERRAZ, A.R.; VILLAR, R.C.; SNITCOVSKY, I.M.; FEDERICO, M.H. ERCC1 protein, mRNA expression and T19007C polymorphism as prognostic markers in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with surgery and adjuvant cisplatin-based chemoradiation. *Oncol. Rep.*, v.25, p.693-699, 2011.
- EASTMAN, A. Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem. Biol. Inter.*, v.61, p.241-248, 1987.
- FINK, D.; NEBEL, S.; AEBI, S.; ZHENG, H.; CENNI, B.; NEHME, A.; CHRISTEN, R.D.; HOWELL, S.B. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res.*, v.56, p.4881-4886, 1996.
- FUERTE, M.A.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem. Rev.*, v.103, p.645-662, 2003.
- HAH, S.S.; STIVERS, K.M.; DE VERE WHITE, R.W.; HENDERSON, P.T. Kinetics of carboplatin-DNA binding in genomic DNA and bladder cancer cells as determined by accelerator mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, v.19, p.622-626, 2006.
- HALL, M.D.; OKABE, M.; SHEN, D.W.; LIANG, X.J.; GOTTESMAN, M.M. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.48, p.495-535, 2008.
- HONING, J.; SMIT, J.K.; MUIJS, C.T.; BURGERHOF, J.G.M.; DE GROOT, J.W.; PAARDEKOOPER, G.; MULLER, K.; WOUTERSEN, D.; LEGDEUR, M.J.C.; FIETS, W.E.; SLOT, A.; BEUKEMA, J.C.; PLUKKER, J.T.; HOSPERS, G.A. A comparison of carboplatin and paclitaxel with cisplatin and 5-fluorouracil in definitive chemoradiation in esophageal cancer patients. *Ann. Oncol.*, v.25, p.638-643, 2014.

- JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem. Rev.*, v.99, p.2467-2498, 1999.
- KANG, S.; JU, W.; KIM, J.W.; PARK, N.H.; SONG, Y.S.; KIM, S.C.; PARK, S.Y.; KANG, S.B.; LEE, H.P. Association between excision repair cross-complementation group 1 polymorphism and clinical outcome of platinum-based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Exp. Mol. Med.*, v.38, p.320-324, 2006.
- KATANO, K.; SAFAEI, R.; SAMIMI, G.; HOLZER, A.; ROCHDI, M.; HOWELL, S.B. The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.*, v.64, p.466-473, 2003.
- KORNBERG, R.D.; LORCH, Y. Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v.9, p.148-151, 1999.
- LI, Z.H.; QIU, M.Z.; ZENG, Z.L.; LUO, H.Y.; WU, W.J.; WANG, F.; WANG, Z.Q.; ZHANG, D.S.; LI, Y.H.; XU, R.H. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7A) is associated with platinum resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Transl. Med.*, v.10, p.10-21, 2012.
- LIM, K.H.; LEE, H.Y.; SONG, S.Y. Efficacy and feasibility of gemcitabine and carboplatin as first-line chemotherapy in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. *Chin. Med. J.*, v.126, p.4446-4448, 2013.
- LIU, J.J.; KIM, Y.; YAN, F.; DING, Q.; IP, V.; JONG, N.N.; MERCER, J.F.; MCKEAGE, M.J. Contributions of rat Ctr1 to the uptake and toxicity of copper and platinum anticancer drugs in dorsal root ganglion neurons. *Biochem. Pharmacol.*, v.85, p.207-215, 2013.
- LORD, R.V.; BRABENDER, J.; GANDARA, D.; ALBEROLA, V.; CAMPS, C.; DOMINE, M.; CARDENAL, F.; SANCHEZ, J.M.; GUMERLOCK, P.H.; TARON, M.; SANCHEZ, J.J.; DANENBERG, K.D.; DANENBERG, P.V.; ROSELL, R. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, v.8, p.2286-2291, 2002.
- MARTINEZ-BALIBREA, E.; MARTÍNEZ-CARDÚS, A.; MUSULÉN, E.; GINÉS, A.; MANZANO, J.L.; ARANDA, E.; PLASENCIA, C.; NEAMATI, N.; ABAD, A. Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int. J. Cancer*, v.124, p.2905-2910, 2009.
- MASTERS, G.A.; HAHN, E.A.; SHEVRIN, D.H.; KIES, M.S. Phase I/II trial of vinorelbine and divided-dose carboplatin in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, v.39, p.221-226, 2003.
- MCWHINNEY, S.R.; GOLDBERG, R.M.; MCLEOD, H.L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol. Cancer Ther.*, v.8, p.10-16, 2009.
- MOXLEY, K.M.; BENBROOK, D.M.; QUEIMADO, L.; ZUNA, R.E.; THOMPSON, D.; MCCUMBER, M.; PREMKUMAR, P.; THAVATHIRU, E.; HINES, L.; MOORE, K.N. The role of single nucleotide polymorphisms of the ERCC1 and MMS19 genes in predicting platinum-sensitivity, progression-free and overall survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, v.130, p.377-382, 2013.
- OHASHI, K.; KAJIYA, K.; INABA, S.; HASEGAWA, T.; SEKO, Y.; FURUCHI, T.; NAGANUMA, A. Copper(II) protects yeast against the toxicity of cisplatin independently of the induction of metallothionein and the inhibition of platinum uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.310, p.148-152, 2003.
- PEREIRA, J.R.; KIM, J.H.; MAGALLANES, M.; LEE, D.H.; WANG, J.; GANJU, V.; BARRERA, L.M.; BARRACLOUGH, H.; KOOTEN, M.V.; ORLANDO, M. A Randomized phase 3 trial comparing pemetrexed/carboplatin and docetaxel/carboplatin as first-line treatment for advanced, nonsquamous non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, v.6, p.1907-1914, 2011.
- PEREZ, E.A.; SUMAN, V.J.; FITCH, T.R.; MAILLIARD, J.A.; INGLE, J.N.; COLE, J.T.; VEEDER, M.H.; FLYNN, P.J.; WALSH, D.J.; ADDO, F.K. A phase II trial of docetaxel and carboplatin as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: NCCTG Study N9932. *Oncology*, v.69, p.117-121, 2005.
- RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.*, v.33, p.9-23, 2007.

- REYNOLDS, C.; OBASAJU, C.; SCHELL, M.J.; LI, X.; ZHENG, Z.; BOULWARE, D.; CATON, J.R.; DEMARCO, L.C.; O'ROURKE, M.A.; WRIGHT, G.S.; BOEHM, K.A.; ASMAR, L.; BROMUND, J.; PENG, G.; MONBERG, M.J.; BEPLER, G. Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, v.27, p.5808-5815, 2009.
- ROSENBERG, B.; VANCAMP, L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. *Cancer Res.*, v.30, p.1799-1802, 1970.
- ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, v.205, p.698-699, 1965.
- ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J.E.; MANSOUR, V.H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, v.222, p.385-386, 1969.
- SAMIMI, G.; KATANO, K.; HOLZER, A.K.; SAFAEI, R.; HOWELL, S.B. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol. Pharmacol.*, v.66, p.25-32, 2004a.
- SAMIMI, G.; SAFAEI, R.; KATANO, K.; HOLZER, A.K.; ROCHDI, M.; TOMIOKA, M.; GOODMAN, M.; HOWELL, S.B. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, v.10, p.4661-4669, 2004b.
- SELVAKUMARAN, M.; PISARCIK, D.A.; BAO, R.; YEUNG, A.T.; HAMILTON, T.C. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*, v.63, p.1311-1316, 2003.
- SEMRAU, R.; TEMMING, S.; PREUSS, S.F.; KLUBMANN, J.P.; GUNTINAS-LICHIUS, O.; MÜLLER, R.P. Definitive radiochemotherapy of advanced head and neck cancer with carboplatin and paclitaxel. *Strahlenther. Onkol.*, v.187, p.645-650, 2011.
- SHAHZAD, M.M.K.; BERESTEIN, G.L.; SOOD, A.K. Novel strategies for reversing platinum resistance. *Drug Resist. Updat.*, v.12, p.148-152, 2009.
- SHI, L.; NISHIOKA, W.K.; TH'NG, J.; BRADBURY, E.M.; LITCHFIELD, D.W.; GREENBERG, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science*, v.263, p.1143-1145, 1994.
- SHIROTA, Y.; STOEHLMACHER, J.; BRABENDER, J.; XIONG, Y.P.; UETAKE, H.; DANENBERG, K.D.; GROSHEN, S.; TSAO-WEI, D.D.; DANENBERG, P.V.; LENZ, H.J. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, v.19, p.4298-4304, 2001.
- SPROWL, J.A.; NESS, R.A.; SPARREBOOM, A. Polymorphic transporters and platinum pharmacodynamics. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, v.28, p.19-27, 2013.
- STEWART, D.J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v.63, p.12-31, 2007.
- STRAUSS, G.M.; HERNDON, J.E. 2nd; MADDAUS, M.A.; JOHNSTONE, D.W.; JOHNSON, E.A.; HARPOLE, D.H.; GILLENWATER, H.H.; WATSON, D.M.; SUGARBAKER, D.J.; SCHILSKY, R.L.; VOKES, E.E.; GREEN, M.R. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J. Clin. Oncol.*, v.26, p.5043-5051, 2008.
- TWELVES, C.; CHMIELOWSKA, E.; HAVEL, L.; POPAT, S.; SWIEBODA-SADLEJ, A.; SAWRYCKI, P.; BYCOTT, P.; INGROSSO, A.; KIM, S.; WILLIAMS, J.A.; CHEN, C.; OLSZANSKI, A.J.; DE BESI, P.; SCHILLER, J.H. Randomised phase II study of axitinib or bevacizumab combined with paclitaxel/carboplatin as first-line therapy for patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.*, v.25, p.132-138, 2014.
- UKITA, Y.; TSUBAMOTO, H.; KATO, T.; SUNO, S.; SHIBAHARA, H. A case of primary metastatic glassy cell carcinoma of the uterine cervix that responded to combined docetaxel and carboplatin. *Gynecol. Oncol. Rep.*, v.6, p.19-21, 2013.
- VILMAR, A.; SØRENSEN, J.B. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin: a review of current literature. *Lung Cancer*, v.64, p.131-139, 2009.

- WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v.4, p.307-320, 2005.
- WERNYJ, R.P.; MORIN, P.J. Molecular mechanisms of platinum resistance: still searching for the Achilles' heel. *Drug Resist. Updat.*, v.7, p.227-232, 2004.
- WHEATE, N.J.; WALKER, S.; CRAIG, G.E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.*, v.39, p.8113-8127, 2010.
- XIAO, X.; MELTON, D.W.; GOURLEY, C. Mismatch repair deficiency in ovarian cancer — Molecular characteristics and clinical implications. *Gynecol. Oncol.*, v.132, p.506-512, 2014.
- ZELLER, C.; DAI, W.; STEELE, N.L.; SIDDIQ, A.; WALLEY, A.J.; WILHELM-BENARTZI, C.S.M.; RIZZO, S.; VANDER ZEE, A.; PLUMB, J.A.; BROWN, R. Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. *Oncogene*, v.31, p.4567-4576, 2012.
- ZHI, X.; GAO, W.; HAN, B.; YANG, Y.; LI, H.; LIU, D.; WANG, C.; MIN, G.; LONG, H.; RIGAS, J.R.; CAREY, M.; JAHAN, T.; SAMMANN, A.; REZA, J.; WANG, D.; MANN, M.J.; JABLONS, D.M.; HE, J. VATS lobectomy facilitates the delivery of adjuvant docetaxel-carboplatin chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.*, v.5, p.578-584, 2013.

Received for publication on 20th December 2013

Accepted for publication on 13th March 2014

ANEXO E – ARTIGO PUBLICADO 2

Journal of Chromatography A, 1443 (2016) 21–25

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Interrelationship between partition behavior of organic compounds and proteins in aqueous dextran-polyethylene glycol and polyethylene glycol-sodium sulfate two-phase systems

Luisa A. Ferreira^a, Nuno R. da Silva^b, Samarina R. Włodarczyk^c, Joana A. Loureiro^d, Pedro P. Madeira^{e,f}, José A. Teixeira^b, Vladimir N. Uversky^g, Boris Y. Zaslavsky^{a,*}

^a Analiza, Inc., 3615 Superior Ave., Cleveland, OH 44114, USA

^b IBB—Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

^c Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica, São Paulo, Brazil

^d LEPABE, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering of the University of Porto, 4200-465 Porto, Portugal

^e Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compositos, Department of Chemistry, Aveiro, Portugal, Portugal

^f Laboratory of Separation and Reaction Engineering—Laboratory of Catalysis and Materials (LSRE-LCM), Porto, Portugal

^g Department of Molecular Medicine, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL 33612, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2016

Received in revised form 14 March 2016

Accepted 14 March 2016

Available online 17 March 2016

Keywords:

Aqueous two-phase partitioning

Aqueous two phase systems

Dex-PEG system

PEG-sodium sulfate system

Mononucleotides

Phosphate group

ABSTRACT

Partition behavior of adenosine and guanine mononucleotides was examined in aqueous dextran-polyethylene glycol (PEG) and PEG-sodium sulfate two-phase systems. The partition coefficients for each series of mononucleotides were analyzed as a functions of the number of phosphate groups and found to be dependent on the nature of nucleic base and on the type of ATPS utilized. It was concluded that an average contribution of a phosphate group into logarithm of partition coefficient of a mononucleotide cannot be used to estimate the difference between the electrostatic properties of the coexisting phases of ATPS.

The data obtained in this study were considered together with those for other organic compounds and proteins reported previously, and the linear interrelationship between logarithms of partition coefficients in dextran-PEG, PEG- Na_2SO_4 and PEG- Na_2SO_4 -0.215 M NaCl (all in 0.01 M Na- or K/Na-phosphate buffer, pH 7.4 or 6.8) was established. Similar relationship was found for the previously reported data for proteins in Dex-PEG, PEG-600- Na_2SO_4 , and PEG-8000- Na_2SO_4 ATPS. It is suggested that the linear relationships of the kind established in ATPS may be observed for biological properties of compounds as well.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There are two main types of aqueous two-phase systems (ATPS) [1–5]. The first type includes those formed in aqueous mixtures of two different polymers, such as dextran and Ficoll or polyethylene glycol (PEG). These ATPS are used for separation of cells and other biological particles [1–4]. The second type of ATPS includes systems formed in aqueous mixtures of a single polymer, such as PEG or polypropylene glycol, and a salt, such as sodium sulfate, phosphate, citrate, and these ATPS are generally used for protein separation [6]. Both these types of ATPS may be used for analytical applications [7]. The third type of ATPS being recently developed

and characterized [8] is the ATPS formed in water by mixing ionic liquids and inorganic salts or polymers. This family of ATPS is used successfully for separation purposes but presents a particular challenge in regard to the mechanism of solute partitioning. It has been established [7] that solute partition behavior in polymer-polymer ATPS and to a lesser degree in polymer-salt ATPS is governed by the solute-water interactions without direct interactions of the solute with the phase-forming components of ATPS. The question of direct solute-ionic liquid interactions in the ionic liquid-salt ATPS, however, remains open.

It has been reported by us recently that various properties of polar organic compounds and proteins in aqueous solutions (solubility [9], lipophilicity (expressed as logD values in octanol-water system) [10], partition coefficients in aqueous two-phase systems (ATPS) [11]) in the presence of different salt additives, and optical rotation of enantiomeric amino acids and glucose in aqueous

* Corresponding author.

E-mail address: bz@analiza.com (B.Y. Zaslavsky).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.032>

0021-9673/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

solutions in the presence of different salts [12,13] are interrelated as:

$$\log SP_{\text{salt}-1} = k_1 + k_2 \times \log SP_{\text{salt}-2} + k_3 \times \log SP_{\text{salt}-3} \quad (1)$$

where SP_{salt} is the property of a solute in the presence of a given salt additive, k_1 , k_2 , and k_3 are constants depending on the solute property under consideration and the salt compositions employed.

From a practical point of view, the most important aspect of the relationship described by Eq. (1) is that once the relationship is established it may be used to predict protein partition coefficient in a system with a certain ionic composition without need to perform experiments saving the necessary protein quantity to be used, time and labor. It may be important when the optimal separation conditions for a target protein are designed. From the theoretical viewpoint the relationship described by Eq. (1) if applicable to both polymer–polymer and polymer–salt ATPS may be used to gain better understanding in what respect these two different subfamilies of ATPS are similar or different and derive better insight into mechanisms of phase separation and fundamental properties of ATPS.

Analysis of the partition coefficients of small organic compounds and proteins in dextran-PEG and PEG–sodium sulfate ATPS was one of the aims of this study. In addition, the second aim of the study was to explore if the homologous series of mononucleotides may be used for characterization of ATPS. Partitioning of adenine and adenosine mono-, di-, and tri-phosphates and guanosine mono-, di-, and tri-phosphates in dextran-PEG and PEG– Na_2SO_4 with and without 0.215 M NaCl additive ATPS were examined to explore if contribution of a phosphate group into logarithm of partition coefficient of mononucleotide may be used for characterization of electrostatic properties of coexisting phases in ATPS.

2. Experimental

2.1. Material and methods

2.1.1. Materials

Polyethylene glycol 8000 (Lot 091M01372 V), $M_w = 8000$, adenine, adenosine, adenosine 5'-monophosphate disodium salt (AMP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), adenosine triphosphate sodium salt (ATP), guanosine, guanosine 5'-monophosphate disodium salt (GMP), guanosine 5'-diphosphate sodium salt (GDP), guanosine 5'-triphosphate sodium salt (GTP) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dextran-75 (Lot 119945) with an average molecular weight (M_w) 75,000 by light scattering were purchased from USB Corporation (Cleveland, OH, USA).

