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

Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguilação

Giovanna Pastore Meneguetti

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2017

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

Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguilação

Giovanna Pastore Meneguetti

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2017

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

Meneguetti, Giovanna Pastore
M541d Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguilação / Giovanna Pastore Meneguetti. -- São Paulo, 2017.
88p.

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

1. Biotecnologia farmacêutica 2. Leucemia 3. Polímeros sintéticos I. T. II. Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira, orientador.

615.1 CDD

Giovanna Pastore Meneguetti

Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguilação

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

Orientadora/Presidente

_____

1º. Examinador

_____

2º. Examinador

_____

3º. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, por ter me concedido a honra de executar um de seus projetos. Além de toda preocupação ao meu crescimento científico e intelectual.

À Profa. Dra. Gisele Monteiro e ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior por terem aberto às portas de seus laboratórios, sem estas colaborações o nosso trabalho não teria sido o mesmo.

Ao Prof. Dr. Adriano Marim de Oliveira que aceitou ser o meu supervisor no IPT. Outro ponto de vista foi fundamental para abrir os horizontes.

Aos meus colegas de laboratório por me auxiliarem incansavelmente neste trabalho. Seja em ajudas rotineiras como em discussões de resultados.

À minha família, e em especial à minha mãe que sempre me deu todo e qualquer tipo de suporte para conquistar este título.

Á minha grande companheira, que além de ter me ajudado de diversas formas na elaboração desta dissertação, também me ajudou a manter o equilíbrio “trabalho-lazer”.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado, possibilitando a realização do presente trabalho.

À Fundação de Apoio ao IPT - FIPT, pela concessão de bolsa suplementar de mestrado, possibilitando a realização do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa, através do Projeto Temático número 2013/08617-7.

À todos que entrei em contato para me ajudar de alguma forma:

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

RESUMO vi
ABSTRACT vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS viii
LISTA DE FIGURAS xi
LISTA DE TABELAS xiii

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 14
2. REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1. L-asparaginase 17
2.1.1 L-asparaginase na terapêutica 19
2.2. Peguilação 21
2.2.1. Proteínas peguiladas 23
2.2.2. Peguilação sítio específica N-terminal 26
3. OBJETIVOS 29
4. MATERIAL E MÉTODOS 30
4.1. Material 30
4.2. Estudo computacional 30
4.3. Peguilação da L-asparaginase 31
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) 32
4.5 Purificação da monoPEG-ASNase 33
4.5.1. Ultrafiltração 33
4.5.2. Cromatografia de troca aniônica 33
4.5.3. Cromatografia de Exclusão Molecular 34
4.6. Determinação da concentração de proteína 34
4.7. Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida (Native-PAGE) 35
4.7.1. Atividade em Native-PAGE (Zimograma) 35
4.8. Determinação da atividade enzimática de L-asparaginase 36
4.8.1. Estabilidade enzimática 37
4.9. Determinação dos parâmetros cinéticos 37
4.10. Avaliação da resistência à clivagem proteolítica 38
4.11. Ensaio de citotoxicidade 39
4.12. Análise dos dados 40

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
5.1. Estudo computacional 41
5.2. Peguilação da L-asparaginase 44
5.3. Purificação da monoPEG-ASNase 50
5.4. Estabilidade da ASNase e da monoPEG-ASNase frente ao tempo 56
5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos da ASNase e monoPEG-ASNase 58
5.6. Degradação proteolítica 62
5.7. Citotoxicidade 64
6. CONCLUSÃO 67
REFERÊNCIAS 69
ANEXO A - CURVA DE CALIBRAÇÃO (CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR) 79
ANEXO B - DISPENSA DA ANÁLISE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA 80
ANEXO C - FICHA DO ALUNO 81
ANEXO D - CURRÍCULO LATTES 83

