UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Desenvolvimento de L-asparaginase peguilada de
E. chrysanthemi para o tratamento de leucemias**

Karin Mariana Torres Obreque

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE
Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Desenvolvimento de L-asparaginase peguilada de
E. chrysanthemi para o tratamento de leucemias**

Karin Mariana Torres Obreque

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE
Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2017

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

T693d Torres-Obreque, Karin Mariana
Desenvolvimento de L-asparaginase peguilada de
E. chrysanthemi para o tratamento de leucemias /
Karin Mariana Torres-Obreque. - São Paulo, 2017.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Rangel Yagui, Carlota de Oliveira

1. Biotecnologia Farmacêutica . 2. Crisantaspose.
3. Peguilação. 4. Biobetter. I. T. II. Rangel Yagui,
Carlota de Oliveira , orientador.

KARIN MARIANA TORRES OBREQUE

**Desenvolvimento de L-asparaginase peguilada de
E. chrysanthemi para o tratamento de leucemias**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui
Orientador/Presidente

1° examinador

2° examinador

3° examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

*“Hardships often prepare
ordinary people for an
extraordinary destiny”*

C.S. Lewis

AGRADECIMIENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pela enorme oportunidade de ser sua aluna, por ser um exemplo como pesquisadora e como mulher. Obrigada por acreditar em mim.

A CAPES, por minha bolsa de Mestrado durante a realização deste projeto.

Aos professores e colegas do Semi Industrial, por dar-me sempre uma boa sugestão, uma boa conversação ou simplesmente o apoio moral que às vezes precisamos para seguir em frente.

À grande família “gringa” que tive durante estes anos. Chile, Peru, México, Argentina, Colômbia, Portugal. Meu coração irá sempre com vocês e espero que a vida nos reúna de novo.

A meus chilenos amados, Mindy, Fabian, Consuelo, Perla e Alexis, por estar comigo nas ruins, nas piores, nas boas e nas melhores. Em especial a minha querida *roomie* Mindy, sentir saudades suas vai ficar curto.

E, finalmente aos mais importantes, minha família, que ainda à distância ficou sempre por perto. Obrigada Gabriela, Lisbet e Cristian. Eu amo vocês.

Obrigada a todas as pessoas que passaram por minha vida estes anos no Brasil, que me ajudaram a mudar e me transformar na pessoa que hoje sou, uma pessoa orgulhosa de ser mestre.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Biofármacos e <i>Biobetters</i>	19
2.2. Peguilação	21
2.3. Peguilação <i>N</i> -terminal	26
2.4. L-asparaginase	28
2.5. L-asparaginase de <i>E. chrysanthemi</i>	34
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Material	36
4.2. Metodologia	36
4.2.1. Preparo do estoque de células da <i>E. coli</i> BL21	36
4.2.2. Cultivo de <i>E. coli</i>	36
4.2.3. Determinação da concentração celular	37
4.2.4. Determinação de glicose	38
4.2.5. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	38
4.2.6. Cálculo da Velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max})	39
4.2.7. Cálculo da Produtividade volumétrica	39
4.2.8. Extração da L-Asparaginase	40
4.2.8.1. Lise celular por ultrassom	40
4.2.8.2. Choque osmótico	40
4.2.9. Purificação da enzima crisantaspase	41
4.2.9.1. Cromatografia de troca cationica	41
4.2.9.2. Cromatografia de exclusão molecular	41
4.2.10. Determinação da concentração de proteínas	42
4.2.11. Determinação da Atividade Enzimática	42

4.2.12.	Zimografia	43
4.2.13.	Pegulação da enzima crisantaspase	43
4.2.14.	Pegulação com solventes orgânicos	44
4.2.15.	Purificação da PEG-crisantaspase	44
4.2.16.	Cinética enzimática.....	45
4.2.17.	Estabilidade enzimática	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	Cultivo da cepa <i>E. coli</i> recombinante.....	46
5.1.1.	Curva correlação de biomassa	46
5.1.2.	Cultivo em agitador orbital	46
5.1.3.	Cultivo em Biorreator	49
5.2.	Extração da crisantaspase.....	53
5.2.1.	Lise celular	53
5.2.2.	Choque osmótico.....	55
5.3.	Purificação crisantaspase	57
5.4.	Estudo da pegulação da crisantaspase	63
5.5.	Purificação da PEG-crisantaspase	66
5.6.	Caracterização <i>in vitro</i> da crisantaspase e da PEG-crisantaspase.....	70
5.6.1.	Atividade específica	70
5.6.2.	Cinética enzimática.....	71
5.6.3.	Estabilidade da crisantaspase e PEG-crisantaspase frente à temperatura e ao tempo	72
6.	CONCLUSÕES.....	74
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	75
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO A	85
	ANEXO B	86
	ANEXO C	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Atividade enzimática
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
β -NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido)
β -NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado)
AHA	Ácidos β -hidroxamato aspártico
ASNase	L-asparafinase
BCA	Ácido bicinconíco
Bis-Tris	Bis (hidroximetil) amino-tris (hidroximetil) metano
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês: <i>Bovine serum albumin</i>)
crisantaspase	L-asparaginase obtida de <i>Erwinia chrysanthemi</i>
DO	Oxigênio Dissolvido (do inglês: <i>Dissolved Oxygen</i>)
EMA	Agência de Medicina da Europa (do inglês: <i>European Medicines Agency</i>)
FDA	Agencia Norte Americana de Medicamentos e Alimentos (do inglês: <i>Food and Drugs Administration</i>)
GDH	Glutamato desidrogenase
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosideo
k _{cat}	Número de renovação
K _{cat} /k _M	Eficiência catalítica
k _M	Constante de Michaelis-Menten
kLa	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
LB	Meio de cultivo Luria Bertani
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
PEG-crisantaspase	L-asparaginase de <i>E. chrysanthemi</i> monopeguilada
mPEG-NHS	Metoxi-polietilenoglicol carboximetil <i>N</i> -hidroxisuccinimidil éster
Native-Page	Gel de electroforese nativo
OD600nm	Densidade ótica a 600 nm (do inglês: <i>Optical Density</i>)
PBS	Tampão fosfato salino
PDB	Banco de dados de proteínas (do inglês: <i>Protein Data Bank</i>)
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial de hidrogênio

pI	Ponto isoeletrico
pKa	Constante de dissociação do ácido
PMSF	Fenilmetilsulfonifluor
PSA	Persulfato de amônio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
T _{1/2}	Tempo de meia-vida
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletenodiamina
U	Unidade internacional de atividade enzimática
UV	Ultravioleta
V _{max}	Velocidade máxima
V _{vm}	Volume de ar por volume de meio por minuto
X	Biomassa (g de massa celular seca por L)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de uma proteína peguilada.....	21
Figura 2. Diferentes estratégias possíveis de peguilação sitio-dirigida.....	26
Figura 3. Reação de peguilação <i>N</i> -terminal empregando-se <i>N</i> -hidroxisuccinimidil éster de PEG (mPEG-NHS). Em azul, tem-se a representação em fita da proteína.....	27
Figura 4. Ilustração das fases do tratamento pediátrico da leucemia linfoblástica aguda e dos fármacos utilizados na maioria dos protocolos.....	29
Figura 5. Resumo dos avances na pesquisa e utilização de L-asparaginase (ASNase) no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA).....	30
Figura 6. Representação esquemática da atividade hidrolítica da L-asparaginase.....	31
Figura 7. Representação esquemática do cristal de L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> na esquerda (Fonte: <i>PDB</i> , cod.3ECA) e de L-asparaginase de <i>Erwinia chrysanthemi</i> na direita (Fonte: <i>PDB</i> , cod.5F52).....	32
Figura 8. Reação de hidrolise da L-Asn por a enzima L-asparaginase e a formação do subproduto de b-hidroxamato aspártico férrico em presença de cloreto férrico.....	43
Figura 9. Curva correlação entre concentração celular em função da massa seca e OD600nm para a cepa recombinante <i>E. coli</i> BL21 expressando crisantaspase.....	46
Figura 10. Curva logarítmica de crescimento típico para bactérias.....	47
Figura 11. (A) Curva de crescimento celular da cepa recombinante <i>E. coli</i> BL21 em agitador metabólico e meio LB sem indução. (B) Representação logarítmica de biomassa em função do tempo.....	48
Figura 12. (A) Curva de crescimento celular da cepa recombinante <i>E. coli</i> BL21 com indução de IPTG em agitador metabólico e da atividade de crisantaspase no cultivo em função do tempo (B) Representação logarítmica de biomassa como função do tempo.....	49

Figura 13. Determinação do kLa mediante o método do Pirt. O valor de kLa corresponde ao coeficiente angular da reta.....	50
Figura 14. (A) Curva de crescimento celular, pH e do oxigênio dissolvido ao longo do tempo para a cepa recombinante <i>E. coli</i> BL21 em Biorreator de 2 L com indução de IPTG. (B) Representação logarítmica de biomassa em função do tempo.....	51
Figura 15. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 10% da produção de crisantaspase em <i>E. Coli</i>	53
Figura 16. Gel electroforese SDS-PAGE 10% do extrato proteico de <i>E. coli</i> BL21 recombinante obtido por rompimento celular por ultrassom.....	54
Figura 17. Resumo dos resultados de rompimento celular de <i>E. coli</i> para a liberação de crisantaspase por ultrassom. A) Lise de 500 mL de cultura celular. B) Lise de 250 mL cultura.....	55
Figura 18. Gel SDS-PAGE 10% das duas etapas do choque osmótico da bactéria <i>E. coli</i> BL21 recombinante, produtora de crisantaspase.....	56
Figura 19. Purificação da enzima crisantaspase recombinante por troca catiônica em gradiente de pH de 5,5 até 8,5.....	58
Figura 20. Purificação da enzima crisantaspase recombinante por troca catiônica em <i>step</i> de pHs (A) Perfil cromatográfico por 280 nm. (B) Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) do <i>step</i> pH 7,5 da purificação.....	59
Figura 21. Purificação por exclusão molecular da enzima crisantaspase recombinante (A) Perfil cromatográfico por 280 nm (B) Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 10% das frações da purificação (C) Zimograma da ASNase de <i>E. coli</i> e <i>Erwinia chrysanthemi</i> (crisantaspase).....	60
Figura 22. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) da crisantaspase de <i>E. coli</i> BL21 recombinante purificada por cromatografia de troca catiônica do extrato proteico obtido por choque osmótico.....	62

- Figura 23.** Reação de peguilação da enzima crisantaspase com o mPEG-NHS 10 kDa a diferentes valores de pH **(A)** Gel de eletroforese (SDS-PAGE 10%) **(B)** Análise da intensidade das bandas do gel de eletroforese pelo software ImageJ.....63
- Figura 24.** Estrutura química dos solventes *N,N*-dimetilformamida (DMF) e tetrahidrofurano (THF).....65
- Figura 25.** Peguilação da enzima ASNase com mPEG-NHS com diferentes solventes orgânicos e tampão. **(A)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) da reação de peguilação em diferentes solventes. **(B)** Porcentagem de rendimento da peguilação calculada pela intensidade das bandas do gel.....65
- Figura 26.** Estrutura da ressonância química que apresenta o solvente *N,N*-dimetilformamida (DMF).....66
- Figura 28.** Cromatogramas da purificação por cromatografia de exclusão molecular em fluxo de $0,75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ **(A)** Purificação das frações 1 até 3 da primeira etapa da troca catiônica, sendo monoPEG-crisantaspase coletada no pico 3 deste cromatograma e **(B)** As frações 4 e 5 da primeira etapa de purificação, onde a crisantaspase que não reagiu foi coletada no pico 4 deste cromatograma.....68
- Figura 29.** Cromatograma em coluna de exclusão molecular, fluxo $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, da reação de peguilação da enzima crisantaspase com mPEG-NHS 10 kDa.....69
- Figura 30.** Atividade específica segundo a linearidade da atividade total (U) em diferentes quantidades de proteína (mg), medido pelo método de Nessler. **(A)** crisantaspase e **(B)** PEG-crisantaspase.....70
- Figura 31.** Curvas de Michaelis-Menten para a determinação das constantes cinéticas da enzima crisantaspase recombinante e PEG-crisantaspase.....71
- Figura 32.** Estabilidade da enzima crisantaspase e PEG-crisantaspase frente **(A)** a diferentes temperaturas e **(B)** ao tempo, mantida em armazenamento a 4°C73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Derivados de PEG reativos mais comumente utilizados segundo o grupamento proteico no qual reagem.....	22
Tabela 2. Conjugados peguilados aprovados pelo FDA.....	24
Tabela 3. Principais características in vivo da enzima ASNase.....	33
Tabela 4. Características da enzima asparaginase de <i>Erwinia chrysanthemi</i>	35
Tabela 5. Resumo das produtividades específica e volumétrica de crisantaspase para os cultivos em shaker e biorreator da cepa recombinante <i>E. coli</i> BL21.....	52
Tabela 6. Resumo da purificação de crisantaspase recombinante, produzida em cultura celular de <i>E. coli</i> BL21 e extraída por lise celular por ultrassom.....	61
Tabela 7. Resumo da purificação de crisantaspase recombinante, produzida por <i>E. coli</i> BL21 e extraída por choque osmótico.....	62
Tabela 8. Resumo dos parâmetros cinéticos das enzimas crisantaspase e PEG-crisantaspase.....	72

RESUMO

TORRES-OBREQUE, K.M. **Desenvolvimento de L-asparaginase peguilada de *E. chrysanthemi* para o tratamento de leucemias.** 2017. 88f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A crisantaspase é uma enzima do tipo asparaginase (ASNase) produzida pela bactéria *Erwinia chrysanthemi* e utilizada como biofármaco no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) em casos de hipersensibilidade à ASNase de *E. coli*. As principais desvantagens deste biofármaco são a curta meia-vida (10 horas) e imunogenicidade. Nesse sentido, sua forma peguilada (PEG-crisantaspase) não só reduziria o efeito imunogênico, como também melhoraria a meia-vida plasmática. Atualmente, somente a ASNase de *E. coli* está disponível comercialmente na forma peguilada e essa, por ter sido uma das primeiras proteínas a serem peguiladas, é resultado de um processo de peguilação aleatória em resíduos de lisina. Portanto, apresenta alto grau de polidispersão em relação à quantidade de cadeias de PEG ligadas à enzima. Nesse trabalho desenvolvemos um processo de obtenção de crisantaspase peguilada de maneira sítio-específica, no grupamento *N*-terminal (PEG-crisantaspase). A crisantaspase foi obtida de forma recombinante na cepa *E. coli* BL21, cultivada em agitador metabólico e biorreator, em meio Luria Bertani. A produtividade volumétrica no biorreator aumentou 37% em comparação com o agitador metabólico (460 e 335 U·L⁻¹·h⁻¹ respectivamente). A crisantaspase foi recuperada por choque osmótico e purificada por cromatografia de troca catiônica (coluna HiTrap SP FF, 5 mL, eluição em pH 7,5), apresentando atividade específica de 694 U·mg⁻¹, fator de purificação de 31 e rendimento de 69%. A crisantaspase purificada foi peguilada com mPEG-NHS 10 kDa, em tampão fosfato 100 mM, 22 °C, razão molar enzima:PEG 1:50 durante 30 min e sob diferentes valores de pH (6,5-9,0). O melhor rendimento de peguilação *N*-terminal (50%) foi em pH 7,5 com menor formação de estruturas poli-peguiladas (7%). A PEG-crisantaspase foi isolada por cromatografia de exclusão molecular, restando 50% da atividade específica (357 U·mg⁻¹) com valor de k_M três vezes maior do que o da crisantaspase (150 e 48,5 μ M respectivamente). Entretanto, apresentou maior estabilidade em altas temperaturas. Em duas semanas, a crisantaspase perdeu 93% de sua atividade específica enquanto que a PEG-crisantaspase foi estável por 20 dias. Portanto, a enzima PEG-crisantaspase desenvolvida representa uma alternativa promissora para o tratamento da LLA.

Palavras-chave: peguilação *N*-terminal, peguilação sítio-dirigida, *biobetter*, crisantaspase, L-asparaginase, leucemia linfoblástica aguda.

ABSTRACT

TORRES-OBREQUE, K.M. **Development of pegylated *E. chrysanthemi* L-asparaginase for the treatment of leukemias.** 2017. 88f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Crisantaspase is an asparaginase enzyme (ASNase) produced by *Erwinia chrysanthemi* bacterium and used as biopharmaceutical in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in case of hypersensitivity to *E. coli* ASNase. The main disadvantages of this biopharmaceutical are the short half-life (10 hours) and immunogenicity. In this sense, its PEGylated form (PEG-crisantaspase) could not only reduce the immunogenic effect but also improve plasma half-life. Currently, only *E. coli* ASNase is commercially available in its pegylated form. Since ASNase was one of the first proteins to be pegylated, it corresponds to a random PEGylation process on lysine residues and consequently preparations are highly polydisperse. In this work we developed a process to obtain a site-specific *N*-terminal PEGylated crisantaspase (PEG-crisantaspase). Crisantaspase was recombinantly expressed in *E. coli* BL21 strain, grown in shaker and bioreactor, in Luria Bertani medium. Volumetric productivity in bioreactor increased 37% compared to shaker conditions (460 and 335 U·L⁻¹·h⁻¹ respectively). Crisantaspase was extracted by osmotic shock and purified by cation exchange chromatography (HiTrap SP FF column, 5 mL, elution at pH 7.5), presenting specific activity of 694 U·mg⁻¹, 31 purification fold and an yield of 69%. Purified crisantaspase was PEGylated with 10 kDa mPEG-NHS in 100mM phosphate buffer, 22°C, enzyme:PEG molar ratio of 1:50 for 30 min, and at different pH values (6.5-9.0). The highest *N*-terminal pegylation yield (50%) was at pH 7.5 with less poly-PEGylated forms (7%). PEG-crisantaspase was purified by size-exclusion chromatography, retaining 50% of specific activity (357 U·mg⁻¹) with a k_M value 3 times higher than crisantaspase (150 and 48,5 μ M respectively). Nonetheless, PEG-crisantaspase was found to be more stable at high temperatures and over the time. In two weeks, crisantaspase lost 93% of its specific activity, while PEG-crisantaspase was stable for 20 days. Therefore, the novel PEG-crisantaspase enzyme developed represents a promising alternative for the treatment of ALL.