2.2.1. Two-phase systems

Dextran-PEG systems of polymer composition of 6.0 wt.% PEG-8000 and 12.0 wt.% Dex-75 and ionic composition of 0.01 M K/NaPB, pH 7.4 and PEG-8000– Na_2SO_4 systems with composition of 11.10 wt.% PEG-8000, 6.33 wt.% Na_2SO_4 (~0.45 M) and 0.01 M NaPB, pH 6.8, with or without 0.215 M NaCl additive were prepared as described previously [11,14,15] by dispensing appropriate amounts of the aqueous stock polymer and salt solutions into a 1.2 mL microtube using a Hamilton Company (Reno, NV, USA) ML-4000 four-probe liquid-handling workstation. with total weight of 0.5 g (total volume 470 μL).

2.2.2. Partitioning

All partition experiments were performed with the Automated Signature Workstation, ASW (Analiza, Inc., Cleveland, OH, USA) as described elsewhere [11,14,15]. The ASW system is based on the ML-4000 liquid-handling workstation (Hamilton Company, Reno,

Table 1

Differences between the solvent properties of the phases and partition coefficients for indicated organic compounds in Dex-PEG-0.01 M K/NaPB, pH 7.4, PEG- Na_2SO_4 -0.01 M NaPB, pH 6.8, and PEG- Na_2SO_4 -0.215 M NaCl-0.01 M NaPB, pH 6.8 ATPS (NaPB–sodium phosphate buffer; K/NaPB–sodium/potassium phosphate buffer).

Solvent properties ^c	Dex-PEG 0.01 M NaPB ^a	PEG- Na_2SO_4 0.01 M K/NaPB ^b	PEG- Na_2SO_4 0.215 M NaCl ^b
$\Delta G(\text{CH}_2)$ (cal/mole)	-45 ± 1.2	-122 ± 1.8	-135 ± 0.6
E	0.033 ± 0.001	0.090 ± 0.002	0.102 ± 0.008
C	0.058 ± 0.003	0.445 ± 0.005	0.49 ± 0.031
Compound			
Adenine	1.220 ± 0.006^a	3.4 ± 0.12^b	3.7 ± 0.16^b
Adenosine	1.128 ± 0.004^a	2.63 ± 0.02^c	3.12 ± 0.04^c
AMP	0.714 ± 0.001	1.02 ± 0.05^b	0.83 ± 0.04^b
ADP	0.769 ± 0.002	0.77 ± 0.02^b	0.54 ± 0.03^b
ATP	0.826 ± 0.002	0.61 ± 0.01^b	0.40 ± 0.02^b
Guanosine	1.068 ± 0.007	1.673 ± 0.008^c	1.8 ± 0.03^c
GMP	0.709 ± 0.005	0.783 ± 0.007	0.606 ± 0.003
GDP	0.753 ± 0.004	0.577 ± 0.002	0.444 ± 0.003
GTP	0.789 ± 0.005	0.514 ± 0.003	0.410 ± 0.004

^a Reported in Ref. [16].

^b Reported in Ref. [17].

^c Reported in Ref. [18].

NV, USA) integrated with a UV–vis microplate spectrophotometer (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Solutions of all compounds were prepared in water at concentrations of 0.5–5 mg/mL depending on the compound solubility. Briefly, varied amounts of compound solution and water were added to a set of the same polymers/buffer or PEG and Na_2SO_4 mixtures. The systems were vortexed and centrifuged for 30–60 min at 23 °C to accelerate phase settling. The top phase in each system was removed, the interface discarded, and aliquots from the top and bottom phases were withdrawn in duplicate for analysis.

For the analysis of the compounds partitioning, aliquots from both phases were diluted with water, vortexed and centrifuged, aliquots were transferred into microplate wells, and the UV–vis plate reader was used to measure optical absorbance at of maximum absorption wavelengths.

The partition coefficient K -value defined as the ratio of the solute concentration in the top PEG-rich phase to the solute concentration in the bottom dextran-rich or salt-rich phase for each solute was determined as the slope of the concentration (absorbance) in the top phase plotted as a function of the concentration in the bottom phase averaged over the results obtained from two to four partition experiments [11,14,15]. Deviation from the average K -value was consistently below 3% and in most cases lower than 1%.

3. Results and discussion

The partition coefficients of AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, and GTP in three ATPSs with previously characterized differences between the hydrophobic and electrostatic properties of the phases [14–16] are listed in Table 1. Some of the partition coefficients for adenine, adenosine, guanosine, AMP, ADP, and ATP in the same ATPSs were reported previously [17,18].

Commonly, the differences between the electrostatic and hydrophobic properties of the coexisting phases of ATPS are estimated by analysis of partitioning of a homologous series of dinitrophenylated (DNP-) amino acids Na salts with aliphatic alkyl side-chains of the increasing length [5,10,11,14–18]. The typical data in a given ATPS may be described as [3,8–13]:

$$\log K_{\text{DNP-AA}}^i = C^i + E^i \times N_c \quad (2)$$

where $K_{\text{DNP-AA}}^i$ is the partition coefficient of a DNP-amino acids Na-salt in i^{th} ATPS; N_c is the equivalent number of CH_2 groups in the side-chain [13]. Parameter E represents an average contribution of

a CH₂ group into $\log K$ and characterizes the difference between the hydrophobic properties of the phases [5,10,11,14–18]. Parameter C represents the contribution of the polar DNP-NH-CH-COONa moiety. The advantages and drawbacks of using this moiety as a probe for electrostatic properties of the phases were considered in detail in [5]. The obvious drawbacks of using the DNP-NH-CH-COONa moiety as a probe for electrostatic interactions are the volume of the moiety and the presence of substituted aromatic group. It would be preferable to replace this moiety with a moiety capable to participate solely in electrostatic interactions.

We used here the similar approach to analysis of partitioning of mononucleotides with the difference that the number of charged phosphate groups is varied. The data obtained in dextran-PEG ATPS are illustrated in Fig. 1a where logarithms of partition coefficients for the two series of mononucleotides are plotted against the number of phosphate groups. An increase in the number of phosphate groups results in the increase of the nucleotide partition coefficient for both series in dextran-PEG ATPS. The data plotted in Fig. 1a may be described as:

$$\log K_A = A_A + B_A \times N_P \text{ and } \log K_G = A_G + B_G \times N_P \quad (3)$$

where K_A and K_G are the partition coefficients of a given adenosine phosphate and guanine phosphate respectively; N_P is the number of phosphate groups; A_A , A_G , B_A , and B_G are coefficients with values dependent on the particular mononucleotides examined.

It can be seen in Fig. 1a, however, that the partition behavior of adenosine mononucleotides differs from that of guanine mononucleotides. The parameters B_A and B_G representing the average contribution of a phosphate group into $\log K$ of the corresponding nucleotides are 0.0316 ± 0.0004 and 0.023 ± 0.002 respectively. The observed dependence of the average contributions of a phosphate group on the nature of nucleobase makes it questionable whether contribution of a phosphate group may be used for evaluation of the difference between the electrostatic properties of the phases in ATPS.

The data obtained for the same two series of mononucleotides in PEG-Na₂SO₄ ATPS are illustrated graphically in Fig. 1b. The partition behavior of adenosine mononucleotides as a function of the number of phosphate groups may be described by Eq. (3), while the same dependence for guanine mononucleotides is clearly nonlinear and may be described as:

$$\log K_G = a_G + b_G \times e^{-N_P} \quad (4)$$

where a_G and b_G are constants; all the other parameters are as defined above.

Similar dependences in PEG-Na₂SO₄-0.215 M NaCl ATPS illustrated in Fig. 1c appear to be nonlinear for both adenosine and guanine mononucleotides series. An increase in the number of phosphate groups results in the decrease of the nucleotide partition coefficient for both series in PEG-Na₂SO₄ ATPS with and without NaCl additive.

If we assume that the partition behavior of adenosine mononucleotides as a function of the number of phosphate groups may be described by Eq. (3) under all conditions used here and plot the slope of the linear function (coefficient B_A) in all three ATPS versus the parameter C' (Eq. (2)), Fig. 2, used as the estimate of the difference between the electrostatic properties of the phases [5] we observe nonlinear relationship. This nonlinearity is not as important as the change of the sign of the difference between the electrostatic properties of the two phases between dextran-PEG and PEG-Na₂SO₄ ATPS observed with adenosine mononucleotides and not detected with DNP-amino acids Na-salts. The previously reported [14–20] studies of partition behavior of small organic compounds and proteins in PEG-Na₂SO₄ ATPS with and without NaCl additive showed that using the difference between the electrostatic properties of the coexisting phases characterized with

Fig. 1. (a) Logarithm of the partition coefficient value, $\log K$, for adenosine and guanine mononucleotides with different number of phosphate groups in aqueous dextran-PEG two-phase system as a function of number of phosphate groups; (b) logarithm of the partition coefficient value, $\log K$, for adenosine and guanine mononucleotides with different number of phosphate groups in aqueous PEG-Na₂SO₄ two-phase system as a function of number of phosphate groups; (c) logarithm of the partition coefficient value, $\log K$, for adenosine and guanine mononucleotides with different number of phosphate groups in aqueous PEG-Na₂SO₄-0.215 M NaCl two-phase system as a function of number of phosphate groups.

