

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Cultivo da linhagem *Escherichia coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$ contendo plasmídeo com gene de L-asparaginase resistente a proteases plasmáticas.

Vanessa Caroline Déssia

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo – 2023

Vanessa Caroline Déssia

Cultivo da linhagem *Escherichia coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$ contendo plasmídeo com gene de L-asparaginase resistente a proteases plasmáticas.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
Adalberto Pessoa Junior

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2023

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

Ficha Catalográfica

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

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

Déssia, Vanessa Caroline
D475c Cultivo da linhagem *Escherichia coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$
contendo plasmídeo com gene de L-asparaginase resistente a proteases
plasmáticas / Vanessa Caroline Déssia. -- São Paulo, 2023.
8op.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Pessoa Junior, Adalberto

1. Asparaginase. 2. Biofármaco. 3. Biotecnologia. 4. *Escherichia coli*. I. T. II. Pessoa Junior, Adalberto, orientador.

CDD 615.1

RESUMO

DÉSSIA, V. C. Cultivo da linhagem *Escherichia coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$ contendo plasmídeo com gene de L-asparaginase resistente a proteases plasmáticas. 2023. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Utilizada há mais de 40 anos no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), a L-asparaginase II da bactéria *Escherichia coli* tem como mecanismo de ação a depleção da asparagina livre no plasma sanguíneo. Células normais são capazes de sintetizar esse aminoácido, ao contrário das células leucêmicas, que sem quantidades suficientes de asparagina para absorver, entram em apoptose. Atualmente, o Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS) utiliza L-asparaginase importada para suprir a demanda interna, adquirida diretamente da empresa licitada no país, protocolo adotado após a grave crise de abastecimento enfrentada entre os anos de 2013 e 2017. A problemática envolvendo a aquisição da enzima e seu alto custo, somados à alta incidência de reações imunológicas indesejadas oriundas das formulações disponíveis atualmente no mercado, são fatores que tornaram relevante a viabilização da produção nacional, bem como o desenvolvimento tecnológico de novas versões da enzima. Deste modo, este projeto de mestrado foi desenhado para estudar, em agitador orbital, os parâmetros de cultivo e indução da bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$ como sistema de expressão de uma molécula de L-asparaginase modificada por engenharia genética e construída em plasmídeo pET-28a. Testes iniciais de atividade enzimática da L-asparaginase EcA^{MUT} expressada pela linhagem *E.coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$, indicaram atividade específica próxima a observada na proteína selvagem (WT) e outras proteoformas já estudadas. Também foi observada diferença de crescimento entre a cepa que teve seus genes deletados *E.coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$ e a cepa *E.coli* BL21 (DE3).

Palavras-chave: L-asparaginase, *Escherichia coli*, cultivo descontínuo, biofármaco.

ABSTRACT

DÉSSIA, V. C. Cultivation of *Escherichia coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$ strain containing a plasmid with plasmatic protease-resistant L-asparaginase gene. 2023. Dissertação (MSc) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Used for over 40 years in acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment, the L-asparaginase II from *Escherichia coli* has as action mechanism the depletion of asparagine free in the blood plasma. Normal cells can synthesize this amino acid, unlike leukemic cells, which without sufficient asparagine amounts to absorb, enter into apoptosis. Currently, the Brazilian Unified Health System (SUS) uses imported L-asparaginase to supply the internal demand, acquiring directly from the country bidding company, a protocol adopted after the serious supply crisis faced between 2013 and 2017. The problem involving enzyme acquisition and its high cost, added to the high incidence of unwanted immunological reactions from the formulations currently available on the market, are factors that made the viability of national production relevant, as well as the technological development of new versions of the enzyme. Thus, this master's project was designed to study, in an orbital shaker, the cultivation and induction parameters of the *Escherichia coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$ bacterium as an expression system for a genetically engineered modified L-asparaginase molecule constructed in the pET-28a plasmid. Initial tests of the enzymatic activity of the *EcA*^{MUT}. L-asparaginase expressed by the *E.coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$ strain indicated a specific activity similar to that observed in the wild-type (WT) protein and other studied proteoforms. A growth difference was also observed between the strain that had its genes deleted, *E.coli* BL21 (DE3) $\Delta asnA/\Delta asnB$, and the *E.coli* BL21 (DE3) strain.

Keywords: L-asparaginase, *Escherichia coli*, fed-batch cultivation, biopharmaceutical.