

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA-BIOQUÍMICA

GUILHERME RAMOS BENEVIDES

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE P40S/S206C PEGUILADA EM RESÍDUO N-
TERMINAL, E ESTUDO DE SUA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* FRENTE À
CÉLULAS LEUCÊMICAS**

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

SÃO PAULO
2023

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
1 INTRODUÇÃO	4
1.1 História e Descoberta da L-asparaginase.....	4
1.2 Produção de L-asparaginase em <i>E. coli</i>	5
1.3 Efeitos colaterais e toxicidade da L-asparaginase.....	7
1.4 PEGuilação: L-asparaginase	8
1.5 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	10
1.6 Panorama Geral	12
2 OBJETIVO	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Produção da L-asparaginase P40S/S206.....	14
3.2 Extração e Purificação da L-asparaginase P40S/S206	15
3.3 Reação de PEGuilação <i>N</i> -terminal.....	16
3.4 Quantificação de proteínas totais	16
3.5 Determinação de atividade enzimática	17
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	17
3.7 Ensaio de citotoxicidade	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Produção e purificação da L-asparaginase	20
4.2 PEGuilação da L-asparaginase	21
4.2.1 PEGuilação empregando razão de PEG:proteína de 50:1	21
4.2.2 PEGuilação empregando razão de PEG:proteína de 25:1	24
4.2.3 Atividade Específica	30
4.2.4 Ensaio de Citotoxicidade	31
5 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BL21(DE3)	Escherichia coli BL21
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTPA	Ácido Dietilenotriaminopentacético
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EC1	L-asparaginase I de Escherichia coli
EC2	L-asparaginase II de Escherichia coli
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LLA	Leucemia linfoide aguda
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mM	Milimol
MOLT-4	Células neoplásicas de leucemia linfoide aguda
mPEG-NHS	Metóxi-poli(etileno)glicol carboximetil N-hidroxisuccinimidil éster
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NHS	N-hidroxisuccinimida
NRU	Captação de vermelho neutro
PBS	Tampão fosfato-salino
PEG	Polietileno glicol
PEG-NHS	Polietileno glicol com grupo de saída de N-Hydroxysuccinimide
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoreto
rh-GCSF	Granulócitos recombinante humano N-terminal PEGuilado
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

SEC	Size exclusion chromatography (cromatografia de exclusão molecular)
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris-HCl	Tampão ácido composto por Tris e Ácido clorídrico
U/mg	Atividade enzimática por miligrama
v/v	Volume por Volume

RESUMO

BENEVIDES, GUILHERME R. **Produção de L-asparaginase P40S/S206C PEGuilada em resíduo N-terminal, e estudo de sua atividade citotóxica *in vitro* frente à células leucêmicas.** 2023. 45 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras-chave: leucemia; L-asparaginase P40S/S206C; PEGuilação; biofármaco.

Leucemias representam cerca de um quarto de todos os casos de câncer infantil entre aqueles com ocorrência em menores de 15 anos de idade, com a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) representando 80% dos casos de leucemia infantil. A LLA é uma doença maligna que afeta a série linfóide do sistema hematopoiético, com aproximadamente 85% dos casos originados de linfócitos B e 15% derivados de linfócitos T. Seu desenvolvimento está relacionado a fatores genéticos, mais especificamente a anomalias cromossômicas, como aneuploidia e mutações estruturais. Como primeira linha de tratamento, tem-se a aplicação de L-asparaginase, um biofármaco enzimático que atua na depleção de asparagina sérica, representando um mecanismo seletivo às células leucêmicas. Apesar da alta eficiência associada ao medicamento, a L-asparaginase possui diversos efeitos adversos, os quais têm sido enfrentados através de processos de PEGuilação, que também apresentam desafios relativos à reprodutibilidade, variabilidade e imunogenicidade. Neste trabalho investigou-se a PEGuilação dirigida ao sítio N-terminal de uma L-asparaginase mutante P40S/S206C, que demonstrou possuir resistência às proteases cathepsina B e endopeptidase. Esta característica confere à enzima a capacidade de driblar os mecanismos de sensibilização específicos ao biofármaco, através do impedimento da ação proteolítica, o que a torna menos imunogênica e prolonga sua meia vida plasmática. Os resultados indicaram que a reação de monoPEGuilação é favorecida pelas condições: tampão PBS 10mM pH 7,5, razão PEG:Proteína de 25:1 e tempo de reação de 30 minutos. Apesar de resultar em certo grau de polidispersão, o protocolo escolhido apresentou o melhor rendimento da espécie monoPEGuilada. Houve manutenção da atividade específica da L-asparaginase após a reação de monoPEGuilação mantendo valores similares à espécie nativa. Estudos de citotoxicidade foram realizados em células MOLT-4 demonstrando a atividade citotóxica da enzima livre frente a essa linhagem leucêmica. A monoPEGuilação sítio-dirigida apresentou baixa interferências nos valores de inibição, mostrando que a enzima reteve seu poder citotóxico. Considerando o potencial da L-asparaginase P40S/206C monoPEGuilada para o desenvolvimento de um novo biofármaco, sugere-se como perspectiva futura a realização de estudos de estabilidade, resistência a proteases e testes *in vitro* de imunogenicidade.

1 INTRODUÇÃO

1.1 História e Descoberta da L-asparaginase

A L-asparaginase é um biofármaco enzimático com aplicações terapêuticas no tratamento de neoplasias, historicamente utilizado em esquemas quimioterápicos para leucemia linfóide aguda (LLA)¹, um tipo de câncer que afeta predominantemente o período da primeira infância². A leucemia representa cerca de um quarto de todos os casos de câncer que acometem indivíduos menores de 15 anos de idade³, com a LLA representando cerca de 80% dos casos de leucemia infantil⁴. Anualmente, nos Estados Unidos, a leucemia linfóide aguda (LLA) é observada em cerca de 3.000 a 4.000 indivíduos, com crianças representando dois terços da população total afetada⁵. A LLA é uma doença maligna que afeta a série linfóide do sistema hematopoiético, sendo que 85% dos casos se originam de linfócitos B e aproximadamente 15% de linfócitos T⁵. O desenvolvimento é relacionado a fatores genéticos, mais especificamente a anomalias cromossômicas, como aneuploidia e mutações estruturais².

A L-asparaginase é produzida por várias espécies de microrganismos, sendo uma enzima catalisadora da hidrólise de L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia⁶. Enquanto as células saudáveis – devido a presença de asparagina sintetase - podem sintetizar L-asparagina, as células leucêmicas dependem da absorção deste aminoácido do plasma sanguíneo⁶. Esta característica torna a L-asparaginase um eficiente agente quimioterápico, já que sua administração leva à redução dos níveis séricos de L-asparagina, afetando a síntese celular de proteínas e ácidos nucleicos, proporcionando morte seletiva das células leucêmicas^{6,7}.

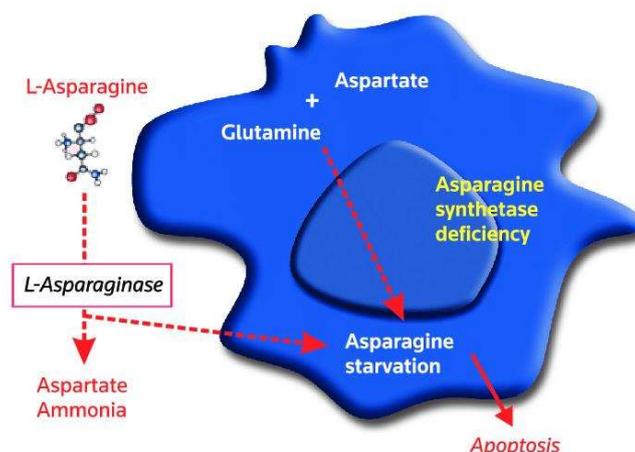


Figura 1 — Mecanismo de ação da L-asparaginase (Extraído de Godfrin, Y, Bax, 2012).

A descoberta da L-asparaginase deu-se no final dos anos 1950, por Kidd et al. (1953)⁸, ao observarem que cobaias implantadas com células tumorais de ascite de Ehrlich exibiram uma redução nas concentrações plasmáticas de asparagina. Broome et al. (1961)⁹, investigando o fenômeno, isolaram uma enzima que demonstrou hidrolisar a L-asparagina em ácido aspártico e amônia, posteriormente denominada L-asparaginase e sendo detectada sua produção por *Escherichia coli*¹⁰.

Na década de 1960, houve a introdução da L-asparaginase como tratamento anti-leucêmico¹¹, tornando-se um componente padrão da terapia. Através de estudos demonstrou-se que a L-asparaginase possui significativos efeitos anti-leucêmicos dependentes da idade, com remissões completas alcançadas em até 90% dos pacientes pediátricos¹² e menores de 20% para pacientes senis¹³. A sobrevida em cinco anos para pacientes menores de 20 anos melhorou substancialmente de 54% (1975-1977) para 90% (2004-2010) devido aos avanços na terapia¹⁴.

1.2 Produção de L-asparaginase em *E. coli*

A *Escherichia coli* é comumente aplicada na produção de proteínas, incluindo a L-asparaginase¹⁵, devido à sua facilidade de cultivo e manipulação genética¹⁶. Duas isoformas de L-asparaginase são sintetizadas por *E. coli*, a L-asparaginase I (EC1), encontrada no citoplasma e L-asparaginase II (EC2), de origem periplasmática, sendo que apenas a segunda apresenta atividade anticancerígena⁸. Alguns estudos descreveram EC1 como uma enzima constitutiva e identificaram que

EC2 é secretada em resposta à exposição a baixas concentrações de nitrogênio¹⁸, podendo apresentar uma nova perspectiva para futuros processos produtivos.

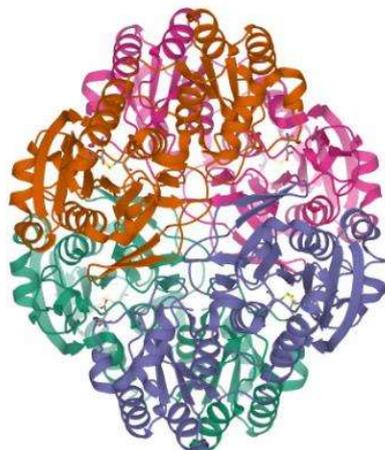


Figura 2 — Modelo estrutural de L-asparaginase ECII expressada por *E. coli*.
(Adaptado de SWAIN et al., 1993).

Várias estratégias foram empregadas para otimizar o cultivo de *E. coli* para a produção de L-asparaginase através da manipulação de diversos parâmetros do processo¹⁵. O meio mais comum utilizado para o cultivo de *E. coli* para a produção de L-asparaginase é o caldo Luria Bertani (LB), que consiste em triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio¹⁸. Estratégias de fermentação descontínua alimentada e cultivo em biorreator são empregados para maximizar o acúmulo de biomassa e os rendimentos de L-asparaginase¹⁹. Agitadores orbitais também apresentam uma estratégia de produção, sendo aplicados para produção de proteínas em pequena escala em culturas de *E. coli*^{19,20}, representando uma abordagem econômica e direta para triagem, podendo posteriormente ser adaptado para produção em larga escala com dimensionamento adequado. Outras abordagens têm sido aplicadas para desenvolver a produção de L-asparaginase, como a modificação genética.

A modificação genética envolve a inserção de genes exógenos em células, o que pode ser obtido por meio de transformação de plasmídeo ou eletroporação²¹. O processo pode resultar em cepas com aumento da expressão de proteínas²², incluindo a L-asparaginase, que pode então ser coletada e purificada para diversas aplicações. A BL21(DE3) é uma cepa de *E. coli* comumente utilizada para a superexpressão de proteínas recombinantes²³. Essa cepa contém o gene da polimerase T7 sob o controle do promotor lac, permitindo a expressão de genes

recombinantes em alto nível quando induzido por IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo)²³. Um sistema de transformação genética - sistema pET - é empregado para transformar a BL21(DE3), o que permite a expressão rigidamente controlada de genes recombinantes sob a direção de um promotor específico, resultando em altos níveis de produção de proteínas²¹.

Após a expressão proteica, métodos de purificação são empregados para isolar e purificar a L-asparaginase produzida em culturas microbianas, são comumente utilizados: a precipitação com sulfato de amônio, cromatografia (como troca iônica, exclusão de tamanho e afinidade), ultrafiltração e precipitação com solventes orgânicos^{15,24}, escolhidos de acordo com as características da molécula. Adicionalmente, métodos de caracterização como eletroforese e espectrofotometria são utilizados para verificar a pureza e a atividade da enzima isolada²⁴.

