

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Carolina Ferraz Babin Correa

Engenharia de proteínas aplicadas à L-asparaginase II de *E. coli* para o aumento da
atividade enzimática e redução da imunogenicidade

São Carlos
2022

Carolina Ferraz Babin Correa

Engenharia de proteínas aplicadas à L-asparaginase II de *E. coli* para o aumento da atividade enzimática e redução da imunogenicidade

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Victório Carvalho Guido - Instituto de Física de São Carlos.

São Carlos
2022

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.

RESUMO

A L-asparaginase II tem grande importância, devido à sua atividade antitumoral. Ela é utilizada, principalmente no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), possuindo alto índice de cura. Porém, há fatores limitantes para sua utilização, como a imunogenicidade e a atividade glutaminase, que podem causar efeitos adversos e reduzir o efeito do medicamento. O principal objetivo do presente trabalho é o estudo da viabilidade de mutações sítio-dirigidas. Através de mutações pontuais em locais estratégicos, procura-se aumentar a atividade enzimática e reduzir a imunogenicidade da L-asparaginase II de *Escherichia coli*. São sugeridas duas mutações para o aumento da atividade enzimática (R116S e R116T) e quatro mutações para a diminuição da imunogenicidade (N219G, N219A, D204R e D204N). Para a redução da constante de Michaelis, sugerimos uma mutação em uma alça localizada próximo ao sítio ativo, onde o aminoácido a ser substituído possui um grande volume estérico, devido a sua cadeia lateral longa. Para a redução da imunogenicidade, as sugestões de substituição foram feitas em resíduos já identificados como epítomos, com o objetivo de fazer com que o anticorpo não os reconheça. Portanto, os resíduos selecionados para substituição apresentam características moleculares e físico-químicas diferentes do aminoácido presente na enzima selvagem. A análise das mudanças na estabilidade termodinâmica causadas pelas mutações foram feitas utilizando o servidor *web* PoPMuSIC, que calcula a energia de desenovelamento da proteína ($\Delta\Delta G$) com base na estrutura da proteína do tipo selvagem e um conjunto de funções de energia. Para valores de $\Delta\Delta G$ negativos a mutação tende a ser estabilizadora e quanto maior for esse valor mais desestabilizadora é essa mutação. Ao obter os valores de $\Delta\Delta G$, é possível observar que duas mutações têm maiores chances de serem desestabilizadoras, são elas R116S e N219G, isso se deve a características específicas desses aminoácidos e a característica do resíduo presente na proteína selvagem. Para a avaliação da atividade catalítica dos mutantes planejados, é sugerida a quantificação da atividade enzimática através da utilização do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (AHA). Para análise da imunogenicidade, recomenda-se a utilização do método de Western-Blot. Portanto, temos que os mutantes R116T, N219A, D204R e D204N tendem a apresentar propriedades catalíticas e/ou imunogênicas otimizadas em relação a enzima selvagem. Portanto, esses mutantes são potenciais biofármacos candidatos a agentes quimioterápicos.

Palavras-chave: L-asparaginase. Mutação sítio-dirigida. Leucemia Linfóide Aguda. Biofármaco.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA E APLICAÇÃO

A L-asparaginase é uma enzima utilizada como importante agente quimioterápico, principalmente no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Este tipo de câncer tem como principal característica o acúmulo de células tumorais na medula óssea, que acabam substituindo as células sanguíneas normais, como hemácias e linfócitos. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que sejam diagnosticados no Brasil cerca de 10.810 novos casos de LLA a cada ano, sendo 5.920 em homens e 4.890 em mulheres (<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>)

Em células normais, a L-asparagina atua como aminoácido não essencial, sendo possível sintetizá-lo através da asparagina sintetase. Em contrapartida, as células tumorais não são capazes de sintetizá-la e, portanto, necessitam da asparagina presentes no soro sanguíneo. Durante o tratamento quimioterápico, quando administrada a L-asparaginase, a asparagina circulante é transformada em ácido aspártico e amônia, o que elimina seletivamente as células leucêmicas e impede sua proliferação.

Essa enzima foi descoberta em 1922, quando Clementi observou que havia presença de atividade asparaginásica no soro de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) (KRISHNAPURA; BELUR; SUBRAMANYA, 2016). Em 1953, foi observada, pela primeira vez, a atividade antitumoral da L-asparaginase, quando Kidd administrou em ratos com linfoma o soro de porquinho-da-índia, resultando em regressão da doença (KIDD, 1953). Mas somente em 1963, Broome demonstrou que a atividade antitumoral estava relacionada à presença de L-asparaginase no soro do porquinho-da-índia (BROOME, 1963).

A L-asparaginase está presente em bactérias, fungos, plantas e mamíferos, sendo sua função principal a formação de aspartato, que pode ser transaminado em oxaloacetato, integrante do ciclo do ácido carboxílico, ou ainda, convertido em fumarato, durante o ciclo da uréia (YUN, 2007).

Atualmente, como biofármaco, as formulações disponíveis de L-asparaginase são derivadas de *E. coli* e *E. chrysanthemi*. Diversos estudos sobre a L-asparaginase advinda de outros micro-organismos foram feitos (MEENA, 2015; SUDHIR, 2014; RAMYA, 2011; REINERT, 2006;

FREIRE,2021) Mas, observa-se que a utilização dessas enzimas no combate ao câncer sofre a influência de diversos fatores, dentre eles:

- 1) Bioquímicos (menor K_M sobre Asn da enzima, atividade reduzida de glutaminase, dentre outros);
- 2) Farmacológicos (depuração sérica da enzima, desenvolvimento de resistência à ASNase, etc.) (AVRAMIS, 2012; LANVERS-KAMINSKY, 2017).