RESUMO

MENEGUETTI, G.P. **Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguilação**. 2017. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A enzima L-asparaginase (ASNase) de *Escherichia coli* é amplamente utilizada para tratar a leucemia linfoblástica aguda (LLA). No entanto, a enzima nativa pode ativar o sistema imune do hospedeiro causando reações alérgicas. A forma peguilada da enzima (PEG-ASNase) não só reduz o efeito imunológico, mas também possui a vantagem de aumentar sua meia-vida plasmática devido à menor degradação por proteases. Não obstante, a conjugação de PEG à ASNase é de forma aleatória e resulta em elevado grau de polidispersão. Nesse trabalho, um protocolo de peguilação sítio-específica *N*-terminal foi desenvolvido para a enzima ASNase, empregando-se metoxi-polietilenoglicol carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS, MW = 10 kDa). Os parâmetros de reação investigados (com PEG 2 kDa) foram a força iônica do tampão, o pH e o tempo de reação para otimizar o rendimento e minimizar a polidispersão. Os resultados confirmaram a ocorrência da reação de peguilação e baixa polidispersão. A força iônica do tampão favoreceu a conjugação *N*-terminal em 100 mM de tampão fosfato salino (PBS). Também observamos que o aumento do pH e tempo de reação estão diretamente relacionados com o aumento de formas polipeguiladas. O maior rendimento de monoPEG-ASNase, 42%, correspondeu à condição de reação de pH 7,5, tempo de reação de 30 min e razão PEG:enzima de 25:1. A monoPEG-ASNase foi purificada em coluna aniônica forte com gradiente linear de NaCl até 170 mM e a fração monopeguilada foi eluída em NaCl 78 mM com grau de pureza de 70% (rendimento de 55%). A cromatografia de exclusão por tamanho aumentou a pureza da monoPEG-ASNase para 99% (rendimento final de 45%). A monoPEG-ASNase, 190 ± 10 kDa, manteve sua atividade específica por 21 dias à 4ºC, enquanto que a enzima não peguilada (controle), 146 ± 6 kDa, teve uma queda de aproximadamente 52% na atividade específica em 7 dias à 4ºC. Um estudo de cinética enzimática foi realizado e obtivemos valores de k_M semelhantes para as formas da enzima nativa e monopeguilada, 20 µM e 35 µM respectivamente. A monoPEG-ASNase apresentou-se mais resistente às proteases plasmáticas asparagina endopeptidase e catepsina B, por 84 h à 37 °C e apresentou ser citotóxica para células leucêmicas (MOLT-4 e Reh). Portanto, a peguilação *N*-terminal sítio-específica resultou em uma nova variante da ASNase que reteve grande parte de seu poder catalítico e pode ser considerada promissora para o emprego no tratamento da LLA.

Palavras-chave: peguilação *N*-terminal, monopeguilação, L-asparaginase, leucemia linfoblástica aguda.

ABSTRACT

MENEGUETTI, G.P. **Nanotechnological development of L-asparaginase using PEGylation methodology.** 2017. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The enzyme L-asparaginase (ASNase) from *Escherichia coli* is widely used to treat acute lymphoblastic leukemia (LLA). However, it can activate the host's immune system causing allergic reactions. Hence, the pegylated form of the enzyme (PEG-ASNase) not only reduces the immune effect but also increases plasma half-life because of less proteases degradations. Nonetheless, the available PEG-ASNase is randomly pegylated and, consequently, with high degree of polydispersity. In this work we developed a site-specific *N*-terminus pegylation protocol for ASNase using methoxy-polyethylene glycol carboxymethyl N-hydroxysuccinimidyl ester (mPEG-NHS, MW = 10 kDa). Reaction parameters investigated (with PEG 2 kDa) were ionic strength, pH and reaction time to optimize yield and minimize polydispersity. Results confirmed pegylation and low polydispersity. Buffer ionic strength favored *N*-terminal conjugation at 100 mM phosphate buffer saline (PBS). Additionally, pH and reaction time were found to increase polyPEGylated species. The highest yield of monoPEG-ASNase, 42%, corresponded to reaction conditions of pH 7.5, reaction time of 30 min and PEG:ASNase ratio of 25:1. The monoPEG-ASNase was purified in a strong anionic column with NaCl linear gradient up to 170 mM and monoPEG-ASNase was eluted with 78 mM NaCl, 70% pure (55% yield). Size exclusion chromatography was further performed and increased monoPEG-ASNase purity to 99% (45% final yield). The monoPEG-ASNase, 190 ± 10 kDa was stable for 21 days at 4ºC while nonpegylated ASNase (control), 146 ± 6 kDa, lost 52% of its activity within 7 days at 4ºC. Enzyme kinetics were studied and similar k_M values were obtained for both native and monoPEG-ASNase, 20 µM and 35 µM respectively. The monoPEG-ASNase demonstrated to be resistant to the plasma proteases asparaginyl endopeptidase and cathepsin B, 84 h at 37 °C and also was cytotoxic to leukemic cells (MOLT-4 and Reh). Therefore, site-specific *N*-terminus pegylation of ASNase resulted in a novel enzyme variant with preserved catalytic activity and, therefore, promising for the treatment of LLA.