1.3 Efeitos colaterais e toxicidade da L-asparaginase

Apesar de sua eficácia, o tratamento com L-asparaginase está associado a uma série de efeitos colaterais, desde sintomas leves a graves⁶. Entre os efeitos adversos comumente relatados estão os distúrbios gastrointestinais, como náuseas, vômitos e redução do apetite^{6,7,11}. Embora menos frequentes, alguns efeitos colaterais mais graves também foram documentados após a terapia com L-asparaginase. Dentre estes, inclui-se complicações relacionadas aos mecanismos de coagulação sanguínea que podem resultar em trombose ou distúrbios hemorrágicos²⁵. Lesão ou disfunção hepática é outro potencial resultado do tratamento com L-asparaginase, manifestando-se por meio de função hepática alterada²⁶. Manifestações como pancreatite, hiperamonemia²⁷, hiperglicemia²⁸, leucopenia e neurotoxicidade também são frequentemente associados ao uso do biofármaco²⁹.

Os mecanismos relacionados aos efeitos tóxicos da L-asparaginase ainda não são totalmente elucidados. Um mecanismo proposto sugere que a depleção dos níveis do aminoácido essencial asparagina - vital para o crescimento de células cancerígenas - possa afetar as células normais, ocasionando sintomas de hepatotoxicidade³⁰. Outro mecanismo sugerido é por meio de um desequilíbrio no metabolismo de aminoácidos, por exemplo, a redução de asparagina pode resultar

em acúmulo excessivo de glutamina, associado à pancreatite e hepatotoxicidade^{29,31}.

É importante mencionar as reações imunes que algumas pessoas desenvolvem após receber tratamento com L-asparaginase²⁹. A hipersensibilidade é o evento mais comum, observado em cerca de 30% dos pacientes que recebem a enzima derivada de *E. coli*, podendo variar de reações cutâneas leves a anafilaxia, emergência potencialmente fatal³². Este evento está relacionado à exposição do organismo a uma proteína exógena. O processo envolve a fagocitose da molécula, viabilizando que proteases, incluindo catepsina B e endopeptidases lisossomais atuem na proteína fazendo com que sua atividade enzimática cesse ao mesmo tempo em que expõem seus epítomos^{29,32}. Esse processo leva a diminuição significativa na meia-vida do biofármaco e estimula a formação de anticorpos, resultando em diminuição de eficácia do tratamento⁶.

Várias estratégias podem ser empregadas para minimizar os efeitos colaterais e a toxicidade da L-asparaginase, sendo o ajuste da dose uma estratégia chave⁷. Outra opção é a coadministração de medicamentos que ajudem a reduzir a incidência e a gravidade dos efeitos colaterais^{29,33}. Adicionalmente, a nanotecnologia mostra-se uma estratégia eficiente para otimizar a entrega e a eficácia da L-asparaginase e minimizar os eventos adversos relacionados a sua toxicidade. Estudos demonstraram que o uso da PEGuilação como método de entrega de fármacos pode aumentar a meia-vida do fármaco, atuando no ajuste de dose e frequência, e atenuar a imunogenicidade, diminuindo as chances de efeitos colaterais³⁴.

1.4 PEGuilação: L-asparaginase

A PEGuilação de proteínas é um processo que envolve a ligação covalente de polietilenoglicol (PEG) a sítios disponíveis de cadeias proteicas³⁵. O polímero pode estar ligado a resíduos de aminoácidos específicos na superfície da proteína, ou em sítios terminais³⁵. Essa modificação aumenta substancialmente a massa molecular da proteína, o que tem efeitos significativos em sua farmacocinética e farmacodinâmica³⁶.

Uma característica notável do PEG é sua alta hidrofiliçidade, que expande o raio hidrofílico da proteína após o processo de conjugação³⁷. Como resultado, uma camada adicional se forma na superfície da proteína, promovendo impedimento estérico contra a degradação proteolítica e depuração pelo sistema reticuloendotelial³⁷. Além dessas propriedades, essa modificação também pode mascarar sítios antigênicos, acarretando redução da imunogenicidade³⁸.

A PEGuilação tornou-se amplamente utilizada para melhorar a estabilidade de proteínas, ao mesmo tempo em que prolonga a meia-vida sérica, tornando possível intervenções terapêuticas mais duradouras com chances reduzidas de reações adversas³⁸. A técnica também pode aumentar a solubilidade de proteínas hidrofóbicas tornando-as facilmente administráveis³⁹. Uma meta-análise realizada a partir da coleta de ensaios clínicos randomizados com utilização de PEG-asparaginase e *E. coli* L-asparaginase em crianças chinesas com ALL, a fim de comparar a eficácia e segurança das diferentes espécies do biofármaco⁴⁰. Os resultados indicaram que a PEG-Asparaginase produziu resultados comparáveis à *E. coli* L-Asparaginase, com o benefício adicional de reduzida incidência de hipersensibilidade e dano hepático. Além disso, a utilização de PEG-asparaginase resultou em menor frequência de aplicações e duração da hospitalização.

Embora a PEGuilação ofereça vantagens farmacológicas notáveis, o processo de modificação de estruturas de proteínas apresenta alguns desafios. Um desses refere-se à polidispersão resultante da dificuldade de direcionamento do sítio reativo^{39,41}. A polidispersão é uma consequência da existência de vários sítios reativos nas moléculas de proteína, resultando em padrões indiscriminados de conjugação dando origem a misturas heterogêneas de conjugados com diferenças no número e localização das cadeias de PEG ligadas à proteína^{39,41}. Essa diversidade pode resultar em diferenças no perfil farmacodinâmico e farmacocinético dos conjugados, ao mesmo tempo em que diminui a reprodutibilidade, afetando a capacidade produtiva. Existe uma correlação direta entre a conjugação gradual de cadeias PEG e a diminuição da atividade catalítica e afinidade pelo substrato, atribuída à restrita dinâmica estrutural da proteína causada por efeitos estéricos^{42,43}.

Outro grande desafio permanece na resposta imune induzida pela fração PEG, que pode acarretar a formação de anticorpos anti-PEG e comprometimento da eficácia do biofármaco modificado em administrações subsequentes^{36,44}. O contato extensivo com o polímero conjugado pode estar relacionado com o processo de

hipersensibilidade ou respostas imunogênicas indesejadas, uma vez que estes anticorpos demonstram-se específicos à estrutura do polietilenoglicol, sem reação à porção proteica⁴⁵.

Para enfrentar os desafios associados à polidispersão, inovações recentes na PEGuilação focam no aumento de seletividade ao sítio desejado, levando à produção e caracterização da L-asparaginase monoPEGuilada^{41,46}. Essas modificações direcionadas resultam em maior especificidade, maior pureza e uniformidade do produto, mantendo as propriedades desejadas, como estabilidade e bioatividade⁸¹. Um dos biofármacos PEGuilados em processo sítio-específico que podem ser encontrados no mercado é o PEGfilgrastim, fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante humano N-terminal PEGuilado (rh-GCSF), sendo o seu nome comercial Neulasca®⁴⁷. Pesquisas demonstraram que apenas uma aplicação de PEGfilgrastim pós-ciclo quimioterápico produz resultados semelhantes às injeções diárias da forma não PEGuilada⁴⁸.

O sítio N-terminal oferece um alvo preferencial para tais modificações devido à sua acessibilidade e natureza isolada⁴⁹, permitindo maior controle no processo de conjugação. A PEGuilação deste sítio pode ser realizada por meio de diferentes abordagens químicas, como o uso de ésteres de NHS (N-hidroxisuccinimida), azidas e aldeídos⁵¹. Cada método químico apresenta suas limitações, como impedimento estérico e suscetibilidade a sítios reativos. Além disso, esses métodos podem carecer de especificidade e resultar em modificações indesejadas ou baixos rendimentos devido a reações competitivas com outros grupos funcionais na molécula⁵¹. Dessa forma, é imperativa a condução de ensaios adequados a fim de determinar a metodologia mais apropriada de PEGuilação para cada proteína.

1.5 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

O cultivo celular *in vitro* é extremamente importante na avaliação do comportamento das células neoplásicas e os efeitos citotóxicos de fármacos, inclusive da L-asparaginase. O uso da cultura foi introduzido por Harrison em 1907, quando tentava provar que as fibras nervosas eram compostas por células. Ao imitar as necessidades básicas de uma célula, além de tomar cuidados especiais com a assepsia, Harrison conseguiu cultivar células nervosas a partir de coágulos da

medula espinhal de anfíbios. Além de provar sua hipótese, estabeleceu a possibilidade de cultivo *in vitro*, iniciando um novo modelo experimental⁵².

Modelos *in vitro* oferecem inúmeras vantagens em testes citotóxicos, como a capacidade de controlar variáveis experimentais e realizar testes reprodutíveis em condições controladas que mimetizam o ambiente *in vivo* sem a necessidade de procedimentos invasivos⁵³. Além disso, os modelos *in vitro* fornecem uma plataforma padronizada para avaliar com eficiência a eficácia de diferentes concentrações e tipos de fármacos⁵⁶. Em sua pesquisa, Asselin et al. (2014)⁵⁴ compararam a resposta de L-asparaginase em testes *in vitro* e *in vivo*, verificando efeito anti-leucêmico em dois modelos experimentais e demonstrando que modelos experimentais *in vitro* podem ser usados para prever a sensibilidade *in vivo* ao biofármaco.

Pesquisas de medicamentos e moléculas biologicamente ativas geralmente empregam ensaios *in vitro* de citotoxicidade para determinar o potencial de compostos específicos para induzir a morte celular e prever a toxicidade em humanos⁵⁵. Tais ensaios são divididos em seis categorias com base na função celular usada como parâmetro de medição, incluindo atividade metabólica celular, permeabilidade da membrana, aderência, produção de ATP, síntese de coenzimas e capacidade de captação de nucleotídeos⁵⁷. Conseqüentemente, diversos resultados podem ser obtidos a partir de vários ensaios de citotoxicidade, dependendo de qual função celular é considerada significativa.

Vários testes citotóxicos *in vitro* são empregados para estudo da L-asparaginase, incluindo: ensaio de MTT^{58,59}, ensaio de exclusão do azul de tripano⁶¹, captação de vermelho neutro (NRU)⁶² e ensaios baseados em citometria de fluxo⁶⁰. Esses testes quantificam vários aspectos da viabilidade celular, como atividade metabólica, integridade da membrana e fragmentação do DNA.

O ensaio MTT quantifica a atividade das enzimas mitocondriais, fornecendo informações sobre a viabilidade celular e atividade metabólica. O método baseia-se na formação dos cristais de formazan, resultantes da interação entre células vivas e MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), sendo o resultado analisado por espectrofotometria⁵⁹. Este ensaio é particularmente útil na determinação da citotoxicidade da L-asparaginase, pois avalia a viabilidade e proliferação celular após o tratamento com diferentes concentrações do biofármaco⁶³.

O ensaio de exclusão do azul de tripano permite distinguir entre células viáveis e não viáveis pela medição da integridade da membrana celular, uma vez que células não-viáveis absorverão o corante, enquanto as células viáveis permanecerão sem coloração⁶¹. O ensaio NRU é utilizado para determinar a citotoxicidade por meio da incorporação e ligação do corante vermelho neutro às células viáveis, resultando em observação visual e quantificação da morte celular⁶². Ensaio baseado em citometria de fluxo medem características celulares, como conteúdo de DNA ou tamanho da célula, passando as células por um feixe de laser e detectando os sinais de luz que elas refratam⁶⁰. Cada um desses métodos tem seus pontos fortes e limitações, por isso é essencial escolher o ensaio mais adequado para o sistema em estudo.

1.6 Panorama Geral

A utilização da L-asparaginase como terapia anticancerígena apresentou resultados encorajadores, levando os pesquisadores a explorarem ativamente a criação de novos processos e modificações, como a monoPEGuilação sítio-dirigida. Essas novas abordagens procuram superar os impedimentos atuais no uso da L-asparaginase, minimizando sua imunogenicidade e amplificando a potência, ao mesmo tempo em que mitigam os efeitos colaterais indesejados associados à sua aplicação.

Nesse trabalho investigamos a PEGuilação dirigida ao sítio N-terminal de uma L-asparaginase mutante, P40S/S206C, que demonstrou possuir resistência às proteases catepsina B e endopeptidase, enzimas responsáveis pela degradação da L-asparaginase⁶⁴. O impedimento da ação proteolítica torna a enzima menos imunogênica e prolonga sua meia vida plasmática⁶⁴. Dessa maneira, o estudo procura superar barreiras farmacológicas e cinéticas, e abrir caminho para melhores opções de tratamento para pacientes com LLA.