Não obstante, a L-asparaginase vem sendo usada há mais de 30 anos no tratamento do câncer, com comprovado índice de cura, estimado em torno de 80%. Porém, existem outros aspectos que podem limitar a eficiência do uso desta enzima no tratamento, entre eles destaca-se as propriedades imunogênicas da enzima. Por ser responsável pela defesa do corpo, o sistema imune é capaz de reconhecer e interagir com biomoléculas detectadas como estranhas ao organismo. Desta forma, a imunogenicidade é a propriedade de uma substância de gerar resposta imune.

As proteínas terapêuticas são macromoléculas com características naturalmente imunogênicas. Verifica-se que a produção de anticorpos anti asparaginase ocorre em uma frequência de 70% em adultos (FERNANDEZ,2014). Essa produção de anticorpos está relacionada à inativação da asparaginase, reduzindo sua capacidade de hidrolisar a asparagina do soro, o que pode acontecer sem sinais de hipersensibilidade.

Outro fator que pode limitar o uso dessa enzima no tratamento contra o câncer é a sua atividade glutaminase, realizada em menor grau quando comparada à atividade asparaginase. A glutamina é responsável por diversos efeitos adversos como, imunossupressão, pancreatites, danos hepáticos, hiperglicemia, anormalidades na coagulação sanguínea e neurotoxicidade.

Além dos aspectos científicos, é importante ressaltar que o Brasil não produz L-asparaginase e, portanto, depende de sua importação. Em 2013, a empresa responsável pela importação do medicamento interrompeu a fabricação, trazendo riscos de esgotamento dos estoques. Em razão dessa crise, definiu-se pela importação do medicamento chinês Leuginase, o que, na época, foi objeto de inúmeras ações judiciais, devido à falta de confiabilidade na eficácia do produto chinês. Em 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) concedeu o registro ao Oncaspar, fabricado pela empresa Exelead Inc., possibilitando a importação do produto pelo Ministério da Saúde.

Neste cenário, vemos a importância do registro de outros medicamentos pela Anvisa e do desenvolvimento da produção nacional de L-asparaginase, a fim de estabelecer a autossuficiência

na produção e distribuição do medicamento e consequente diminuição dos riscos de interrupção do tratamento.

1.2 ESTRUTURA E ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE

As bactérias produzem dois tipos de enzima, as quais apresentam diferenças estruturais, de expressão e características bioquímicas distintas. Nas sequências de aminoácidos, a região mais conservada é a do sítio ativo e as regiões mais distintas são as de alças e da superfície da enzima. A L-asparaginase do tipo I é encontrada no citoplasma e a L-asparaginase do tipo II de origem periplasmática. Porém, apenas a L-asparaginase II tem atividade anticancerígena, uma vez que possui maior afinidade para a asparagina, presente em baixa concentração no soro humano.

A estrutura da L-asparaginase tipo II de *E. coli* foi determinada por cristalografia de raios-X com uma resolução de 2.3 Å (SWAIN, 1993), sendo sua massa molecular entre 140 – 160 kDa. L-asparaginase tipo II é um tetrâmero, composto por subunidades idênticas de 34 kDa e denominadas A, B, C e D (Figura 1). O tetrâmero é na realidade um “dímero de dímeros”, já que as subunidades AC e BD, chamados de dímeros “íntimos”, possuem maior número de interações de Van der Waals e pontes de hidrogênio, do que as interfaces AB e BC.

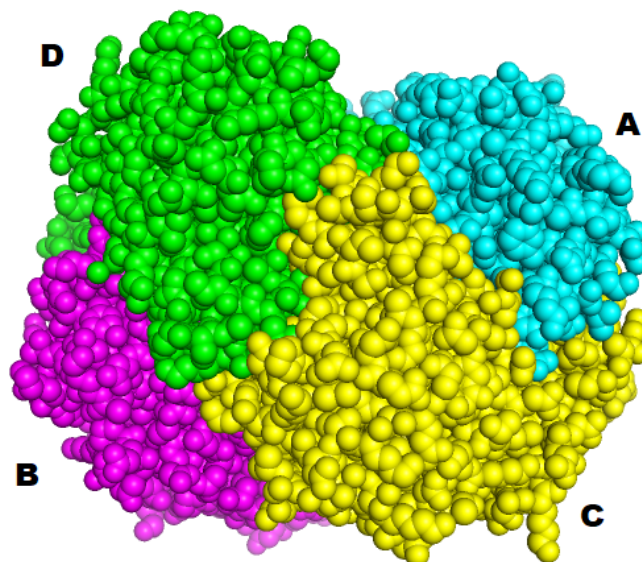


Figura 1: Estrutura L-asparaginase II de *E. coli* (PDB: 3ECA)

Cada monômero possui um sítio ativo, localizado na interface dos dímeros “íntimos”. Cada sítio ativo é composto pelos resíduos do domínio N-terminal em contato com o domínio C-terminal da subunidade intimamente ligada e, portanto, somente o tetrâmero possui atividade catalítica.

O mecanismo de reação da L-asparaginase II de *E. coli* envolve duas tríades catalíticas: Thr12-Tyr25-Glu283* (o asterisco denota monômero distinto) e Thr89-Asp90-Lys162, como o mostrado na Figura 2 .