Keywords: *N*-terminal pegylation, monopegylation, L-asparaginase, acute lymphoblastic leukemia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Atividade enzimática
α-amino	Amina de cadeia peptídica
ε-amínicos	Amina do radical do aminoácido
β-NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido)
β-NAD^+	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado)
AEP	Asparagina endopeptidase
AHA	Ácidos β-hidroxamato aspártico
ASNase	L-asparaginase
ASNS	Asparagina sintetase
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Ácido bicinconínico
Bis-Tris	Bis (hidroximetil) amino-tris(hidroximetil) metano
BSA	Albumina de soro bovino (do *inglês: Bovine serum albumin*)
crisantaspase	L- asparaginase obtida de *Erwinia chrysanthemi*
C-terminal	Região amino-terminal de proteínas (-NH_2)
CBB	Coomassie Brillant Blue R-250
cdKs	Quinases dependentes de ciclinas
CTSB	Catepsina-B
Cu^{2+}	Cobre
Cu^+	Cobre reduzido
CP	Concentração de proteína
CYS	Cisteína
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
ES	Enzima-Substrato
E.C.	Comissão enzimática (do inglês, *Enzyme Commission*)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do *inglês Ethylenediamine*

	tetraacetic acid)
FDA	Agência Norte Americana de Medicamentos e Alimentos (do inglês, *Food and Drugs Administration)*
GDH	Glutamato desidrogenase
HUVEC	células endoteliais da veia umbilical *(do ingles: Human umbilical vein endothelial cells*)
k_{av}	Constante de distribuição
k_{CAT}	Número de renovação
k_{CAT}/k_M	Eficiência catalítica
k_M	Constante de Michaelis-Menten
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LYS	Lisina
MOLT-4	Linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda de células T
monoPEG-ASNase	L-asparaginase monopeguilada
m-PEG	Metoxi polietilenoglicol
mPEG-NHS	Metoxi-polietilenoglicol carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaCl	Cloreto de sódio
Native-PAGE	Gel de eletroforese nativo
NHS	*N*-hidroxisuccinimidil éster
[P]	Concentração de produto
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PDB	Banco de dados de proteínas (do inglês: *Protein Data Bank*)
PEG	Polietilenoglicol
PEG-ASNase	L-asparaginase conjugada ao polietilenoglicol
pegaspargase	L-asparaginase conjugada ao polietilenoglicol (Oncaspar®)
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico

pKa	Constante de dissociação do ácido
PSA	Persulfato de amônio
poliPEG-ASNase	L-asparaginase polipeguilada
R_f	Migração relativa
Reh	Linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda de células B
S	Substrato
[S]	Concentração de substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de eletroforese desnaturado
RPMI	Meio de cultura Instituto Memorial Roswell Park (do inglês: *Roswell Park Memorial Institute*)
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris(hidroximetil)amino-metano
UI	Unidade internacional
UV	Ultravioleta
V_{max}	Velocidade máxima

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do cristal de L-asparaginase com os quatro monômeros idênticos (A, B, C, D).....18

Figura 2 - Reação de desaminação da L-asparagina, catalisada pela L-asparaginase, formando L-aspartato e amônio.....19

Figura 3 - Representação esquemática de uma proteína peguilada com as vantagens de peguilação 22

Figura 4 - Estrutura química básica do metoxi-polietilenoglicol (m-PEG-R) 24

Figura 5 - Diferentes estratégias de peguilação em proteína.....25

Figura 6 - Reação de peguilação sítio específica *N*-terminal da ASNase empregando-se *N*-hidroxi succinimidil éster de PEG (mPEG-NHS) em um monômero.....27

Figura 7 - Estrutura molecular do mPEG-NHS utilizado 30

Figura 8 - Sequência Fasta da enzima L-asparaginase do tipo II de *E. coli*, código PDB 3ECA.....31

Figura 9 - Estrutura molecular da lisina e da arginina 41

Figura 10 - Tretrâmero da L-asparaginase de *E. coli* (PDB código 3ECA).....43

Figura 11 - L-asparaginase conjugada ao PEG 2 kDa em diferentes molaridades do tampão PBS pH 7,6.....44

Figura 12 - L-asparaginase conjugada ao PEG 10 kDa em tampão PBS 100 mM pH 7,5 nas razões de PEG:enzima 25:1 e 50:1.....46

Figura 13 - L-asparaginase conjugada ao PEG 2 kDa em PBS 100 mM em diferentes pHs.....47