2 OBJETIVO

Produção de L-asparaginase P40S/S206C PEGuilada em *N*-terminal para avaliação de seu potencial citotóxico frente a células leucêmicas. Para que este objetivo fosse alcançado, as seguintes etapas foram estabelecidas:

- Produzir e purificar a enzima;
- Realizar PEGuilação em resíduo *N*-terminal e calcular o rendimento;
- Investigar o efeito da PEGuilação na atividade específica da enzima;
- Investigar o efeito da PEGuilação na atividade inibitória em células leucêmicas através do cálculo de Concentração Inibitória Mínima 50 e 90.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção da L-asparaginase P40S/S206

A enzima utilizada foi obtida através do cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) modificada pela inserção de plasmídeo pET 15b codificante para a expressão da proteína L-asparaginase P40S/S206C, gentilmente cedida pela Professora Dr^a Gisele Monteiro de Souza. A produção de L-asparaginase se deu através do pré-inóculo, no qual 15 µL de *E. coli* BL21 (DE3)/pET 15b foram adicionados em frascos do tipo Erlenmeyer sem defletores contendo meio Luria Bertani (LB) e incubados a 37°C e 250 rpm por 16 horas. Após o período, foi retirada uma alíquota para determinação da densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}), a partir da qual foi calculado o volume a ser inoculado para cultivo à DO_{600nm} inicial igual a 0,1. Feita a inoculação, os novos frascos foram incubados a 37°C e 250 rpm por 2,5 horas, período em que se atinge DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8, em seguida adicionou-se 300 µL de IPTG (1M) para induzir a expressão da enzima de interesse por 22h sob as mesmas condições de incubação. Após a indução, transferiu-se o cultivo para tubos de centrifuga, previamente pesados, sendo centrifugados por 10 minutos a 4000 xg e 4°C. Os tubos foram novamente pesados para determinação da massa de células obtida, que poderia ser congelada a -20°C para posterior extração da enzima de interesse.

Alíquotas do cultivo foram coletadas no momento inicial e final para a determinação de sua DO_{600nm} , os valores obtidos foram empregados para a determinação da concentração celular (equação 1) com base em uma curva de calibração correlacionando massa seca e DO_{600nm} previamente obtida pelo doutorando Rafael Bertelli Ferraro e a Dr^a LARISSA PEREIRA. A produtividade do cultivo foi calculada através da equação 2.

$$\text{Concentração celular} = 0,4285 \times DO_{600nm} \quad (1)$$

$$Px = \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0} \quad (2)$$

Em que:

X_f = concentração celular ao final do cultivo ($g \cdot L^{-1}$)

X_0 = concentração celular inicial ($g \cdot L^{-1}$)

$t_f - t_0$ = tempo de cultivo (h)

3.2 Extração e Purificação da L-asparaginase P40S/S206

Após a obtenção do pellet celular, foi aplicado um processo de choque osmótico para extrair a L-asparaginase P40S/S206 expressa pela bactéria. O racional deste processo baseia-se na inserção da bactéria em soluções de diferentes concentrações, visando fragilizar sua membrana por estresse osmótico com decorrente formação de poros para retirada da enzima de seu periplasma⁶⁵. Para isso, as células foram suspensas com um tampão hiperosmótico Tris-HCl 20mM, pH 8,0, 20% sacarose, 1 mM EDTA, 100 μ M de DTPA na proporção 25 mL por grama de célula, sendo submetido a agitação resfriada por 5 minutos. A suspensão foi, então, centrifugada a 10.000 xg e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado para análise e o precipitado ressuspensão, sob mesma proporção, em solução hiposmótica 10 mM MgSO₄, 0,5 mM de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) e 100 μ M de DTPA, e agitado em ambiente resfriado por 10 minutos, sendo em seguida submetido a centrifugação a 10.000 xg por 30 minutos a 4°C. A suspensão obtida foi filtrada e encaminhada para as outras etapas de purificação. O extrato filtrado foi submetido a cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna de troca aniônica Hi-Trap™ DEAE FF de 5mL, previamente equilibrada e lavada com tampão Tris-HCl 20mM pH 8,0. A corrida foi realizada com fluxo de 2,5 mL/min, sob gradiente linear de 100 mL até 1M de NaCl em tampão Tris-HCl 20mM pH 8,0, sendo coletadas amostras de 1,5 mL, as correspondentes ao pico da enzima de interesse foram selecionadas e concentradas para próxima etapa de purificação. As frações escolhidas foram submetidas à purificação por cromatografia de exclusão molecular. Para isso, utilizou-se uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL de 24 mL, tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5,0 e 100mM de glicina, como fase móvel. A corrida foi realizada em fluxo de 0,5 mL/min, com coleta de amostras de 1 mL. As frações correspondentes aos picos foram analisadas por SDS-PAGE. A análise do processo

foi feita a partir dos parâmetros de Fator de purificação e do Enriquecimento, calculados pelas equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{Fator de purificação} = \frac{\text{Atividade Específica final}}{\text{Atividade Específica inicial}} \quad (3)$$

$$\text{Enriquecimento} = \frac{\text{Atividade Total final}}{\text{Atividade Total inicial}} \quad (4)$$

3.3 Reação de PEGuilação N-terminal

A proteína purificada foi condicionada em PBS, pH 7,5, por meio de filtração centrífuga à 4000xg em filtros Amicon de 30.000 Da de corte, em seguida submetida à reação com metóxi-polietilenoglicol carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS) de tamanho 20 kDa, sendo testadas diferentes proporções para avaliar o melhor rendimento. O meio foi posto sob agitação magnética a 22°C, variando-se o tempo de reação. Adicionou-se hidroxilamina para clivagem dos sítios instáveis, mantendo-se as condições já citadas por mais 5 minutos. Coletou-se uma amostra do meio para análise de SDS-PAGE. A enzima PEGuilada foi submetida à filtração centrífuga para remoção de reagentes residuais utilizando filtro Amicon Ultra 15 (Merck Millipore), 2.906 xg por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular para separação das proteínas PEGuiladas e não PEGuiladas. Para este processo, utilizou-se uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL e tampão fosfato 20mM, pH 7,0 com coleta de amostras de 1 mL nos picos de interesse.

3.4 Quantificação de proteínas totais

Para quantificação de proteínas totais, empregou-se o método de BCA, baseado na formação de complexo entre o cobre do reagente e a proteína presente na amostra⁶⁶. O cobre reacional sofre redução no meio alcalino, possibilitando sua reação com o ácido bicinconínico (BCA), formando uma solução de cor arroxeadada com espectro visível a 562 nm, proporcional à quantidade proteica. O protocolo

utiliza a mistura de ácido bicinconínico e solução a 4% de sulfato de cobre, na proporção 50:1. Alíquotas de 200 µL da mistura foram reagidas com 25 µL da amostra, em uma placa de 96 poços, submetida à incubação a 37 °C por 30 minutos e analisada em espectrofotômetro a 562 nm. Os dados obtidos foram analisados com ajuda de uma curva padrão construída empregando-se albumina sérica bovina.

3.5 Determinação de atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada a partir do método de Nessler⁶⁶. Neste protocolo, emprega-se tampão Tris-HCl 50mM (pH 8,6), água ultrapurificada, L-asparagina 100 mM e amostra contendo a enzima, utilizados para montagem da placa de 96 poços, incubada a 37 °C por 30 minutos. O processo é interrompido pela adição de ácido tricloroacético 1,5 M. Na segunda etapa da análise, adiciona-se água e reagente de Nessler, resultando em coloração amarelada que pode ser lida a 436 nm em espectrofotômetro. A partir dos valores de absorbância determinados, a atividade enzimática foi obtida em unidade arbitrária, baseando-se em uma curva de calibração com sulfato de amônio. Os experimentos foram realizados em triplicata. A atividade específica ($U \cdot mg^{-1}$) foi determinada pela aplicação da equação 5 com a quantificação de proteínas totais por BCA (item 3.4) no mesmo dia deste ensaio. O mesmo parâmetro também foi aferido a partir de uma curva de atividade enzimática, sendo o valor de atividade específica correspondente ao coeficiente angular da reta.

$$Atividade\ específica = \frac{Atividade\ Enzimática}{Concentração\ de\ Proteínas\ totais} \quad (5)$$

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes Native-PAGE foi utilizada para análise qualitativa da PEGuilação da proteína. O sistema de separação é constituído por um gel de separação a 12% composto por tampão Tris 1,5 M, pH 8,8, acrilamida/bis-acrilamida 30%, persulfato de amônio 10% e tetrametiletlenodiamina (TEMED), sobreposto por um gel de empilhamento, composto por tampão Tris 1,5 M, pH 6,8, acrilamida 30%, SDS 10%, persulfato de

amônio 10% e TEMED. Após a montagem do equipamento, que foi preenchido com tampão apropriado, 15 µL das amostras já condicionadas em tampão de carga foram aplicadas em poços criados na superfície do gel, excetuando-se o primeiro poço, que abrigou a mesma quantidade de marcador de massa molecular. O equipamento foi ligado em uma tensão de 120 V por cerca de 2 horas, até o tampão de carga ser expelido do gel. Por fim, o gel obtido foi corado em solução aquosa de Coomassie G-250, 45% (v/v) metanol, 10% ácido acético glacial sob agitação branda, e descorado com solução aquosa de 45% (v/v) metanol, 10% ácido acético glacial em razão 1:1, até a visualização das bandas coradas.

3.7 Ensaio de citotoxicidade

Células neoplásicas de leucemia linfóide aguda (MOLT-4) foram submetidas à ação de L-asparaginase P40S/S206C e de sua forma PEGuilada em *N*-terminal para que seus efeitos citotóxicos fossem comparados. O cultivo das células deu-se em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), incubadas a 37 °C. Para realização dos ensaios, as células foram transferidas para um meio novo, no qual se adicionou-se 10 µL da enzima nas concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 30,0 e 60,0 U/mL, com o intuito de determinar os valores de IC₅₀ e IC₉₀ para cada enzima, sendo incubadas por 72 horas a 37°C. Controles positivos e negativos foram realizados com tampão PBS. Os cultivos controles e teste foram centrifugados (3.220 xg 4°C, 10 minutos) e o *pellet* celular foi subsequentemente ressuspensionado em tampão PBS em duas etapas. Ao término das lavagens, as células foram contadas em câmara de Neubauer e sua concentração celular não-diferencial (viáveis e não viáveis) foi conhecida. Diluiu-se as células em *Binding Buffer* (0.1 M HEPES, pH 7,5; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂) para concentração de 10⁶ células/mL; 5% de Anexina V-Biotina foi adicionada à suspensão celular e, por fim, a amostra foi analisada por teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina). O cálculo das concentrações inibitórias foi realizado com a aplicação das equações 6 e 7.

$$IC_{50} = 2,71 \frac{50-k}{a} \quad (6)$$

$$IC_{90} = 2,71 \frac{90-k}{a} \quad (7)$$

As variáveis “a” e “k” representam, respectivamente, o coeficiente e a constante real da função logarítmica de inibição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção e purificação da L-asparaginase

Para análise do crescimento celular do cultivo de *Escherichia coli* em meio LB empregou-se a curva de correlação entre a massa seca e a DO_{600nm} , $Y = 0,4285 * X$, disposta no anexo A. Com a aplicação da curva, a DO_{600nm} de 2,8 observada corresponde a uma concentração celular final de $1,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, em contraste com a concentração celular inicial de $0,043 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($DO_{600nm} = 0,1$). Os dados calculados permitiram a determinação da produtividade em massa seca de $1,268 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A partir da massa celular, a L-asparaginase P40S/206C foi purificada, sendo que a atividade enzimática e o teor de proteínas totais foram acompanhados ao longo das diversas etapas de purificação, para cálculo dos parâmetros de purificação: atividade específica e fator de purificação (Tabela 1).

Tabela 1 — Etapas de purificação da L-asparaginase P40S/206C.