Fig. 2. An average contribution of phosphate group into logarithm of partition coefficient of adenosine mononucleotides versus parameter C in Eq. (2) characterizing the difference between electrostatic properties of two phases in ATPS indicated.

Fig. 3. Logarithms of partition coefficients for organic compounds and proteins in PEG-8000- Na_2SO_4 -0.5 M sorbitol-0.01 M sodium phosphate buffer (NaPB), pH 6.8 ATPS versus those for the same compounds and proteins in PEG-8000- Na_2SO_4 -0.01 M sodium phosphate buffer (NaPB), pH 6.8 ATPS and in PEG-8000- Na_2SO_4 -0.5 M sucrose-0.01 M sodium phosphate buffer (NaPB), pH 6.8 ATPS.

parameter C^i (Eq. (2)) allowed to estimate the solute-solvent interactions. Hence it seems possible to conclude that the contribution of a phosphate group into partition coefficient of mononucleotide does not provide the reliable estimate of the difference between the electrostatic properties of the phases in PEG-salt ATPS.

All the partition coefficients for small organic compounds and proteins in the three ATPS under consideration reported previously [3,10–12] together with those obtained in this study are presented in Table 2. Analysis of these data shows that there is a linear relationship illustrated in Fig. 3 corresponding to Eq. (1) and described as:

$$\log K_i^{\text{PEG-Na}_2\text{SO}_4} = 0.05 \pm 0.02 + 0.5 \pm 0.12 \log K_i^{\text{Dex-PEG}} + 0.71 \pm 0.05 \log K_i^{\text{PEG-Na}_2\text{SO}_4-0.215\text{M-NaCl}} \quad (5)$$

$N = 22$; $r^2 = 0.9775$; $SD = 0.079$; $F = 412.3$ where $K_i^{\text{PEG-Na}_2\text{SO}_4}$ —partition coefficient of the i -th compound in PEG- Na_2SO_4 -0.01 M NaPB ATPS; $K_i^{\text{Dex-PEG}}$ —partition coefficient

Fig. 4. Logarithms of partition coefficients for organic compounds and proteins in dextran-PEG-8000-0.8 M CsCl-0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 ATPS versus those for the same compounds and proteins in PEG-600- Na_2SO_4 -0.4 M NaSCN-0.17 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 ATPS and in PEG-8000- Na_2SO_4 -0.33 M NaCl-0.01 M universal buffer, pH 7.4 ATPS.

coefficient of the i -th compound in dextran-PEG-0.01 M K/NaPB ATPS; $K_i^{\text{PEG-Na}_2\text{SO}_4-0.215\text{M NaCl}}$ —partition coefficient of the i -th compound in PEG- Na_2SO_4 -0.215 M NaCl-0.01 M NaPB ATPS; N —number of compounds (including proteins); r^2 —correlation coefficient; SD —standard deviation; F —ratio of variance (K/NaPB—sodium/potassium phosphate buffer, pH 7.4; NaPB—sodium phosphate buffer, pH 6.8).

It should be noted that the above relationship holds for partition coefficients of proteins in PEG- Na_2SO_4 -0.01 M NaPB and PEG- Na_2SO_4 -0.215 M NaCl-0.01 M NaPB ATPS at pH 6.8 and in dextran-PEG-0.01 M K/NaPB at pH 7.4. This fact seems to imply that the pH differences as well as the differences in the buffer composition do not affect the nature and spatial arrangement of the solvent exposed groups in the proteins examined.

Previously the similar relationship was reported for partition coefficients of organic compounds and proteins in Dex-PEG ATPS with different ionic composition [11], and in PEG- Na_2SO_4 ATPS formed by PEG-8000 and PEG-600 with different salt additives [20]. Analysis of the data reported previously [16,20] shows also that the similar relationship for proteins may be found between polymer-polymer and polymer-salt ATPS. For example the relationship illustrated graphically in Fig. 4 may be described as:

$$\log K_i^{\text{Dex-PEG-0.8M CsCl-0.01M NaPB}} = 0.12 \pm 0.10 + 0.30 \pm 0.07 \log K_i^{\text{PEG-600-Na}_2\text{SO}_4-0.4\text{M NaSCN-0.17M K/NaPB}} + 0.46 \pm 0.08 \log K_i^{\text{PEG-8000-Na}_2\text{SO}_4-0.33\text{M NaCl-0.01M UB}} \quad (6)$$

$N = 10$; $r^2 = 0.9416$; $SD = 0.18$; $F = 56.4$

where $K_i^{\text{Dex-PEG-0.8M CsCl-0.01M NaPB}}$ —partition coefficient of the i -th compound in dextran-PEG-0.8 M CsCl-0.01 M NaPB ATPS; $\log K_i^{\text{PEG-600-Na}_2\text{SO}_4-0.4\text{M NaSCN-0.17M K/NaPB}}$ —partition coefficient of the i -th compound in PEG-600-0.4 M NaSCN-0.17 M K/NaPB ATPS; and $K_i^{\text{PEG-8000-Na}_2\text{SO}_4-0.33\text{M NaCl-0.01M UB}}$ —partition coefficient of the i -th compound in PEG-8000- Na_2SO_4 -0.33 M NaCl-0.01 M UB ATPS; all the other parameters are as defined above (NaPB—sodium phosphate buffer, pH 7.4; UB—universal buffer, pH 7.4).

Table 2

Partition coefficients for organic compounds and proteins in Dex-PEG-0.01 M K/NaPB, pH 7.4 [16]; PEG- Na₂SO₄-0.01 M NaPB, pH 6.8 [14,17,18]; and PEG- Na₂SO₄-0.215 M NaCl-0.01 M NaPB, pH 6.8 ATPS [15,17] (NaPB—sodium phosphate buffer; K/NaPB—sodium/potassium phosphate buffer).

Compound	Dex-PEG 0.01 M K/NaPB	PEG-Na ₂ SO ₄ 0.01 M NaPB	PEG-Na ₂ SO ₄ 0.215 M NaCl
Adenine	1.220 ± 0.006	3.4 ± 0.12	3.7 ± 0.16
Adenosine	1.128 ± 0.004	2.63 ± 0.02	3.12 ± 0.04
AMP	0.714 ± 0.001	1.02 ± 0.05	0.83 ± 0.04
ADP	0.769 ± 0.002	0.77 ± 0.02	0.54 ± 0.03
ATP	0.826 ± 0.002	0.61 ± 0.01	0.40 ± 0.02
Benzyl alcohol	1.409 ± 0.009	3.500 ± 0.007	4.067 ± 0.008
Caffeine	1.154 ± 0.009	1.85 ± 0.039	2.11 ± 0.036
Coumarin	1.490 ± 0.009	4.86 ± 0.014	4.86 ± 0.014
Glucopyranoside ^a	1.232 ± 0.003	2.18 ± 0.023	2.47 ± 0.033
Guanosine	1.068 ± 0.007	1.673 ± 0.008	1.8 ± 0.03
GMP	0.709 ± 0.005	0.783 ± 0.007	0.606 ± 0.003
GDP	0.753 ± 0.004	0.577 ± 0.002	0.444 ± 0.003
GTP	0.789 ± 0.005	0.514 ± 0.003	0.410 ± 0.004
Methyl anthranilate	1.77 ± 0.01	7.28 ± 0.035	9.59 ± 0.027
Phenol	1.70 ± 0.02	4.60 ± 0.084	6.5 ± 0.17
2-Phenylethanol	1.469 ± 0.005	4.16 ± 0.020	4.98 ± 0.012
Vanillin	1.709 ± 0.009	6.78 ± 0.027	8.28 ± 0.020
α-Chymotrypsin	0.42 ± 0.01	0.117 ± 0.001	0.110 ± 0.001
α-Chymotrypsinogen A	1.00 ± 0.01	0.429 ± 0.003	0.543 ± 0.003
Concanavalin A	0.236 ± 0.003	0.192 ± 0.001	0.183 ± 0.001
Lysozyme	0.23 ± 0.003	0.406 ± 0.003	0.983 ± 0.003
Papain	1.05 ± 0.01	2.22 ± 0.011	1.92 ± 0.007

^a *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside.

The above relationships seem to indicate that Eq. (1) is rather universal. These correlations suggest that the properties and mechanism of phase separation in both types of polymer–polymer and polymer–salt ATPS are of the same nature.

We do not know yet the boundaries of its applicability to physicochemical and biological properties. The work in this regard is currently in progress in our laboratories.

Acknowledgments

Nuno da Silva acknowledges the financial support by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) of the Portuguese's Ministry for Science, Technology and Higher Education, in the framework of the Operational Program COMPETE (PTDC/EQU-FTT/120332/2010).

Pedro P. Madeira acknowledges the financial support in part provided by (i) FCT/MEC and FEDER through COMPETE 2020 (Project UID/EQU/50020/2013-POCI-01-0145-FEDER-006984) and (ii) QREN, FCT, ON2 and FEDER, through COMPETE (Project NORTE-07-0124-FEDER-0000011).