Keywords: *N*-terminal pegylation, site-specific pegylation, *biobetter*, crisantaspase, L-asparaginase, acute lymphoblastic leukemia.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os medicamentos biológicos ou biofármacos revolucionaram a indústria farmacêutica, sendo considerados uma das maiores descobertas na área desde os anos 80, refletindo atualmente em um mercado de mais de 5 bilhões de dólares ao ano. Os biofármacos são definidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como *“moléculas complexas de alta massa molecular obtidas a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal ou procedimentos biotecnológicos por meio da manipulação ou inserção de outro material genético (tecnologia do DNA recombinante) ou alteração dos genes que ocorre devido à irradiação, produtos químicos ou seleção forçada”*. Nesse contexto, a maioria dos medicamentos biológicos são proteínas (como enzimas e anticorpos) e hormônios (DINWOODIE, 2011; RYU; KIM; NAM, 2012).

A produção de proteínas recombinantes mediante a utilização de microrganismos, especialmente bactérias e leveduras, tem muitas vantagens tais como: o crescimento em forma de células individuais, são facilmente cultiváveis, utilizam meios de baixo custo e são de fácil manipulação genética, dando origem a processos melhorados para a produção de metabólitos, produtos biofarmacêuticos recombinantes e enzimas industriais (BAHREINI et al., 2014; GUPTA; SHUKLA, 2016). A bactéria *Escherichia coli*, em especial, é considerada um dos produtores mais eficientes já que, possui um tipo de genoma amplamente conhecido, melhorando assim as possibilidades na manipulação genética, possui fisiologia e metabolismo bem conhecidos, tem diversos vetores de clonagem bem definidos para a produção de proteínas recombinantes e apresenta uma alta taxa de crescimento em meios simples. Atualmente, 30% das proteínas recombinantes de uso terapêutico são expressas em *E. coli* (FERRER-MIRALLES et al., 2009; ROSANO et al., 2014).

Atualmente, com a proximidade de vencimento de patentes de diversos biofármacos, temos uma nova geração de produtos biológicos denominados biossimilares e *biobetters*. De uma maneira geral, os biossimilares são produtos biológicos com o mesmo perfil molecular que os produtos de referência e que estabelecem evidências suficientes de que não há diferenças clínicas significativas, sendo portanto intercambiáveis com seus originadores. Já os *biobetters* contém modificações no perfil molecular originador com a finalidade específica de aumentar a sua eficácia terapêutica, desta maneira inserindo no mercado um produto superior (SATTERWHITE, 2013). A

peguilação é um modo efetivo de obtenção de proteínas terapêuticas com características farmacocinéticas aprimoradas e menor imunogenicidade (ZHANG et al., 2012). Essa técnica refere-se à ligação covalente de cadeias de PEG (polietilenoglicol) a proteínas e consiste na principal estratégia para obtenção de *biobetters*. A principal desvantagem da peguilação é a obtenção de um produto polidisperso (conjugados de tamanhos heterogêneos), porém a utilização de reações sítio-dirigidas a aminoácidos específicos (ex: cisteína ou grupo *N*-terminal) podem amenizar esse problema.

Dentre os medicamentos biológicos atualmente disponíveis, destaca-se a L-asparaginase (ASNase), biofármaco utilizado como fármaco de primeira linha no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Descoberta em 1922 por Clementi e a enzima proveniente da bactéria *E. coli* foi aprovada pela FDA em 1978. Atualmente, três preparações comerciais da ASNase estão disponíveis, sendo duas de *Escherichia coli*, uma em sua forma nativa e outra peguilada, e uma de *Erwinia chrysanthemi* (RIZZARI et al., 2013). Muitas ASNases derivadas de diversos outros micro-organismos foram caracterizadas, não obstante a escolha da ASNase mais adequada para o tratamento tem sido um dilema na comunidade científica. Diferenças na farmacocinética, hipersensibilidade imunológica, baixo *clearance* renal, alta afinidade pelo substrato, doses, preços, entre outros fatores são levados em consideração para a enzima ser comercializada e indicada para terapêutica (NAGARETHINAM et al., 2012; RIZZARI et al., 2013). Os principais fatores que influenciam a atividade antileucêmica da ASNase são os bioquímicos (atividade de hidrólise, K_M da enzima, atividade excessiva de glutaminase) e os farmacológicos (depuração sérica da enzima e desenvolvimento de resistência à ASNase)(AVRAMIS, 2012).

A ASNase de *E. coli* apresenta-se atualmente como primeira escolha devido à meia-vida plasmática da enzima de *E. chrysanthemi* (crisantaspase) ser significativamente menor. Entretanto, os efeitos secundários da ASNase, principalmente a alta imunogenicidade, representam uma das principais problemáticas que tem levado à procura de novas estratégias com o objetivo de eliminar estes efeitos. Nesse sentido, a crisantaspase apresenta menores efeitos adversos no tratamento dos pacientes, pois resulta em menor resposta imunológica (anticorpos anti-ASNase), além de apresentar maior atividade específica que a enzima de *E. coli* (CHIEN et al., 2014). A peguilação da crisantaspase resultaria em aumento de meia-vida biológica e também diminuição da imunogenicidade (PASUT; VERONESE, 2009).

Nesse contexto, no presente trabalho produzimos uma crisantaspase recombinante expressa em *E. coli* e desenvolvemos um protocolo de peguilação sítio-dirigida N-terminal, visando o futuro desenvolvimento de um *biobetter*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biofármacos e *Biobetters*

A indústria farmacêutica expandiu significativamente nos últimos 30 anos, devido ao desenvolvimento dos medicamentos biológicos ou biofármacos (RYU; KIM; NAM, 2012). A definição desta classe de medicamentos difere de uma agência regulatória para outra, como FDA (*Food and Drug Administration*), EMA (*European Medicines Agency*) e a própria ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil), mas em geral são definidas como moléculas maiores e de estrutura mais complexa que os fármacos não-biológicos e que conseguiriam apenas ser produzidas por organismos vivos ou isoladas a partir de fontes naturais (humana, animal, micro-organismo ou planta). Enzimas, anticorpos, citocinas e hormônios são exemplos de biofármacos (ANVISA, 2017; EMA, 2015; FDA, 2017).

Na Atualidade, a biotecnologia envolve aproximadamente 40% dos produtos do mercado farmacêutico mundial (SPADIUT et al., 2014) e no ano 2016 a lista dos 25 fármacos mais rentáveis no mundo incluía 10 produtos biotecnológicos, entre eles Humira® (adalimumabe, USD\$16 bilhões em vendas), Enbrel® (etanercepte, USD\$8,8 bilhões em vendas), Avastin® (bevacizumabe, USD\$6,7 bilhões em vendas), Neulasta® (pegfilgrastim, USD\$4,7 bilhões em vendas), entre outros (PHILIPPIDIS, 2017). Assim, a produção de proteínas recombinantes é um mercado de bilhões de dólares que compreende produtos biofarmacêuticos e enzimas industriais. A venda global de proteínas biofarmacêuticas atingiu USD\$ 87 bilhões no ano 2008 e US\$ 170 bilhões no ano de 2014 (WEINACKER et al., 2013). A Roche é a companhia com maiores vendas, atingindo USD\$38,7 bilhões no ano 2015 (SPADIUT et al., 2014).

A introdução de biofármacos nas terapias foi uma revolução na indústria farmacêutica, atingindo necessidades médicas previamente não atendidas como hemofilia, diabetes, artrite e doenças do sistema imunológico. Ainda assim existem problemas, principalmente relativos à baixa meia-vida plasmática dessas moléculas com necessidade de administrações frequentes para atingir a melhora clínica desejada, e imunogenicidade, devido principalmente à produção de anticorpos anti-fármaco (ADA ou *Anti-drug Antibodies*) que reduzem a atividade biológica e resultam em respostas de hipersensibilidade (BARBOSA, 2011; BARBOSA et al., 2012; RYU; KIM; NAM, 2012).

Com o objetivo de minimizar estes problemas intrínsecos dos biofármacos, assim como também necessidades econômicas de mercado devido à proteções patentárias, surgiu uma nova geração de produtos biológicos: os biossimilares e os *biobetters*. Biossimilares são produtos biológicos com o mesmo perfil molecular que os produtos de referência e que apresentam evidências suficientes de que não há diferenças clínicas significativas (SATTERWHITE, 2013), sendo, portanto, intercambiáveis com o produto original. Os *biobetters*, por sua vez, possuem modificações no perfil molecular resultantes de diferentes técnicas de bio-engenharia, tais como: ligações com polímeros, glicoengenharia, engenharia de proteínas, entre outras. A finalidade é aumentar a eficácia clínica sem alterar o alvo ou indicação terapêutica, inserindo no mercado um produto superior ao original. Os análogos da insulina naturais e a darbepoetina foram, em definição, *biobetters* pioneiros referentes à insulina e à eritropoetina (DE MORA, 2015; SATTERWHITE, 2013).

Os *biobetters* representam uma oportunidade de inovação com riscos reduzidos, considerando que já é bem conhecido o mecanismo de ação da molécula originadora. Além disso, eles promovem o aumento de conhecimento científico e melhoram o tratamento para os pacientes (DINWOODIE, 2011). O desenvolvimento de *biobetters* é realizado através de modificações químicas e moleculares com mudanças em certas propriedades, principalmente o aumento de meia vida, toxicidade reduzida, imunogenicidade reduzida e melhora dos efeitos farmacodinâmicos (SATTERWHITE, 2013). Uma das abordagens mais estudadas nos últimos 10 anos para a produção de *biobetters* corresponde à peguilação. A falta de alternativas que tenham atingido o mesmo sucesso da peguilação, torna esta técnica ainda mais atrativa a médio e longo prazo (KURINOMARU; SHIRAKI, 2014).

2.2. Peguilação

A peguilação refere-se à ligação covalente de cadeias de polietilenoglicol (PEG) à superfície da proteína, como representado na figura 1. Esta técnica foi descrita pela primeira vez na década dos 70 por Abuchwoski *et al.*, conjugando o PEG em albumina de soro bovino (ABUCHOWSKI; ES; PALCZUK, 1977).

Figura 1. Representação esquemática de uma proteína peguilada (em cinza, a estrutura da proteína em modelo de fita; em azul, as cadeias de PEG) (BEHANCE, 2017).

O PEG é um polímero anfifílico que possui em sua estrutura química unidades repetidas de óxido de etileno e grupos hidroxilas em suas terminações que podem ser substituídos por outros grupos funcionais (os que favorecem a interação com as proteínas sob condições específicas). O PEG apresenta baixa imunogenicidade, alta solubilidade em água e em alguns solventes orgânicos pela grande capacidade de ligações de hidrogênio. Além disso, esse polímero apresenta volume hidrodinâmico 3-5 vezes maior que o de uma proteína globular com a mesma massa molecular (PFISTER; MORBIDELLI, 2014; VERONESE, 2001).

O metóxiPEG (ou monometóxi-PEG) contém um grupo funcional metila numa das extremidades e um grupo reativo no outro extremo. Ele é o derivado de PEG empregado em todos os produtos peguilados aprovados atualmente, seja na sua forma linear ou ramificada, devido à facilidade de ativação. Até agora, o maior tamanho de PEG utilizado para a conjugação a proteínas é de 40 kDa na forma ramificada e de 20 kDa para enzimas mono-peguiladas (VERONESE, 2001; ZHANG *et al.*, 2012).

A extremidade reativa atua como ligante seletivo a resíduos específicos na superfície de proteínas, enquanto a outra permanece exposta em direção à solução com nenhuma ou mínima reatividade em relação à extremidade “conectora” (ZHANG et al., 2012). Esta estrutura monofuncional do polímero é normalmente preferida para não ligar duas proteínas com uma mesma cadeia de PEG. O grupo reativo, também chamado porção ativa, é escolhido dependendo as necessidades da reação e disponibilidade dos resíduos na proteína, segundo é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Derivados de PEG reativos mais comumente utilizados segundo o grupamento proteico no qual reagem.

*NHS: ester *N*-hidroxisuccinimida (PFISTER; MORBIDELLI, 2014).

Seletividade	Ligação	Abreviação
Carboxila		
Amina	Amida	PEG-NH ₂
Hidrazida	Amida	PEG-NNH ₂
Amina		
Carboxilatos de NHS*	Amida	PEG-SCM, -SG, -SS, -SPA, -SVA
Carbonilimidazol	Amida	PEG-CI
Acrilato	Amida	PEG-ACRL
Ácido Carboxílico	Amida	PEG-COOH
Tosilato	Amida	PEG-TS
Diclorotiazina	Amida	PEG-DCT
Carbonato	Carbamato	PEG-BRC, -SC, -NPC, -TCPC
Porção <i>N</i>-terminal		
Aldeído	Amina secundária	PEG-ALD
Orto-piridiltioéster	Amina secundária	PEG-OPTE
Grupamento Tiol		
Maleimido	Tioéter	PEG-MAL
Orto-piridiltioéster	Dissulfeto	PEG-OPSS
Tiol	Dissulfeto	PEG-TS
Ponte dissulfeto		
Propenil sulfona	Tioéter	PEG-PS
Diversos		
Epóxido	Éter	PEG-EPOX
Isocianato	Uretano	PEG-NCO
Biotina	Não-covalente	PEG-BIO

No ano de 2010, os produtos biológicos peguillados geraram mais de 5 bilhões de dólares, e ainda o número de produtos no mercado está em constante crescimento. O medicamento Neulasta (PEG-rG-CSF ou Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos recombinante peguillado) por exemplo, com patente expirada em outubro do 2015, atingiu uma venda de USD\$4,39 bilhões no ano 2016 (CPHI, 2016). Atualmente, existem 14 conjugados PEG-proteína aprovados pelo FDA, apresentados na tabela 2.

A estratégia da peguilação fornece uma série de vantagens para a proteína conjugada, tais como (PFISTER; MORBIDELLI, 2014; ROBERTS; HARRIS, 2002):

- i. Proteger os sítios antigênicos presentes na superfície da proteína, ou seja, os epítomos antigênicos, assim como prevenir o reconhecimento e degradação *in vivo* por enzimas proteolíticas e endocitose;
- ii. Aumentar o tamanho aparente da proteína e o volume hidrodinâmico, reduzindo a filtração renal e alterando a biodistribuição, o que prolongaria a meia-vida *in vivo*;
- iii. Conferir à proteína maior solubilidade em água e redução da formação de agregados devido à repulsão estérica entre as superfícies peguilladas;
- iv. Aumentar sua estabilidade térmica e mecânica.

O aumento da meia-vida plasmática, além de aumentar a probabilidade de ligação da proteína ao seu alvo terapêutico devido ao maior tempo de residência, também permite a redução na dosagem e/ou um aumento nos intervalos de dose nos tratamentos. Adicionalmente, a prevenção da imunogenicidade não só é dada pela menor exposição de epítomos imunogênicos, mas também pela menor dosagem utilizada, levando a uma menor toxicidade (GINN et al., 2014; KOZLOWSKI; CHARLES; HARRIS, 2001; PASUT; SERGI; VERONESE, 2008; ROQUE et al., 2015).

As propriedades físico-químicas, biológicas e farmacêuticas da proteína peguillada variam de acordo com o número de moléculas de PEG que reagiram, a localização do PEG na proteína e a massa molecular e estrutura do PEG (linear/ramificado). É importante considerar que as proteínas peguilladas não apresentam alterações nas suas estruturas primárias e terciárias (BALAN et al., 2007; PELEGRI-O'DAY; LIN; MAYNARD, 2014).

Tabela 2. Conjugados peguילים aprovados pelo FDA (LI, 2013; TURECEK, 2016).