Procedimento	Atividade total (U)	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
Choque osmótico	136,8	3,92	0,205	3,93	-
Cromatografia de Troca Aniônica	58,3	8,33	0,618	13,46	3,4
Cromatografia SEC	97,6	24,39	1,472	16,57	4,2

A L-asparaginase produzida em *E. coli* é exportada para seu periplasma, onde é armazenada⁶⁷. Este processo é realizado com somente 7 das 25 proteases conhecidas e representa de 4% a 8% da massa de proteína celular⁶⁸. O choque osmótico tem a capacidade de sensibilizar a membrana celular preservando sua estrutura, promovendo a liberação do conteúdo periplasmático para o meio externo⁶⁹. A extração parcial do extrato bruto de L-asparaginase, utilizando somente a solução hiperosmótica, Tris-HCl 20mM, pH 8,0, 20% sacarose, 1 mM EDTA, 100

μM de DTPA, apresentou quantidade de proteína de 0,16 mg/mL e atividade de 1,25 U/mg, enquanto o extrato obtido após a finalização do processo de choque osmótico, apresentou quantidade de proteína de 0,31 mg/mL e atividade de 3,93 U/mg. Demonstra-se aumento da quantidade total de proteínas e aumento de sua atividade com o processo, evidenciando que o choque osmótico foi eficiente em extrair a enzima de interesse do periplasma celular.

Em relação ao processo de purificação do extrato, a cromatografia de troca aniônica resultou em um enriquecimento de 3,4 vezes, consonante com o estudo apresentado por Gonçalves (2021)⁷⁰. Já ao avaliar o bioprocesso como um todo, comparando o extrato inicial obtido a partir do choque osmótico ao material final obtido após a cromatografia de exclusão molecular, observa-se enriquecimento de 4,2 vezes, similar ao resultado obtido por Chand (2022)⁷¹.

4.2 PEGuilação da L-asparaginase

4.2.1 PEGuilação empregando razão de PEG:proteína de 50:1

Inicialmente investigou-se o efeito do tempo de reação no rendimento do processo de PEGuilação, com o emprego da proporção de PEG:proteína de 50:1. Para avaliação do rendimento das reações de PEGuilação, foram utilizados os cromatogramas obtidos após a purificação final por cromatografia de exclusão molecular. Abaixo são demonstrados dois cromatogramas, sendo o primeiro (Figura 3A) de uma proteína não modificada para padronização de seu pico (retirado entre as frações 12-14) e o segundo (Figura 3B) de uma proteína submetida à reação de PEGuilação, no qual podem ser vistos picos referentes a diferentes formas PEGuiladas da enzima (mono e poliPEGuilada), bem como o pico correspondente à sua forma nativa e o pico atribuído ao PEG remanescente, que não reagiu com a proteína.

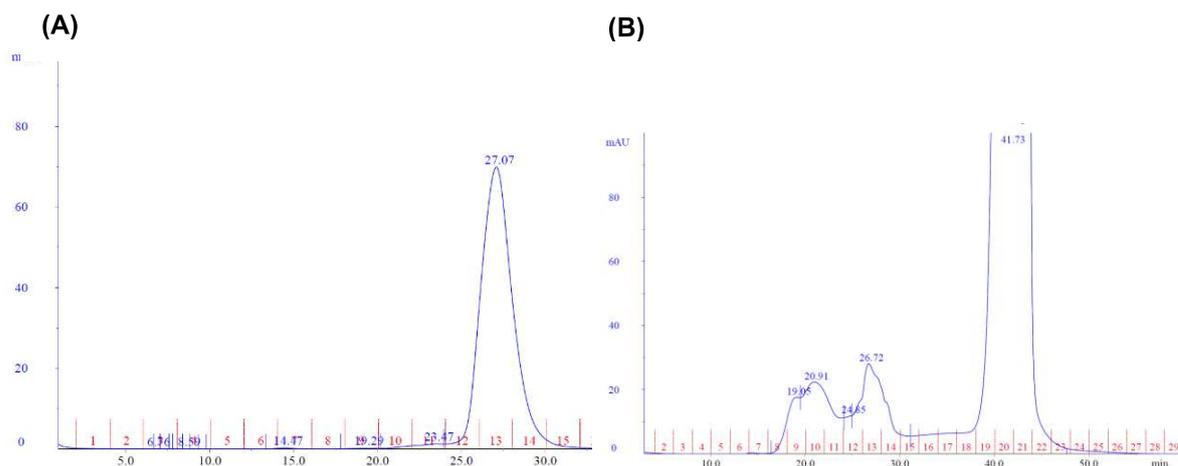


Figura 3 — Cromatogramas de purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC): **(A)** Cromatograma de L-asparaginase P40S/S206C em PBS 100mM, pH 7,5, referente à purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(B)** Cromatograma referente ao meio reacional de PEGuilação em proporção 50:1 de PEG-NHS:L-asparaginase, reagidos em PBS 100mM, pH 7,5 por 20 minutos. Destacam-se, respectivamente, os picos referentes à proteína poliPEGuilada (fração 8-9), monoPEGuilada (fração 10-11), não PEGuilada (fração 12-14) e o PEG remanescente (fração 19-22).

A partir dos cromatogramas obtidos, calculou-se o rendimento de reação de PEGuilação N-terminal, por meio da integração dos picos em SEC-FPLC. Os dados compilados são apresentados no gráfico abaixo (Figura 4), também se compara o uso de diferentes molaridades de tampão, visando verificar seu efeito na obtenção das diferentes espécies PEGuiladas.

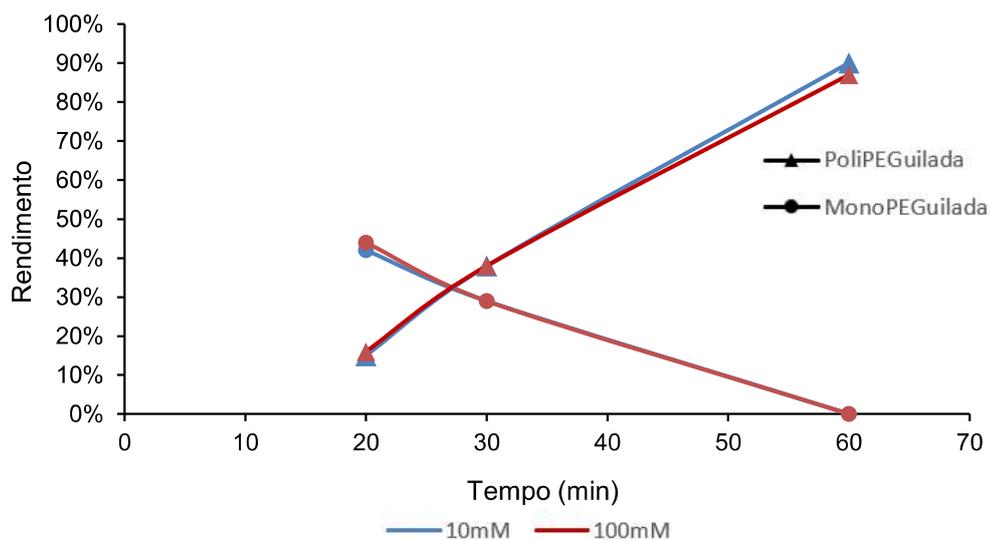


Figura 4 — Influência do tempo de reação no rendimento da L-asparaginase P40S/206C monoPEGuilada e poliPEGuilada em tampão a diferentes valores de molaridade.

Analisando a Figura 4, observa-se sobreposição das curvas na obtenção de ambas as espécies para reações em tampão a diferentes valores de molaridade, demonstrando que sob as condições testadas esse fator não influenciou consideravelmente o processo de PEGuilação da L-asparaginase. No entanto, o tempo de reação se mostrou influente no rendimento das espécies PEGuiladas. Observa-se, que o tempo de reação de 60 minutos resultou na poliPEGuilação de praticamente toda a L-asparaginase presente (90%). Dessa forma, acredita-se que o tempo seja um determinante para a formação do biofármaco poliPEGuilado em reações com 50 equivalentes molares de PEG, sendo provável que o longo tempo de reação leve à adição de estruturas PEG indesejadas na espécie monoPEGuilada, ocasionando a poliPEGuilação.

Considerando a influência do tempo na formação de espécies poliPEGuiladas, realizou-se um experimento com tempo de reação de 10 minutos, sendo o cromatograma resultante apresentado na Figura 5.

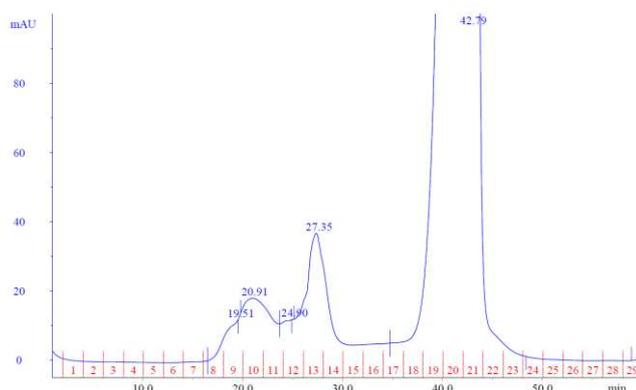


Figura 5 — Cromatograma referente ao meio reacional de PEGuilação em proporção 50:1 de PEG-NHS:L-asparaginase, reagidos em tampão fosfato 10mM, pH 7,5, por 10 minutos, referente à purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Destacam-se os picos referentes à proteína poliPEGuilada (fração 8-9), monoPEGuilada (fração 10-11), reação incompleta (fração 11-12) não PEGuilada (fração 12-14) e o PEG remanescente (fração 18-23).

São observados quatro picos principais, correspondentes às frações: 8-9, 10-11, 12-14 e 18-23; os picos são característicos de poliPEGuilação, monoPEGuilação, proteína não PEGuilada e o PEG remanescente, respectivamente. Adicionalmente, observa-se um pico correspondente às frações 11-12 que se atribuiu a proteínas em que menos de quatro cadeias de PEG se ligaram, ou seja, reação incompleta. Cabe esclarecer que, sendo a L-asparaginase um tetrâmero e, portanto, apresentando quatro grupos N-terminal⁷⁷, a

monoPEGuilação se refere à ligação de quatro cadeias de PEG em cada molécula de proteína. Foram calculados os rendimentos de cada pico contendo proteína, dispostos em ordem de saída, sendo obtidos: 15% para as formas poliPEGuiladas, 28% para a forma monoPEGuilada, 4% reação incompleta e 53% para a L-asparaginase que não reagiu. Verifica-se menor formação da espécie poliPEGuilada e maior de monoPEGuilada, corroborando a hipótese de que o tempo de reação é determinante para a formação de espécies poliPEGuiladas. Outro ponto a ser considerado é o rendimento global da PEGuilação ao analisar a menor formação de espécies poliPEGuiladas, visto que a diminuição dessa espécie pode estar intrinsecamente relacionada ao baixo rendimento de PEGuilação apresentado pela reação.

Em estudo prévio realizado por Torres-Obreque (2017)⁷², foi demonstrado que reações de 30 minutos com 50 equivalentes podem alcançar rendimentos de até 50% da proteína monoPEGuilada, em contraste com os 28% obtidos nesse trabalho. Ressalta-se que os picos referentes as espécies poli e monoPEGuilada mostram-se sobrepostos na Figura 5, uma estratégia para maior separação dos picos é a diminuição do fluxo de corrida. Com esta sobreposição o cálculo dos rendimentos é aproximado, executado através da separação dos picos correspondentes no software do equipamento.

4.2.2 PEGuilação empregando razão de PEG:proteína de 25:1

Segundo os dados obtidos por Meneguetti et al. (2019)⁴¹, a monoPEGuilação N-terminal de L-asparaginase demonstrou melhores resultados na proporção PEG (20 kDa):Proteína de 25:1. Considerando que os resultados prévios apontaram o tempo como um dos fatores determinantes para a poliPEGuilação, testes foram realizados em diferentes tempos: 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos, utilizando a proporção PEG:Proteína de 25:1. Abaixo seguem os cromatogramas obtidos.