Figura 14 - Esquema da hidrólise do polietilenoglicol em duas estruturas moleculares diferentes.....48

Figura 15 - L-asparaginase conjugada ao PEG 2 kDa em PBS 100 mM pH 7,5 em diferentes tempos de reação.....49

Figura 16 - Cromatograma de purificação por exclusão molecular do meio reacional.....51

Figura 17 - Purificação da L-asparaginase peguilada por coluna de troca aniônica.....52

Figura 18 - Comparação de diferentes proteínas e suas respectivas massas moleculares.....53

Figura 19 - Cromatograma de purificação por exclusão molecular (coluna Superdex 200 10/300 GL, GE Life Sciences) das frações eluídas em NaCl 78 mM obtidas na troca aniônica.....55

Figura 20 - Estudo da estabilidade enzimática frente ao tempo de armazenamento 57

Figura 21 - Esquema de reação enzimática proposta por Michaelis-Menten.....59

Figura 22 - Cinética enzimática da ASNase pura (controle) e da monoPEG-ASNase.....60

Figura 23 - Estudo da degradação proteolítica da asparagina endopeptidase (AEP) e da catepsina B (CTSB), por 84 h á 37 °C, em agitação de 50 xg.....63

Figura 24 - Estudo de citotoxicidade em células HUVEC 65

Figura 25 - Estudo de citotoxicidade em células MOLT-4 e Reh.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de meia-vida plasmática das diferentes formas de L-asparaginase disponíveis comercialmente 20

Tabela 2 - Classificação dos resíduos com grupo amino passível de ataque nucleofílico baseado nos valores de pKa e respectivas localizações na estrutura quaternária da L-asparaginase 43

Tabela 3 - Concentração de enzima em cada etapa de purificação, rendimento (%) e grau de pureza da fração monoPEG-ASNase (%).....56

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos da ASNase e da monoPEG-ASNase 61

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Multidisciplinar por natureza, a nanotecnologia tem o potencial de revolucionar amplamente vários campos tecnológicos e científicos, como os da biologia, da física, química e engenharia. A nanotecnologia está ligada à manipulação da matéria em escala nanométrica. O domínio da nanotecnologia encontra-se compreendido entre 0,1 e 1000 nm. Entretanto, diversos grupos acadêmicos, científicos e industriais, inclusive no campo farmacêutico, consideram um “nanomaterial” quando as dimensões estão compreendidas entre 1 a 100 nm (BROCHADO, 2013), região em que as propriedades dos materiais são determinadas e podem ser controladas para o desenvolvimento de novos materiais, dispositivos ou estruturas com propriedades específicas, controladas e reprodutíveis (NATIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY COUNCIL, NSTC, 2014).

Uma das mais promissoras frentes de inovação tecnológica com grande potencial de impulsionar a produção industrial brasileira é a nanobiotecnologia, devido à forte tendência mundial em buscar alternativas para princípios ativos farmacêuticos obtidos por processos biotecnológicos. Apesar do progresso no domínio da biotecnologia ter contribuído para tornar os fármacos proteicos mais acessíveis (MELO, CUNHA & FIALHO, 2012), proteínas ainda exigem atenção na manipulação devido à complexidade estrutural, sendo que a atividade biológica pode ser facilmente alterada resultando, por exemplo, em uma forma inativa ou um produto imunogênico (ALBERTS et al., 2004).

Uma das abordagens nanobiotecnológicas mais eficazes para resolver os problemas intrínsecos de várias proteínas como imunogenicidade e meia-vida curta, refere-se à ligação covalente de cadeias de polietilenoglicol na superfície da proteína, técnica conhecida como peguilação (PASUT, SERGI & VERONESE, 2007). A peguilação corresponde à modificação de proteínas, peptídeos, fosfolipídeos, fármacos e outras moléculas pela ligação covalente de uma ou mais cadeias de polietilenoglicol (PEG). Este polímero, altamente solúvel em água, é atóxico, não

imunogênico, não antigênico e aprovado pela Agência Norte Americana de Medicamentos e Alimentos (FDA).

Os conjugados de PEG-proteína têm diversas vantagens. Dentre elas, podemos destacar o aumento de solubilidade, meia-vida prolongada no organismo, a diminuição da degradação por enzimas metabólicas e a redução da imunogenicidade da proteína (VERONESE & PASUT, 2005). Dessa maneira, a peguilação tornou-se uma tecnologia bem estabelecida no campo da formulação biofarmacêutica e é usada para melhorar a estabilidade, a solubilidade, a biodisponibilidade e as propriedades imunológicas de compostos bioativos, aumentando o potencial de peptídeos e proteínas como agentes terapêuticos (PASUT, SERGI & VERONESE, 2007).