Nome comercial	Conjugados de PEG	Companhia	Tipo de peguilação	Tipo de PEG	Ano	Doença alvo
Adagen®	PEG-adenosina deaminase	Sigma-Tau	Aleatória	Linear 5 kDa	1990	Imunodeficiência combinada grave (SCID)
Oncaspar®	PEG-asparaginase	Enzon	Aleatória	Linear 5 kDa	1994	Leucemia linfoblástica aguda (LLA)
PEGIntron®	PEG-interferon α 2b	Schering-Plugh	Aleatória	Linear 12 kDa	2001	Hepatite C, esclerose múltipla, HIV/AIDS
Pegasys®	PEG-interferon α 2a	Hoffmann-La Roche	Aleatória	ramificado 40 kDa	2002	Hepatite C
Neulasta®	PEG-G-CSF	Amgen	Seletiva (N-terminal)	Linear 20 kDa	2002	Neutropenia durante quimioterapia
Somavert®	PEG- antagonista do receptor GH	Pfizer	Aleatória	Linear 5 kDa	2003	Acromegalia
Macugen®	PEG-aptanibe sódico	Eyeteck e Pfizer	Seletiva (Lisina única)	Ramificado 40 kDa	2004	Degeneração macular relacionada à idade (DMRI)
Mircera®	PEG-eritropoetina	Hoffmann-La Roche	Aleatória	Linear 30 kDa	2007	Anemia associada à insuficiência renal crônica
Cimzia®	Certolizumab pegol	UCB Pharma	Seletiva (Grupo tiol)	ramificado 40 kDa	2008	Doença de Crohn
Krystexxa®	PEG-uricase	Savient	Aleatória	Linear 10 kDa	2010	Gota crônica
Omontys®	PEG-inesatide	Takeda Pharmaceutic als America	Aleatória	ramificado 40 kDa	2012	Anemia associada à doença renal crônica
Movantik®	Naloxegol	AstraZeneca	Aleatória	Linear 339 Da	2014	Constipação induzida por opioides
Plegridy®	peginterferon beta-1	Biogen	Seletiva (N-terminal)	Linear 20 kDa	2014	Esclerose múltipla
GIS-PEG®	Griseofulvin	Valeant Pharms	-	Linear 8 kDa	2016	Infecções fúngicas

Apesar do grande número de características benéficas da peguilação, existem algumas desvantagens na sua utilização, como (ZHANG; LIU; WAN, 2014): diminuição de atividade pelo impedimento estérico da enzima ao substrato e heterogeneidade do produto conjugado ou polidispersão, o que pode alterar as características farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas de cada conjugado.

Com relação à diminuição da atividade, podemos citar a PEG-interferona $\alpha 2a$, fármaco que retém somente 7% da atividade antiviral da proteína nativa, mas é recompensado pelo considerável aumento na meia-vida (VERONESE; PASUT, 2005). A polidispersão, por sua vez, pode ser minimizada pelo emprego de reações sítio-dirigidas em que é possível controlar o número de moléculas de PEG e a posição na sequência proteica onde são ligadas, resultando em um produto reprodutível e pouco polidisperso (WU et al., 2013).

Existem muitas reações sítio-dirigidas, apresentadas na figura 2, em que é observado um equilíbrio entre a manutenção da atividade e a meia-vida da biomolécula. As principais ligações são as procedentes do grupo tiol, que vem dos resíduos de cisteína, e os grupos amínicos procedentes tanto dos resíduos de lisina quanto do grupo *N*-terminal. Esses resíduos apresentam uma reatividade química significativamente maior em relação aos outros resíduos de aminoácidos, portanto são preferencialmente utilizados para peguilação (ZHANG et al., 2012). A dificuldade de encontrar resíduos de cisteínas livres nas proteínas, que não formem pontes dissulfetos, restringe a exposição dos grupos tiol, diminuindo significativamente a possibilidade de peguilação neste tipo de grupamento. Mediante técnicas de engenharia genética é possível modificar um aminoácido da cadeia proteica de maneira a expor uma cisteína e conseguir uma peguilação específica. Não obstante, por essas dificuldades e pelo fato de ter diversos grupos aminos expostos nas proteínas, a maioria das reações de peguilação são realizadas em grupamentos amínicos (BROCCHINI et al., 2006; GINN et al., 2014).

Figura 2. Diferentes estratégias possíveis de peguilação sítio-dirigida (PFISTER; MORBIDELLI, 2014)

Embora a estratégia mais comum de peguilação de proteínas referira-se à peguilação em grupamentos amínicos (resíduos de lisina), essa abordagem apresenta baixa seletividade e envolve a ligação aleatória das cadeias de PEG, resultando em uma mistura de isômeros peguilados em diferentes posições, ou seja, um produto polidisperso e de baixa reprodutibilidade. Isto acontece devido ao fato da lisina ser um aminoácido abundante e geralmente exposto na superfície das proteínas. Alguns autores, por essa razão, não consideram a peguilação em resíduos de lisina como sítio-dirigida (GINN et al., 2014; PFISTER; MORBIDELLI, 2014).

2.3. Peguilação N-terminal

A peguilação N-terminal é uma das principais estratégias de peguilação sítio-dirigida. Considerando que cada cadeia proteica apresenta um grupo N-terminal, os sítios de peguilação são drasticamente reduzidos (GINN et al., 2014; PFISTER; MORBIDELLI, 2014). A peguilação N-terminal envolve a conjugação preferencial de uma molécula de PEG, utilizando-se principalmente PEG ativados de carbonatos ou carboxilatos, mediante um ataque nucleofílico pelo grupo amino da porção N-terminal da proteína em um carbono deficiente em elétrons do PEG reativo. Tem sido utilizada para a peguilação de

fator de crescimento epidermal (EGF), fator estimulante de colônias de granulócitos e interferona (KINSTLER et al., 1996; PELEGRI-O'DAY; LIN; MAYNARD, 2014).

Essa estratégia baseia-se no fato do grupo amino terminal apresentar menor valor de pKa (7,6 - 8,0) que os grupamentos amínicos de lisinas presentes na proteína (9,3 – 9,5) (Yu, 2010). Dessa maneira, a reação é realizada em condições de pH em que os resíduos de lisina estarão prevalentemente protonados, dificultando a reação com o PEG, enquanto que o grupo amino terminal encontra-se preferencialmente desprotonado e disponível para a ligação com o polímero (VERONESE; PASUT, 2005; WU et al., 2013).

Um dos PEG ativados utilizados nesta estratégia é o metoxi-polietilenoglicol carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS). O mPEG-NHS reage com aminas primárias para formar ligações amida estáveis e irreversíveis. As aminas primárias desprotonadas reagem com ésteres de *N*-hidroxisuccinimidil ester (NHS) por ataque nucleofílico e o grupo NHS (grupo de saída) é liberado com subproduto (ROBERTS; HARRIS, 2002), como representado na figura 3. O grupamento NHS é extremamente reativo e depende da estrutura molecular do mPEG-NHS e o local do grupo éster na cadeia. Assim, uma cadeia alifática de C3 entre PEG e NHS apresenta uma meia-vida ($t_{1/2}$) de hidrólise de 10 a 15 minutos, enquanto uma ligação C4 aumenta para 20 a 25 minutos (CREATIVE PEGWORKS, 2015; ZALIPSKY, 1998)

Figura 3. Reação de pegulação *N*-terminal empregando-se *N*-hidroxi succinimidil éster de PEG (mPEG-NHS). Em azul, tem-se a representação em fita da proteína.

(Fonte: baseado em www.iris-biotech.de/info_pegylation).

Uns dos principais fatores a serem estudados na otimização da peguilação *N*-terminal é a determinação das condições ótimas de pH para a reação, o que pode ser difícil pois pequenas alterações podem derivar em competição por outros grupos amínicos, além que o pH ótimo pode variar entre distintas proteínas (GINN et al., 2014). A síntese de subprodutos indesejados, como proteínas poli-peguiladas, apesar de significativamente reduzida, ainda acontece com essa técnica. Em adição a esses subprodutos, proteína não peguilada, excesso de PEG ativado e outras impurezas de baixa massa molecular precisam ser removidos ao final da reação para que se obtenha a proteína mono-peguilada pura. Em geral, a purificação de proteínas peguiladas é dada por cromatografia em coluna, mais especificamente por cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iônica (SHANG; YU; GHOSH, 2011; YU; GHOSH, 2010).

2.4. L-asparaginase

No contexto dos biofármacos e sua melhora como *biobetters*, a enzima L-asparaginase (ASNase) é um bom exemplo, sendo produzida nas ultimas décadas por fontes bacterianas e utilizada no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).

A LLA é um câncer de rápido crescimento nos glóbulos brancos, levando à proliferação descontrolada e ao acúmulo de linfoblastos (ou “blastos leucêmicos” que não funcionam como as células sanguíneas normais), diminuindo assim, por exemplo, a capacidade de proteção contra infecções e a eficiência dos processos de cicatrização (LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY, 2014). A LLA é o tipo de câncer mais comum em pediatria e representa aproximadamente 25% de todos os cânceres em pacientes menores de 15 anos (AL-MAHAYRI; PATRINOS; ALI, 2017). A incidência é maior entre as crianças com idades entre 2 e 3 anos e declina com a idade, também tem uma maior taxa de incidência em homens que em mulheres, assim como também é maior em pessoas de pele branca versus negros/africanos (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). Para o ano 2016, no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 10.070 novos casos de LLA, sendo 5.540 em homens e 4.530 em mulheres. O tratamento ocorre em três fases principais (figura 4), num tempo total de 2 - 2,5 anos: indução, consolidação e manutenção, sendo que nas duas primeiras fases é prescrita a L-asparaginase. O principal objetivo da terapia é induzir a completa remissão com a restauração da hematopoese normal (LOUREIRO et al., 2012; ORTEGA et al., 2007).

Figura 4. Ilustração das fases do tratamento pediátrico da leucemia linfoblástica aguda e dos fármacos utilizados na maioria dos protocolos (AL-MAHAYRI; PATRINOS; ALI, 2017).

A primeira observação importante da atividade da ASNase foi realizada por Clementi (1922), mas o potencial terapêutico desta enzima foi explorado pela primeira vez por Kidd (1953), que observou a atividade anti-linfoma do soro de porcos da Índia em ratos. Posteriormente, Broome (1963) descobriu que o efeito é devido à presença da enzima ASNase no soro. Como não foi possível obter quantidades suficientes da enzima a partir do soro de cobaia, Mashburn & Wriston (1964) e Campbell & Mashburn (1969) pesquisaram a possibilidade de obter esta enzima de fontes bacterianas, demonstrando que a ASNase da bactéria *E. coli* apresentava atividade antitumoral. Finalmente, em 1978, o FDA aprovou a ASNase de *E. coli* como biofármaco para o tratamento da leucemia. A introdução de ASNase no tratamento logrou que as taxas de sobrevivência em crianças aumentassem progressivamente para 90% entre os anos 2004 e 2010 (MAHAJAN et al., 2014; NAGARETHINAM et al., 2012; SOARES et al., 2002).

Existem três preparações da ASNase clinicamente aprovadas; duas são de formas nativas de fontes bacterianas: *Escherichia coli* (Kidrolase®, EUSA Pharma; Elspar®, Ovation Pharmaceuticals; Crasnitin™, Bayer; Leunase®, sanofi-aventis; Asparaginase Medac™, Kyowa Hakko) e *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®, EUSA Pharma), sendo essa última restrita para o uso em pacientes que demonstram reações alérgicas à ASNase de *E. coli*. A terceira é uma preparação de enzima de *E. coli* poli-peguilada (Oncaspar™, Enzon Pharmaceuticals Inc) (PIETERS et al., 2011; RIZZARI et al., 2013). Em fevereiro de 2016 foi aprovada pela Agência de Medicina da Europa (EMA) a primeira ASNase de

E. coli recombinante, chamada Spectrila (Laboratório MEDAC GmbH, Alemanha e produzido pela Wacker Biotech, Alemanha) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2017). A figura 5 apresenta o resumo das descobertas ao longo do tempo da ASNase.

Figura 5. Resumo dos avances na pesquisa e utilização de L-asparaginase (ASNase) no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA). FDA: USA *Food and Drug Administration*. EMA: *European Medicines Agency*.

Os efeitos antitumorais da ASNase são o resultado de sua ação catalítica na L-asparagina (L-Asn), um aminoácido indispensável para produção de proteínas celulares, convertendo-o em ácido L-aspartico e amônio, como é apresentado figura 6. O efeito anti-leucêmico da ASNase está associado com a capacidade de esgotar rápida e completamente a L-Asn no sangue circulante, levando as células leucêmicas à morte por apoptose. As células normais não são afetadas significativamente, porque possuem a capacidade de produzir L-Asn por meio da reação catalisada pela asparagina sintetase (AsnS), enquanto as células tumorais apresentam uma baixa ou nula atividade desta enzima, sendo sensíveis à depleção de asparagina (ADVANI, 2015; ASHRAFI et al., 2013; AVRAMIS, 2012; CHIEN et al., 2014; FERNANDEZ et al., 2014). Além disso, foi mostrado que terapia com ASNase interfere com as vias de sinalização celulares e inibe a expressão de fatores de tradução oncogênicos (VERMA et al., 2014). A depleção de L-Asn também provoca retardamento da biossíntese dos nucleotídeos, prolonga a fase S do ciclo celular, bloqueia as células cancerosas na fase G1, antes da duplicação do DNA (KRISHNAPURA; BELUR; SUBRAMANYA, 2016). Existe uma concentração de L-Asn no sangue aproximada de 50 μM , e é reportado que a quantidade mínima de ASNase no

soro tem que ser de 0,1 U/mL para a depleção da L-Asn ser suficiente (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Figura 6. Representação esquemática da atividade hidrolítica da L-asparaginase (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

O potencial da ASNase como fármaco antineoplásico para a LLA continua sendo um tema de discussão, devido à alta incidência de reações alérgicas apresentadas nos pacientes. Aproximadamente 1-2% dos pacientes pediátricos de LLA morrem por consequência dos efeitos secundários da terapia e não pela própria doença (AL-MAHAYRI; PATRINOS; ALI, 2017; GUILLEME; DELGADO; NAVARRO, 2013). Os principais efeitos secundários na terapia com a ASNase são: disfunção hepática, diarreia, vômitos, pancreatite e transtornos de coagulação que podem levar à trombose ou hemorragia, além dos efeitos visíveis como pruridos e hipersensibilidade (KOTZIA; LABROU, 2007; NARAZAKI et al., 2012). As complicações imunológicas são atribuídas à estrutura complexa da ASNase, um tetrâmero com quatro subunidades idênticas, com massa molecular de 136-140 kDa, representado na figura 7. Dessa maneira, a enzima é reconhecida pelo sistema imune dos pacientes como um agente exógeno, o que resulta na geração de anticorpos anti-ASNase. Além das complicações imunológicas, os anticorpos resultam em elevada taxa de inativação silenciosa da enzima (CHIEN et al., 2014; NAGARETHINAM et al., 2012).

Figura 7. Representação esquemática do cristal de L-asparaginase de *Escherichia coli* na esquerda (Fonte: PDB, cod.3ECA) e de L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* na direita (Fonte: PDB, cod.5F52)

As reações de hipersensibilidade, devido à produção de anticorpos, são observadas em 60% dos pacientes que fazem uso da enzima derivada de *E. coli*. A fim de reduzir a reação adversa causada pela quimioterapia, foi desenvolvida a PEG-ASNase (conjugada com polietilenoglicol) que apresenta, a vantagem de ter um período de meia-vida biológico maior que ASNase nativa (PIETERS et al., 2011). Entretanto, é comprovada a existência de reação-cruzada entre anticorpos desenvolvidos nos pacientes previamente tratados com ASNase nativa e PEG-ASNase, inviabilizando a mudança de uma para outra. A alternativa quando há reação a alguma das formulações de *E. coli* é substituí-la pela enzima proveniente de *E. chrysanthemi* (PIETERS et al., 2011; RIZZARI et al., 2013).

A PEG-ASNase de *E. coli*, comercialmente conhecida como Oncaspar®, foi desenvolvida pela primeira vez nos anos 70, sendo submetida aos primeiros ensaios clínicos em 1984. Foi aprovada pelo FDA como tratamento pra LLA em 1994 para pacientes apresentando hipersensibilidade à isoforma nativa da ASNase e no ano 2006 foi aprovada como primeira linha no tratamento de LLA nos EUA e alguns países da Europa (DINNDORF et al., 2007). Entretanto, a ASNase nativa de *E. coli* continua sendo a terapia de primeira linha na maioria dos países onde o produto peguilado não está disponível ou é muito caro (SALZER et al., 2014).

A PEG-ASNase é preparada pela ligação covalente de cadeias de PEG de massa molecular de 5000 Da à resíduos de lisina. Estima-se que entre 69 e 82 moléculas de PEG sejam aleatoriamente conjugadas à molécula de ASNase, resultando em uma

mistura complexa de diferentes conjugados PEG-ASNase, apresentando 50% da atividade *in vitro* comparada com a enzima não modificada (ABRIBAT; SAINTE FOY LES LYON, 2012).

Em proteínas peguiladas, as cadeias do polímero podem ser um obstáculo para a interação com moléculas grandes, tais como anticorpos e outras proteínas. Para a PEG-ASNase, o substrato é uma molécula pequena (L-Asn) que pode penetrar através dessa barreira e chegar ao sítio ativo (PASUT; SERGI; VERONESE, 2008). Ettinger et al. (1994) relataram ausência de anafilaxia, reduzindo a incidência de pancreatite e hiperglicemia durante o tratamento com PEG-ASNase (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Três de cada cinco pacientes com LLA desenvolvem anticorpos anti-ASNase de *E. coli*, porém só um dos cinco pacientes apresenta anticorpos anti-PEG-ASNase. Ainda assim, anticorpos anti-ASNase já formados podem reconhecer a PEG-ASNase (AVRAMIS, 2012).