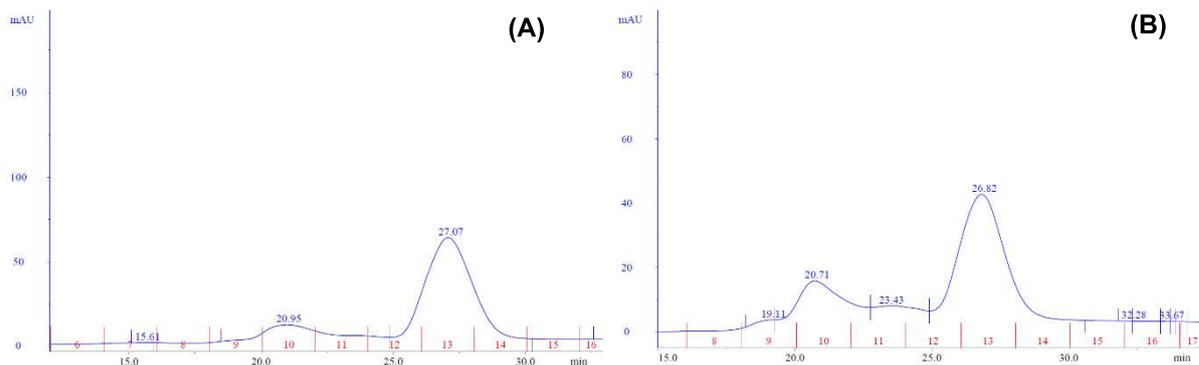


Figura 6 — Cromatograma referente ao meio reacional de PEGuilação em proporção 25:1 de PEG-NHS:L-asparaginase, reagidos em tampão fosfato 10mM, pH 7,5, referente à purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Tempo de reação de 5 minutos. Destacam-se os picos referentes à proteína monoPEGuilada (fração 10) e não PEGuilada (fração 12-14). **(B)** Tempo de reação de 10 minutos. Destacam-se os picos referentes à proteína poliPEGuilada (fração 8-9), monoPEGuilada (fração 9-10), reação incompleta (fração 11-12) e não PEGuilada (fração 12-14).

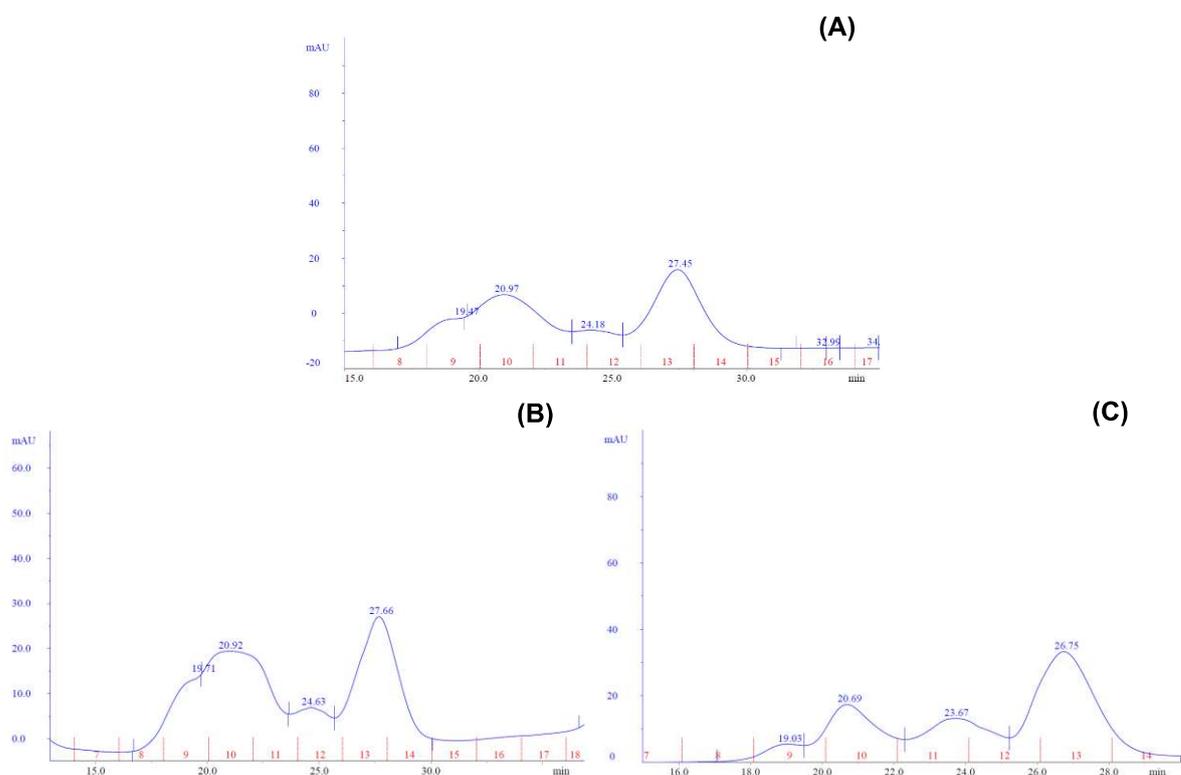


Figura 7 — Cromatograma referente ao meio reacional de PEGuilação em proporção 25:1 de PEG-NHS:L-asparaginase, reagidos em PBS 10Mm, pH 7,5, por: **(A)** 30 minutos; **(B)** 60 minutos; **(C)** 120 minutos; referentes à purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC). Destacam-se os picos referentes à proteína poliPEGuilada (fração 8-9), monoPEGuilada (fração 9-10), reação incompleta (fração 11-12) e não PEGuilada (fração 12-14).

Os cromatogramas exibidos nas Figuras 6 e 7 apresentam picos característicos, referentes à poliPEGuilação, correspondendo às frações 8-9, à forma monoPEGuilada, frações 9-11, e o pico referente à enzima não-PEGuilada nas

frações 12-13. Evidencia-se a formação de um pico adicional nas frações 11-12, possivelmente referente a reação incompleta de monoPEGuilação.

Para verificação dos picos, foi confeccionado um gel nativo de eletroforese com as frações isoladas a partir da PEGuilação em proporção 25:1 de PEG:L-asparaginase, reagidos em tampão fosfato 10mM, pH 7,5, por 60 minutos, de acordo com o cromatograma da Figura 7B. O gel é apresentado na Figura 8.

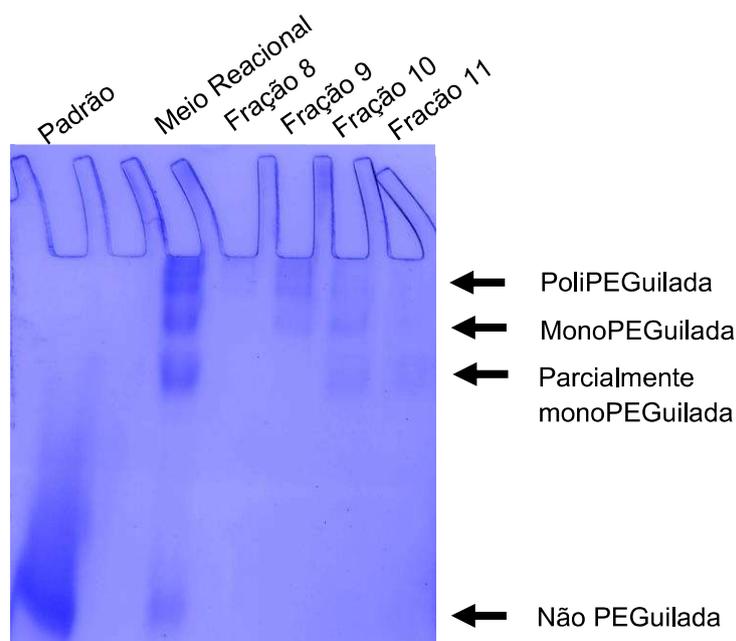


Figura 8 — Eletroforese (Gel Nativo) das amostras obtidas da reação de 25 equivalentes com tempo de reação de 60 minutos, coletadas após purificação em SEC-FPLC. São exibidas raias contendo: padrão (proteína não PEGuilada), mistural reacional de PEGuilação, e as amostras coletadas nos picos das frações 8, 9, 10 e 11 exibidos na Figura 7B. Setas indicam as espécies contidas em cada banda.

Com a separação das proteínas, foi possível identificar a presença da proteína em diferentes formas a partir da comparação das bandas com o padrão (proteína não PEGuilada) e com a informação da massa molecular aproximada de cada espécie. Podem ser destacados quatro pontos de coloração acentuada, podendo ser classificados, respectivamente, como Proteína poliPEGuilada, Proteína monoPEGuilada, Proteína de PEGuilação incompleta (parcialmente monoPEGuilada) e Proteína nativa.

Verifica-se a presença de L-asparaginase monoPEGuilada nos poços contendo as frações 9, 10 e 11 do cromatograma - sua posição é característica devido à reação sítio-dirigida que ao incorporar PEG em sua estrutura diminui a mobilidade eletroforética quando comparada à espécie não PEGuilada. A espécie

poliPEGuilada, devido às várias estruturas de PEG incorporadas, foi incapaz de resolver no gel de separação, ficando concentrada no gel de empacotamento, sendo observada nos poços correspondentes as frações 8, 9 e 10, sendo sua maior concentração (coloração mais acentuada) no segundo, no qual é apresentado o pico característico a espécie (Figura 7B). O poço correspondente à fração 10 contém em maior parte a espécie monoPEGuilada, mas devido a transição de pico observada no cromatograma, detecta-se a presença de outras espécies. A fração 11 contém uma coloração acentuada na terceira banda, corroborando a hipótese da formação de estruturas com reação incompleta. Apesar de serem detectadas misturas entre as espécies, foi possível verificar bandas características as espécies nos poços correspondentes as frações do cromatograma.

Cabe endereçar a complexidade envolvida no processo de purificação de espécies PEGuiladas, já que apesar do protocolo de PEGuilação sítio-específico, diversas espécies conjugadas podem ser formadas^{73,74}, como demonstrado pelos cromatogramas. Adicionalmente, o processo de purificação por cromatografia de exclusão molecular apresenta melhores resultados quando a diferença de tamanho entre as moléculas a serem separadas é de pelo menos 3 vezes⁷⁵. Com tamanhos de, aproximadamente, 133-140 kDa para a L-asparaginase, 173-180 kDa para a monoPEG-asparaginase⁷⁶, o processo torna-se desafiador e com reduzida eficiência, acarretando certa sobreposição dos picos. Contudo, através da integração dos picos, foi possível calcular o rendimento aproximado para cada espécie, disposto abaixo.

Tabela 2 — Rendimentos de cada espécie obtida na reação de PEGuilação da L-asparaginase P40S/S206C em N-terminal em função do tempo, tampão fosfato 10Mm, pH 7,5. Cálculos foram realizados a partir da integração dos picos nos cromatogramas.

Condições de Reação	Rendimento			
	PoliPEGuilada	MonoPEGuilada	Reação incompleta	Não PEGuilada
1 25 eq.; 5 minutos	0%	14%	---	86%
2 25 eq.; 10 minutos	1%	24%	8%	67%
3 25 eq.; 30 minutos	9%	41%	7%	43%
4 25 eq.; 60 minutos	23%	31%	9%	38%

5	25 eq.; 120 minutos	10%	36%	37%	16%
---	------------------------	-----	-----	-----	-----

Para melhor visualização da influência do tempo na formação das espécies, os rendimentos da poliPEGuilação e monoPEGuilação são apresentados no gráfico abaixo.

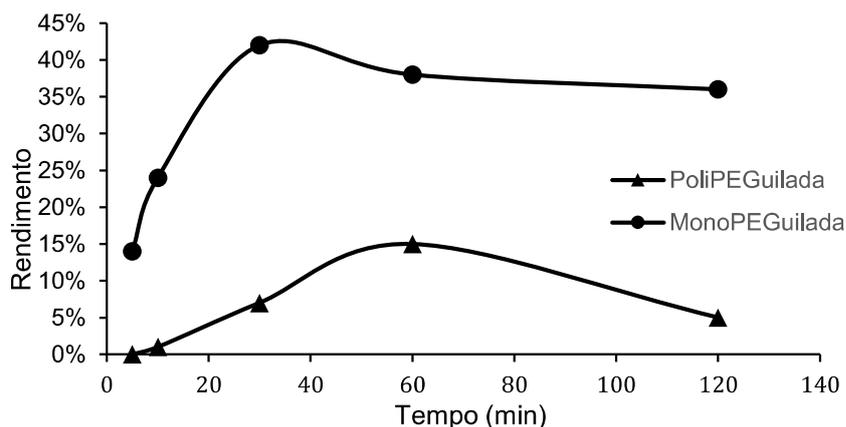


Figura 9 — Comparação da influência do tempo no rendimento das espécies poliPEGuilada e monoPEGuilada da L-asparaginase P40S/206C em 25 equivalentes.

Observa-se novamente que o tempo é uma variável importante do processo de PEGuilação. A curva de formação da espécie monoPEGuilada é deslocada para cima em relação a espécie poliPEGuilada, alcançando o valor máximo de 43% de rendimento no período de 30 minutos, evidenciando que o uso de 25 equivalentes é eficiente para a reação. Destaca-se que a proporção de PEG e o tempo são variáveis críticas no processo de PEGuilação, influenciando no rendimento em relação às espécies formadas. Além disso, verifica-se que em tempos menores, a formação de L-asparaginase poliPEGuilada foi inexistente ou baixa, porém o rendimento em enzima monoPEGuilada também foi baixo, além do baixo rendimento global da reação.