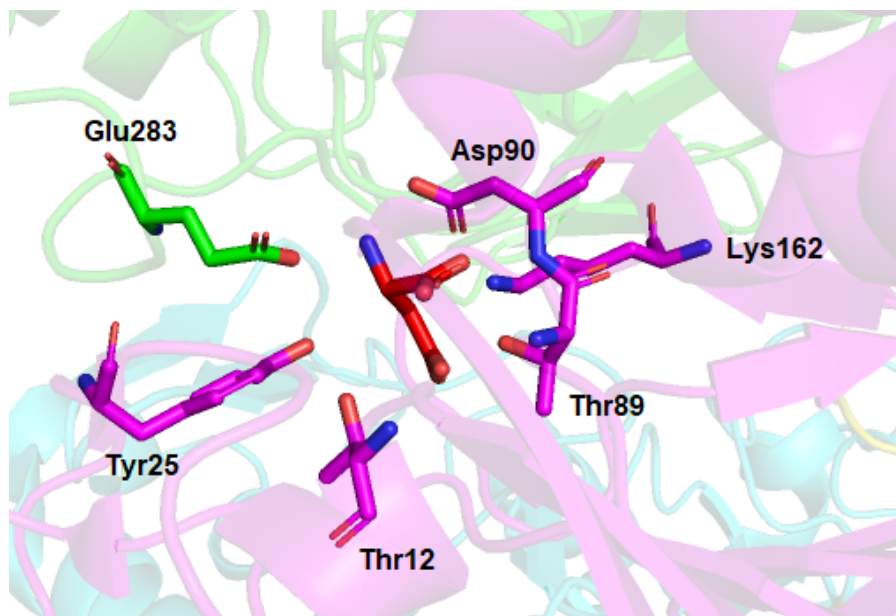


Figura 2: Sítio ativo L-asparaginase II (PDB:3ECA). O substrato está indicado em vermelho.

O mecanismo de reação da L- asparaginase está representado na Figura 3. Na Figura 3-I há a formação da tríade catalítica Thr12-Tyr25-Glu283*, onde há a formação de uma ligação de hidrogênio entre a Thr12 e a Tyr25, uma vez que o hidrogênio do grupo OH da cadeia lateral é doado ao O da cadeia lateral do resíduo de Glu283*.

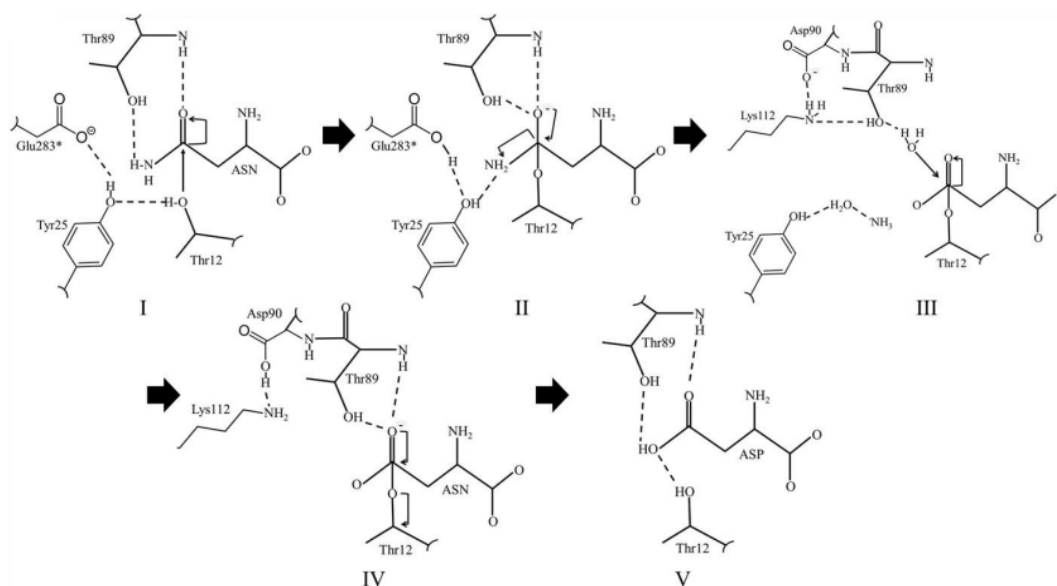


Figura 3: Mecanismo de ação da L-asparaginase (SCHULTZ, 2019)

Simultaneamente, a posição da Thr89 no sítio ativo permite a interação com o substrato. Na Figura 3-II, vemos que a Thr89 estabiliza o oxiânion formado no intermediário tetraédrico. Através da regeneração do grupo carbonila (CO) do substrato, temos a formação do complexo enzima-β-aspartil, onde há a liberação de amônia (NH₃) intermediada por uma molécula de H₂O e pela Tyr25, como vemos na Figura 3-III. Na Figura 3-IV, há o ataque nucleofílico de uma molécula de H₂O ao carbono do grupo CO do intermediário β-aspartil-enzima. Por fim, a Figura 3-V representa a eliminação do substrato, pela regeneração da ligação dupla do átomo de O do grupo carbonila, regenerando a enzima (SCHULTZ, 2019).

Análises estruturais da enzima indicam que, além da importância dos resíduos catalíticos no mecanismo de ação, a flexibilidade da alça formada pelos resíduos 14 a 33 também afeta a atividade enzimática (OFFMAN, 2011).

1.3 ENGENHARIA DE PROTEÍNAS

No desenvolvimento de uma proteína terapêutica, os principais desafios a serem superados são a instabilidade e a imunogenicidade, visto que ambas reduzem a eficácia no uso do medicamento. A instabilidade pode gerar a necessidade de administração constante do medicamento, resultando no aumento de custos de produção. Ademais, devemos considerar o prazo de validade do medicamento que é menor quanto mais instáveis são os seus componentes.

Por outro lado, a imunogenicidade gera a produção de anticorpos que irão neutralizar a proteína administrada, reduzindo a eficiência do medicamento no combate à doença, além da ocorrência de reações adversas importantes nos pacientes.