A Tabela 3 apresenta as principais diferenças da enzima peguilada em comparação à enzima sem modificações, destacando-se a queda acentuada na presença de anticorpos anti-ASNase, mas também diminuição da afinidade ao substrato (portanto da atividade enzimática). O aumento da meia-vida plasmática, entretanto, reduz significativamente o intervalo e número de doses. Estudos clínicos relatam que uma dose de PEG-ASNase pode substituir múltiplas doses de ASNase nativa (AVRAMIS, 2012; PASUT; VERONESE, 2009).

Tabela 3. Principais características *in vivo* da enzima ASNase.
(AVRAMIS, 2012; EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016)

Característica	ASNase de <i>E. coli</i>	ASNase de <i>E. chrysanthemi</i>	PEG-ASNase
Meia vida	1,28 dias IM 0,76 dias IV	0,65 dias IM 0,31 dias IV	5,73 dias IM
Presença de anticorpos	45-75%	30-50%	5-18%
Afinidade ao substrato (Km)	12,5 - 15 μ M	48 μ M	70 μ M
Tratamento	doses de 6000UI/m ² a cada 48 h (15 doses)	3 doses semanais de 25000 UI/m ² por duas semanas	doses de 2500 UI/m ² a cada duas semanas (3 doses)

2.5. L-asparaginase de *E. chrysanthemi*

A ASNase de *E. chrysanthemi*, ou crisantaspase, foi aprovada no ano 2011 nos EUA como segunda opção terapêutica para o tratamento de LLA em pacientes que desenvolvem hipersensibilidade a outras formulações de ASNase (SALZER et al., 2014). Suas principais características são apresentadas na tabela 4. Esta enzima é imunologicamente distinta da asparaginase de *E. coli* e não apresenta reação-cruzada com anticorpos anti-ASNase de *E. coli* (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). Entretanto, em pacientes adolescentes e adultos jovens (AYA, adolescent and young adult, 16–39 anos) observou-se 10,9% de hipersensibilidade, 6,1% de hiperglicemia, 4,1% de trombozes e 3,4% de pancreatites com o uso de crisantaspase (SALZER et al., 2014).

Crisantaspase é considerada uma ASNase do tipo II, semelhantemente à de *E. coli*, apresentando estrutura altamente conservada. Como a maioria das ASNases provenientes de bactérias, é um homotetrâmero com 4 sítios ativos entre os domínios N- e C-terminal de dois monômeros adjacentes e apresenta massa molecular de aproximadamente 140 kDa (KOTZIA; LABROU, 2007). Exibe uma atividade asparaginasica mais elevada, cerca de duas vezes superior à ASNase de *E. coli*, sendo favorável para seu efeito anticancerígeno (NGUYEN; SU; LAVIE, 2016). Estudos clínicos mostram efeitos similares para as ASNases de *E. coli* e de *E. chryshantemi* mas, embora a crisantaspase seja capaz de depletar a L-Asn com pouca estimulação do sistema imune, apresenta uma meia vida menor que as enzimas de *E. coli*, precisando de doses mais frequentes (AVRAMIS, 2012). Em administração intra-muscular (IM) apresenta uma meia vida de 15,6 h e em administração intra-venosa (IV) tem uma meia vida ainda menor de 7,44 h (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). A terapia normal com esta enzima é uma terapia de indução de 30.000 U/m²/dia intramuscular, por 10 dias, e re-indução de 25.000 U/m² três vezes por semana, por duas semanas, como é apresentado na tabela 4 (AVRAMIS, 2012).

Para melhorar as propriedades farmacocinéticas e reduzir a imunogenicidade, recentemente as empresas Jazz Pharmaceuticals e a Aliz'e Pharma associaram-se para desenvolver uma ASNase recombinante peguilada derivada de Erwinia (Asparec® ou pegcrisantaspase), cuja formulação utiliza um PEG de 5 kDa e é ligado aleatoriamente nos resíduos de lisina, similar à formulação de Oncaspar®, com a ligação de 28 a 52 de

moléculas de PEG ao tetrâmero e uma massa molar do monômero aproximada de 85 kDa (ABRIBAT; SAINTE FOY LES LYON, 2012; CHIEN et al., 2014; SALZER et al., 2014).

Tabela 4. Características da enzima asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* (KOTZIA; LABROU, 2007; NGUYEN; SU; LAVIE, 2016).

Característica	Valor
Aminoácidos	348 por monómero
Peptídeo sinal	21 aminoácidos
Resíduos de aminoácidos que interagem com o substrato	116-117
Massa molar monômero	35-37 kDa
Atividade específica	650-700 U/mg
k_M (μ M)	48

3. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho constituiu o desenvolvimento de um protocolo de peguilação *N*-terminal da enzima L-asparaginase de *E. chrysanthemi*, expressa em *E. coli*, para o qual as seguintes etapas foram estabelecidas:

- Produção da enzima crisantaspase mediante cultivo de *E. coli* BL21 recombinante;
- Estudo da lise celular por ultrassom e choque osmótico para obtenção de crisantaspase;
- Desenvolvimento de um protocolo de purificação da crisantaspase por técnicas de cromatografia;
- Desenvolvimento de protocolo de peguilação *N*-terminal da crisantaspase;
- Desenvolvimento de um protocolo de purificação da enzima mono-peguiada *N*-terminal;
- Determinação de parâmetros cinéticos da PEG-crisantaspase e crisantaspase;
- Estudo da estabilidade da PEG-crisantaspase e crisantaspase.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

A enzima foi obtida a partir do cultivo da cepa *E. coli* BL21 (DE3) recombinante com o vetor pET15b com o gene para a produção de ASNase de *Erwinia chrysanthemi*. A cepa de *E. coli* geneticamente modificada, foi fornecida pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Gisele Monteiro da Souza do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo (FCF/USP).

O polímero empregado nos estudos de peguilação, metoxi-polietilenoglicol carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS) 10 kDa), foi adquirido da NANOCS (New York, NY). Todas as soluções tampão foram preparadas com água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Metodologia

4.2.1. Preparo do estoque de células da *E. coli* BL21

Para o estabelecimento das culturas-estoque, a cepa de *E. coli* BL21 recombinante produtora de crisantaspase, foi cultivada em agitador metabólico, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultura Luria Bertani ou LB (composição: triptona 10 g·L⁻¹, extrato de levedura 5 g·L⁻¹ e NaCl 10 g·L⁻¹) a 37 °C por 18 h (250 rpm). O cultivo foi então fracionado em tubos com 200 µL cada com 10% de glicerol como agente crioprotetor e armazenadas a -80 °C. Todos os procedimentos foram realizados em esterilidade.

4.2.2. Cultivo de *E. coli*

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio LB suplementado com 50 µg·mL⁻¹ de ampicilina, foram inoculados 100 µL da cultura estoque (*E. coli* BL21) armazenada em 10% de glicerol. O pré-inóculo foi realizado por 16 h a 37°C em agitador metabólico a 180 rpm.

Os cultivos foram desenvolvidos de duas maneiras. Primeiro em agitador metabólico, com 500 mL de meio de cultura em frasco Erlenmeyer de 2 L, com 10% do pré-inóculo, a 37 °C e 180 rpm. Segundo em biorreator Bioflo 115 de 2 L (New Brunswick), a 37 °C, com 600 rpm e 1 vvm. Os dois foram cultivados até densidade ótica a 600 nm (OD600nm) de aproximadamente 0,7-0,8. As medidas de absorbância (densidade ótica) foram realizadas em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384. Em seguida, foi adicionado o indutor IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) a 0,1 mM concentração final, e os cultivos incubados por 3 h a 37 °C. Finalmente, o meio contendo as células foi centrifugado a 8.000xg por 30 minutos; o sobrenadante foi descartado e as células recuperadas foram ressuspensas em água Milli-Q e centrifugadas novamente sob as mesmas condições. Em seguida, elas foram utilizadas para a extração da enzima de interesse ou armazenadas a -20 °C para futura utilização.

4.2.3. Determinação da concentração celular

A biomassa (X) foi determinada pela medição de densidade ótica em relação à massa celular seca obtida pelo método de secagem em membrana. As células foram crescidas em 25 mL de meio a 37 °C e 180 rpm (16 h). Foram feitas sete diluições com distintos valores conhecidos de densidade ótica. De cada diluição se utilizaram alíquotas de 5 mL para medir a massa seca mediante a filtração a 0,22 μm. Após secagem, o filtro foi pesado em balança térmica Analítica UniBloc SHIMADZU e, descontando-se o peso do filtro previamente pesado, obteve-se o valor de massa seca segundo a equação 1.

$$X(g \cdot L^{-1}) = \frac{(Mf - M0)}{5} * 1000 \quad (Equação 1)$$

Em que,

X = concentração da biomassa (g·L⁻¹)

Mf = massa do filtro com as células depois da secagem (g)

M0 = massa inicial do filtro (g)

A partir dos valores obtidos, uma curva de correlação entre massa seca e absorbância foi construída. Durante os cultivos foi medida a OD600nm e a concentração de biomassa foi obtida pela equação de linearidade da curva de correlação.

4.2.4. Determinação de glicose

A glicose foi medida pelo método enzimático de glicose-oxidase (THOMAS et al., 1968), usando o Kit Glicose Bioliquid (Laborclin, Paraná, Brasil). Ele baseia-se na oxidação da glicose catalisada pela glicose-oxidase, de acordo com a seguinte reação:

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado reage com a 4-aminofenazona e hidroxibenzoato presentes no meio, sob a ação da peroxidase, formando antipirilquinonimina que apresenta uma coloração vermelha medida por espectrofotometria a 505 nm.

4.2.5. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa)

Os ensaios para determinação de kLa foram executados mediante o uso de um eletrodo específico para medir oxigênio em meio líquido (InPro 6800 da Mettler Toledo, Ohio, USA). Primeiro, foi removido todo o oxigênio dissolvido borbulhando nitrogênio no meio. A medição foi realizada no biorreator de 2 L (Bioflo 115 da New Brunswick). Em seguida, iniciou-se a aeração (1 vvm) e a agitação (600 rpm). Foram registrados os valores do sinal da sonda e o tempo até o valor 100%.

Segundo o método de Pirt (1975), durante o período de aeração a concentração de oxigênio dissolvido (C) varia em função do tempo e pode ser descrita pela equação 2 que, ao integrar, resulta na equação 3.

$$\frac{dC}{dt} = kLa \cdot (C_s - C) \quad (\text{Equação 2})$$

$$\ln(C_s - C) = -kLa \cdot t \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

C_s = concentração de saturação de oxigênio dissolvido ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

C = oxigênio dissolvido ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

kLa = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O valor do kLa foi determinado pela inclinação da curva na relação linear do $\ln(C_s - C)$ em função do tempo (h).

4.2.6. Cálculo da Velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max})

A velocidade específica de crescimento (μ_x) é a capacidade celular de produzir biomassa em função do tempo, ou seja, massa de célula formada por unidade de massa de célula presente no cultivo por unidade de tempo. Ela é expressa segundo a equação 4 para um processo descontínuo (sem variação de volume, nem entradas ou saídas) (VITOLO, 2015).

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 4})$$

A equação 5 (obtida da integração da equação 4) e a equação 6 (expressa como uma equação da reta) representam o crescimento de uma população microbiana.

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_x(t - t_0) \quad (\text{Equação 5})$$

$$\ln(X - X_0) = \mu_x(t - t_0) \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:

X = Biomassa final num determinado tempo ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

X_0 = Biomassa inicial num determinado tempo ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$t - t_0$ = intervalo de tempo (h)

μ_x = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

Assim, μ_x é obtido como a inclinação da reta, no trecho linear, obtida do logaritmo neperiano da biomassa (X) sobre a biomassa inicial (X_0) [$\ln(X - X_0)$] em função do tempo (h). Ao trabalhar no intervalo de tempo correspondente à fase exponencial do crescimento, μ_x pode ser considerada como a velocidade específica máxima (μ_{max}) e é expressa em h^{-1} .

4.2.7. Cálculo da Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica determina a concentração de produto (atividade ASNase) acumulada em um volume de cultivo durante um período de tempo. O valor da produtividade volumétrica foi determinado pelo produto da concentração da biomassa (X) e a produtividade específica de cada célula (U por grama de células) durante o tempo de cultivo (Equação 7).

$$Qp = \frac{(Q_{p/x} \cdot X)}{t} \quad (\text{Equação 7})$$

Em que:

Qp = produtividade volumétrica ($U \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

$Q_{p/x}$ = produtividade específica de células ($U \cdot g^{-1}$)

X = biomassa ($g \cdot L^{-1}$)

t = tempo de cultivo (h)

O valor da $Q_{p/x}$ foi determinado pela relação da atividade ASNase total (U) e massa de célula (g) do cultivo, expresso como $U \cdot g^{-1}$.

4.2.8. Extração da L-Asparaginase

4.2.8.1. Lise celular por ultrassom

As células obtidas a partir do cultivo de *E. coli* BL21 (item 4.2.2) foram ressuspensas em 25 mL do tampão de lise: fosfato de potássio 20 mM, pH 5,5, com adição de 1mM de PMSF (fenilmetilsulfonilflúor). Elas foram submetidas a rompimento por sonda de ultrassom com 30% de amplitude por distintos intervalos de tempo, com ciclo de 20 segundos *ON* e 59 segundos *OFF* (submersa no banho de gelo com 10% de NaCl). O homogeneizado celular foi centrifugado a 16000xg a 4°C por 30 min. O sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,45 µm e foi utilizado para as seguintes etapas de purificação.

4.2.8.2. Choque osmótico

As células obtidas segundo o item 4.2.2 foram submetidas à metodologia adaptada de Neu *et al.* (1965). Primeiro foram suspensas em tampão Tris-HCl 33 mM (pH 7,2), sacarose 20% e EDTA 1,0 mM, agitadas levemente por 10 min e, imediatamente, centrifugou-se a 10000xg por 25 min a 4°C. Foi avaliada a presença de ASNase no sobrenadante mediante o perfil de proteínas em SDS-PAGE. O *pellet* foi utilizado para a segunda etapa, em que as células foram suspensas em $MgCl_2$ 0,5 M, agitadas levemente por 10 min e centrifugadas (nas mesmas condições da primeira etapa). O sobrenadante foi avaliado por SDS-PAGE.

4.2.9. Purificação da enzima crisantaspase

4.2.9.1. Cromatografia de troca catiônica

Foi utilizada a coluna cromatográfica de troca catiônica forte, HiTrap SP FF 5 mL (GE Healthcare), empregando-se o equipamento do tipo Fast Protein Liquid Chromatography (AKTA FPLC, GE Healthcare). Primeiro, a coluna foi equilibrada em um fluxo de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e com 5 volumes de coluna (CV, *column volume*), empregando-se tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 5,5. Procedeu-se à injeção da amostra na coluna. Os 25 mL do extrato proteico obtido após lise celular por ultrassom foram injetados mediante bomba peristáltica num fluxo de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Para o extrato proteico do choque osmótico, primeiro realizou-se uma troca de tampão, em tubos Amicon® Ultra-15 MWCO 10 kDa (Merck Millipore), até obter uma amostra com volume de 5 mL no tampão de equilíbrio. A amostra foi injetada em um fluxo de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A lavagem das proteínas não ligadas na coluna ocorreu com 3 CV, mantendo-se o tampão de equilíbrio e fluxo $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Para a eluição da ASNase empregou-se duas diferentes metodologias: (i) gradiente linear de pH, com o tampão B fosfato de potássio pH 8,5 (20 mM) em 10 CV e fluxo de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; e (ii) eluição em *step* com 3 CV de tampão fosfato de potássio, 20 mM, pH 7,5 em fluxo de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Finalmente, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio com 1 M de NaCl, em 5 CV e fluxo de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Frações de 0,5 mL foram coletadas e mantidas a 4°C até a determinação da atividade enzimática. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado a 280 nm e confirmado mediante eletroforese em gel SDS-PAGE 10%. As frações que apresentaram maiores proporções de ASNase foram reunidas e armazenadas a 4°C para a etapa seguinte.

4.2.9.2. Cromatografia de exclusão molecular

A amostra purificada por troca catiônica foi concentrada em tubos Amicon® 10 kDa até 500 μL e injetada em coluna de exclusão molecular previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5. A coluna utilizada foi a Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences) e a eluição isocrática foi realizada com o equipamento AKTA FPLC. Foram coletadas alíquotas de 1 mL para determinação de atividade e análise por eletroforese. As frações que apresentaram atividade foram armazenadas a 4°C .

4.2.10. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de ácido bicinonínico (BCA), com o BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Foram adicionados 25 µL de amostra em 200 µL do tampão de reação (4% sulfeto de cobre (II) e ácido bicinonínico na razão 1:50) e incubados a 37° C por 30 min. Em seguida, mediu-se a absorbância a 562 nm. A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de Albumina de Soro Bovino (BSA).

4.2.11. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade da ASNase foi determinada pela técnica de Nesslerização de acordo com protocolo adaptado de Imada *et al* (1973). O reagente de Nessler (solução alcalina de tetraiodomercurato (II) de potássio) permite detectar o amônio por formação de um precipitado de cor castanha. A reação é descrita por:

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), 100 µL de asparagina 189 mM, 900 µL de água Milli-Q e 100 µL da solução enzimática. Em seguida, os tubos foram suavemente agitados (manualmente) e incubados a 37°C durante 30 min, quando então a reação foi interrompida com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M. Após essa etapa, 200 µL dos tubos de reação foram adicionados em 4,3 mL de água Milli-Q, e 500 µL do reagente de Nessler. As amostras foram suavemente agitadas (manualmente) e quantificadas imediatamente por espectrofotometria em leitor de microplacas a 436 nm e temperatura ambiente (25°C). O branco foi preparado substituindo-se 100 µL da solução enzimática pela mesma quantidade de água ultra purificada. A curva padrão foi realizada com distintas concentrações de sulfato de amônio. Uma unidade de asparaginase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de amônia por min a 37°C.