A enzima L-asparaginase (ASNase) foi uma das primeiras proteínas a serem peguiladas, resultando no fármaco pegaspargase (Oncaspar®), aprovado pelo FDA em 1994 para uso combinado no tratamento quimioterápico de pacientes portadores de leucemia com hipersensibilidade à forma nativa da enzima (AVRAMIS et al., 2002; VERONESE & PASUT, 2005).

O método utilizado na peguilação da ASNase consiste na conjugação do PEG nas aminas livres, normalmente em resíduos de lisina e no aminoácido *N*-terminal. Uma limitação importante desta abordagem é que as proteínas contêm tipicamente diversas lisinas e, consequentemente, ocorre a peguilação aleatória de resíduos de lisina da enzima com várias cadeias de PEG, levando a um alto grau de polidispersão nas preparações resultantes (LEE et al., 2003). As diferentes espécies peguiladas muitas vezes possuem diferentes perfis farmacocinéticos e atividades biológicas intrínsecas (SOARES et al., 2012).

Portanto, considerando os avanços recentes em peguilação de proteínas e as exigências atuais para licenciamento de produtos farmacêuticos envolvendo nanotecnologia (FU & SAKAMOTO, 2007; FOOD DRUG AND ADMINISTRATION, FDA, 2015), é importante estudar alternativas de peguilação da ASNase, visando preparações mais uniformes e menos polidispersas. A estratégia de peguilação *N*-terminal apresenta-se como alternativa mais específica e envolve a conjugação de

uma molécula de PEG à terminação amínica, baseando-se nas diferenças entre os pKas dos diferentes grupamentos amínicos da proteína, sendo menor o pKa do grupo α-amino (pKa 7,6 – 8,0) do que os grupos ε-amino (pKa 9,3 – 9,5) (YU & GHOSH, 2010). Portanto, para valores de pH entre 7,0 – 8,5, resíduos amínicos de lisinas da ASNase encontram-se predominantemente protonados e, consequentemente, não reativos ao PEG. O grupo α-amino livre (*N*-terminal), por sua vez, apresenta-se predominantemente em sua forma não protonada disponível para a conjugação com o PEG, de maneira a resultar na proteína monopeguilada (KINSTLER et al., 2002). Nesse trabalho estudamos a peguilação *N*-terminal da ASNase.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. L-asparaginase

A leucemia é o câncer das células brancas do sangue (leucócitos), que começa na medula óssea e se espalha para outras partes do corpo. A leucemia linfóide aguda ou leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o comprometimento da linhagem linfóide, caracterizada pelo rápido crescimento de células imaturas (linfoblástos) no sangue. De modo geral, a LLA invade o sangue e pode se espalhar para outras partes do corpo. Como gânglios linfáticos, baço, fígado, sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) (EGLER, AHUJA & MATLOUB, 2016).

A L-asparaginase ou ASNase (Figura 1), enzima descoberta em 1953 por Kidd, é um eficiente inibidor do crescimento tumoral e constitui um importante biofármaco utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, doença que atinge três a cada quatro crianças diagnosticadas com leucemia nos Estados Unidos (CANCER, 2016). A leucemia, no Brasil e na maioria dos países, representa 25 a 35% dos tipos de câncer infantojuvenil (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, INCA, 2016).

Desde 1970, a ASNase tornou-se um componente essencial na quimioterapia para o tratamento de LLA infantil (NARTA, KANWAR & AZMI, 2007; RAETZ & SALZER, 2010; DOUER, 2008). A ASNase é produzida por *E. coli* e é composta por quatro subunidades idênticas de aproximadamente 33 - 37 kDa (cada); formando uma enzima tetramérica com massa molecular variável entre 140 - 160 kDa (LOUREIRO, 2010).

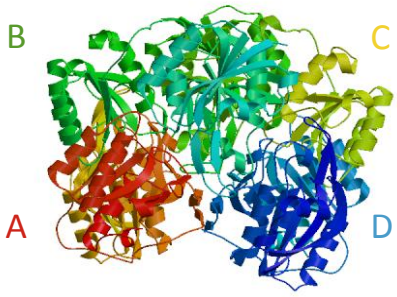


Figura 1 - Representação esquemática do cristal de L-asparaginase com os quatro monômeros idênticos (A, B, C e D**).** Resolução de 2,40 Å, do banco de dados de proteína - PDB, código 3ECA.