Ao comparar os rendimentos obtidos na produção de L-asparaginase PEGuilada nos períodos de 30 e 60 minutos, utilizando 50 equivalentes e 25 equivalentes é constatada menor formação de espécies poliPEGuiladas na reação com 25 equivalentes, em ambos os tempos.

Outro fator verificado é reação incompleta de PEGuilação. Como mencionado anteriormente, a L-asparaginase é um tetrâmero, ou seja, composta por 4 monômeros, assim contando com quatro sítios disponíveis para a monoPEGuilação

sítio-dirigida em N-terminal⁷⁷. Algumas hipóteses podem ser levantadas sobre o que influencia o processo incompleto de monoPEGuilação. A menor proporção PEG:Proteína pode estar ligada a este processo, já que, apesar de também ser verificada a formação do pico característico em reações com 50 equivalentes, seu rendimento foi menor (4%) do que quando comparado com as reações de menor proporção. Analisando o tempo de reação como variável responsável pelo fenômeno, compara-se as espécies formadas nos tempos de 30 e 60 minutos, reações 3 e 4 (Tabela 2), sendo detectada pouca diferença entre os rendimentos da espécie de reação, havendo certa estabilidade em seu rendimento. É cabível inferir que as espécies demonstram um fino balanço em sua dinâmica de formação, não sendo possível indicar o tempo como fator determinante para a reação incompleta.

Em relação à reação 5 (Tabela 2), observa-se menor rendimento das espécies poliPEGuilada e monoPEGuilada, e grande quantidade de reação incompleta. Uma hipótese gerada para este acontecimento é a reação de hidrólise espontânea do PEG. O PEG-NHS utilizado possui um grupo de saída éster, hidrolisável ao longo do tempo⁷⁷. Dessa forma, é possível que as moléculas de PEG reativo tenham parcialmente se degradado, inviabilizando a reação com a proteína e resultando no baixo rendimento.

A fim de melhorar a resolução dos picos, o fluxo de corrida foi diminuído de 0,5 mL/min para 0,3mL/min. O cromatograma obtido é exibido abaixo:

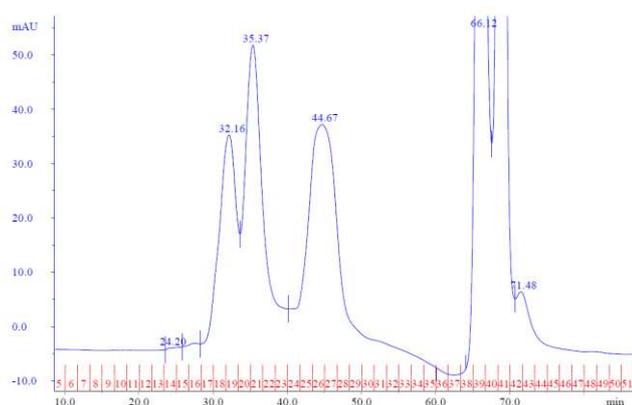


Figura 10 — Cromatograma referente ao meio reacional de PEGuilação em proporção 25:1 de PEG-NHS:L-asparaginase, reagidos em tampão fosfato 10mM, pH 7,5, por 30 minutos, referente à purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC) sob fluxo reduzido. Destacam-se os picos referentes à proteína poliPEGuilada (fração 17-19), monoPEGuilada (fração 20-22) não PEGuilada (fração 13-14) e o PEG remanescente (fração 25-28).

Apesar da melhor resolução dos picos, ainda é evidenciada sobreposição. Não é possível visualizar a formação do pico de reação incompleta, exibido nos outros cromatogramas, o que pode ser explicado pelo aumento da concentração da amostra, fazendo com que o pico não tenha sobressaído no gráfico devido ao seu baixo rendimento em relação as demais espécies.

4.2.3 Atividade Específica

Proteínas submetidas a processos de PEGuilação podem sofrer redução de atividade específica³⁶. A causa desta perda em geral está relacionada a dois fatores: (1) a restrição conformacional resultante da ligação covalente de cadeias de PEG e (2) o impedimento estérico que as cadeias de PEG podem causar, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo³⁷. Portanto, reações de PEGuilação de primeira geração, em que mais cadeias de PEG se ligam à proteína e ocorre maior polidispersão, em geral resultam em diminuição da atividade específica. As reações de segunda geração, sítio-dirigidas, como a empregada neste projeto, foram desenvolvidas com o objetivo de contornar os problemas apresentados pela geração anterior⁷⁹.

A atividade específica da enzima monoPEGuilada foi calculada baseada na determinação da concentração e da atividade de L-asparaginase, empregando-se o método de quantificação de BCA e o método de Nessler, respectivamente. A título de comparação, a forma não PEGuilada da enzima foi submetida aos mesmos testes simultaneamente. As curvas de atividade são apresentadas na Figura 11.

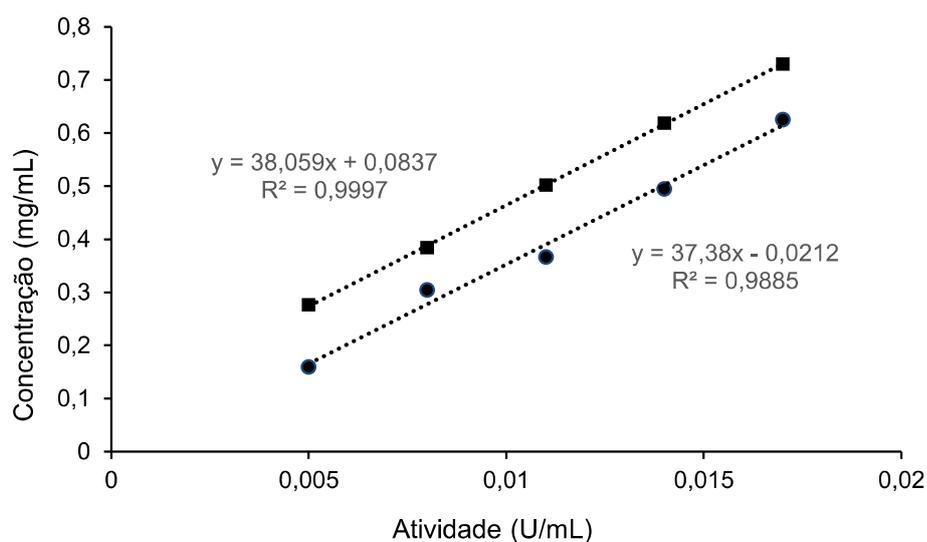


Figura 11 — Atividade da L-asparaginase P40S/206C não PEGuilada (quadrados) e monoPEGuilada em N-terminal (círculos) em função da concentração da proteína.

As curvas mostram-se bem ajustadas com R^2 próximo a 1. A espécie monoPEGuilada apresentou atividade específica de $37,38 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, semelhante à forma não PEGuilada ($38,06 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$). Observou-se a manutenção da atividade específica, com uma variação menor que 2% após o processo de PEGuilação. Portanto, a PEGuilação sítio-específica não deve interferir significativamente no perfil farmacodinâmico da enzima.

Em contrapartida, como abordado por Meneghetti et al (2019)⁴¹, a asparaginase poliPEGuilada demonstra diminuição em sua atividade específica. Apresentando uma grande quantidade de sítios disponíveis à PEGuilação, a asparaginase poliPEGuilada apresenta maior modificação e conseqüentemente suscetibilidade de interferência de acesso do substrato ao sítio ativo por efeito estérico do PEG. Dessa forma, é reforçada a vantagem da monoPEGuilação sítio-específica frente a poliPEGuilação na preservação da atividade da asparaginase

4.2.4 Ensaio de Citotoxicidade

A Atividade citotóxica da L-asparaginase monoPEGuilada foi avaliada a partir de sua incubação junto à linhagem celular de leucemia linfóide aguda MOLT-4 sensível à L-asparaginase em uma faixa de concentração de $0,01$ a $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. O controle foi preparado sob as mesmas condições, utilizando a enzima em sua forma

não PEGuilada. Após o tempo de incubação, aplicou-se MTT para determinar a viabilidade celular em cada uma das concentrações preparadas. As absorbâncias obtidas em triplicata foram ajustadas a partir do controle positivo e tratadas para confecção de uma curva inibitória para cada espécie (Figuras 12 e 13). Com as equações provenientes de cada curva, realizou-se o cálculo das concentrações inibitórias 50% e 90% das células viáveis, que estão resumidas na Tabela 3.

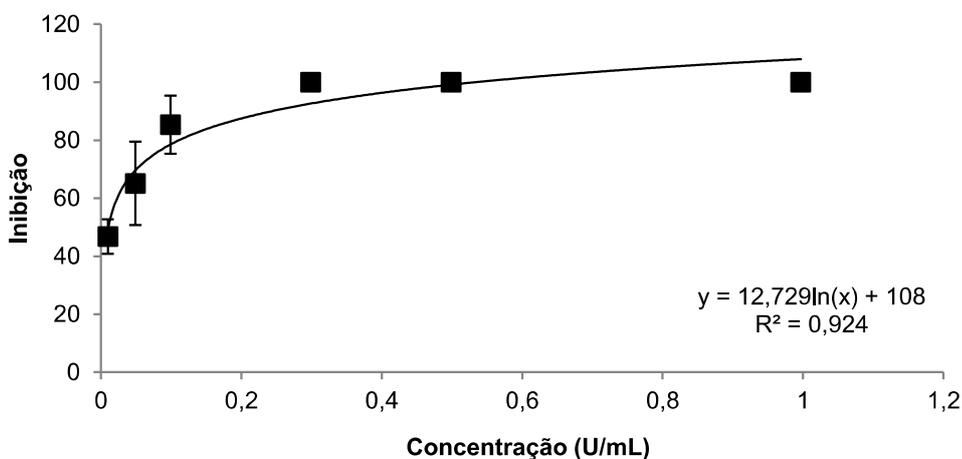


Figura 12 — Porcentagem de inibição do crescimento da linhagem celular leucêmica MOLT-4 em função da concentração de L-asparaginase P40S/206C monoPEGuilada em N-terminal, a partir dos ensaios de MTT. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

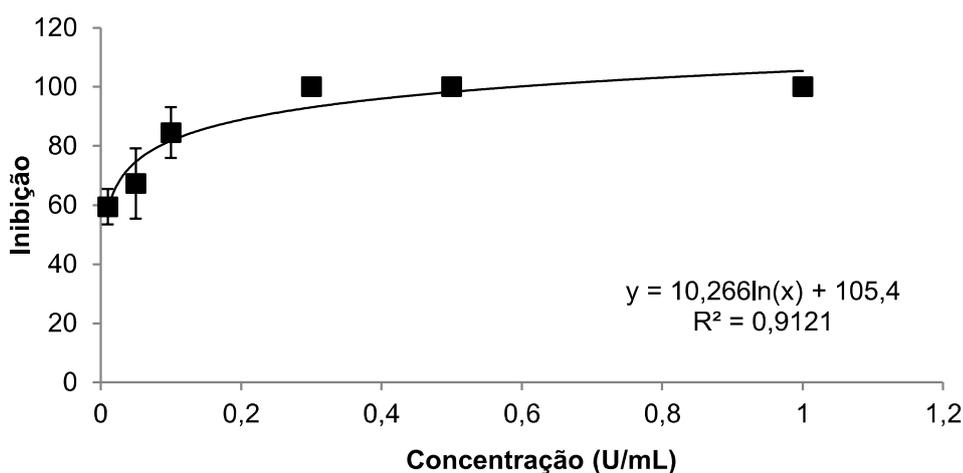


Figura 13 — Porcentagem de inibição do crescimento da linhagem celular leucêmica MOLT-4 em função da concentração de L-asparaginase P40S/206C não PEGuilada, a partir dos ensaios de MTT. As baarras de erro correspondem ao desvio padrão.

Tabela 3 — Concentrações inibitórias da L-asparaginase P40S/S206C e sua forma PEGuilada em N-terminal, obtidas através do teste de viabilidade celular por MTT.