Ante as dificuldades na produção de novos medicamentos, surge a engenharia de proteínas que estuda e busca tornar possível o uso de novas proteínas terapêuticas, com melhoria do desempenho e a redução de efeitos colaterais em pacientes submetidos ao tratamento.

A mutação sítio-dirigida é uma técnica da engenharia de proteínas que permite a inserção, deleção ou a substituição de aminoácidos específicos que estejam envolvidos nas propriedades que se pretende otimizar. Essa técnica exige o conhecimento da estrutura da proteína, gerada a partir de métodos experimentais como a cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear e criomicroscopia eletrônica.

Diversos estudos, utilizando engenharia de proteínas, já demonstraram que determinadas alterações são eficientes para a melhora da atividade e da imunogenicidade da L-asparaginase II. (OFFMAN, 2011; VIDYA; USHASREE; PANDEY, 2014; CHAN, 2014; JIANHUA, 2006; MEHTA, 2014; VERMA, 2014).

Em 2014, foi realizado estudo, em que foi utilizada a mutagênese sítio-dirigida (VIDYA; USHASREE; PANDEY, 2014). Neste trabalho, foram alterados dois resíduos carregados positivamente (Lys139 e Lys207) nas alças de superfície por resíduos que apresentavam cargas neutras e reversas. As substituições por resíduos com carga neutra (K139A e K207A) apresentaram maior termoestabilidade, seguidas pelas substituições com resíduos de carga negativa (K139D e K207D) em comparação com a enzima selvagem.

Em outro estudo, verificou-se que a alteração do resíduo Asn24 por um resíduo Ala ou Thr combinado com a substituição de aminoácidos volumosos (Arg195 e Tyr250), localizados na interface dos monômeros da L-asparaginase, por resíduos com menor volume estérico (Ser e Leu, respectivamente) alterava a atividade da enzima. Assim, foi obtido um duplo mutante (N24A/R195S), que teve uma redução de 50% na atividade de glutaminase, com manutenção de sua atividade de asparaginase (OFFMAN, 2011).

2 OBJETIVOS

Avaliar a viabilidade da realização de mutações sítio-dirigidas na enzima L-asparaginase II de *E. coli* para a redução na imunogenicidade e aumento da atividade catalítica.

3 JUSTIFICATIVA

Este projeto teve início na disciplina de Modelagem e Engenharia de Proteínas, onde a proposta foi a criação de uma proteína modificada, utilizando-se de uma das técnicas aprendidas. Consequentemente, surgiu a ideia da criação de uma empresa *start-up* voltada à produção nacional desta proteína, considerando o cenário brasileiro.

O Brasil não produz a L-asparaginase e, portanto, é dependente do mercado externo, o que acarreta gastos expressivos para o sistema de saúde e aumenta os riscos de possíveis desabastecimentos, como o ocorrido em 2013.

O mercado de biofármacos representa cerca de 20% do total da indústria farmacêutica e vem crescendo consistentemente nos últimos anos. Ainda existe uma preferência mundial pelo investimento do capital de risco na Oncologia, representando 29% de todos os investimentos de risco no setor, segundo relatório da *Biotechnology Industry Organization*. Em 2019, por exemplo, o mercado de medicamentos biológicos faturou, aproximadamente, R\$ 22 bilhões (Anuário Estatístico do Mercado Financeiro 2019/20). Portanto, a produção de uma enzima como biofármaco 100 % nacional promoveria a independência do Brasil neste nicho de mercado e estimularia o desenvolvimento de novas competências na área estratégica de biotecnologia e fármacos.

4 METODOLOGIA

Primeiramente, selecionamos resíduos estratégicos para otimizar as funções desejadas, nesse caso, a melhora da atividade enzimática e a diminuição da imunogenicidade. Em seguida, utilizamos o software PoPMuSIC para avaliar a viabilidade dessas mutações. O PoPMuSIC é um servidor *web* que prevê as mudanças de estabilidade termodinâmica causadas por mutações em um único sítio em proteínas, usando uma combinação linear de potenciais estatísticos cujos coeficientes dependem da acessibilidade do solvente do resíduo substituído. (DEHOUCK, 2011).

Para avaliar as mutações sugeridas, é importante analisar o nível de energia livre de desenovelamento ($\Delta\Delta G$). A energia livre de desenovelamento de uma proteína é a diferença entre a energia livre da enzima selvagem e a mutante. A energia livre de desenovelamento de proteínas é uma característica considerada extremamente importante, sendo diretamente relacionada com a estabilidade da molécula (HORTON et al., 2008). Uma mutação que acrescenta energia ($\Delta\Delta G > 0$)

tenderá a desestabilizar a estrutura, enquanto uma mutação que reduza a energia ($\Delta\Delta G < 0$) estabiliza o sistema.

4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O aumento na atividade enzimática consiste em maior afinidade com o seu substrato e a consequente redução no valor de K_M . Com o objetivo de aumentar esta atividade, foi escolhido um resíduo localizado na alça próxima ao sítio ativo da enzima (Figura 4). O resíduo escolhido está representado em laranja e, em vermelho, temos a asparagina como ligante no sítio ativo.