Muitos blastos de leucemia e células da medula são auxotróficos para L-asparagina, porque lhes falta ou tem um nível muito baixo de asparagina-sintetase, enzima normalmente expressa em células saudáveis (COSTA, 2015). Portanto, a ASNase, enzima que catalisa a hidrólise de L-asparagina para L-aspartato e amônio (Figura 2) é capaz de destruir seletivamente as células tumorais que dependem de L-asparagina extracelular para sobrevivência (PASUT, SERGI, & VERONESE, 2007). A diminuição desse aminoácido leva à inibição da síntese de proteínas constitutivas, além de proteínas regulatórias fundamentais como as do ciclo celular (quinases dependentes de ciclinas - cdKs - e ciclinas) e proteínas anti-apoptóticas, resultando em morte celular. Alguns estudos sugerem que por causar efeitos drásticos nas células tumorais, a ASNase deve depletar outros aminoácidos (AVRAMIS, 2012; NOMME et al., 2012). Mais especificadamente, a enzima catalisa a hidrólise do grupo amino da cadeia lateral do aminoácido, convertendo-o em ácido, portanto a ASNase também foi denominada L-asparagina aminoidrolase.

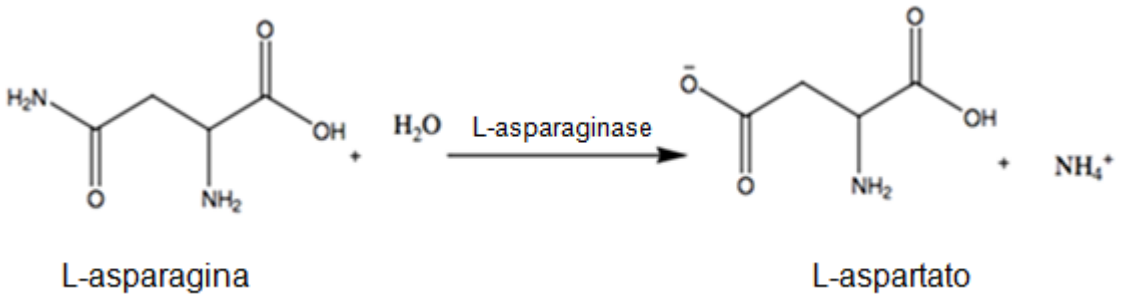


Figura 2 - Reação de desaminação da L-asparagina, catalisada pela L-asparaginase, formando L-aspartato e amônio.

2.1.1 L-asparaginase na terapêutica

A L-asparaginase é essencial para a terapia combinada de leucemia linfoblástica aguda. Existem três formas de L-asparaginase terapeuticamente utilizadas: a L-asparaginase nativa, a L-asparaginase peguilada (pegaspargase) que possui ligação covalente com grupamentos de polietilenoglicol, ambas obtidas de *Escherichia coli*; e a L-asparaginase obtida de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspase) (VAN DEN BERG, 2011).

Os três tipos possuem alta atividade e estabilidade, porém diferem no ponto isoelétrico, no tempo de meia-vida plasmática e outras propriedades farmacocinéticas. Portanto, não é possível a intercambiabilidade com a mesma dose e frequência entre os três agentes (RIZZARI *et al*., 2013). As propriedades farmacocinéticas da enzima são significativamente melhoradas por peguilação especialmente em termos de meia-vida *in vivo,* quando comparado com as formas nativas correspondentes.

A tabela 1 ilustra o aumento da meia-vida ($t_{1/2}$) da enzima modificada em relação à enzima nativa de *Escherichia coli* e de *Erwinia chrysanthemi.* Como pode ser observado, a meia-vida do conjugado PEG-ASNase pode chegar a mais ou menos cinco dias, contra aproximadamente um dia da L-asparaginase nativa de *E. coli* (KEATING et al., 1993; NARTA, KANWAR & AZMI, 2007) e menos de um dia com a crisantaspase (ASSELIN, 1993).

Tabela 1 - Valores de meia-vida plasmática das diferentes formas de L-asparaginase disponíveis comercialmente. Dados apresentados em média ± desvio-padrão (adaptado de ASSELIN, 1993).