4.2.12. Zimografia

A atividade enzimática da fração purificada foi analisada por zimografia em gel de poliacrilamida a 10%, empregando-se metodologia descrita por Laemmli (1970) mas sem componente desnaturante (SDS). A análise de atividade enzimática no gel foi realizada pelo método de detecção do ácido L-aspartil-*b*-hidroxâmico (AHA). Este método utiliza o cloreto férrico que reage com o AHA, derivado da hidrólise de L-Asn pela enzima ASNase, formando o composto *b*-hidroxamato aspártico férrico que possui uma coloração marrom, como é apresentado na figura 8.

Figura 8. Reação de hidrólise da L-Asn por a enzima L-aparaginase e a formação do subproduto de b-hidroxamato aspártico férrico em presença de cloreto férrico..

4.2.13. Peguilação da enzima crisantaspase

A uma solução de concentração conhecida de enzima, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5-9,0, foi adicionada uma solução de metóxi-poli(etilenoglicol) carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS), na proporção molar de 1:50. A reação foi mantida sob agitação a 22 °C por 30 min. Em seguida, uma solução de hidroxilamina 2 M foi adicionada à mistura reacional de modo a clivar qualquer sítio instável de peguilação que tenha sido formado na proteína (KINSTLER et al., 1996). A reação foi avaliada mediante eletroforese SDS-PAGE 10%.

Para as reações de peguilação, os géis de eletroforese foram analisados pelo *software* ImageJ, que calcula a área e o valor estatístico dos pixels de seções definidas de uma determinada imagem. A porcentagem de enzima peguilada foi obtida considerando-se 100% todas as bandas presentes no *mix* reacional para cada pH avaliado.

4.2.14. Peguilação com solventes orgânicos

Na tentativa de aumentar o rendimento da reação de peguilação, estudamos diferentes solventes orgânicos para evitar a hidrólise do PEG reativo. Neste estudo foi utilizada a ASNase de *E. coli* comercial. Primeiro foi avaliada a estabilidade da enzima em presença de 0, 10, 20 e 30% de dimetilformamida (DMF) e 0, 20, 30 e 40% de tetrahydrofurano (THF). A enzima foi mantida sob agitação a 22 °C e a atividade foi avaliada segundo o item 4.2.11 depois de 30 e 60 min. Para o processo de peguilação a ASNase foi diluída em PBS 100 mM, pH 7,5 e o mPEG-NHS no solvente orgânico. A solução de PEG reativo em solvente foi adicionada aos poucos (gotejando) à solução de ASNase, durante um tempo total de 30 min até atingir a concentração máxima de solvente na qual a enzima apresenta-se estável. A razão molar enzima:PEG no volume final foi mantida em 1:50. Ao final da adição do PEG, 2 M de hidroxilamida foram adicionados. O resultado foi avaliado em gel de eletroforese SDS-PAGE 10% e o rendimento foi calculado com auxílio do *software* ImageJ.

4.2.15. Purificação da PEG-crisantaspase

Para purificação da PEG-crisantaspase, foram realizadas duas tentativas:

1.- Cromatografia de troca catiônica (coluna HiTrap SP FF 5 mL, GE Healthcare) em gradiente de sal até 1 M de NaCl, em 20 CV e fluxo de 3 mL·min⁻¹. As frações da troca catiônica foram reunidas, concentradas em filtros Amicon® Ultra-15 MWCO 10 kDa (Merck Millipore) até 0,5 mL e injetadas na coluna de exclusão molecular (Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE Life Sciences). A eluição isocrática foi realizada com tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5, em fluxo de 0,75 mL·min⁻¹. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas e o perfil cromatográfico foi avaliado mediante SDS-PAGE 10%.

2.- Cromatografia de exclusão molecular, na mesma coluna mencionada anteriormente e com tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5, em fluxo de 0,1 mL·min⁻¹. Novamente foram coletadas alíquotas de 0,5 mL e avaliadas pela atividade enzimática.

4.2.16. Cinética enzimática

A cinética enzimática foi realizada para a crisantaspase nativa e mono-peguiada, mediante o ensaio acoplado à glutamato desidrogenase. Este ensaio mede a oxidação do NADH à NAD⁺ pela glutamato desidrogenase (GDH), do qual é cofator. A GDH oxida uma molécula de NADH para a síntese de cada molécula de glutamato, a partir de uma molécula de α -cetoglutarato e uma molécula de amônia (Balcão *et al.*, 2001). No ensaio acoplado, a molécula de amônia provém da hidrólise da asparagina pela crisantaspase. No ensaio foi utilizado 400 mU de GDH de soro bovino, 1 mM de α -cetoglutarato e 131 μ M de β -NADH. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tamponados com Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). A concentração de L-Asn variou-se de 10 a 2000 μ M, enquanto a enzima foi utilizada a 4 nM para crisantaspase e 10 nM para monoPEG-crisantaspase. A oxidação do NADH foi monitorada em tempo real a 340 nm em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384, considerando-se como coeficiente de extinção molar do NADH o valor de 6,1 μ M⁻¹·cm⁻¹ (calculado). O branco foi realizado sem o β -NADH e de cada ensaio foi descontado o controle (sem enzima).

Os modelos matemáticos foram realizados empregando-se o software GraphPad Prism 5, sendo aplicado o modelo de Michaelis-Menten (curva hiperbólica) e hipótese nula ($p < 0,005$). Foram calculados os parâmetros cinéticos tais como velocidade máxima ($V_{\max}$), número de renovação (k_{cat}) e constante de Michaelis-Menten (k_M) e constante de especificidade (k_{cat}/k_M).

4.2.17. Estabilidade enzimática

A estabilidade da monoPEG-crisantaspase e da crisantaspase em função da temperatura foi estudada, para valores de 25 a 75 °C, acompanhado-se a atividade residual pelo método de Nessler (item 4.2.10). A estabilidade das duas enzimas ao longo do tempo também foi estudada armazenando-se as mesmas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, a 4 °C e quantificando a atividade específica durante 35 dias. Os dados são apresentados como atividade residual ($A/A_{\max}$), em que a atividade máxima ($A_{\max}$) corresponde à atividade a 55 °C para estabilidade térmica e à atividade no $t = 0$ para estabilidade ao longo do tempo. Foi realizado o teste de ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, com p -valor=0,005.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo da cepa *E. coli* recombinante

5.1.1. Curva correlação de biomassa

Para obter a concentração de massa celular seca (biomassa), foi determinada a absorbância (densidade óptica) das amostras a 600 nm (OD_{600nm}) de 6 diluições diferentes (em triplicata) e feita uma regressão linear com a massa seca, realizada segundo o item 4.2.3 e apresentada na figura 9. A equação da reta obtida, $OD_{600nm} = 0,928 * biomassa + 0,088$, foi utilizada para calcular todas as concentrações de biomassa (X).

Figura 9. Curva correlação entre concentração celular em função da massa seca e OD_{600nm} para a cepa recombinante *E. coli* BL21 expressando crisantaspase.

5.1.2. Cultivo em agitador orbital

O hospedeiro utilizado nesta produção de crisantaspase recombinante foi a linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*, uma forma modificada da *E. coli*, que produz pouco acetato, sendo deficiente em duas proteases codificadas pelos genes lon (protease citoplasmática) e ompT (protease periplasmática), as quais participam na degradação de proteínas recombinantes.

Também, deve-se considerar que o crescimento bacteriano tem quatro fases típicas ao longo do tempo, representadas na figura 10: (1) fase lag ou de adaptação ao meio; (2) fase exponencial ou logarítmica, em que ocorre o maior aumento de biomassa com divisão celular em velocidade máxima e constante; (3) fase estacionária, quando existem condições limitantes de substrato e as velocidades de crescimento e morte celular são semelhantes, portanto a biomassa se mantém constante; e (4) fase de morte, como consequência do esgotamento de nutrientes ou níveis tóxicos de subprodutos (MOULTON, 2014).

Figura 10. Curva logarítmica de crescimento típico para bactérias (MOULTON, 2014).

Além disso, o meio complexo Luria Bertani (LB) é um meio de cultivo comum para a bactéria *E. coli*, porque sua formulação é fácil e permite rápido crescimento celular, sendo que o extrato de levedura (incluso no meio LB) tem um papel benéfico para manter o nível de expressão de proteínas recombinantes (Panda *et al.*, 2000). Para o crescimento da bactéria *E. coli*, em agitador metabólico e meio LB, foi estimado que a fase de crescimento exponencial acaba numa OD600nm entre 0,6 a 1,0. Ainda assim, é reportado que a biomassa pode continuar aumentando até uma OD600nm de 7 após de 24 h (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D 'ARI, 2007). Nesse trabalho, a *E. coli* BL21 recombinante foi cultivada em meio LB com um pré-inóculo de 16 h, atingindo uma OD600nm equivalente a 2,76 em 50 mL de meio L.B. O cultivo começou com inóculo de 10% e a figura 11 representa o crescimento celular do cultivo sem indução.

Figura 11. (A) Curva de crescimento celular da cepa recombinante *E. coli* BL21 em agitador metabólico e meio LB sem indução. **(B)** Representação logarítmica de biomassa em função do tempo.

Uma fase *lag* curta (0,5 h) foi observada, seguida de uma fase exponencial de 3 h com μ_{max} de $0,66 \text{ h}^{-1}$ (figura 11B) e alcançando uma biomassa seca de $1,14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Antes de entrar em fase estacionária, o cultivo bacteriano apresenta diminuição da taxa de crescimento devido ao esgotamento dos nutrientes no meio de cultura e ao acúmulo de inibidores, atingindo $2,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em 13 h de cultivo.

Nos cultivos seguintes a indução com IPTG foi feita com 2 h de crescimento, tempo correspondente à metade da fase exponencial, equivalente a uma OD_{600nm} de 0,7-0,8 (representada na figura 12). Nesta etapa do cultivo, as células estão com a maior velocidade específica de crescimento (μ_{max} de $0,73 \text{ s}^{-1}$ como apresenta a figura 12B) e o metabolismo celular está acelerado, portanto é o momento ideal para realizar a indução. A fase exponencial se estendeu por meia hora após a indução, pois a adição de IPTG ativa a transcrição do vetor, mudando o metabolismo celular que passa a priorizar a produção da proteína recombinante, provocando uma redução na produção de biomassa devido à competição desigual pelo aparelho de tradução (ROZKOV et al., 2004). Portanto, ocorre uma diminuição em μ_{max} , o que acelera o início da fase estacionária. Ao final do cultivo foi obtida uma massa seca de $2,09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Figura 12. (A) Curva de crescimento celular da cepa recombinante *E. coli* BL21 com indução de IPTG em agitador metabólico e da atividade de crisantaspase no cultivo em função do tempo **(B)** Representação logarítmica de biomassa como função do tempo.

Como pode ser observado na figura 12A, a atividade da crisantaspase aumenta logo após a indução, atingindo na primeira hora de indução uma atividade total de 930 U. Nas horas seguintes, a atividade se manteve constante mostrando que não é necessário um tempo maior para conseguir obter a maior produção de enzima.

A eficiência de um cultivo é medida pela produtividade e não só pela atividade total produzida, sendo que a produtividade volumétrica determina a quantidade de produto obtido em certo período e volume de produção (COONEY, 1983). A atividade enzimática foi medida diretamente das células pelo método de Nessler e a produtividade calculada segundo o item 4.2.6. Ao final do cultivo, obteve-se atividade de 881 U·g⁻¹ de biomassa seca, com 1843 U·L⁻¹ de cultivo e uma produtividade volumétrica de 335 U·L⁻¹·h⁻¹ (Tabela 5).

5.1.3. Cultivo em Biorreator

A *E. coli* apresenta metabolismo aeróbio facultativo, que permite assimilar a fonte de carbono para o crescimento com maior eficiência em condições aeróbias. Em condições de anaerobiose, entretanto, a *E. coli* pode formar subprodutos do metabolismo como etanol, acetato, lactato, succinato e formiato (CLARK, 1989; VUORISTO et al., 2015). De todos esses subprodutos, o acetato é o mais importante porque pode levar à inibição do crescimento e, inclusive, inibir a expressão de proteínas recombinantes (JENSEN; CARLSEN, 1990). Portanto, o fornecimento de oxigênio é essencial para

favorecer o crescimento celular, assim como a agitação é importante para promover a difusão de oxigênio no meio de cultivo, além de promover a difusão dos nutrientes, garantindo um meio homogêneo (VITOLLO, 2015).

Assim, para escalonar o processo na tentativa de aumentar a produção de biomassa e a quantidade de crisantaspase, a cepa recombinante de *E. coli* BL21 foi cultivada em biorreator esperando-se ter uma maior densidade celular devido ao melhor controle da oxigenação em relação aos cultivos desenvolvidos em agitador orbital.

Na otimização da transferência de oxigênio, de acordo com a equação 3 (item 4.2.5), pode-se: (i) aumentar a agitação, ocorrendo aumento de a (área de gás por volume de líquido) pois diminui o tamanho das bolhas de ar, e do kLa (pois reduz a resistência da película líquida); ou (ii) aumentar a vazão de ar que produz um aumento de a (VITOLLO, 2015). Para o cultivo de *E. coli* BL21 recombinante em biorreator descontínuo, foram utilizados os parâmetros comumente descritos na literatura para o cultivo desta cepa: agitação de 600 rpm e oxigenação de 1 vvm (LI; WILLARD; SHA, 2014; MIRRO, 2011; ROBICHON et al., 2011). No entanto, é preciso calcular o valor de kLa , para assegurar a mesma transferência de oxigênio independente das condições ou equipamentos utilizados. Assim, o cálculo de kLa é representado na figura 13 (mediante o método de Pirt segundo o item 4.2.5), sendo que obtivemos um valor de 206 h^{-1} .

Figura 13. Determinação do kLa mediante o método do Pirt. O valor de kLa corresponde ao coeficiente angular da reta.

O crescimento celular nestas condições é apresentado na figura 14. A maior disponibilidade de oxigênio, em comparação com o agitador metabólico, resulta em maior valor de $\mu_{\max} = 0,95 \text{ s}^{-1}$ (Figura 14B). Adicionalmente, o cultivo em biorreator não apresentou uma adaptação inicial ao meio ou fase *lag*, o que favorece o crescimento da biomassa ao longo do tempo. A indução foi feita às 2 h de cultivo (reproduzindo as condições em frascos agitados), momento no qual o cultivo apresentava uma OD600nm de 0,8.

Figura 14. (A) Curva de crescimento celular, pH e do oxigênio dissolvido (%DO) ao longo do tempo para a cepa recombinante *E. coli* BL21 em Biorreator de 2 L com indução de IPTG. **(B)** Representação logarítmica de biomassa em função do tempo.

A quantidade de oxigênio dissolvido (DO, dissolved oxygen), teve a maior queda durante a fase exponencial do crescimento (Figura 14A), momento em que a velocidade específica de crescimento é máxima e o metabolismo celular encontra-se acelerado e, portanto, necessitando de alta quantidade de oxigênio. Após a indução, o DO começa a aumentar novamente pois o metabolismo celular diminui e, consequentemente, a quantidade de oxigênio consumido. Assim, nas condições de kLa utilizadas, o DO não foi inferior a 40%, valor recomendado para os cultivos de *E. coli* (LI; WILLARD; SHA, 2014; SMITH et al., 2011); as células foram mantidas sempre sob condições aeróbicas e não apresentaram mudanças no metabolismo (por falta de oxigênio) que pudesse prejudicar a produção da enzima alvo ou gerar algum metabólito secundário não desejado.

Ao final do cultivo foi obtida uma concentração de biomassa seca de $3,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ou seja, foi possível obter 150% da produção de biomassa em comparação ao agitador metabólico sob as mesmas condições de cultivo (inóculo, meio de cultura e tempo), demonstrando que o rendimento em biomassa depende fortemente do consumo de oxigênio (HENKEL et al., 2014). O aumento na biomassa produzida pode ser refletido no aumento da produtividade volumétrica, obtendo no biorreator um valor de $460 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, o que corresponde a um aumento de 37% em comparação ao cultivo em frascos agitados (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo das produtividades específica e volumétrica de crisantaspase para os cultivos em shaker e biorreator da cepa recombinante *E. coli* BL21.

	Biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Produtividade específica ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	Produtividade volumétrica ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
Agitador metabólico	2,0	881	335
Biorreator	3,2	713	460

5.2. Extração da crisantaspase

Inicialmente, a presença da enzima foi avaliada no meio extracelular (sobrenadante após a separação da biomassa por centrifugação), no espaço periplasmático (extrato proteico do rompimento da parede celular mediante choque osmótico) e no citoplasma ou espaço intracelular (extrato proteico da lise celular mediante ultrassom). O resultado, apresentado na figura 15, indicou a presença da crisantaspase (correspondente à banda de 35 kDa) tanto no periplasma quanto no espaço citoplasmático, mostrando que a enzima não é exportada ao meio extracelular.