- [8] M.G. Freire, A.F.M. Cláudio, J.M.M. Araújo, J.A.P. Coutinho, I.M. Marrucho, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4966–4995.
- [9] L.A. Ferreira, A. Chervenak, S. Placko, A. Kestranek, P.P. Madeira, B.Y. Zaslavsky, Responses of polar organic compounds to different ionic environment in aqueous media are interrelated, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 23341–23342.
- [10] L.A. Ferreira, A. Chervenak, S. Placko, A. Kestranek, P.P. Madeira, B.Y. Zaslavsky, Effect of ionic composition on partitioning of organic compounds in octanol-buffer systems, *RSC Adv.* 5 (2015) 20574–20582.
- [11] L.A. Ferreira, P.P. Madeira, A.V. Uversky, V.N. Uversky, B.Z. Zaslavsky, Responses of proteins to different ionic environment are linearly interrelated, *J. Chromatogr. A* 1387 (2015) 32–41.
- [12] P.L. Nostro, B.W. Ninham, S. Milani, L. Frattoni, P. Baglioni, Specific anion effects on the optical rotation of glucose and serine, *Biopolymers* 81 (2006) 136.
- [13] S. Rossi, L.P. Nostro, M. Lagi, B.W. Ninham, P. Baglioni, Specific anion effects on the optical rotation of alpha-amino acids, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 10510.
- [14] N. da Silva, L.A. Ferreira, P.P. Madeira, J.A. Teixeira, V.N. Uversky, B.Y. Zaslavsky, Analysis of partitioning of organic compounds and proteins in aqueous polyethylene glycol-sodium sulfate aqueous two-phase systems in terms of solute-solvent interactions, *J. Chromatogr. A* 1415 (2015) 1–10.
- [15] N. da Silva, L.A. Ferreira, P.P. Madeira, J.A. Teixeira, V.N. Uversky, B.Y. Zaslavsky, Effect of NaCl additive on solute-solvent interactions in aqueous polyethylene glycol-sodium sulfate two-phase systems, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 51–61.
- [16] L.A. Ferreira, P.P. Madeira, J.A. Teixeira, V.N. Uversky, B.Y. Zaslavsky, Effect of NaCl additive on solute-solvent interactions in aqueous polyethylene glycol-sodium sulfate two-phase systems, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 51–61.

ANEXO F – ARTIGO PUBLICADO 3

Research Ideas and Outcomes 2: e9342
doi: [10.3897/rio.2.e9342](https://doi.org/10.3897/rio.2.e9342)

Research Idea

Chimeric spider silk production in microalgae: a modular bionanomaterial

João Vitor Dutra Molino[‡], Tiago Lubiana Alves[§], Livia S Ferreira-Camargo[‡], Miguel A Croce[§], Allan Tanaka[‡], Felipe X Buson[§], Pedro de Freitas Ribeiro[§], Antony B Campos-Salazar[‡], Eduardo Padilha Antonio[¶], André Schraider Maizel[§], Viviane M Siratuti[‡], Claudia Costa[§], Samarina R Wlodarczyk[‡], Raquel de Souza Lima[§], Fabio N Mello[§], Stephen P Mayfield[#], João C M Carvalho[‡]

[‡] University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, São Paulo, Brazil

[§] University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[‡] University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Department of Clinical and Toxicological Analyses, São Paulo, Brazil

[¶] Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[#] University of California, San Diego. Food and Fuel for the 21st Department, San Diego, United States of America

Corresponding author: João Vitor Dutra Molino (molino@usp.br)

Reviewable v1

Received: 25 May 2016 | Published: 23 Jun 2016

Citation: Molino J, Lubiana Alves T, Ferreira-Camargo L, Croce M, Tanaka A, Buson F, Ribeiro P, Campos-Salazar A, Antonio E, Maizel A, Siratuti V, Costa C, Wlodarczyk S, de Souza Lima R, Mello F, Mayfield S, Carvalho J (2016) Chimeric spider silk production in microalgae: a modular bionanomaterial. Research Ideas and Outcomes 2: e9342. doi: [10.3897/rio.2.e9342](https://doi.org/10.3897/rio.2.e9342)

Abstract

Background

In this project, we propose to explore the modular characteristic of spider silk proteins, through synthetic biology techniques, by combining and directing its properties to the desired application. The aim of this project is to generate a modular bionanomaterial able to immobilize proteins. This bionanomaterial will be composed of modular recombinant proteins from spider silk, which will be the immobilization support to other proteins, in this project an antimicrobial protein (enzymatic). By combining these proteins and their properties, the primary focus will be the use of this technology for the development of artificial skin for burn victims.

New information

The recombinant proteins, spider silk proteins and enzybiotics, will be expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* strains by nuclear transformation. Each recombinant strain will express a different protein, which will contain the N- and C-terminal polymerization domains from native spider silk proteins. These domains are essential to the polymerization step and, subsequently, for production of a material very similar to silk. This material will be evaluated regarding its antimicrobial and mechanical properties, as well as the system productivity. These results may shed some light on spider silk-based immobilization support effectiveness, even for other biotechnological applications, such as the one idealized here.

Keywords

Bionanomaterial, Silk protein, Recombinant protein, Microalgae, Enzybiotic

Overview and background

Immobilization techniques are applied to a wide range of treatments and processes, from medical applications to biotransformations in industrial plants. The industrial/commercial application of biomolecules such as proteins depends on the stability and functionality of the process employed. This process often differs from the natural environment of proteins in terms such as temperature, presence of organic solvents and pH values. Consequently, techniques such as immobilization can promote stabilization and add functionality even when these biomolecules are under different environmental conditions. This stabilization is normally achieved by protein binding to a scaffold (Liese and Hilterhaus 2013). Recent studies explored spider silks as a possible immobilization support (Blüm et al. 2013, Monier 2013). This biomaterial has exceptional properties such as tensile strength and tension. Furthermore, medical applications are possible due to its biocompatibility and biodegradability, as coating for implants and transplanted organs, drug delivery and scaffolding for cell lines (Lewis 2006, Hardy et al. 2008, Kluge et al. 2008).

The aim of this project is to use this biomaterial for protein immobilization. Initially, we will immobilize enzybiotics for application to burn wounds, as a model to test this support. However, there are other possible applications with economic and academic interest. Fig. 1 presents an overview of the project.

Figure 1.

Project overview. Schematic representation of spider web structure from macro to nano scale. A representation of: enzybiotic protein from a bacteriophage; a spider silk protein with repetitive domains and N and C terminals; host expression system *Chlamydomonas reinhardtii* and a chimeric protein envisioned in this project; and the final product, a biopatch produced from recombinant silk proteins and chimeric proteins.

Immobilization Systems

The retention of molecules inside a reactor, or an analytical system, is described as immobilization, whose purpose is to improve protein stability, selectivity, and particularly for the enzymes, increase catalytic activity (Tomotani et al. 2005). Aside from enzymes, other protein types can be immobilized, for example peptide domains for protein purification or immobilization such as: albumin binding domain (ABD), avidin (AvBD) and immunoglobulin G (IgGBD) (Luisi et al. 2013).

Enzymes are widely used in our society, and their applications range from industrial processes - such as in food production, biofuels and tissue - to more complex therapeutic applications, such as biopharmaceuticals (e.g., asparaginase use for acute lymphoblastic leukemia treatment (Pieters et al. 2010).

A medical application that benefits from enzyme immobilization is biosensor development (Sassolas et al. 2012). These devices display additional advantages such as reliability, speed, ease of handling and low cost compared to traditional diagnostic methods (Khan and Alzohairy 2010). Immobilized therapeutic enzymes are also being exploited due to their stability and reusability which enhance the targeting of specific tissues and cells (Bosio et al. 2015).

Enzybiotics

Enzybiotics comprise a class of enzymes with antibiotic activity. These enzymes are able to fight resistant bacteria, such as MRSA, VRSA and VISA (Rashel et al. 2007), antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*, which is a serious and recurring problem in hospitals. Enzybiotics refers mainly to the antibacterial potential of bacteriophage lytic enzymes endowed with the capacity to degrade bacterial cell wall (Rashel et al. 2007). This set of enzymes exhibits potential application on burn wounds otherwise susceptible to opportunistic colonization by microorganisms (Merabishvili et al. 2009). Thus, an artificial skin graft with antimicrobial properties may present a therapeutic option. Furthermore, an immobilized enzyme may not easily penetrate the skin and would thereby exhibit low or no allergenicity (Sheldon and van Pelt 2013). Considering this application and the different materials used as support matrix, enzybiotic functionalized spider silk proteins become an attractive alternative.

Spider webs

The polymer constituting the spider silk bears interesting properties for various applications, including immobilization of molecules such as proteins. Spider silk is known mainly for its tensile strength and fracture resistance, but also exhibits elasticity, adhesion, biocompatibility and low degradation. Its strength can be compared to Kevlar synthetic polymer, which is composed of aramid and is used in for manufacturing body armor (Lewis 2006).