Preparação de L-asparaginase	nº de pacientes	Dose ($UI \cdot m^{-2}$)	Meia-vida plasmática ($t_{1/2}$)
pegaspargase	21	2.500	5,73 ± 3,24
ASNase	28	25.000	1,24 ± 0,17
crisantaspase	19	25.000	0,65 ± 0,13

O tratamento quimioterápico da LLA empregando-se terapia combinada incluindo a ASNase resulta em mais de 90% de taxa de cura em crianças (CANCER, 2016). Entretanto a ASNase nativa pode induzir resposta imune, produzindo anticorpos anti-asparaginase sendo essa uma das principais causas de resistência ao medicamento, resultando na redução de sua atividade terapêutica. A resistência à ASNase pode ser sintomática, com sinais de hipersensibilidade clínica, ou assintomática. Os sintomas incluem urticária, erupções, prurido, eritema, edema, broncoespasmos, hipotensão e ocasionalmente choque anafilático (raros casos). O uso de medidas profiláticas, como corticóides e anti-histamínicos, não é aconselhável, pois podem mascarar os sintomas de inativação do biofármaco. Outros efeitos adversos relatados são: disfunção hepática, alterações na coagulação sanguínea, diarreia, vômito, pancreatite, supressão da medula óssea, hiperglicêmia e baixos níveis séricos de antitrombina III e fibrinogênio (AVRAMIS, 2012; NARAZAKI et al., 2012).

As reações de hipersensibilidade devido à produção de anticorpos têm sido observadas em 60% dos pacientes que fazem uso da enzima nativa derivada de *E. coli*. A fim de reduzir a reação adversa causada pelo tratamento, desenvolveu-se a crisantaspase (ASNase derivada de *E. chrysanthemi*) e a pegaspargase (ASNase conjugada com polietilenoglicol). A enzima peguilada, apresenta ainda, a vantagem

de ter um período de meia-vida biológico maior que as duas outras ASNases comerciais (LOUREIRO, 2010).

O fármaco comercial da PEG-ASNase (pegaspargase) é indicado, nos Estados Unidos, como tratamento de primeira linha em pacientes pediátricos e adultos com leucemia linfoblástica aguda como parte de um regime de quimioterapia multi-agente em casos de hipersensibilidade à ASNase nativa (LOUREIRO et al., 2012). A ASNase é conjugada de forma covalente ao metóxi-polietilenoglicol carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS). Aproximadamente 69 a 82 moléculas de PEG 5.000 Da são conjugadas à enzima (SIGMA-TAU, 1994). Consequentemente, o processo desenvolvido refere-se à peguilação aleatória de resíduos de lisina da enzima com várias cadeias de PEG de massa molecular de 5.000 Da, levando a um alto grau de polidispersão nas preparações resultantes. As diferentes espécies de proteínas peguiladas muitas vezes possuem diferentes atividades biológicas intrínsecas e, principalmente, perfis farmacocinéticos. Isto pode apresentar problemas quando se desenvolve uma proteína peguilada terapêutica, pois a reprodutibilidade de produção e de perfil terapêutico encontra-se prejudicadas (SOARES et al., 2012).

2.2. Peguilação

A peguilação corresponde à estratégia bem-sucedida de conjugação covalente de polietilenoglicol (PEG) a proteínas. O PEG é um polímero sintético biocompatível podendo ser utilizado como aditivo de medicamentos em xaropes, cremes, pomadas, comprimidos e como veículo de produtos injetáveis tanto de aplicação intramuscular quanto endovenosa. Soma-se a isto a possibilidade de obter este polímero com vários graus de polimerização, como, o PEG 80, que é líquido ou o PEG 5.000, que é sólido em temperatura entre 20 a 25°C (SHANG, 2013). A reação de peguilação foi descrita pela primeira vez por Abuchowski et al. na década de 70. Eles conjugaram polietilenoglicol em catalase de fígado bovino (ABUCHOWSKI et al., 1979) e em albumina de soro de bovino (ABUCHOWSKI et al., 1977). Observou-se que a ligação do PEG tornou a enzima menos imunogênica

in vivo e que as proteínas mantiveram a atividade com maior tempo de circulação no organismo.

A peguilação cria uma camada hidrofílica composta por PEG e água sob a molécula de proteína, resulta em aumento do tamanho hidrodinâmico, prolongando assim a meia-vida *in vivo* através da diminuição da filtração glomerular (ABUCHOWSKI et al, 1979; BARAN, OZER & HASIRCI, 2003; MENG et al., 2008). Além disso, essa camada hidrofílica estabiliza as moléculas de proteínas e assim, reduz a agregação proteica (Figura 3) (SHANG, 2013). Outro mecanismo possível para a meia-vida prolongada de proteínas peguiladas na circulação inclui a diminuição da degradação por proteases, tais como catepsina B (CTSB) e asparagina endopeptidase (AEP) (PATEL et al., 2009). Adicionalmente, a depuração da proteína pelo sistema retículo-endotelial também pode diminuir com a peguilação. (BARAN, OZER & HASIRCI, 2003).