L-Asparaginase P40S/S206C		
	Não PEGuilada	MonoPEGuilada
IC₅₀ (U.mL⁻¹)	0,014 ± 0,007	0,029 ± 0,021
IC₉₀ (U.mL⁻¹)	0,281 ± 0,023	0,295 ± 0,072

A concentração inibitória para inviabilizar 50% das células apresenta consonância com valores demonstrados por Irino (2004)⁸⁰ em seus estudos com a L-asparaginase não PEGuilada. Quando comparados os resultados obtidos para as duas espécies, considerando o desvio padrão obtido, observa-se manutenção dos valores inibitórios para a concentração inibitória de 50%, e leve variação para a concentração de 90%, demonstrando que o processo de PEGuilação resultou em baixa interferência na atividade citotóxica da enzima.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, investigamos a PEGuilação N-terminal de L-asparaginase P40S/S206C, sendo que as condições que forneceram os melhores resultados foram: tampão PBS 10mM pH 7,5, razão PEG:Proteína de 25:1 e tempo de reação de 30 minutos. Apesar de resultar em certo grau de polidispersão, o protocolo escolhido apresentou o melhor rendimento da espécie monoPEGuilada (41%). A espécie não PEGuilada recuperada na reação pode ser empregada em um novo processo de PEGuilação.

A L-asparaginase P40S/206C monoPEGuilada reteve sua atividade específica, demonstrando que o processo de PEGuilação resulta em enzima ativa e potencialmente passível de ser empregada para o tratamento da leucemia. Ensaios *in vitro* de citotoxicidade celular frente à linhagem leucêmica (MOLT-4) demonstraram que a enzima mantém o perfil de citotoxicidade em comparação à forma não PEGuilada, confirmando que a PEGuilação preservou as características necessárias para seu emprego terapêutico.

Dessa forma, apresentou-se um procedimento estratégico para o aprimoramento de uma nova L-asparaginase mutante visando melhorar o tratamento da Leucemia Linfóide Aguda. A reação de PEGuilação sítio-dirigida em N-terminal otimizada pode proporcionar maior controle produtivo, além da redução do potencial imunogênico da enzima devido à baixa polidispersão. Ademais, o processo prevê melhorias nos parâmetros farmacocinéticos com aumento da resistência da proteína frente a proteases, característica já intrínseca da proteína mutante, e diminuição da imunogenicidade, proporcionando aumento de meia vida e conseqüentemente maior intervalo entre doses.

Considerando o potencial da L-asparaginase P40S/206C monoPEGuilada para o desenvolvimento de um novo biofármaco, sugere-se como perspectiva futura a realização de estudos de estabilidade, resistência a proteases e testes *in vitro* de imunogenicidade.

REFERÊNCIAS

1. LANVERS-KAMINSKY, C. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 79, n. 3, p. 439–450, 14 fev. 2017.
2. MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, v. 395, n. 10230, p. 1146–1162, abr. 2020.
3. PUI, C.-H. et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *Journal of Clinical Oncology*, v. 33, n. 27, p. 2938–2948, 20 set. 2015.
4. VAN MAELE-FABRY, G. et al. Childhood leukemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes & Control*, v. 21, n. 6, p. 787–809, 21 fev. 2010.
5. PHILIP, A. T. et al. Detection of Acute Lymphoblastic Leukemia in Microscopic images using Image Processing Techniques. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 1937, n. 1, p. 012022, 1 jun. 2021.
6. VAN TRIMPONT, M. et al. Novel Insights on the Use of L-Asparaginase as an Efficient and Safe Anti-Cancer Therapy. *Cancers*, v. 14, n. 4, p. 902, 11 fev. 2022.
7. KOPRIVNIKAR, J.; MCCLOSKEY, J.; FADERL, S. H. Safety, efficacy, and clinical utility of asparaginase in the treatment of adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *OncoTargets and Therapy*, v. Volume 10, p. 1413–1422, mar. 2017.
8. KIDD, J. G. REGRESSION OF TRANSPLANTED LYMPHOMAS INDUCED IN VIVO BY MEANS OF NORMAL GUINEA PIG SERUM. *Journal of Experimental Medicine*, v. 98, n. 6, p. 583–606, 1 dez. 1953.
9. BROOME, J. D. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. *Nature*, v. 191, n. 4793, p. 1114–1115, set. 1961.
10. SCHWARTZ, J. H.; REEVES, J. Y.; BROOME, J. D. Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 56, n. 5, p. 1516–1519, nov. 1966.
11. HILL, J. M. L-Asparaginase Therapy for Leukemia and Other Malignant Neoplasms. *JAMA*, v. 202, n. 9, p. 882, 27 nov. 1967.

12. BHOJWANI, D. YANG, J. J.; PUI, C.-H. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, v. 62, n. 1, p. 47–60, fev. 2015.
13. JULURI, K. R.; SIU, C.; CASSADAY, R. D. Asparaginase in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Current Evidence and Place in Therapy. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*, v. Volume 12, p. 55–79, maio 2022.
14. EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, v. 7, n. 2, p. 62–71, jun. 2016.
15. LOPES, A. M. et al. Therapeutical-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 37, n. 1, p. 82–99, 23 dez. 2015.
16. ROTH, G. et al. Recombinant *Erwinia carotovora* I-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 2, p. 245–256, jun. 2013.
17. CHARBONNEAU, D. M. et al. Development of *Escherichia coli* Asparaginase II for Immunosensing: A Trade-Off between Receptor Density and Sensing Efficiency. *ACS Omega*, v. 2, n. 5, p. 2114–2125, 17 maio 2017.
18. SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETITD.; D'ARI, R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 23, p. 8746–8749, dez. 2007.
19. BARROS, T. et al. Development of Processes for Recombinant L-Asparaginase II Production by *Escherichia coli* BI21 (De3): From Shaker to Bioreactors. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 1, p. 14, 24 dez. 2020.
20. BRODSKY, O.; CRONIN, C. N. Economical parallel protein expression screening and scale-up in *Escherichia coli*. *Journal of Structural and Functional Genomics*, v. 7, n. 2, p. 101–108, 23 dez. 2006.
21. MIERENDORF, R. C. et al. Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods in Molecular Medicine*, v. 13, p. 257–292, 1998.
22. MERGULHÃO, F. J. M.; SUMMERS, D. K.; MONTEIRO, G. A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, v. 23, n. 3, p. 177–202, maio 2005.
23. ROSANO, G. L.; MORALES, E. S. CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli* : A 5-year update. *Protein Science*, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, jul. 2019.

24. MUNEER, F. et al. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. *Archives of Microbiology*, v. 202, n. 5, p. 967–981, 12 fev. 2020.
25. HOP, W. C. J. et al. L-asparaginase and the effect of age on coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 100, n. 08, p. 330–337, 2008.
26. DURDEN, D. L.; SALAZAR, A. M.; DISTASIO, J. A. Kinetic analysis of hepatotoxicity associated with antineoplastic asparaginases. *Cancer Research*, v. 43, n. 4, p. 1602–1605, 1 abr. 1983.
27. HEITINK-POLLÉ, K. M. J. et al. High incidence of symptomatic hyperammonemia in children with acute lymphoblastic leukemia receiving pegylated asparaginase. *JIMD reports*, v. 7, p. 103–108, 2013.
28. AVRAMIS, V. I.; TIWARI, P. N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, n. 3, p. 241–254, 2006.
29. FONSECA, M. H. G. et al. Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 139, p. 111-616, jul. 2021.
30. KAMAL, N. et al. Asparaginase-induced hepatotoxicity: rapid development of cholestasis and hepatic steatosis. *Hepatology International*, v. 13, n. 5, p. 641–648, 7 ago. 2019.
31. BARAL, A. et al. Selection of the Optimal L-asparaginase II Against Acute Lymphoblastic Leukemia: An In Silico Approach. *JMIRx Med*, v. 2, n. 3, p. e29844, 8 set. 2021.
32. HIJIYA, N.; VAN DER SLUIS, I. M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, v. 57, n. 4, p. 748–757, 20 nov. 2015.
33. THU HUYNH, V.; BERGERON, S. Asparaginase Toxicities: Identification and Management in Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, v. 21, n. 5, p. E248–E259, 1 out. 2017
34. HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, n. 3, p. 214–221, mar. 2003.
35. DAMODARAN, VINOD BABU; FEE, C. Protein PEGylation: An overview of chemistry and process considerations. *European Pharmaceutical Review*, v. 15, n. 1, p. 18–26, 3 fev. 2010.

36. 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, jan. 2008.
37. JEVSEVAR, S.; KUNSTELJ, M.; POREKAR, V. G. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnology Journal*, v. 5, n. 1, p. 113–128, jan. 2010.
38. GUPTA, V. et al. Protein PEGylation for cancer therapy: bench to bedside. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 13, n. 3, p. 319–330, 29 nov. 2018.
39. SANTOS, J. H. P. M. ; TORRES-OBREQUE, K. M. ; MENEGUETTI, G. P. ; AMARO, B. P. ; RANGEL-YAGUI, C. O. Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.54, n.SPE, 2018.
40. DAI, Z.-J.; HUANG, Y.-Q.; LU, Y. Efficacy and safety of PEG-asparaginase versus *E. coli* L-asparaginase in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Translational Pediatrics*, v. 10, n. 2, p. 244–255, fev. 2021.
41. MENEGHETTI, G. P. et al. Novel site-specific PEGylated L-asparaginase. *PLOS ONE*, v. 14, n. 2, p. e0211951, 12 fev. 2019.
42. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. A. et al. Stabilization of α -chymotrypsin upon PEGylation correlates with reduced structural dynamics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, n. 6, p. 1142–1149, 15 dez. 2008.
43. 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, abr. 2002.
44. MISHRA, P.; NAYAK, B.; DEY, R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 11, n. 3, p. 337–348, jun. 2016.
45. GABERC-POREKAR, V. et al. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, v. 11, n. 2, p. 242–250, 1 mar. 2008.
46. DOZIER, J.; DISTEFANO, M. Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 10, p. 25831–25864, 28 out. 2015.
47. PIEDMONTE, D. M.; TREUHEIT, M. J. Formulation of Neulasta® (pegfilgrastim). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 1, p. 50–58, jan. 2008.

48. GREEN, M. D. et al. A randomized double-blind multicenter phase III study of fixed-dose single-administration pegfilgrastim versus daily filgrastim in patients receiving myelosuppressive chemotherapy. *Annals of Oncology*, v. 14, n. 1, p. 29–35, jan. 2003.
49. VARLAND, S.; OSBERG, C.; ARNESEN, T. N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects. *PROTEOMICS*, v. 15, n. 14, p. 2385–2401, 16 jun. 2015.
50. KINSTLER, O. et al. Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)–protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 4, p. 477–485, jun. 2002.
51. NISCHAN, N.; HACKENBERGER, C. P. R. Site-specific PEGylation of Proteins: Recent Developments. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 79, n. 22, p. 10727–10733, 3 nov. 2014.
52. ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253.
53. NILES, A. L.; MORAVEC, R. A.; RISS, T. L. In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Current Chemical Genomics*, v. 3, p. 33–41, 11 jun. 2009.
54. ASSELIN, B. L. et al. In vitro and in vivo killing of acute lymphoblastic leukemia cells by L-asparaginase. *Cancer Research*, v. 49, n. 15, p. 4363–4368, 1 ago. 1989.
55. CLEMEDSON, C.; EKWALL, B. Overview of the Final MEIC Results: I. The In Vitro–In Vitro Evaluation. *Toxicology in Vitro*, v. 13, n. 4-5, p. 657–663, ago. 1999.
56. SEO, B. R.; DELNERO, P.; FISCHBACH, C. In vitro models of tumor vessels and matrix: Engineering approaches to investigate transport limitations and drug delivery in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 69-70, p. 205–216, abr. 2014.
57. COSTA-SILVA, T. A. et al. Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. *Blood Reviews*, v. 43, p. 100651, set. 2020.
58. HUSAIN, I. et al. Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from *Enterobacter cloacae*: In-Vitro Evaluation of Cytotoxic

Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. PLOS ONE, v. 11, n. 2, p. e0148877, 18 fev. 2016.