It is known that certain repetitive sequences of amino acids confer specific properties to these structures and proteins in tissue, allowing one to obtain materials with desired characteristics through genetic manipulation of these structural domains. The poly-alanine domains (poly(A/GA) (Glycine-Alanine) in MaSp1 proteins, MaSp2 and MISp are associated with formation of beta-sheets and the production of strong fibers, while repeating sequences "GPGGx" and "GGX" as in Flag protein, preferably generates an elastic beta-spiral region, which provides elasticity (Tokareva et al. 2014).

In addition, terminal domains (N-terminal NT and C-terminal CT) are highly conserved both among species and different types of silk (Garb et al. 2010), which suggests they play important roles in the formation of silk and not in the generation of its mechanical properties *per se*. The change in CO₂ and proton concentrations controlled by the glandular duct ensures that polymerization occurs in precise time and space, at high speeds, reaching more than 1 m / s (Andersson et al. 2014).

There is some evidence of dependence on N- and C-terminal domains for polymerization, which can lead to interesting technological possibilities. The adaptation of these domains flanking a protein of interest opens the possibility of its immobilization if spun alongside "native" spider silk proteins. Moreover, core structural domains' ("poly(A/GA" and "GPGGx" and "GGX") customization influence the physical properties of the silk (Tokareva et al. 2014). Fig. 2 represents a scheme of the spider silk proteins and the chimeric protein proposed in this project.

Figure 2.

Schematic representation of spider silk proteins and chimeric protein. **A:** MaSp1 - Major ampullate spidroin 1, MaSp2 - Major ampullate spidroin 2 **B:** Chimeric protein of an enzymatic with N and C terminals domains of spider silk proteins.

Expression System

Heterologous proteins are produced in several established expression systems, such as *Escherichia coli*, mammalian cell lines and yeast, but several systems are in the developing pipeline. Appropriate expression system choice should be based on priorities regarding performance and requirements of each recombinant protein (Walsh 2014). Currently, mammalian "CHO" cells (Chinese Hamster Ovary) and *E. coli* are the most used systems, which correspond to 35.5% and 19%, respectively, of the total products approved by the FDA in biopharmaceuticals (Walsh 2014). *E. coli* cells have rapid growth, productivity and low production cost, but it is a system unable to produce complex proteins and some post-translational modifications. Moreover, the production of endotoxins and inclusion bodies requires more purification process steps (Petsch 2000).

Therapeutic proteins are preferably produced in transgenic mammalian cell systems, because of their ability to express and correctly fold proteins. However, its production cost is high, especially when compared to plants as expression systems. Molecules such as monoclonal antibodies (mAbs) are mainly produced in mammalian cells and their average production cost in this system is estimated to be \$ 150.00 per gram of raw materials, whereas production in plant systems costs approximately US\$0.05 per gram (Dove 2002, Mayfield et al. 2003). But the estimated value for algae reaches US \$ 0.002 per liter, making them potential competitors for land plants (Mayfield et al. 2003). Microalgae present several desirable features in an expression system, such as: rapid growth (characteristic for microbial growth), swift and stable transgenic lineage generation, scalability and low-cost production (Wijffels et al. 2013, Rosenberg et al. 2008). They are also able to produce and secrete complex proteins and perform post-transcriptional

modifications. They are Generally Regarded As Safe (GRAS), with low risk of virus contamination, prions or bacterial endotoxins, and establish no gene flow with the flora around through pollens as in transgenic plants (Mayfield et al. 2007).

However, the studies on genetic engineering using microalgae are incipient and present challenges. The main challenge is the low productivity of recombinant proteins expressed in the nuclear genome, hindering commercial applications to date (Rasala and Mayfield 2011). Strategies to increase nuclear expression levels in *Chlamydomonas reinhardtii* are being developed. These strategies may result in productivity gains, enabling commercial-scale production. Such strategies include codon optimization (León-Bañares et al. 2004), development of alternative vectors (Heitzer and Zschoernig 2007, Lauersen et al. 2013) and modifications to the design expressed constructs. Changes in constructs include the addition of autocleavage peptide (Rasala et al. 2012), use of fused promoters (Eichler-Stahlberg et al. 2009, Schroda et al. 2000) and addition of intronic sequences (Eichler-Stahlberg et al. 2009, Lumbreras et al. 1998). Alongside these improvements, *Chlamydomonas reinhardtii* presents a GC-rich genome, which may play an important role in spider silk protein expression due to its high GC content. It is hypothesized that high GC content clogs the heterologous expression of this kind of protein in non-GC-rich systems (Yang et al. 2016).

Objectives

- Evaluate production capacity of synthetic spider silk proteins (based on MaSp1 and MaSp2) and protein chimeras with NT and CT domains flanking enzybiotics in *Chlamydomonas reinhardtii* by transforming the nuclear genome;
- Set methods for polymerization of silk produced by microalgae;
- Test biopolymer and antibiotic properties of spun spider silk, pure and in combination with enzybiotic chimeric proteins;
- Assess the project development in an iGEM competition context regarding its scientific achievement and the real-time openness in all process steps: idealization, laboratory procedures, results and discussion

Impact

Many obstacles need to be overcome for the effective production of a biomaterial such as a recombinant spider silk capable of immobilizing proteins in its matrix. With this purpose, this project offers solutions, as of yet untested, for example: the use of microalgae as a production platform for the expression of spider silk proteins, as well as chimeras with NT and CT domains, and flanking enzybiotics. Research on transgenic microalgae are driven by the global demand for recombinant proteins and other bioproducts. This biotechnological market is growing exponentially, it has reached 140 billion dollars in sales as of 2013, and it continues to grow (Walsh 2014) with the potential for commercial application.

More than developing a product that could help thousands of patients, the development of an antibiotic chimeric biopolymer in *C. reinhardtii* can result in many scientific outcomes. Spider silk is a challenging material to work with, and accessing its production with chimeric and functional materials can pave the way for many applications in the biomaterial field. Moreover, the microalgae community is still incipient, in comparison to the *E. coli* system, and integrative projects like this one can expand the synthetic biology tools applied to this model microorganism, which will benefit the scientific community.

It is important to highlight the fact that this project will be carried out at an international competition dedicated to the development of high-level research in Synthetic Biology (iGEM - International Genetically Engineered Machine) with an open and integrative approach. This competition takes place annually in Boston, USA, and it stimulates interdisciplinary groups to problem solving through genetically modified organisms. In line with this proposal, the team responsible for this project consists of undergraduate and graduate students from various institutes of the University of São Paulo. The blending of open approaches and such interdisciplinary groups contributes to the development of the research *per se*, ultimately impacting its quality and depth for the better. The project is also integrated with the SynBio Brasil community, actively engaged in promoting synthetic biology education, leading to a powerful impact on scientific awareness in Brazil.

Implementation

Plasmid Construction

The vector pBluescript II (Thermo Fisher Scientific Inc.) will be used. The constructed cassette will be flanked by the restriction sites *Kpn* I at one end, and *Xba* I at the other. There are also two different restriction sites, *Xho* I and *Bam* HI, flanking the coding sequence of the desired protein. The codons of the proteins will be optimized for the expression in *C. reinhardtii* nucleus (Fuhrmann et al. 1999) and the restriction sites *Kpn* I and *Xba* I will be removed. Rubisco introns will be inserted in the promoter *hsp70A/rbcs2* sequence, in the *Sh-ble* sequence and in the terminal region *RbcS2* 3' UTR, aiming to increase the expression of the protein of interest (Eichler-Stahlberg et al. 2009, Lumberras et al. 1998). Primers will be designed to confirm (by PCR) the insertion of the whole sequence in the plasmidial vector. Fig. 3 shows the generic cassette for expression.

The native proteins MaSp1 and MaSp2 (*Major Ampullate Silk Protein*) were selected since they are the most studied proteins among the cob constituents. The antimicrobial enzymes were selected from a screening of the phiBIOTICS databank (Hojckova et al. 2013) looking for molecules that are effective against resistant strains of *Staphylococcus aureus*. All these proteins are summarized in Table 1.

Figure 3.

Cassette construction to be inserted in *C. reinhardtii* nuclear genome for the expression of desired proteins. **Promoter hsp70A/rbcS2**: fusion of the promoters hsp70A and rbcS2 (Eichler-Stahlberg et al. 2009, Schroda et al. 2000). **Sh-Ble**: gene that gives resistance to Zeomycin. **2A**: self-cleavage peptide obtained from Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) (Rasala et al. 2012). **PS**: Secretion signal peptide of the gene Ars1. **GOI**: gene of interest coding the proteins to be used in the project. **His**: coding sequence of six histidines (histidine tag). **RbcS2 3'UTR**: terminal sequence (untranslated region) of the gene RbcS2 (Fuhrmann et al. 1999)

Table 1.

Desired proteins to be expressed in *C. reinhardtii*.

NTD: N-terminal domain of MaSp1. **CTD**: C-terminal domain of MaSp1. **MRSA**: Methicillin-resistant *S. aureus*. **VRSA**: Vancomycin-resistant *S. aureus*. **VISA**: Vancomycin-intermediate *S. aureus*. **ORSA**: Oxacillin-resistant *S. aureus*. **CDS**: Coding DNA sequence. **MaSp1**: Major Ampullate Silk Protein 1. **MaSp2**: Major Ampullate Silk Protein 2.