Figura 15. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 10% da produção de crisantaspase em *E. Coli*: (1) sobrenadante do meio de cultivo, (2) extração do espaço periplasmático, (3) extração do espaço intracelular, (MM) Padrão de Massa Molecular.

5.2.1. Lise celular

A primeira tentativa de rompimento celular foi mediante emprego de ultrassom, tentando atingir a maior liberação de crisantaspase e por requerer menos etapas antes da purificação (troca de tampão). Entretanto, as ondas de ultrassom rompem completamente as células, tanto a parede celular externa (liberando o conteúdo periplasmático) quanto a membrana celular (liberando o conteúdo citoplasmático), resultando em um extrato proteico complexo, como observado na figura 16. Essa metodologia gera uma grande quantidade de calor, sendo obrigatório manter a temperatura do sistema abaixo de 10 °C (HARRISON, 1991). Todos os testes foram realizados em banho de gelo, e, sob as condições utilizadas, não houve um aumento maior a 9 °C durante o processo todo.

Igualmente, no rompimento celular se liberam proteases que podem clivar a proteína-alvo, o que demanda a utilização de fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), inibidor de serino-proteases e de algumas cisteíno-proteases (ALONSO et al., 1996).

Figura 16. Gel electroforese SDS-PAGE 10% do extrato proteico de *E. coli* BL21 recombinante obtido por rompimento celular por ultrassom.

Inicialmente, foram utilizadas as células correspondentes a 500 mL de cultivo resuspensas em 25 mL de tampão de lise, nas condições descritas no item 4.2.7.1, obtendo os resultados da figura 17A. O processo de rompimento iniciou com uma concentração celular de $33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e depois de 3 min de exposição ao ultrassom, a concentração diminuiu 10 vezes. Aos 5 minutos ainda observa-se lise celular, entretanto, entre 3 e 4 minutos a concentração de proteínas totais atingiu o máximo equivalente a $4,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, mantendo-se constante após esse período. O maior valor de atividade enzimática ($534 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) também foi atingido aos 4 minutos, definido como tempo ótimo de extração. Após 6 minutos, a atividade enzimática diminuiu, mostrando que as ondas de ultrassom também podem desnaturar as proteínas.

A segunda tentativa de rompimento celular foi realizada com a metade da densidade celular inicial ($17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), tentando obter um maior rendimento em virtude da maior exposição das células às ondas de ultrassom. Além disso, as proteínas liberadas teoricamente seriam expostas a um menor estresse e, portanto, menor desnaturação. Os resultados obtidos (figura 17B), são similares aos anteriores, atingindo o máximo de proteína liberada aos 3 minutos ($2,27 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a máxima atividade enzimática aos 4 minutos ($185 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ou seja, a utilização de menor quantidade de biomassa não resultou em otimização do processo e a mesma quantidade de proteínas foi liberada em

proporção às células utilizadas. Portanto, considerando a maior capacidade de processamento, selecionamos o volume de 500 mL de cultura celular submetidos à sonda de ultrassom durante 4 minutos como a melhor condição de rompimento celular.

Figura 17. Resumo dos resultados de rompimento celular de *E. coli* para a liberação de crisantaspase por ultrassom. A) Lise de 500 mL de cultura celular. B) Lise de 250 mL cultura. (●) Concentração de proteínas totais. (▲) Concentração celular do meio. (■) Atividade enzimática.

5.2.2. Choque osmótico

A metodologia do choque osmótico permite a extração do conteúdo do espaço periplasmático sem rompimento celular completo, o que apresenta uma série de vantagens em relação à lise celular como menor ação de proteases, adequada “maturidade” das proteínas (enovelamento correto) e liberação de menores quantidades de proteínas facilitando as etapas de purificação. Uma das principais estratégias de permeabilização da membrana celular externa refere-se ao uso de EDTA (CHOI; LEE, 2004; JONASSON et al., 2002).

No tratamento de 250 mL de cultivo celular, a primeira etapa de exposição a EDTA resultou na liberação de 6,65 mg de proteínas totais e atingiu uma atividade de 117 U. A segunda etapa não apresentou atividade. O gel de SDS-PAGE (Figura 18) apresenta o extrato proteico para as duas etapas, mostrando grande liberação de proteínas na primeira etapa (com uma banda mais forte de 35 kDa, correspondente à crisantaspase) e a nula presença de proteínas na segunda etapa. Segundo OUTTEN et al. (2001), o meio LB contém 2,4 vezes menos Mg^{+2} do que o requerido pelas células ($3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), formando assim uma membrana celular mais instável e podendo ocorrer com maior facilidade a permeabilização, sem a necessidade de duas etapas.

Ao comparar a quantidade de proteína liberada, pode-se observar que a lise por ultrassom libera 56,75 mg de proteínas (na lise de 250 mL), valor que representa 8,5 vezes a mais que o liberado empregando-se choque osmótico. Esta diferença representa a grande quantidade de contaminação ou proteínas inespecíficas (todas as proteínas liberadas do citoplasma) e não um aumento na quantidade da enzima alvo; por conseguinte, requer ao final um esforço maior na etapa de purificação.

Figura 18. Gel SDS-PAGE 10% das duas etapas do choque osmótico da bactéria *E. coli* BL21 recombinante, produtora de crisantaspase.

5.3. Purificação crisantaspase

A sequência genética da ASNase de *E. chrysanthemi*, injetada no vetor, é dada a seguir (UNIPROT: P06608 (ASPG_DICCH)):

```

      10      20      30      40      50      60
MERWFKSLFV LVLFFVFTAS AADKLPNIVI LATGGTIAGS AATGTQTTGY KAGALGVDTL

      70      80      90     100     110     120
INAVPEVKKL ANVKGEQFSN MASENMTGDV VLKLSQRVNE LLARDDVDGV VITHGTDTE

     130     140     150     160     170     180
ESAYFLHLTV KSDKPVVFVA AMRPATAISA DGPMNLLEAV RVAGDKQSRG RGVMVVLNDR

     190     200     210     220     230     240
IGSARYITKT NASTLDTFKA NEEGYLGVII GNRIYYQNRI DKLHTTRSVF DVRGLTSLPK

     250     260     270     280     290     300
VDILYGYQDD PEYLYDAAIQ HGVKGIVYAG MGAGSVSVRG IAGMRKAMEK GVVVIRSTRT

     310     320     330     340
GNGIVPPDEE LPGLVSDSLN PAHARILLML ALTRTSDPKV IQEYFHTY

```

Os primeiros 21 aminoácidos (em vermelho) correspondem ao peptídeo sinal de exportação ao periplasma. A sequência foi analisada pela ferramenta bioinformática *The ExPASy* (The Expert Protein Analysis System): ProtParam. Esta ferramenta permite computar vários parâmetros físicos e químicos da proteína a partir da sequência de aminoácidos, como por exemplo massa molar, *pI* teórico, composição de aminoácidos, composição atômica, coeficiente de extinção molar, entre outros. Esta análise apresentou os dados já conhecidos da crisantaspase: 348 aminoácidos, *pI* teórico de 7,84 e 37,5 kDa de massa molar para cada monômero. Baseado nesta informação, foi utilizado um protocolo de purificação por cromatografia em coluna de troca catiônica por gradiente de pH em que a eluição da proteína alvo é feita em pH igual ao seu *pI*, ou seja, valor no qual a proteína apresenta uma carga líquida neutra, portanto não irá interagir com a resina da coluna.

O gradiente de pH para eluição da crisantaspase começou com pH 5,5 (duas unidades abaixo do *pI* da enzima, portanto carregada positivamente) até atingir pH 8,5. O resultado é apresentado na figura 19A, sendo observado um pico durante o gradiente a uma concentração de 21% do tampão B (pH 8,5).

Utilizando-se a equação de *Henderson-Hasselbalch* (equação 8), foram calculadas as concentrações de sal e de ácido do tampão fosfato de potássio 20 mM, considerando 21% de tampão B pH 8,5 e 79% de tampão A pH 5,5. Assim, o pico do gradiente a 21% corresponde a um pH de 7,5-7,6. Essa condição indica a ausência de interações eletrostáticas entre a enzima e a coluna e, portanto, a condição em que a enzima apresenta carga líquida neutra (pI), o que corrobora com os resultados encontrados no software *The ExPasy*.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (\text{Equação 8})$$

Figura 19. Purificação da enzima crisantaspase recombinante por troca catiônica em gradiente de pH de 5,5 até 8,5 **(A)** Cromatograma. Linha azul: Absorbância a 280nm. Linha verde: porcentagem do tampão B (pH 8,5) no gradiente. **(B)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida a 10%, referente à fração obtida com 21% do tampão B.

Como pode ser observado no gel de eletroforese da figura 19B, a banda mais forte perto de 37 kDa representa a enzima crisantaspase, porém, no gradiente de pH a enzima não ficou pura. Portanto, realizamos uma nova tentativa de purificação em *steps* iniciando com o tampão de equilíbrio em pH 5,5 seguido de um *step* de eluição com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,5. Deve-se considerar que a bactéria *E. coli* possui uma enzima ASNase endógena, de características similares e de mesma massa molar, mas com pI de 4,7. Sob as condições utilizadas, a ASNase endógena de *E. coli* encontra-se carregada

negativamente (devido à utilização de pH acima do seu pI) e portanto, não interage eletrostaticamente com a resina. Assim é possível separar a enzima recombinante crisantaspase da enzima endógena da bactéria.

Observa-se na figura 20A um pico em pH 5,5, correspondente à todas as proteínas contaminantes que não interagem com a coluna, e outro pico em pH 7,5 correspondente à enzima de interesse. Esta etapa de purificação apresentou baixo rendimento de 5,5% e fator de purificação de 3,7 (Tabela 6). A análise do perfil eletroforético da fração purificada (figura 20B) indicou a presença de duas bandas majoritárias. Na tentativa de remover essa possível proteína contaminante, realizamos uma etapa subsequente de purificação por exclusão molecular.

Figura 20. Purificação da enzima crisantaspase recombinante por troca catiônica em *step* de pHs **(A)** Perfil cromatográfico por 280 nm. **(B)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) do *step* pH 7,5 da purificação (linha 1), MM: massa molar.

Figura 21. Purificação por exclusão molecular da enzima crisantaspase recombinante **(A)** Perfil cromatográfico por 280 nm **(B)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 10% das frações da purificação **(C)** Zimograma da ASNase de *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspase).

A partir do perfil cromatográfico, apresentado na figura 21A, observam-se quatro picos bem definidos. As frações foram analisadas pela medição de atividade e por eletroforese SDS-PAGE. Só o segundo pico, com volume de retenção de 14 mL aproximadamente, apresentou atividade asparaginásica e foi o único que apresentou a banda correspondente à crisantaspase no perfil eletroforético (Figura 21B). Ainda assim, é possível observar a presença das mesmas duas bandas da etapa anterior. A figura 21C apresenta o zimograma da ASNase de *E. coli* como controle e da crisantaspase recombinante obtida da purificação por exclusão molecular. Por representar um gel nativo com presença de atividade, observamos que a fração obtida na purificação corresponde a uma proteína com massa molar semelhante à ASNase de *E. coli* (136-140 kDa) e com atividade, ou seja a enzima crisantaspase.

A proteína obtida apresentou concentração de $0,15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e atividade específica de $398 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, inferior ao valor reportado. Embora a atividade específica (grau de pureza) tenha aumentado, esta metodologia não resultou eficiente, tendo um fator de purificação de 9,7 e um rendimento de apenas 1,4% (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da purificação de crisantaspase recombinante, produzida em cultura celular de *E. coli* BL21 e extraída por lise celular por ultrassom.

Etapa	Volume (mL)	Concentração de proteínas ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Atividade Total (U)	Atividade específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	25	4,03	4149	41,2	-	100
Troca catiônica	5	0,30	229	152,7	3,7	5,5
Exclusão molecular	1	0,15	59,7	398,0	9,7	1,4

Considerando que a amostra já passou por duas cromatografias, pode-se concluir que estamos obtendo proteínas que não podem ser separadas, ou seja, tem as mesmas características de carga e tamanho.

Na tentativa de compreender esse resultado, analisamos no software *The ExPasy* a sequência da crisantaspase sem o peptídeo sinal (sem os primeiros 21 aminoácidos). Entende-se que quando a enzima migra até o espaço periplasmático perde este peptídeo sinal e atinge o enovelamento final. A enzima citoplasmática, em contrapartida, ainda contém estes 21 aminoácidos a mais e pode não ter a estrutura correta, podendo apresentar diferenças no sítio ativo que dificultem a interação com o substrato. Esta segunda análise bioinformática informou que a crisantaspase madura possui 327 aminoácidos, massa molar de 35 kDa e pI de 7,2. Portanto, dadas as poucas diferenças (tamanho e valores de pI muito próximos), torna-se muito difícil a separação entre a forma citoplasmática e a forma madura (periplasmática) da crisantaspase.. Efetivamente, a diferença de 2 kDa entre as duas formas da crisantaspase é observada nas duas bandas presentes no gel de eletroforese (Figura 20B) da proteína purificada depois da lise celular por ultrassom. Portanto, o resultado da purificação corresponde à duas enzimas crisantaspase: enzima madura ou periplasmática e enzima não-ativa citoplasmática. A enzima não ativa apresenta pouca ou nula atividade, portanto, a mistura das duas formas apresenta atividade específica baixa, explicando assim o baixo rendimento da purificação.

Baseado nesses resultados, purificamos a crisantaspase extraída por choque osmótico, correspondente à enzima periplasmática utilizando o protocolo anterior de troca catiônica, com um primeiro *step* em pH 5,5 e a eluição em pH 7,5. A proteína crisantaspase eluiu no pH 7,5 e apresentou alto grau de pureza, resultando em banda única no gel de eletroforese (figura 22). A enzima purificada atingiu uma atividade de 817 U·mg⁻¹, valor similar ao reportado na literatura para a crisantaspase (650-750 U·mg⁻¹), alto rendimento de 69% e um fator de purificação de 31 (Tabela 7). Esses resultados são similares aos de Kotzia (2007) que produzindo crisantaspase recombinante em *E. coli*, reportou rendimento de 69,8% e fator de purificação do 15,4.

Cabe destacar que foi possível obter uma enzima com alto grau de pureza em só uma etapa cromatográfica. Para todos os ensaios seguintes foi utilizada esta metodologia de purificação.

Figura 22. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) da crisantaspase de *E. coli* BL21 recombinante purificada por cromatografia de troca catiônica do extrato proteico obtido por choque osmótico.

Tabela 7. Resumo da purificação de crisantaspase recombinante, produzida por *E. coli* BL21 e extraída por choque osmótico.

Etapa	Volume (mL)	Concentração de Proteínas (mg·mL⁻¹)	Atividade Total (U)	Atividade específica (U·mg⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extracto bruto	5,0	1,33	177,2	26,6	-	100
Troca catiónica	1,5	0,10	122,6	817,3	31	69

5.4. Estudo da peguilação da crisantaspase

A peguilação acontece por um ataque nucleofílico de um grupo amínico da proteína ao PEG reativo, sendo que o estado de protonação de cada resíduo amínico influencia na especificidade da reação de peguilação. Para obter uma peguilação sítio-dirigida *N*-terminal, é importante assegurar que todos os resíduos amínicos, exceto o *N*-terminal, estejam preferencialmente protonados e, portanto, indisponível para o ataque nucleofílico. Em outras palavras, é preciso trabalhar num valor de pH perto ou levemente acima do pKa do aminoácido *N*-terminal (PASUT; VERONESE, 2012).

A sequência da crisantaspase foi analisada pelo software *H++*, capaz de prever a protonação e os valores de pKa para cada aminoácido na cadeia proteica. O resultado desta análise mostrou que a crisantaspase tem como resíduo *N*-terminal uma leucina (Leu) com valor de pKa de 7,24. Também indicou que as lisinas (Lys) apresentam valor de pKa entre 10-11. Esta grande diferença entre os pKas do *N*-terminal e dos resíduos com grupamentos amínicos favorece a peguilação sítio-dirigida. Assim, é de esperar que em valores de pH perto do pKa do resíduo *N*-terminal a peguilação aconteça com muita especificidade; ao contrário, em valores de pH superiores a formação de conjugados poli-peguilados poderia aumentar significativamente pelas reações entre o mPEG-NHS e resíduos de Lys. Além disso, deve-se considerar que o mPEG-NHS é facilmente hidrolisado em condições extremas de pH (meios muito básicos e muito ácidos) (PFISTER; MORBIDELLI, 2014). Neste sentido foi investigada a reação a diferentes pHs entre de 6,5 e 9,0 (figura 23).

Figura 23. Reação de peguilação da enzima crisantaspase com o mPEG-NHS 10 kDa a diferentes valores de pH **(A)** Gel de eletroforese (SDS-PAGE 10%) **(B)** Análise da intensidade das bandas do gel de eletroforese pelo software ImageJ.