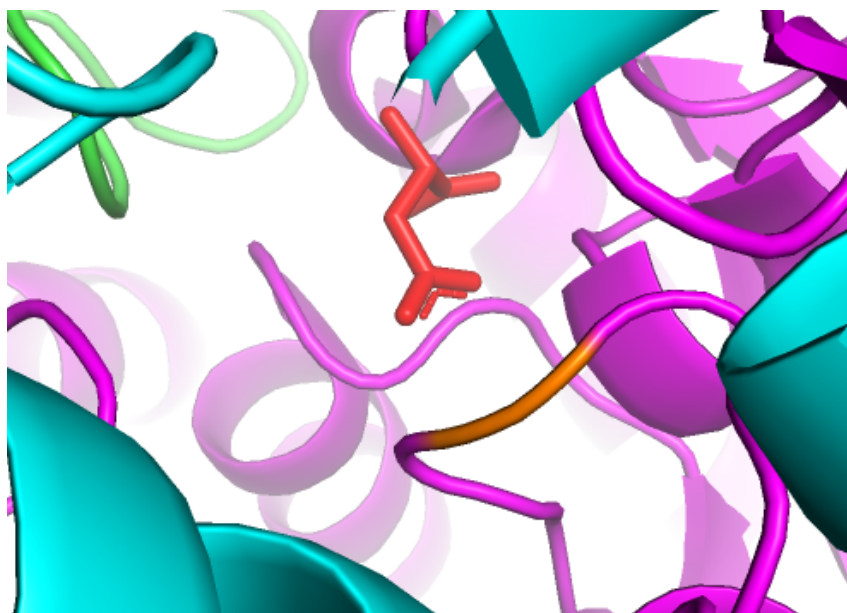


Figura 4 : Localização do resíduo a ser mutado (em laranja). Em vermelho, está a asparagina como ligante no sítio ativo (PDB: 3ECA).

O resíduo selecionado para o estudo da mutação é a Arg116. A Arginina possui uma longa cadeia lateral com um grupo guanidínico, o qual pode ser carregado positivamente em pH fisiológico. As características moleculares da cadeia lateral (e.g., alta polaridade) faz com que a arginina apresente o menor índice de hidropatia (-4,5) entre os vinte aminoácidos comuns. Por outro lado, sua longa cadeia alquílica determina um grande volume estérico capaz de influenciar na afinidade com o substrato em razão de sua proximidade ao sítio ativo (Figura 5). Portanto, com o

objetivo de aumentar a atividade catalítica, propomos a substituição do resíduo Arg116 por um aminoácido com menor volume estérico.

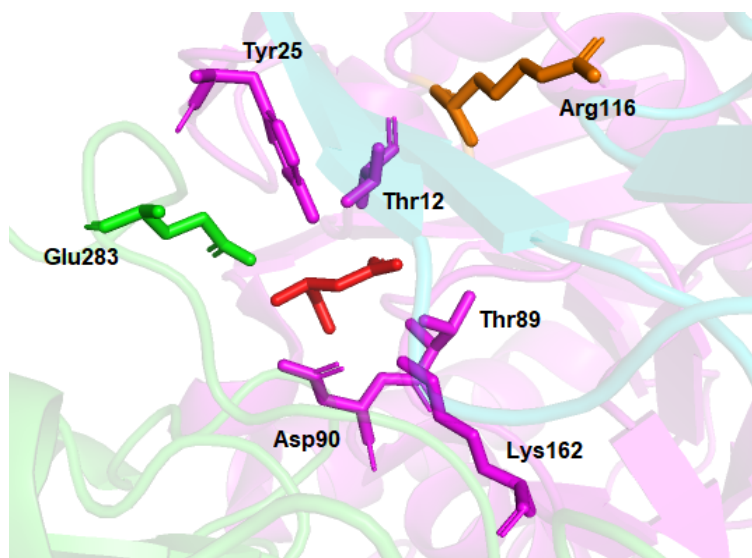


Figura 5: Destaque para o sítio ativo e o resíduo alvo da mutação (laranja) (PDB: 3ECA)

Com o objetivo de se evitar alterações muito significativas na polaridade, os resíduos selecionados para substituir a Arg foram resíduos polares, porém, com menor volume estérico. Dessa forma, os resíduos escolhidos foram a Serina e a Treonina, obtendo-se assim dois possíveis mutantes: R116S e R116T. Os modelos da estruturas de L-asparaginase mutantes estão indicados na Figura 6.

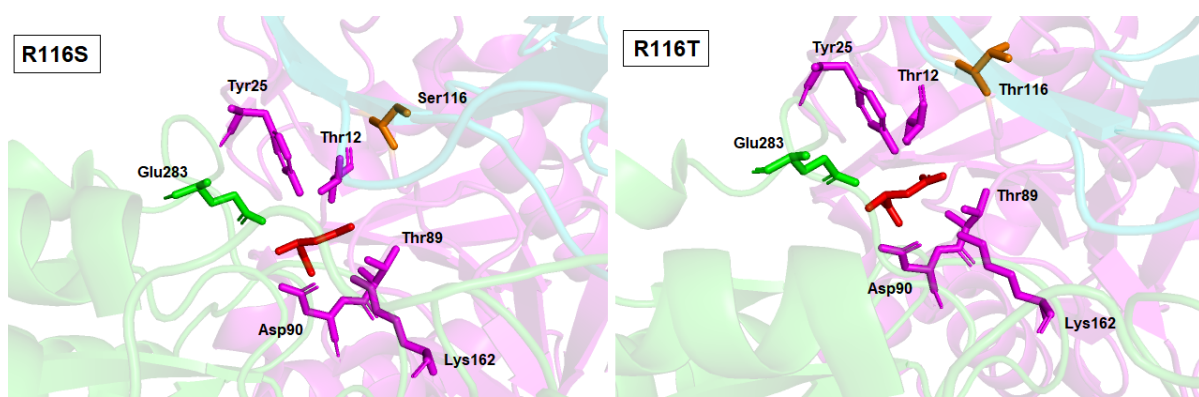


Figura 6 : Modelos dos mutantes R116S e R116T feitas utilizando Pymol (PDB: 3ECA)

Para essas mutações, obtivemos os seguintes valores:

- 1) para o mutante R116S o valor de energia de desenovelamento foi de 1,54 kcal/mol e;
- 2) para o mutante R116T o valor de energia de desenovelamento foi de 0,78 kcal/mol.