59. PIETERS, R. et al. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood*, v. 76, n. 11, p. 2327–2336, 1 dez. 1990.
60. JIANG, L. et al. Monitoring the progression of cell death and the disassembly of dying cells by flow cytometry. *Nature Protocols*, v. 11, n. 4, p. 655–663, 3 mar. 2016.
61. STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, maio 2001.
62. BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, v. 24, n. 2-3, p. 119–124, fev. 1985.
63. KASPERS, G. J. L. et al. In Vitro Cellular Drug Resistance and Prognosis in Newly Diagnosed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, v. 90, n. 7, p. 2723–2729, 1 out. 1997.
64. RODRIGUES, Mariane A. D.; PIMENTA, Marcela V.; COSTA, Iris M.; et al. Influence of lysosomal protease sensitivity in the immunogenicity of the antitumor biopharmaceutical asparaginase. *Biochemical Pharmacology*, v. 182, p. 114230, 2020.
65. CHAIB, F.; BERNIER, A.; BRAENDLI, E. Towards large scale methods for the selective release of periplasmic human cystatin C from E. coli. *Biotechnology Techniques*, v. 9, n. 3, p. 179–184, mar. 1995.
66. SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.*, v.150, p. 76-86,.1985
67. SANTOS, Juan Carlos Flores. Cultivo de Escherichia coli BL21 (DE3) para produção de L-asparaginase II. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/D.9.2017.tde-27042017-172422. Acesso em: 2022-09-14.
68. FRENCH, C.; KESHAVARZ-MOORE, E.; WARD, J. M. Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the Escherichia coli periplasm. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, n. 5, p. 332–338, out. 1996.
69. PEREIRA, Larissa Miranda. Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante. 2009. Dissertação

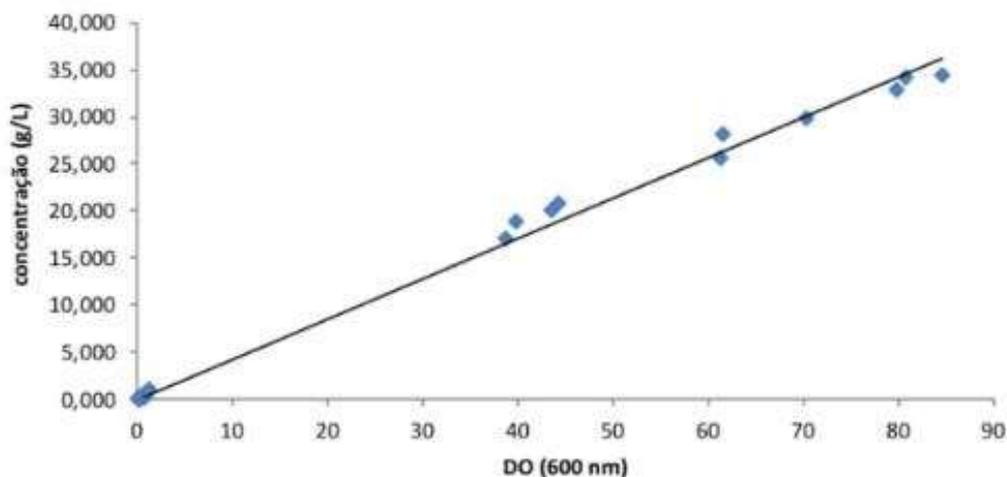
(Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. doi:10.11606/D.85.2009.tde-22092011-101810. Acesso em: 2023-03-14.

70. GONÇALVES, Vinicius de Lima. Obtenção e purificação de L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* produzida por *Escherichia coli* recombinante. 2019. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11422/13581>. Acesso em: 2022-09-13
71. CHAND, S. et al. L-asparaginase from *Bacillus flexus* strain SS: Isolation, Screening, Production Process Optimization, Purification, and Anticancer Activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 58, n. 4, p. 416–427, 12 jul. 2022..
72. TORRES-OBREQUE, Karin; GIOVANNA PASTORE MENEGUETTI; DÉBORA FERNANDES CUSTODIO; et al. Production of a novel N-terminal PEGylated crisantaspase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 66, n. 3, p. 281–289, 2019.
73. YU, D., SHANG, X. & GHOSH, R. Fractionation of different PEGylated forms of a protein by chromatography using environment-responsive membranes. *Journal of Chromatography A.*, v.1217, n.35, p.5595–601, 2010.
74. SHANG, X. Synthesis and purification of pegylated proteins. 2013. 196 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - McMaster University, Ontario.
75. GUTTMAN, C. Purify, purify and...purify more: tips for improving your protein purification capabilities – part 4, Benchwise, 2012. Disponível em <<https://benchwise.wordpress.com/2012/02/19/purify-purify-and-purify-more-tips-forimproving-protein-purification-capabilities/>>. Acesso em: 2023-05-02.
76. NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l'asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 61, n.3, p. 208-221. 2007.
77. UPADHYAY, A., SINGH, A., MUKHERJEE, K.J. & PANDA, A.K. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E.coli* in to active tetrameric protein. *Frontiers in Microbiology*, v.5, n.486, 2014.
78. TURECEK, et al PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.105, n.2, p.460-475, 2016.
79. ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 4, p. 459–476, jun. 2002.

80. IRINO, T. et al. Establishment of Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Quantitative Analysis of Asparagine Synthetase Expression. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 6, n. 3, p. 217–224, ago. 2004.
81. SWAIN, A. L. et al. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 4, p. 1474–1478, 15 fev. 1993.

ANEXO

CURVA DE CORRELAÇÃO ENTRE A DO600nm E A CONCENTRAÇÃO CELULAR DE *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3). AUTORIA CONJUNTA DO ALUNO DE DOUTORADO RAFAEL BERTELLI FERRARO E DR^a LARISSA PEREIRA BRUMANO. R2 = 0,9957; EQUAÇÃO: $Y = 0,4285 * X$



Documento assinado digitalmente
GUILHERME RAMOS BENEVIDES
Data: 23/05/2023 09:16:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Data e assinatura do aluno(a)

DocuSigned by:

Carlota de Oliveira Rangel Yasqui

623A43BE7D6D48D...

Data e assinatura do orientador(a)

Certificate Of Completion

Envelope Id: D9898E21A19849D0BC7ABD6DDBF381E4	Status: Completed
Subject: [USPAssina] Documento para assinatura via DocuSign	
Source Envelope:	
Document Pages: 45	Signatures: 1
Certificate Pages: 4	Initials: 0
AutoNav: Enabled	Envelope Originator:
EnvelopeId Stamping: Enabled	USP Universidade de São Paulo
Time Zone: (UTC-03:00) Brasilia	Av. Prof. Luciano Gualberto, travessa 3 no 71
	São Paulo, SP 05508-010
	uspassina@usp.br
	IP Address: 200.144.237.2

Record Tracking

Status: Original 23/5/2023 09:45	Holder: USP Universidade de São Paulo uspassina@usp.br	Location: DocuSign
---------------------------------------	---	--------------------

Signer Events

Carlota de Oliveira Rangel Yagui
corangel@usp.br
Security Level:
.Email
23/5/2023 | 09:45

Signature

DocuSigned by:
Carlota de Oliveira Rangel Yagui
623A43BE7D6D48D...

Signature Adoption: Pre-selected Style
Using IP Address: 193.61.207.239

Timestamp

Sent: 23/5/2023 | 09:45
Viewed: 23/5/2023 | 09:46
Signed: 23/5/2023 | 09:47
Freeform Signing

Electronic Record and Signature Disclosure:
Accepted: 23/5/2023 | 09:46
ID: 93d96726-caa4-49fd-a485-46366ec7b612

In Person Signer Events	Signature	Timestamp
Editor Delivery Events	Status	Timestamp
Agent Delivery Events	Status	Timestamp
Intermediary Delivery Events	Status	Timestamp
Certified Delivery Events	Status	Timestamp
Carbon Copy Events	Status	Timestamp
Witness Events	Signature	Timestamp
Notary Events	Signature	Timestamp
Envelope Summary Events	Status	Timestamps
Envelope Sent	Hashed/Encrypted	23/5/2023 09:45
Certified Delivered	Security Checked	23/5/2023 09:46
Signing Complete	Security Checked	23/5/2023 09:47
Completed	Security Checked	23/5/2023 09:47
Payment Events	Status	Timestamps
Electronic Record and Signature Disclosure		

ELECTRONIC RECORD AND SIGNATURE DISCLOSURE

From time to time, PETACORP OBO Universidade de Sao Paulo (we, us or Company) may be required by law to provide to you certain written notices or disclosures. Described below are the terms and conditions for providing to you such notices and disclosures electronically through the DocuSign system. Please read the information below carefully and thoroughly, and if you can access this information electronically to your satisfaction and agree to this Electronic Record and Signature Disclosure (ERSD), please confirm your agreement by selecting the check-box next to 'I agree to use electronic records and signatures' before clicking 'CONTINUE' within the DocuSign system.

Getting paper copies

At any time, you may request from us a paper copy of any record provided or made available electronically to you by us. You will have the ability to download and print documents we send to you through the DocuSign system during and immediately after the signing session and, if you elect to create a DocuSign account, you may access the documents for a limited period of time (usually 30 days) after such documents are first sent to you. After such time, if you wish for us to send you paper copies of any such documents from our office to you, you will be charged a \$0.00 per-page fee. You may request delivery of such paper copies from us by following the procedure described below.

Withdrawing your consent

If you decide to receive notices and disclosures from us electronically, you may at any time change your mind and tell us that thereafter you want to receive required notices and disclosures only in paper format. How you must inform us of your decision to receive future notices and disclosure in paper format and withdraw your consent to receive notices and disclosures electronically is described below.

Consequences of changing your mind

If you elect to receive required notices and disclosures only in paper format, it will slow the speed at which we can complete certain steps in transactions with you and delivering services to you because we will need first to send the required notices or disclosures to you in paper format, and then wait until we receive back from you your acknowledgment of your receipt of such paper notices or disclosures. Further, you will no longer be able to use the DocuSign system to receive required notices and consents electronically from us or to sign electronically documents from us.

All notices and disclosures will be sent to you electronically

Unless you tell us otherwise in accordance with the procedures described herein, we will provide electronically to you through the DocuSign system all required notices, disclosures, authorizations, acknowledgements, and other documents that are required to be provided or made available to you during the course of our relationship with you. To reduce the chance of you inadvertently not receiving any notice or disclosure, we prefer to provide all of the required notices and disclosures to you by the same method and to the same address that you have given us. Thus, you can receive all the disclosures and notices electronically or in paper format through the paper mail delivery system. If you do not agree with this process, please let us know as described below. Please also see the paragraph immediately above that describes the consequences of your electing not to receive delivery of the notices and disclosures electronically from us.

How to contact PETACORP OBO Universidade de Sao Paulo:

You may contact us to let us know of your changes as to how we may contact you electronically, to request paper copies of certain information from us, and to withdraw your prior consent to receive notices and disclosures electronically as follows:

To contact us by email send messages to: lefregna@usp.br

To advise PETACORP OBO Universidade de Sao Paulo of your new email address

To let us know of a change in your email address where we should send notices and disclosures electronically to you, you must send an email message to us at lefregna@usp.br and in the body of such request you must state: your previous email address, your new email address. We do not require any other information from you to change your email address.

If you created a DocuSign account, you may update it with your new email address through your account preferences.

To request paper copies from PETACORP OBO Universidade de Sao Paulo

To request delivery from us of paper copies of the notices and disclosures previously provided by us to you electronically, you must send us an email to lefregna@usp.br and in the body of such request you must state your email address, full name, mailing address, and telephone number. We will bill you for any fees at that time, if any.

To withdraw your consent with PETACORP OBO Universidade de Sao Paulo

To inform us that you no longer wish to receive future notices and disclosures in electronic format you may:

- i. decline to sign a document from within your signing session, and on the subsequent page, select the check-box indicating you wish to withdraw your consent, or you may;
- ii. send us an email to lefregna@usp.br and in the body of such request you must state your email, full name, mailing address, and telephone number. We do not need any other information from you to withdraw consent.. The consequences of your withdrawing consent for online documents will be that transactions may take a longer time to process..

Required hardware and software

The minimum system requirements for using the DocuSign system may change over time. The current system requirements are found here: <https://support.docusign.com/guides/signer-guide-signing-system-requirements>.

Acknowledging your access and consent to receive and sign documents electronically

To confirm to us that you can access this information electronically, which will be similar to other electronic notices and disclosures that we will provide to you, please confirm that you have read this ERSD, and (i) that you are able to print on paper or electronically save this ERSD for your future reference and access; or (ii) that you are able to email this ERSD to an email address where you will be able to print on paper or save it for your future reference and access. Further, if you consent to receiving notices and disclosures exclusively in electronic format as described herein, then select the check-box next to 'I agree to use electronic records and signatures' before clicking 'CONTINUE' within the DocuSign system.

By selecting the check-box next to 'I agree to use electronic records and signatures', you confirm that:

- You can access and read this Electronic Record and Signature Disclosure; and
- You can print on paper this Electronic Record and Signature Disclosure, or save or send this Electronic Record and Disclosure to a location where you can print it, for future reference and access; and
- Until or unless you notify PETACORP OBO Universidade de Sao Paulo as described above, you consent to receive exclusively through electronic means all notices, disclosures, authorizations, acknowledgements, and other documents that are required to be provided or made available to you by PETACORP OBO Universidade de Sao Paulo during the course of your relationship with PETACORP OBO Universidade de Sao Paulo.