Como pode ser observado, a peguilação aumenta com o pH e a concentração de enzima nativa vai diminuindo. A partir do pH 7,5 foram obtidos rendimentos similares de enzima mono-peguilada *N*-terminal (45-50%), mas a quantidade de formas poli-peguiladas aumenta devido à peguilação de resíduos de lisinas. Na literatura, a reação de conjugação do mPEG-NHS à proteína é descrita com rendimento de 27 a 36% (Shang e Ghosh, 2014). Neste trabalho o maior rendimento de peguilação *N*-terminal foi a pH 7,5 - 8,0 (50%), entretanto, a pH 8,0 o rendimento de formas poli-peguiladas foi duas vezes maior (7% para pH 7,5 e 14% para pH 8,0). Considerando que a separação da forma nativa das proteínas peguiladas é relativamente fácil e a maior dificuldade é dada para separar as diferentes formas peguiladas, selecionamos o pH 7,5 como ótimo para a peguilação sítio-específica da crisantaspase.

Como utilizamos um PEG reativo de 10 kDa, cada monômero peguilado deveria apresentar um tamanho aproximado de 45 kDa, mas observa-se no gel de eletroforese (Figura 23A) que a banda mono-peguilada corresponde a uma massa molecular acima de 50 kDa. É reportado que a migração das proteínas peguiladas em gel de poliacrilamida com SDS ocorre de forma mais lenta ao esperado segundo sua massa molecular, devido à formação de um complexo entre o PEG e o SDS (ZHENG; MA; SU, 2007). Como uma guia, pode-se considerar duas vezes a massa do PEG na proteína peguilada (BROCCHINI et al., 2006). Assim, considerando cada PEG com o dobro da sua massa molar, cada monômero peguilado possuiria uma massa aparente de 55 kDa, o explicaria o tamanho da banda mono-peguilada.

Na tentativa de minimizar a hidrólise rápida do mPEG-NHS no meio reacional (Reação apresentada no Anexo A) e, portanto, aumentar o rendimento da peguilação, foram estudados solventes orgânicos em substituição à água. A água fornece um próton (H^+) ao grupamento éster do PEG reativo, permitindo a formação de um carbocátion onde acontecera o ataque nucleofílico. O grupamento *N*-terminal da proteína poderá interagir formando um grupo amida e resultando na proteína peguilada. Em presença de água, o grupo hidroxila (OH^-) reage com o carbocátion do PEG reativo, liberando o grupamento NHS e impedindo que aconteça a ligação com a proteína, aumentando a quantidade de PEG sem reagir e, por conseguinte, diminui o rendimento da reação.

Portanto, solubilizamos o PEG em solventes orgânicos e realizamos a adição gradual desse ao meio aquoso contendo a crisantaspase. Foram empregados solventes orgânicos polares apróticos, ou seja, que não dão nem aceitam prótons e, portanto poderiam diminuir a clivagem do mPEG-NHS e aumentar o rendimento do processo. Os solventes utilizados foram *N,N*-dimetilformamida (DMF) e tetrahidrofurano (THF), estruturas apresentadas na figura 24.

Figura 24. Estrutura química dos solventes *N,N*-dimetilformamida (DMF) e tetrahidrofurano (THF).

Para esse ensaio inicialmente estudamos a porcentagem de solvente na qual a enzima ainda é capaz de manter sua atividade, empregando a ASNase de *E. coli* como modelo. Os resultados mostraram que a atividade é mantida por até uma hora na presença de 30% de DMF ou 40% de THF. Os resultados da peguilação com solvente são apresentados na figura 25 e, como pode ser observado, a peguilação em DMF resultou em rendimento de 40% e em THF o rendimento foi de 20%. Em contrapartida, a reação em PBS resultou em um rendimento de 50% em enzima mono-peguilada *N*-terminal.

Figura 25. Peguilação da enzima ASNase com mPEG-NHS com diferentes solventes orgânicos e tampão. **(A)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) da reação de peguilação em diferentes solventes. **(B)** Porcentagem de rendimento da peguilação calculada pela intensidade das bandas do gel.

O solvente DMF se apresenta naturalmente em equilíbrio de ressonância (figura 26), em que não existe uma carga negativa forte no oxigênio que possa fazer um ataque nucleofílico ao PEG reativo. Entretanto, também não é capaz de fornecer o próton ao grupamento éster do PEG reativo que permitiria a formação de um carbocátion susceptível ao ataque nucleofílico pelo grupamento amina da proteína; isso explica porque o rendimento foi menor com este solvente.

Figura 26. Estrutura da ressonância química que apresenta o solvente *N,N*-dimetilformamida (DMF)

No caso do solvente THF, acreditamos que esse solvente interaja com as moléculas de água dificultando a doação de prótons por essa, ou seja, a reatividade do PEG diminui pois não se forma o carbocátion que sofre ataque nucleofílico.

O melhor solvente para este tipo de reação seria aquele que doasse prótons, mas que não apresentasse potencial de interação com o grupo éster do PEG reativo. Uma futura perspectiva poderia ser a utilização de líquidos iônicos (ILs) como solventes para peguilação

5.5. Purificação da PEG-crisantaspase

A maioria das proteínas peguiladas são purificadas por cromatografia em coluna, principalmente cromatografia de exclusão molecular (SEC, size exclusion chromatography) e cromatografia de troca iônica (Yu & Ghosh, 2010). O objetivo é separar a enzima mono-peguilada *N*-terminal da enzima que não reagiu, das formas poli-peguiladas e do PEG não reagido (ZHENG; MA; SU, 2007).

A primeira tentativa de purificação consistiu em uma etapa de cromatografia de troca catiônica com gradiente de NaCl até 1 M. Esta metodologia baseia-se em diferenças de carga pois o PEG não carregado diminui a carga aparente na proteína, sendo que esse efeito de blindagem aumenta com o aumento do grau de peguilação (YU; GHOSH, 2010). Nossos resultados (figura 27), mostram que não foi possível separar em picos bem

definidos cada uma das formas peguiladas. Ainda assim foi possível obter certo grau de separação em que os conjugados PEG-crisantaspase foram eluídos a 660 mM de NaCl (frações 1-3), mas ainda assim com contaminação da enzima que não reagiu. A crisantaspase eluiu a 820 mM de NaCl (frações 4-5). Este resultado foi confirmado por gel de eletroforese (Figura 27B). Em conclusão, a cromatografia de troca catiônica não foi suficiente para separar os conjugados peguilados da enzima que não reagiu.

Figure 27. Purificação da reação de peguilação de crisantaspase por troca catiônica, num fluxo de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, com gradiente de sal. **(A)** Perfil cromatogramatográfico em 280 nm (azul) e gradiente de 0 a 1 M de NaCl (verde) **(B)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) das frações coletadas.

Um segundo passo de purificação por SEC foi testado na tentativa de aumentar o grau de pureza da enzima. O aumento considerável no raio hidrodinâmico dos conjugados peguilados permite a separação por tamanho tanto da forma nativa como das diferentes formas peguiladas. As frações 1, 2 e 3 da purificação por troca catiônica, correspondente às frações de enzima peguilada, foram combinadas, concentradas até 0,5 mL e injetadas na coluna de exclusão molecular. Como pode ser observado na figura 28, essa etapa resultou em melhor resolução, com picos definidos. O maior pico foi observado perto de 12 mL de volume de retenção (pico hachurado na figura 28A), correspondente à PEG-crisantaspase. Na mesma corrida, é possível observar outros picos a 7,97 mL (pico 1) e

10,24 mL (pico 2). Esses picos correspondem às enzimas que estão formando agregados e às enzimas poli-peguiladas. Também é possível observar um pico aos 14 mL (pico 4), correspondente à enzima nativa que não reagiu, pois apresenta o mesmo volume de retenção que foi observado na purificação do extrato proteico anteriormente (Figura 21A). A PEG-crisantaspase corresponde a um 60% de todas as proteínas eluídas.

Figura 28. Cromatogramas da purificação por cromatografia de exclusão molecular em fluxo de $0,75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ **(A)** Purificação das frações 1 até 3 da primeira etapa da troca catiônica, sendo PEG-crisantaspase coletada no pico 3 deste cromatograma e **(B)** As frações 4 e 5 da primeira etapa de purificação, onde a crisantaspase que não reagiu foi coletada no pico 4 deste cromatograma.

As frações da troca catiônica correspondentes à enzima que não reagiu (frações 4 e 5), também foram injetadas na coluna SEC, apresentando o maior pico no volume de retenção da enzima nativa (14 mL, pico 4 hachurado), mas ainda assim é possível observar pequenos picos 1 e 2 (8 e 10,5 mL) de enzima poli-peguilada e um pico 3 (12 mL) de PEG-crisantaspase. Neste segundo cromatograma, 70% das proteínas eluídas corresponderam à crisantaspase nativa e um 21% à enzima mono-peguilada, o que indica perda de nossa enzima alvo na etapa de purificação por troca catiônica.

Nos dois cromatogramas é possível observar um pico aos 24 mL de retenção (pico 5), volume correspondente ao volume total da coluna, equivalente à eluição de estrutura menores (10 kDa, corresponde ao menor tamanho de separação segundo o fabricante) e que atribuímos ao PEG que não reagiu.

Na tentativa de se empregar somente uma etapa de purificação e considerando que a primeira etapa não conseguiu purificar completamente a PEG-crisantaspase, uma segunda tentativa de purificação em etapa única de SEC foi realizada. Foram injetados 0,5 mL da reação de peguilação e foi utilizado um fluxo de $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, atingindo uma alta resolução. Diminuir o fluxo resulta em melhor transporte de massa e, portanto, melhor resolução e nitidez do pico (YU; GHOSH, 2010). O resultado é apresentado na figura 29, em que é possível observar 4 picos bem definidos. Primeiro as formas poli-peguiladas aos 7,97 mL e 10,24 mL, a PEG-crisantaspase aos 11,35 mL, a enzima nativa que não reagiu (13,70 mL) e finalmente um pico aos 20,73 mL correspondente ao PEG livre. Este resultado mostra que é possível obter boa separação dos conjugados peguilados em uma única etapa cromatográfica, o que otimiza o processo, além de diminuir a perda de enzima produzida. Esta última metodologia foi definida como o processo de separação da reação de peguilação e foi utilizada para todos os estudos seguintes.

Figura 29. Cromatograma em coluna de exclusão molecular, fluxo $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, da reação de peguilação da enzima crisantaspase com mPEG-NHS 10 kDa.

5.6. Caracterização *in vitro* da crisantaspase e da PEG-crisantaspase.

5.6.1. Atividade específica

A atividade específica foi considerada como o coeficiente angular da reta de atividade total (U) em função de diferentes concentrações de proteína (mg). A crisantaspase recombinante apresentou uma atividade específica de $694 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (figura 30A), valor equivalente ao mencionado na literatura para esta enzima, $650\text{-}700 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. Por outro lado, a PEG-crisantaspase apresentou atividade específica de $347 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (figura 30B), retendo 50% da atividade da enzima não peguilada. É reportado que a pegasparaginase de *E. coli* (Oncaspar®) e a pegcrisantaspase (Asparec®) retêm 30% e 65% da atividade da enzima nativa, respectivamente (CHIEN et al., 2014).

A queda de atividade pode ser causada devido ao fato de que aminoácidos da fração *N*-terminal estão envolvidos na atividade catalítica da crisantaspase. Além disso, os resíduos 14 a 33 formam um loop flexível, o qual aberto permite o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima, e fechado posiciona adequadamente os resíduos responsáveis pela catálise. A flexibilidade deste loop é essencial para atividade enzimática, e a diminuição de sua mobilidade está relacionada à redução da atividade (Borek et al., 2014). A peguilação *N*-terminal poderia estar influenciando na flexibilidade deste loop, diminuindo a atividade. Ainda assim, as vantagens intrínsecas das proteínas peguiladas, como a maior meia-vida e a menor imunogenicidade, continuam a fazer da PEG-crisantaspase uma alternativa altamente promissora, pois, além de apresentar uma quantidade controlada de ligações de PEG, apresenta maior atividade específica que a reportada para ASNase de *E. coli* ($225 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Figura 30. Atividade específica segundo a linearidade da atividade total (U) em diferentes quantidades de proteína (mg), medido pelo método de Nessler. **(A)** crisantaspase e **(B)** PEG-crisantaspase.

5.6.2. Cinética enzimática

Para caracterizar e conseguir comparar a enzima nativa da peguilada, foram calculados os parâmetros cinéticos de ambas enzimas, resultando que a crisantaspase e a PEG-crisantaspase apresentaram um comportamento michaeliano. Os parâmetros cinéticos relevantes de uma enzima são k_{cat} (constante catalítica para a conversão de substrato ao produto) e k_M (a constante de Michaelis-Menten, que é definida como a concentração de substrato em que a velocidade é a metade da velocidade máxima) (EISENTHAL; DANSON; HOUGH, 2007).

A crisantaspase apresentou um valor de k_M de 45,7 μM . Nguyen (2016) e Kotzia (2007) reportaram valores de k_M similares ao encontrados neste trabalho, 47,5 e 58 μM respetivamente. Portanto, a enzima recombinante está sendo produzida com as características descritas para a enzima nativa de *E. chrysanthemi*.

O obstáculo estérico devido à conjugação de PEG geralmente leva à uma diminuição significativa da afinidade enzima-substrato, ou seja, um aumento no valor de k_M , levando a uma menor eficácia da enzima peguilada. A PEG-crisantaspase apresentou k_M de 150 μM , 3 vezes maior ao valor da enzima não peguilada. Este valor ainda é menor que o reportado para a poli pegcrisantaspase (Asparec®), que possui um k_M de 185 μM (Chien et al., 2014). As curvas de Michaelis-Menten para as duas enzimas são apresentadas na figura 31 e os parâmetros cinéticos são resumidos na tabela 8.

Figura 31. Curvas de Michaelis-Menten para a determinação das constantes cinéticas da enzima crisantaspase recombinante e PEG-crisantaspase.

Tabela 8. Resumo dos parâmetros cinéticos das enzimas crisantaspase e

PEG-crisantaspase

	K_M (μM)	V_{max} ($\mu mol \cdot min^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
crisantaspase	46 ± 8	$2,16 \pm 0,09$	540 ± 24	$11,74 \times 10^6$
PEG-crisantaspase	150 ± 19	$2,59 \pm 0,09$	260 ± 9.8	$1,73 \times 10^6$

5.6.3. Estabilidade da crisantaspase e PEG-crisantaspase frente à temperatura e tempo

A conjugação do PEG à proteína está intimamente correlacionada à estabilidade proteica, aumentando a meia-vida e tornando a enzima mais termoestável em relação à forma não peguilada. Assim é reportado que Oncaspar® aumenta 5 vezes a meia vida plasmática da ASNase de *E. coli* (ASSELIN et al., 1993).

A atividade frente à diferentes temperaturas mostrou que a crisantaspase e a PEG-crisantaspase apresentaram sua máxima atividade a 55 °C e aos 37 °C (temperatura biológica) retém 70% da sua atividade máxima. Em temperaturas menores, as duas formulações (nativa e mono-peguilada) apresentam um comportamento similar, porém, a PEG-crisantaspase mostra uma estabilidade maior em altas temperaturas, sendo estável (sem diferença significativa na sua atividade segundo o teste de Bonferroni, p -valor=0,05) entre 50 e 75 °C. A enzima não peguilada apresentou estabilidade entre 50 e 65 °C, chegando a ter uma perda de 40% a 75°C e uma tendência a diminuir constantemente a sua atividade em temperaturas mais elevadas. Os resultados são apresentados na figura 32A.

A estabilidade da enzima em armazenamento a 4 °C ao longo do tempo é apresentada na figura 32B. A crisantaspase se mantém estável por dois dias, tendo uma queda brusca na sua atividade, perdendo 50% da sua atividade em uma semana e mantendo 7% depois de 14 dias de armazenamento. Ao contrário, a PEG-crisantaspase apresenta estabilidade durante 20 dias, momento no qual a atividade começa a diminuir lentamente, sendo que com 30 dias ainda retém 60% da sua atividade.

A perda da atividade ao longo do tempo pode ser ocasionada por agregação proteica ou instabilidade do tetrâmero. Em geral, as formulações de ASNase possuem até 20% de agregados, os quais podem ser ainda mais imunogênicos que a proteína livre, ocasionando diminuição da eficácia terapêutica. Por este motivo a ASNase nativa de *E. coli* não é aceita em vários países (AVRAMIS, 2012). A maior solubilidade, pela hidratação do PEG, diminui o grau de agregação da enzima peguilada e promove maior estabilidade à estrutura proteica (BAUER et al., 2017).

Tanto sob altas temperaturas como ao longo do tempo, a enzima peguilada apresentou maior estabilidade que a enzima nativa, mantendo sua atividade enzimática.

Figura 32. Estabilidade da enzima crisantaspase (preto) e PEG-crisantaspase (vermelho) frente **(A)** a diferentes temperaturas e **(B)** ao tempo, mantida em armazenamento a 4 °C.

*não apresenta diferença significativa, teste de comparações múltiplos Bonferroni, p -valor=0,05.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido pela primeira vez um protocolo para obtenção da enzima crisantaspase peguilada *N*-terminal. A enzima foi obtida de forma recombinante em cultivo de *E. coli* BL21, em que foi observado que a produtividade volumétrica em biorreator ($460 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) aumentou 37% em comparação com o agitador metabólico ($335 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). A enzima foi extraída do espaço periplasmático por choque osmótico e purificada em etapa única de cromatográfica de troca catiônica, com fator de purificação de 30,7 e um rendimento de 69%.