Isso significa que a substituição do resíduo de arginina por treonina tende a ser mais estabilizadora do que pela serina. Isto pode se dever ao fato que o resíduo de treonina é mais volumoso e, portanto, não altera a compactação da enzima. Mesmo substituindo aminoácidos com polaridades próximas, a arginina é carregada positivamente e os aminoácidos que irão substituí-la não são carregados. Essa troca pode fazer com que haja uma possível desestabilização na carga da proteína. O valor obtido da energia de desenovelamento para o mutante R116S, torna-o inviável, pois há uma grande probabilidade da desestabilização.

4.2 IMUNOGENICIDADE

O organismo de um paciente que faz tratamento quimioterápico com o uso da L-asparaginase detecta a enzima como uma biomolécula estranha, então, há a produção de anticorpos que irão inativá-la. Para essa inativação acontecer, o anticorpo precisa reconhecer os epítomos da proteína. O epítopo é o sítio de ligação reconhecido por um anticorpo, ou seja, regiões específicas na estrutura da proteína contra as quais as respostas imunes são direcionadas. Essas regiões são geralmente localizadas na superfície da molécula. Já foram identificados diversos epítomos na superfície da L-asparaginase II de *E.coli*. Em 2014, um estudo que analisou o alelo, associado aos maiores índices de hipersensibilidade e produção de anticorpos anti-L-asparaginase, utilizou ferramentas de identificação de ligação de epítomos e identificou uma região que poderia ser a mais imunogênica da proteína. Essa região é compreendida entre a Prolina 212 a Alanina 231 (²¹²PKVGIVYNYANASDLPAKA²³⁰) (FERNANDEZ, 2014). Essa região está identificada na cor azul na Figura 7.

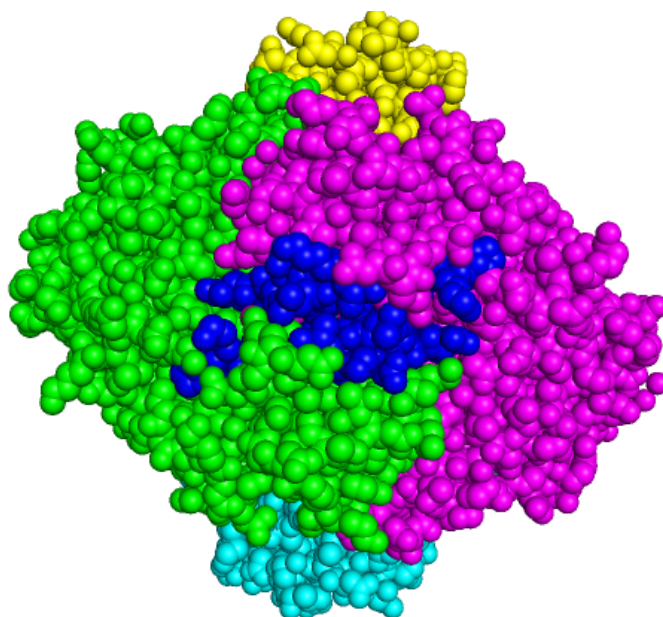


Figura 7 : Tetrâmero de L-asparaginase II com destaque para a região identificada como imunogênica (azul) (PDB: 3ECA)

Outro estudo conduzido por Werner, Röhm, e Müller utilizou *phage display* e o método SPOTs para a determinação de epítomos clinicamente relevantes (WERNER; RÖHM; MÜLLER, 2005). Dentre os epítomos identificados, destacam-se a Asn55, Asp204, Asp255, Lys229 e Lys288, indicados em azul na Figura 8.

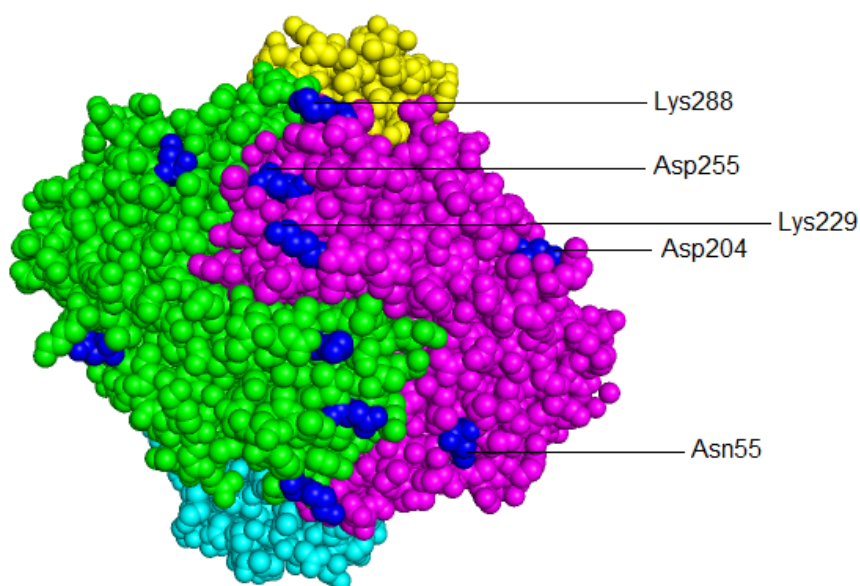


Figura 8: Tetrâmero de L-asparaginase II com destaque para os epítomos identificados (azul) (WERNER; RÖHM; MÜLLER, 2005) (PDB: 3ECA)

Com base nestes estudos, escolhemos os resíduos Asn219 e Asp204 para avaliar a possível aplicação de mutação sítio-dirigida. Esses dois resíduos estão localizados na alça que conecta os segmentos de hélices alfa e folhas beta, assim, não há alterações em sua estrutura.