Protein	Source	Information	Ref.
MaSp1	<i>Latrodectus hesperus</i> (Black Widow)	CDS fully sequenced	Ayoub et al. 2007
MaSp2	<i>Latrodectus hesperus</i> (Black Widow)	CDS fully sequenced	Ayoub et al. 2007
NTD + MV-L + CTD	Bacteriophage phiMR11	Effective against MRSA, VRSA e VISA	Rashel et al. 2007
NTD + LysK + CTD	Bacteriophage K	Effective against MRSA e VRSA	O'Flaherty et al. 2005
NTD + Lysostaphin + CTD	<i>Staphylococcus simulans</i>	Effective against MRSA, ORSA e VISA	Yang et al. 2007

C. reinhardtii cultivation

The *C. reinhardtii* strain cc1690 will be obtained at the Chlamydomonas Resource Center. After going through the process of transformation, the ones identified to produce the protein of interest will be grown for protein production. The strains will be cultivated in TAP (Tris-Acetate-Phosphate) medium (Gorman and Levine 1965) in 250 mL Erlenmeyer flasks, containing 50 mL of the medium, at temperatures between 20-25°C, under constant agitation at 100-150 rpm and constant illumination of $50 \pm 10 \mu\text{E/m}^2 \text{ s}$. The growth will be

evaluated by cell counting with Neubauer chambers and by reading the absorbance at 750 nm wavelength every 12 h (Eichler-Stahlberg et al. 2009). Aliquots will be taken during the growth process for further analysis and for identification of the proteins through Western Blot.

***C. reinhardtii* transformation**

C. reinhardtii cells will be grown in TAP medium until reaching the cell density of $3\text{--}6 \times 10^6$ cells/mL. The cells will be collected by centrifugation and resuspended in TAP enriched with 40 mM of sucrose reaching a cell density of $3\text{--}6 \times 10^6$ cells/mL. Then, 250 μL of the culture will be incubated with 300–1000 ng of plasmidial DNA, previously linearized through the digestion with *Xba* I and *Kpn* I for 5–10 min in cuvettes kept in an ice bath. An exponential electrical pulse of 2000 V/cm will be applied to the sample with an electroporation device, GenePulser XCellTM (BioRad, Hercules, CA). Capacitance will be adjusted to 25 mF and the resistance will not be regulated. After that, the cells will be incubated for 18 h in 10 mL of TAP/40 mM sucrose and plated in TAP/Zeocin solid medium (Rasala et al. 2012).

Selection of mutants and identification of recombinant proteins

Recovered cells will be plated on TAP agar medium with increasing antibiotic concentrations (0.1, 2 and 5 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin). Candidate transformed colonies, displaying high Zeocin resistance, will be analyzed through PCR screening, and PCR positives colonies will be tested for protein of interest production by Western blot. Basically, the mutant cells are cultured as described above and fractions of the supernatant and cell lysate will be tested for the presence of the protein of interest. Cell lysis will be accomplished by sonication as described in the literature (Lumbreras et al. 1998).

Western Blot

Samples of supernatant and total soluble proteins will be denatured by adding SDS-PAGE loading buffer (Laemmli) with β -mercaptoethanol, followed by incubation at 95 °C for 5 min. Proteins will be separated on 12% polyacrylamide gels at 120–150 V and transferred to nitrocellulose membrane at 200mA for 1h. Then they will be blocked in 5% solution of skimmed milk and the protein of interest will be probed with monoclonal mouse anti-His antibody. The membrane will then be washed 3 times with TBS-T (Tris-buffered saline with Tween 20 detergent) for 10 min and incubated with anti-mouse antibody conjugated with alkaline phosphatase, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) substrates which forms an insoluble dark blue diformazan precipitate, allowing protein identification.

Recombinant proteins purification

Purification of the proteins of interest will be carried out by Nickel resin (Ni Superflow His60, Clontech®) following the manufacturer's instructions. The method is based on the

affinity interaction with the hexa histidine tail, present in recombinant protein with the already mentioned resin. Basically, the sample is added to the column with the resin precharged with nickel ions, in which the proteins of interest containing histidine residues on its surface will be attached. Proteins not bound to the column will be washed out with the wash buffer, while the protein of interest is eluted with buffer containing 500 mM Imidazole.

Quantification of recombinant proteins

Quantification of purified proteins will be obtained via the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Thus 200 μ L of sample are incubated in 96-well plates at 37 °C for 30 min, then the solutions are removed, blocked in 5% solution of skimmed milk and the wells are washed 3 times with TBS-T (Tris-buffered saline with Tween 20 detergent) . Then, 200 μ L/ well of TBS-T solution of monoclonal mouse anti-His is added and incubated at room temperature for 2 h and washed as described above. A new TBS-T solution with anti-mouse monoclonal antibody conjugated with alkaline phosphatase is added, incubated at room temperature for 2 h and washed 3 times with TBS-T for 10 min. For the development, a freshly prepared solution of p-nitrophenyl phosphate is added and incubated in the wells for 30 min, and the plate is subsequently read in a plate reader at 405 nm.

Data analysis

Results will be evaluated by analysis of variation (ANOVA) performed in Statistica software 10. Statistical significance will be evaluated by estimating the descriptive level (p) and the results will be considered statistically significant at $p < 0.05$ (confidence level of 95%) .The methods described above are shown in the flowchart in Fig. 4 and the execution chronogram in Table 2.

Table 2. Chronogram of execution					
Month	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th
Plasmid construction	X				
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> transformation		X	X		
Transformed strains evaluation		X	X	X	X
Cob polymerization evaluation				X	X
Results analysis	X	X	X	X	X
Wiki development					X

Figure 4.

Experimental Flowchart. (A) Wild Cells incubated with built vectors. (B) Wild-cell transformation by electroporation. (C) Selection of mutants resistant to Zeocin. (D) Screening of antibiotic resistant cells by PCR. (E) Cultivation of PCR positive cells. (F) Fractions to be tested for the presence of recombinant proteins. (G) Detection of recombinant proteins present in the fractions by Western Blot. (H) Protein Purification. (I) Quantification via ELISA. (J) Spider silk polymerization reaction.

Acknowledgements

We would like to thank Nicolau de Almeida for reviewing the manuscript for the use of English.

Hosting institution

University of São Paulo.

Author contributions

All the authors contributed to this manuscript by reviewing and editing the final text, as well as either writing, doing background research or making figures.

Conflicts of interest

The authors report no conflict of interest.

References

- Andersson M, Chen G, Otikovs M, Landreh M, Nordling K, Kronqvist N, Westermarck P, Jörnvall H, Knight S, Ridderstråle Y, Holm L, Meng Q, Jaudzems K, Chesler M, Johansson J, Rising A (2014) Carbonic Anhydrase Generates CO₂ and H⁺ That Drive Spider Silk Formation Via Opposite Effects on the Terminal Domains. *PLoS Biology* 12 (8): e1001921. DOI: [10.1371/journal.pbio.1001921](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001921)
- Ayoub N, Garb J, Tinghitella R, Collin M, Hayashi C (2007) Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes. *PLoS ONE* 2 (6): e514. DOI: [10.1371/journal.pone.0000514](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000514)
- Blüm C, Nichtl A, Scheibel T (2013) Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes. *Advanced Functional Materials* 24 (6): 763-768. DOI: [10.1002/adfm.201302100](https://doi.org/10.1002/adfm.201302100)
- Bosio V, Islan G, Martínez Y, Durán N, Castro G (2015) Nanodevices for the immobilization of therapeutic enzymes. *Critical Reviews in Biotechnology* 35: 1-18. DOI: [10.3109/07388551.2014.990414](https://doi.org/10.3109/07388551.2014.990414)
- Dove A (2002) Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nature Biotechnology* 20 (8): 777-779. DOI: [10.1038/nbt0802-777](https://doi.org/10.1038/nbt0802-777)
- Eichler-Stahlberg A, Weisheit W, Ruecker O, Heitzer M (2009) Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 229 (4): 873-883. DOI: [10.1007/s00425-008-0879-x](https://doi.org/10.1007/s00425-008-0879-x)
- Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P (1999) A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 19 (3): 353-361. DOI: [10.1046/j.1365-313x.1999.00526.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00526.x)
- Garb JE, Ayoub NA, Hayashi CY (2010) Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains. *BMC Evolutionary Biology* 10 (1): 243. DOI: [10.1186/1471-2148-10-243](https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-243)
- Gorman DS, Levine RP (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 54: 1665-1669. DOI: [10.1073/pnas.54.6.1665](https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665)
- Hardy J, Römer L, Scheibel T (2008) Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* 49 (20): 4309-4327. DOI: [10.1016/j.polymer.2008.08.006](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.08.006)
- Heitzer M, Zschoernig B (2007) Construction of modular tandem expression vectors for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using the Cre/lox-system. *BioTechniques* 43 (3): 324-332. DOI: [10.2144/000112556](https://doi.org/10.2144/000112556)
- Hojckova K, Stano M, Klucar L (2013) phiBIOTICS: catalogue of therapeutic enzybiotics, relevant research studies and practical applications. *BMC Microbiology* 13 (1): 53. DOI: [10.1186/1471-2180-13-53](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-53)
- Khan AA, Alzohairy M (2010) Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. *Research Journal of Biological Sciences* 5 (8): 565-575. DOI: [10.3923/rjbsci.2010.565.575](https://doi.org/10.3923/rjbsci.2010.565.575)
- Kluge J, Rabotyagova O, Leisk G, Kaplan D (2008) Spider silks and their applications. *Trends in Biotechnology* 26 (5): 244-251. DOI: [10.1016/j.tibtech.2008.02.006](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.02.006)
- Lauersen K, Berger H, Mussgnug J, Kruse O (2013) Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology* 167 (2): 101-110. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2012.10.010](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.010)