Os estudos de peguilação mostram o pH 7,5 como ótimo para a peguilação sitio-dirigida ao grupo *N*-terminal, com um rendimento de 50% e menor formação de estruturas poli-peguiladas (7%). A PEG-crisantaspase foi isolada por diferença de tamanho mediante cromatografia de exclusão molecular e a enzima mono-peguilada pura demonstrou reter 50% da atividade específica ($357 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) e um valor de k_M 3 vezes maior ($150 \mu\text{M}$) comparado à forma não peguilada.

A crisantaspase apresenta uma perda de 93% da sua atividade específica depois de duas semanas armazenada a 4°C , enquanto que a PEG-crisantaspase foi estável por 20 dias e em um mês ainda retém 60% da sua atividade, além de apresentar maior estabilidade em altas temperaturas.

Portanto, a enzima PEG-crisantaspase desenvolvida representa uma nova e promissora alternativa para o tratamento da LLA como um novo *biobetter*. Ainda que esses sejam os primeiros estudos *in vitro*, esta enzima peguilada apresenta maior estabilidade e parâmetros cinéticos similares aos esperados, além de permitir maior controle lote a lote na sua produção, diferente da ASNase poli-peguilada disponível atualmente.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A necessidade de novos teste *in vitro* e avaliação do comportamento *in vivo* desta nova proposta de *biobetter* é imprescindível, como resistência a proteases, estudos de citotoxicidade em linhas celulares leucêmicas, avaliação da resposta imune, entre outras.

Além disso, ainda é possível melhorar a técnica de peguilação. A utilização de solventes adequados que impeçam a clivagem ou não diminuam a reatividade do PEG poderiam resultar em rendimentos superiores. Nesse sentido, destacamos a possibilidade de se utilizar líquidos iônicos (ILs). Adicionalmente, a utilização de novas ferramentas como os microreatores para síntese em fluxo contínuo poderia resultar em maiores rendimentos e diminuir a perda de PEG reativo, o qual apresenta custo elevado.

REFERÊNCIAS

ABRIBAT, T.; SAINTÉ FOY LES LYON. **PEGYLATED L-ASPARAGINASE**.US. License. 2012/0100121 A1, 2012.

ABUCHOWSKI, A.; ES, T. VAN; PALCZUK, N. C. Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol*. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 252, n. 11, 1977.

ADVANI, A. Antibodies: Immunoconjugates and autologous cellular therapy in acute lymphoblastic leukemia. 2015.

AL-MAHAYRI, Z. N.; PATRINOS, G. P.; ALI, B. R. Pharmacogenomics in pediatric acute lymphoblastic leukemia: promises and limitations. **Pharmacogenomics**, v. 18, n. 7, p. 687–699, 2017.

ALONSO, M. et al. Degradation of aggrecan precursors within a specialized subcompartment of the chicken chondrocyte endoplasmic reticulum. **Biochem. J.**, v. 316, p. 487–495, 1996.

ANVISA. **Conceitos e Definições** -. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/conceitos-e-definicoes7>>. Acesso em: 17 maio. 2017.

ASHRAFI, H. et al. Nanostructure l-asparaginase-fatty acid bioconjugate: Synthesis, preformulation study and biological assessment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 180–187, 2013.

ASSELIN, B. L. et al. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 9, p. 1780–1786, set. 1993.

AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Research**, v. 32, n. 7, p. 2423–2437, 2012.

BAHREINI, E. et al. AN OPTIMIZED PROTOCOL FOR OVERPRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION IN *Escherichia coli*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 5, p. 510–528, 4 jul. 2014.

BALAN, S. et al. Site-specific PEGylation of protein bisulfide bonds using a three-carbon bridge. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 61–76, 2007.

BARBOSA, M. D. F. S. Immunogenicity of biotherapeutics in the context of developing biosimilars and biobetters. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7, 2011.

BARBOSA, M. D. F. S. et al. Biosimilars and biobetters as tools for understanding and mitigating the immunogenicity of biotherapeutics. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 1282–1288, 2012.

BAUER, K. C. et al. Impact of additives on the formation of protein aggregates and viscosity in concentrated protein solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1–2, p. 82–90, 2017.

BEHANCE. **Technical Illustrations on Behance**. Disponível em: <<https://www.behance.net/gallery/7289583/Technical-Illustrations>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

BROCCHINI, S. et al. PEGylation of native disulfide bonds in proteins. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2241–2252, 2006.

CHIEN, W. W. et al. Pharmacology, immunogenicity, and efficacy of a novel pegylated recombinant *Erwinia chrysanthemi*-derived L-asparaginase. **Investigational New Drugs**, v. 32, n. 5, p. 795–805, 2014.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 625–635, 1 jun. 2004.

CLARK, D. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 63, n. 3, p. 223–234, set. 1989.

COONEY, C. L. Bioreactors: Design and Operation. **Science**, v. 219, n. 4585, p. 728–733, 11 fev. 1983.

CPhI. **Top10 Best-selling Bio Drugs in 2016: Humira Leading the List and Roche Having 3 Products Listed - EN-CPhI.cn**.

CREATIVE PEGWORKS. **PEG NHS Ester Stability**. Disponível em: <http://www.creativepegworks.com/PEG_Acid_NHS.html>. Acesso em: 3 set. 2015.

DE MORA, F. Biosimilar: what it is not. **The British Pharmacological Society**, v. 80, n. 5, p. 949–956, 2015.

DINNDORF, P. A. et al. FDA Drug Approval Summary: Pegaspargase (Oncaspar(R)) for the First-Line Treatment of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). **The Oncologist**, v. 12, n. 8, p. 991–998, 2007.

DINWOODIE, N. Biobetters and the Future Biologics Market. **BioPharm International**, v. 24, n. 11, 2011.

EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62–71, 2016.

EISENTHAL, R.; DANSON, M. J.; HOUGH, D. W. Catalytic efficiency and k_{cat}/K_M : a useful comparator? **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 247–249, jun. 2007.

EMA. BIOSIMILARS: WHAT DO PATIENTS NEED TO CONSIDER? **Eular**, 2015.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Spectrila: SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002661/WC500200538.pdf>. Acesso em: 11 maio. 2017.

FDA. **What Are “Biologics” Questions and Answers**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CBER/ucm133077.htm>>. Acesso em: 17 maio. 2017.

FERNANDEZ, C. A. et al. Successful challenges using native *E. coli* asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated *E. coli* asparaginase. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 73, n. 6, p. 1307–1313, 2014.

FERRER-MIRALLES, N. et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 17, 24 mar. 2009.

GINN, C. et al. PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 16, p. 1829–1846, 19 out. 2014.

GUILLEME, C. M.; DELGADO, R. F.; NAVARRO, J. S. Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. **AN Pediatr (Barc)**, v. 79, n. 5, 2013.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1089–1098, 18 nov. 2016.

HARRISON, S. T. . Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 217–240, jan. 1991.

HENKEL, S. G. et al. Basic Regulatory Principles of Escherichia coli's Electron Transport Chain for Varying Oxygen Conditions. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

JENSEN, E. B.; CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 1, p. 1–11, 5 jun. 1990.

JONASSON, P. et al. REVIEW Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli. **Biotechnol. Appl. Biochem**, v. 35, p. 91–105, 2002.

KINSTLER, O. B. et al. Characterization and Stability of N-terminal PEGylated rgG-CSF. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 7, 1996.

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

KOZLOWSKI, A.; CHARLES, S. A.; HARRIS, J. M. Development of Pegylated Interferons for the Treatment of Chronic Hepatitis C. **BioDrugs**, v. 15, n. 7, p. 419–429, 2001.

KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D.; SUBRAMANYA, S. Critical Reviews in Microbiology A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases. **Crit Rev Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 1040–841, 2016.

KURINOMARU, T.; SHIRAKI, K. Noncovalent PEGylation of L-Asparaginase Using PEGylated Polyelectrolyte. **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v. 104, p. 587–592, 2014.

LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY. Leucemia linfoblástica aguda. 2014.

LI, B.; WILLARD, S.; SHA, M. High cell density fermentation of Escherichia coli Using the New Brunswick™ BioFlo® 115. **Eppendorf**, n. 1, p. 10798, 2014.

LI, W. et al. Current drug research on PEGylation with small molecular agents. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 421–444, 2013.

LOUREIRO, C. B. et al. Purification and Biochemical Characterization of Native and Pegylated Form of L-Asparaginase from Aspergillus terreus and Evaluation of Its Antiproliferative Activity. **Advances in Microbiology**, v. 2, p. 138–145, 2012.

MAHAJAN, R. V et al. Purification and Characterization of a Novel and Robust L-Asparaginase Having Low-Glutaminase Activity from Bacillus licheniformis: In Vitro Evaluation of Anti- Cancerous Properties. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

MIRRO, R. Introduction To Escherichia Coli In A Stirred-Tank Bioreactor. **Eppendorf**, n. October, p. 1–2, 2011.

MOULTON, G. G. Capitulo 3: Recombinant fed-batch fermentation using Escherichia coli. **Fed-batch fermentation: A practical guide to scalable recombinant protein production in Escherichia coli.**, p. 63–106, 2014.

NAGARETHINAM, S. et al. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. **Asian Journal of Medical Research**, v. 1, n. 4, p. 159–160, 2012.

NARAZAKI, H. et al. Delayed-type hypersensitivity in response to L-asparaginase in a case of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi**, v. 79, n. 6, p. 489–93, 2012.

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

NGUYEN, H. A.; SU, Y.; LAVIE, A. Design and characterization of erwinia chrysanthemi L-asparaginase variants with diminished L-glutaminase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 34, p. 17664–17676, 2016.

ORTEGA SÁNCHEZ, A. M.; OSNAYA ORTEGA, L. M.; ROSAS BARRIENTOS, J. V. Leucemia linfoblástica aguda. **Medicina Interna de México Volumen**, v. 23, n. 1, 2007.

OUTTEN, C. E.; O'HALLORAN, T. V. Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. **Science**, v. 292, n. 5526, p. 2488–2492, 29 jun. 2001.

PASUT, G.; SERGI, M.; VERONESE, F. M. Anti-cancer PEG-enzymes: 30?years old, but still a current approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 1, p. 69–78, 3 jan. 2008.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1177–1188, 2009.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 461–472, 20 jul. 2012.

PELEGRI-O'DAY, E. M.; LIN, E.; MAYNARD, H. D. Therapeutic Protein – Polymer Conjugates : Advancing Beyond PEGylation. **Journal of American Chemical Society**, v. 136, p. 14323–14332, 2014.

PFISTER, D.; MORBIDELLI, M. Process for protein PEGylation. **Journal of Controlled Release**, v. 180, n. 1, p. 134–149, 2014.

PHILIPPIDIS, A. **The Top 15 Best-Selling Drugs of 2016 | The Lists | GEN**. Disponível em: <http://www.genengnews.com/the-lists/the-top-15-best-selling-drugs-of-2016/77900868>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer January**, v. 15, n. 1172, p. 238–249, 2011.

RIZZARI, C. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, p. S1–S9, mar. 2013.

ROBERTS, M.; HARRIS, J. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 459–476, 2002.

ROBICHON, C. et al. Engineering Escherichia coli BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize E. coli Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 77, n. 13, p. 4634–4646, 2011.

ROQUE, C. et al. Effect of Polyethylene Glycol Conjugation on Conformational and Colloidal Stability of a Monoclonal Antibody Antigen-Binding Fragment (Fab?). **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 562–575, 2 fev. 2015.

ROSANO, G. L. et al. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. 172, 2014.

ROZKOV, A. et al. Characterization of the metabolic burden on Escherichia coli DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 909–915, 30 dez. 2004.

RYU, J. K.; KIM, H. S.; NAM, D. H. Current Status and Perspectives of Biopharmaceutical Drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 900–911, 2012.

SALZER, W. L. et al. Development of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1329, n. 1, p. 81–92, nov. 2014.

SATTERWHITE, C. Assessing Development Needs for Biobetters and Biosimilars. **Biopharm International**, v. 26, n. 2, p. 28–32, 2013.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 189, n. 23, p. 8746–8749, 2007.

SHANG, X.; YU, D.; GHOSH, R. Integrated solid-phase synthesis and purification of PEGylated protein. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2772–2779, 2011.

SMITH, □ B J Z et al. Development of a Method To Produce Hemoglobin in a Bioreactor Culture of *Escherichia coli* BL21(DE3) Transformed with a Plasmid Containing *Plesiomonas shigelloides* Heme Transport Genes and Modified Human Hemoglobin Genes. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 77, n. 18, p. 6703–6705, 2011.

SOARES, A. L. et al. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1–2, p. 163–170, 2002.

SPADIUT, O. et al. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 54–60, jan. 2014.

TURECEK, P. L. et al. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 460–475, 2016.

VERMA, S. et al. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of *E. coli* asparaginase II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1844, p. 1219–1230, 2014.

VERONESE, F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. **Biomaterials**, v. 22, p. 405–417, 2001.

VERONESE, F. M.; PASUT, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. **DDT**, v. 10, n. 21, 2005.

VITOLO, M. **Biotecnologia Farmacêutica**. [s.l.] Editora Blucher, 2015.

VUORISTO, K. S. et al. Metabolic engineering of the mixed-acid fermentation pathway of *Escherichia coli* for anaerobic production of glutamate and itaconate. **AMB Express**, v. 5, n. 61, 2015.

WEINACKER, D. et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1043–1048, 2013.

WU, L. et al. Pharmaceutical nanotechnology N-terminal mono-PEGylation of growth hormone antagonist: Correlation of PEG size and pharmacodynamic behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 533–540, 2013.

YU, D.; GHOSH, R. Purification of PEGylated Protein Using Membrane Chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 8, 2010.

ZALIPSKY, S. Alkyl succinimidyl carbonates undergo Lossen rearrangement in basic buffers A side reaction producing β -alanine and derivatives through Lossen rearrangement was found to accompany hydrolysis of alkyl succinimidyl carbonates in basic aqueous buffers . **Chem. Commun.**, p. 69–70, 1998.

ZHANG, C. et al. Site-specific PEGylation of therapeutic proteins via optimization of both accessible reactive amino acid residues and PEG derivatives. **BioDrugs**, v. 26, n. 4, p. 209–215, 2012.

ZHANG, F.; LIU, M.-R.; WAN, H.-T. Discussion about Several Potential Drawbacks of PEGylated Therapeutic Proteins. **Biol. Pharm. Bull**, v. 37, n. 3, p. 335–339, 2014.

ZHENG, C. Y.; MA, G.; SU, Z. Native PAGE eliminates the problem of PEG–SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation. **Electrophoresis**, v. 28, p. 2801–2807, 2007.

ANEXO A

Figura A1. Mecanismos de reação de hidrólise do mPEG-NHS e de ataque nucleofílico pelo grupamento amina da proteína.

ANEXO B
DISPENSA DA ANÁLISE DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

São Paulo, 22 de junho de 2017

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o presente projeto de pesquisa dispensa análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal e/ou da Comissão Interna de Biossegurança-CIBio.

Cordialmente,

Karin Mariana Torres Obreque

Profa. Dra. Carlota Rangel Yagui
Depto. De Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
FBT/USP

ANEXO C

FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9135 - 8730260/1 - Karin Mariana Torres Obreque

Email: karintorres90@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
 Data de Nascimento: 23/12/1990
 Cédula de Identidade: RNE - V935072-S - DF
 Local de Nascimento: Chile
 Nacionalidade: Chilena
 Graduação: Licenciada em Biologia - Faculdade de Ciencias de La Ingenieria - Universidad de la Frontera - Chile - 2014

Curso: Mestrado
 Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
 Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica
 Data de Matrícula: 27/04/2015
 Início da Contagem de Prazo: 27/04/2015
 Data Limite para o Depósito: 25/08/2017
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Carlota de Oliveira Rangel Yagui - 27/04/2015 até o presente. Email: corangel@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 27/04/2015
 Português, Aprovado em 04/04/2016
 Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 27/04/2017 até 25/08/2017
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 10/06/2016
 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 27/04/2015
 Prorrogação em 23/03/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 23/03/2017

Impresso em: 22/06/2017 02:59:52

ANEXO C

FICHA DO ALUNO (CONTINUAÇÃO)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9135 - 8730260/1 - Karin Mariana Torres Obreque

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5738-1/2	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	03/08/2015	19/10/2015	30	2	90	A	N	Concluída
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	75	A	N	Concluída
ECO5044-1/2	O Ensino de Ciências e a Formação Docente: Estudo e Análise das Pesquisas Atuais (Curso Interunidades: Ecologia Aplicada - Universidade de São Paulo)	11/08/2015	23/11/2015	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5825-10/1	Prática de Ensino de Química e Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	17/08/2015	29/11/2015	45	3	80	B	N	Concluída
BTC5704-7/3	Engenharia Bioquímica (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	29/09/2015	11/01/2016	75	5	94	B	N	Concluída
QFL5965-1/1	Fronteiras em Biotecnologia Industrial (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	07/12/2015	20/12/2015	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
PQI5882-1/4	Nanotecnologia Aplicada à Engenharia Química (Escola Politécnica - Universidade de São Paulo)	22/02/2016	03/06/2016	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5800-1/4	Patentes em Fármaco e Medicamentos	10/03/2016	12/05/2016	45	3	90	A	N	Concluída
FBT5776-5/3	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	17/10/2016	30/10/2016	30	2	80	A	N	Concluída
FBT5789-1/1	Caracterização de Biosistemas	01/11/2016	15/12/2016	90	6	100	A	S	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

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: Prorrogação em 23/03/2017

Impresso em: 22/06/2017 02:59:53