A asparagina é um aminoácido polar e não carregado e possui em sua cadeia lateral um grupo carboxamida. O aspartato é um aminoácido também polar, porém possui grupo carboxílico na cadeia lateral que se encontra desprotonado em pH fisiológico, conferindo carga negativa e acidez à molécula.

Para a escolha dos aminoácidos que irão substituir os resíduos mencionados foi considerada a hipótese de que o anticorpo não reconheça mais aquela região. Por isso, as características dos aminoácidos mutantes são diferentes dos aminoácidos observados na enzima selvagem.

Para o resíduo Asn219, optamos pela Glicina e a Alanina que consistem em dois aminoácidos apolares. A diferença entre esses dois aminoácidos é que a Glicina tem característica mais flexível, já a Alanina possui uma maior tendência de manter a estrutura. Para o resíduo Asp204, trocaremos um resíduo carregado negativamente, por um não carregado e um carregado positivamente, sendo eles, respectivamente, a Asparagina e a Arginina. Esses quatro mutantes foram submetidos aos cálculos de energia livre no PoPMuSIC (Tabela 1):

Mutante	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
N219G	1,40
N219A	0,45
D204R	0,83
D204N	0,19

Tabela 1 : Valores de energia livre de desenovelamento obtidos para os mutantes de L-asparaginase II planejados.

Com relação a posição 219, observamos que a mutação N219A tende a ser menos desestabilizadora que a mutação N219G, isso possivelmente se deve ao fato da Alanina manter a estrutura e não ser flexível como a Glicina. Um valor de $\Delta\Delta G > 1$ torna o mutante inviável, tendo uma grande chance de desestabilizar a proteína. Na posição 204, temos valores aceitáveis de $\Delta\Delta G$, sendo viável os dois mutantes propostos. Podemos observar que o valor de $\Delta\Delta G$ para D204R é maior que o de D204N, possivelmente, em virtude da substituição de um resíduo de aminoácido carregado negativamente por um resíduo carregado positivamente ser mais desestabilizadora que a substituição por um resíduo não carregado.

5 RESULTADOS ESPERADOS E PARÂMETROS DA AVALIAÇÃO

5.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Estudos anteriores mostraram que a L-asparaginase selvagem apresenta valor de $K_M = 10 - 15 \mu M$ (YUN,2007). Se uma enzima apresenta um baixo valor de K_M ela atinge sua velocidade máxima (V_{max}) em baixas concentrações de substrato.

A quantificação da atividade da L-asparaginase é realizada utilizando o método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (AHA), que mede a quantidade total de β -hidroxamato do ácido L-aspártico liberado no meio de reação ou pelo reagente de Nessler, que mede a quantidade total de amônia liberada. Uma Unidade Internacional (U) de L-ASNase foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol do aminoácido asparagina em aspartato e amônia por minuto a 37 °C. Para o método AHA, as amostras devem ser incubadas a 37°C durante 30 min com 10 mM de l -Asparagina, 100 mM de hidroxilamina, 100 mM de NaOH e 15 mM de Tris-HCl, pH 8,6. A reação é interrompida com 50 μ L de uma solução contendo 5% TCA, 10% FeCl 3e HCl 0,66 M e os resultados medidos espectrofotometricamente a $\lambda = 500$ nm. Concentrações conhecidas de β -hidroxamato de ácido l -aspártico são usadas como padrão para construir uma curva de calibração. Para o método de Nessler, as amostras devem incubadas a 37°C durante 10 min com asparagina 8,6 mM e Tris-HCl 19,5 mM, pH 8,6. A reação é interrompida com 10 uL de uma solução contendo 5% de TCA e diluída 4,5 vezes em água. Adicionouadiciona-se 25 uL de reagente de Nessler e os resultados são medidos espectrofotometricamente a $\lambda = 436$ nm. Concentrações conhecidas de sulfato de amônio são usadas como padrão para construir a curva de calibração (LIMA,2020).

5.2 IMUNOGENICIDADE

Para a comparação da imunogenicidade das proteínas mutantes com a proteína do tipo selvagem será utilizado o método Western-Blot. Amostras de diferentes preparações são carregadas em gel SDS-PAGE a 12%. Após a separação, as proteínas do gel são transferidas para a membrana de PVDF através de eletroforese horizontal a 95 V por 50 min em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina e 2% Metanol). Após a transferência eletroforética, a membrana é incubada

por 3 h em solução de bloqueio (leite desnatado a 5% e tampão TBS-T) e então sondada com anticorpo policlonal de coelho anti-l-asparaginase (1:2000). A membrana é lavada três vezes com tampão TBS-T (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl e 0,05% Tween® 20, pH 7,5), com 5 min de incubação para cada vez. A solução de anticorpo secundário conjugado com fosfato alcalino anti-coelho é então aplicada à membrana por 1 h. Em seguida, a membrana é lavada novamente três vezes e a revelação realizada usando solução de substrato NBT BCIP (100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,4 mM NBT e 0,4 mM BCIP, pH 9,5) até a detecção cromogênica de bandas (LIMA, 2020).

Ao analisar o resultado do Western-Blot, esperamos que as proteínas recombinantes não se liguem ao anticorpo e, portanto, a banda referente aos mutantes seja mais clara que a banda referente a proteína selvagem. Um exemplo do resultado esperado está apresentado na Figura 9.