- León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A, Fernández E (2004) Transgenic microalgae as green cell-factories. Trends in biotechnology 22 (1): 45-52. DOI: [10.1016/j.tibtech.2003.11.003](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.11.003)
- Lewis R (2006) Spider Silk: Ancient Ideas for New Biomaterials. Chemical Reviews 106 (9): 3762-3774. DOI: [10.1021/cr010194g](https://doi.org/10.1021/cr010194g)
- Liese A, Hilterhaus L (2013) Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. Chemical Society Reviews 42 (15): 6236. DOI: [10.1039/c3cs35511j](https://doi.org/10.1039/c3cs35511j)
- Luisi I, Pavan S, Fontanive G, Tossi A, Benedetti F, Savoini A, Maurizio E, Sgarra R, Sblattero D, Berti F (2013) An Albumin-Derived Peptide Scaffold Capable of Binding and Catalysis. PLoS ONE 8 (2): e56469. DOI: [10.1371/journal.pone.0056469](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056469)
- Lumbrales V, Stevens D, Purton S (1998) Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. The Plant Journal 14 (4): 441-447. DOI: [10.1046/j.1365-313x.1998.00145.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00145.x)
- Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA (2003) Expression and assembly of a fully active antibody in algae. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 (2): 438-442. DOI: [10.1073/pnas.0237108100](https://doi.org/10.1073/pnas.0237108100)
- Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Muto M, Marin-Navarro J (2007) *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. Current Opinion in Biotechnology 18 (2): 126-133. DOI: [10.1016/j.copbio.2007.02.001](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.001)
- Merabishvili M, Pirnay J, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, Glonti T, Krylov V, Mast J, Parys LV, Lavigne R, Volckaert G, Mattheus W, Verween G, Corte PD, Rose T, Jennes S, Zizi M, Vos DD, Vaneechoutte M (2009) Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. PLoS ONE 4 (3): e4944. DOI: [10.1371/journal.pone.0004944](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004944)
- Monier M (2013) Immobilization of β -galactosidase from *Escherichia coli* onto modified natural silk fibers. Journal of Applied Polymer Science 130 (4): 2923-2931. DOI: [10.1002/app.39475](https://doi.org/10.1002/app.39475)
- O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP (2005) The Recombinant Phage Lysin LysK Has a Broad Spectrum of Lytic Activity against Clinically Relevant Staphylococci, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 187 (20): 7161-7164. DOI: [10.1128/jb.187.20.7161-7164.2005](https://doi.org/10.1128/jb.187.20.7161-7164.2005)
- Petsch D (2000) Endotoxin removal from protein solutions. Journal of Biotechnology 76: 97-119. DOI: [10.1016/s0168-1656\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00185-6)
- Pieters R, Hunger S, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, Goekbuget N, Schrappe M, Pui C (2010) L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. Cancer 117 (2): 238-249. DOI: [10.1002/cncr.25489](https://doi.org/10.1002/cncr.25489)
- Rasala B, Mayfield S (2011) The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. Bioengineered Bugs 2 (1): 50-54. DOI: [10.4161/bbug.2.1.13423](https://doi.org/10.4161/bbug.2.1.13423)
- Rasala B, Lee P, Shen Z, Briggs S, Mendez M, Mayfield S (2012) Robust Expression and Secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by Fusion to a Selection Gene and Processing with the FMDV 2A Peptide. PLoS ONE 7 (8): e43349. DOI: [10.1371/journal.pone.0043349](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043349)
- Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, Yagyu K, Muraoka A, Sugai M, Hiramatsu K, Honke K, Matsuzaki S (2007) Efficient Elimination of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* by Cloned Lysin Derived from

- Bacteriophage ϕ MR11. *The Journal of Infectious Diseases* 196 (8): 1237-1247. DOI: [10.1086/521305](https://doi.org/10.1086/521305)
- Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology* 19 (5): 430-436. DOI: [10.1016/j.copbio.2008.07.008](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.008)
 - Sassolas A, Blum L, Leca-Bouvier B (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* 30 (3): 489-511. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003)
 - Schroda M, Blocker D, Beck C (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal* 21 (2): 121-131. DOI: [10.1046/j.1365-3113x.2000.00652.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2000.00652.x)
 - Sheldon RA, van Pelt S (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society reviews* 42 (15): 6223-35. DOI: [10.1039/c3cs60075k](https://doi.org/10.1039/c3cs60075k)
 - Tokareva O, Jacobsen M, Buehler M, Wong J, Kaplan D (2014) Structure–function–property–design interplay in biopolymers: Spider silk. *Acta Biomaterialia* 10 (4): 1612-1626. DOI: [10.1016/j.actbio.2013.08.020](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.020)
 - Tomotani EJ, das Neves LCM, Vitolo M (2005) Oxidation of Glucose to Gluconic Acid by Glucose Oxidase in a Membrane Bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121: 0149-0162. DOI: [10.1385/abab:121:1-3:0149](https://doi.org/10.1385/abab:121:1-3:0149)
 - Walsh G (2014) Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology* 32 (10): 992-1000. DOI: [10.1038/nbt.3040](https://doi.org/10.1038/nbt.3040)
 - Wijffels RH, Kruse O, Hellingwerf KJ (2013) Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology* 24 (3): 405-413. DOI: [10.1016/j.copbio.2013.04.004](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.004)
 - Yang X-Y, Li C-R, Lou R-H, Wang Y-M, Zhang W-X, Chen H-Z, Huang Q-S, Han Y-X, Jiang J-D, You X-F (2007) In vitro activity of recombinant lysostaphin against *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in Beijing, China. *Journal of Medical Microbiology* 56 (1): 71-76. DOI: [10.1099/jmm.0.46788-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.46788-0)
 - Yang Y, Qian Z, Zhong J, Xia X (2016) Hyper-production of large proteins of spider dragline silk MaSp2 by *Escherichia coli* via synthetic biology approach. *Process Biochemistry* 51 (4): 484-490. DOI: [10.1016/j.procbio.2016.01.006](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.01.006)

ANEXO G – ARTIGO EM FASE DE FINALIZAÇÃO PELOS AUTORES (AINDA NÃO PUBLICADO – APENAS PRIMEIRA PÁGINA)

Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations

Samarina R. Wlodarczyk¹; Débora Custódio¹; Adalberto Pessoa Jr.¹; Gisele Monteiro^{*1}

¹ Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo – SP, 05434-070, Brazil

* Corresponding author: smgisele@usp.br, +55 11 3091 3734

Address: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B16, Cidade Universitária - 05508-000, São Paulo/SP, Brazil. Phone: 55-11-3091-3862 - Fax: 55-11-3815-6386.

ABSTRACT

Osmolytes are small organic molecules accumulated by the cells in response to environmental stresses. They are represented by amino acids, sugars, polyols, tertiary sulphonium and quaternary ammonium compounds. These molecules present a protective behavior and favor the equilibrium of macromolecules towards the native form, preventing denaturation and promoting folding of unfolded proteins. Protein formulations, as biologics, present many problems during the manufacture process, shelf life and drug administration, possibly resulting in protein denaturation, inactivation and/or aggregation. These drawbacks can be surpassed using osmolytes as excipients in protein formulations as stabilizers, bulking agents and even buffers. A number of 123 biologics, including vaccines and immunoglobulins, approved by U.S. Food and Drug Administration (FDA) between 1996 and 2016 were analyzed in this work in order to identify the most used group of osmolyte molecules. A deep insight into their role in protein formulations was discussed and compared from literature data. The ad- and disadvantages of their use in specific formulations were also extensively discussed here. Finally, investigation about the role of osmolytes in each formulation is essential for understanding their effect and provides a background to be used when selecting the best osmolyte to fit a specific formulation without excluding the patient needs.

Keywords: Biologics, protein formulation, stabilizers, excipients, vaccine.

Introduction

Introduction

Biopharmaceutical drugs are proteins, synthesized by cell systems, of highest importance for the treatment of many diseases (BLANDIZZI; MERONI; LAPADULA; LI et al., 2014). They provided new hope for patients for whom traditional therapy has failed or treatment options were not previously available, causing a revolution in the pharmaceutical industry (BAESHEN et al., 2014; RODGERS; CHOU, 2016).