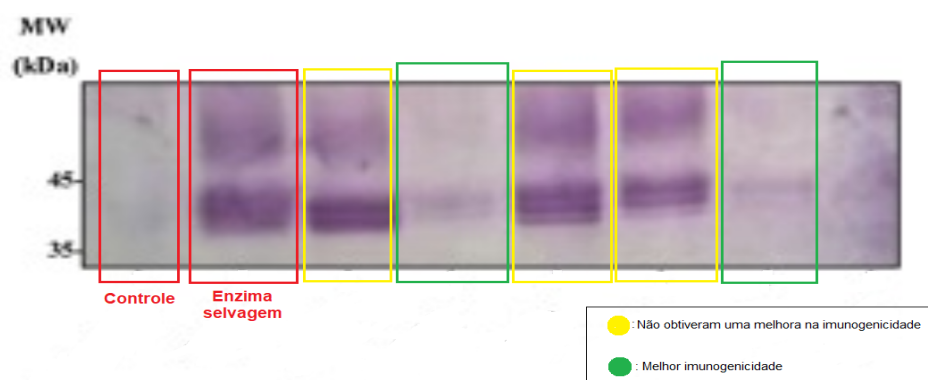


Figura 9: Exemplo de western-blot para a avaliação de imunogenicidade.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclui-se que os mutantes planejados R116T, N219A, D204R e D204N podem melhorar o desempenho da atividade enzimática e a imunogenicidade da L-asparagina II, já que estão localizadas em locais estratégicos, com baixa tendência que culminem na desestabilização da proteína.

Como perspectivas futuras, temos a realização dos ensaios cinéticos e de Western-Blot para avaliação da otimização das propriedades catalíticas e imunogênicas da enzima. Para o financiamento dos ensaios experimentais, temos como perspectiva elaborar um plano de negócios

que fará parte da proposta de pesquisa para apresentação ao programa PIPE-FAPESP, sendo, portanto, o primeiro passo para a criação de uma nova empresa *start-up* voltada à produção nacional de L-asparaginase recombinante para o tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

1 **Instituto Nacional do Câncer – INCA** 2020.

2 KRISHNAPURA, Prajna Rao; BELUR, Prasanna D.; SUBRAMANYA, Sandeep. A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 5, p. 720-737, 2016.

3 KIDD, John G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum: I. course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **The Journal of experimental medicine**, v. 98, n. 6, p. 565-582, 1953.

4 BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: I. properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of experimental medicine**, v. 118, n. 1, p. 99-120, 1963.

5 YUN, Mi-Kyung et al. Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic Escherichia coli L-asparaginase I. **Journal of molecular biology**, v. 369, n. 3, p. 794-811, 2007.

6 MEENA, Balakrishnan et al. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 2, p. 373-388, 2015.

7 SUDHIR, Ankit P. et al. Characterization of a recombinant glutaminase-free l-asparaginase (ansa3) enzyme with high catalytic activity from *Bacillus licheniformis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 7, p. 2504-2515, 2014.

8 RAMYA, L. N. et al. In silico engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 33, n. 8, p. 617-621, 2011.

9 REINERT, Rachel B. et al. Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase. **Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31222-31233, 2006.

- 10 FREIRE, Rominne Karla Barros et al. Glutaminase-free L-asparaginase production by *Leucosporidium muscorum* isolated from Antarctic marine-sediment. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 277-288, 2021.
- 11 AVRAMIS, Vassilios I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer research**, v. 32, n. 7, p. 2423-2437, 2012.
- 12 LANVERS-KAMINSKY, Claudia. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 439-450, 2017.
- 13 FERNANDEZ, Christian A. et al. HLA-DRB1* 07: 01 is associated with a higher risk of asparaginase allergies. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 124, n. 8, p. 1266-1276, 2014.
- 14 SWAIN, Amy 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, 1993.
- 15 SCHULTZ, Leonardo. Caracterização funcional, estrutural e modificação racional da ASNaseM: Um novo fármaco para o tratamento da Leucemia Linfóide Aguda?. 2019.
- 16 OFFMAN, Marc N. et al. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 117, n. 5, p. 1614-1621, 2011.
- 17 VIDYA, Jalaja; USHASREE, Mrudula Vasudevan; PANDEY, Ashok. Effect of surface charge alteration on stability of l-asparaginase II from *Escherichia* sp. **Enzyme and microbial technology**, v. 56, p. 15-19, 2014.
- 18 CHAN, Wai Kin et al. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 23, p. 3596-3606, 2014.
- 19 JIANHUA, Chen et al. Probing the antigenicity of *E. coli* L-asparaginase by mutational analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 57-65, 2006.

- 20 MEHTA, Ranjit Kumar et al. Mutations in subunit interface and B-cell epitopes improve antileukemic activities of Escherichia coli asparaginase-II: evaluation of immunogenicity in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 6, p. 3555-3570, 2014.
- 21 VERMA, Shikha et al. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of E. coli asparaginase II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 7, p. 1219-1230, 2014.
- 22 DEHOUC, Yves et al. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2011.
- 23 HORTON, H. et al. **Principios de bioquímica**. Pearson México, 2008
- 24 WERNER, Anne; RÖHM, Klaus-Heinrich; MÜLLER, Hans-Joachim. Mapping of B-cell epitopes in E. coli asparaginase II, an enzyme used in leukemia treatment. **Biology Chemistry**, v.386 , n. 6, p.535-540, 2005.
- 25 LIMA, Guilherme Meira et al. Glycosylation of L-asparaginase from E. coli through yeast expression and site-directed mutagenesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, p. 107516, 2020.