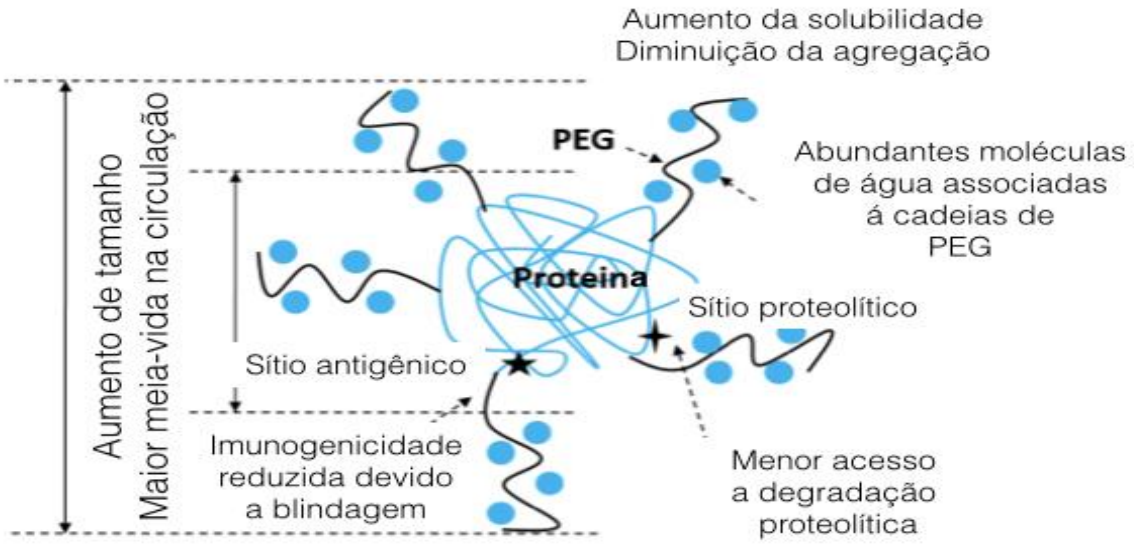


Figura 3 - Representação esquemática de uma proteína peguilada com as vantagens de peguilação. Incluindo aumento de meia-vida, diminuição da agregação, redução da imunogenicidade e redução da degradação proteolítica (adaptado de SHANG, 2013).

A inserção de grupamentos de polietilenoglicol vem sendo amplamente utilizada para modificação química de proteínas, ainda que a atividade biológica em geral sofra algum grau de alteração. Este procedimento, ao mesmo tempo em que traz o benefício de manter parcialmente a atividade biológica da proteína conjugada, diminui ou até mesmo suprime as manifestações adversas como hipersensibilidade, reações alérgicas moderadas e anafiláticas fatais, que ocorrem devido à sensibilização do organismo pela segunda inoculação de proteínas nativas, inviabilizando a sequência de aplicações (ABUCHOWSKI et al., 1979).

2.2.1. Proteínas peguiladas

A enzima utilizada na terapêutica quando reconhecida como uma substância estranha pelo organismo desencadeia reações imunológicas e produção de anticorpos específicos (STEPHANO, 2005). A continuidade dessa aplicação pode causar resposta indesejada do sistema imunológico do tipo anafilática, que pode ser fatal. Além disso, o sistema imunológico pode reduzir o tempo de eliminação da enzima, fazendo com que perca a sua função e a ação terapêutica (LOUREIRO, 2010). Esses problemas no uso de enzimas como fármacos podem ser reduzidos com a associação de PEG às proteínas.

Proteínas peguiladas têm sido extensivamente estudadas em relação à terapia de várias doenças como câncer, doenças inflamatórias e alérgicas (ABUCHOWSKI et al, 1979; BARAN, OZER & HASIRCI, 2003; VERONESE & PASUT, 2005; LOUREIRO, 2010; SHANG, 2013). Os produtos peguilados em grupamento amínico aprovados pela FDA referem-se à peguilação aleatória, exceto o Neulasta® em que a peguilação é sítio específica *N*-terminal (ALCONCEL, BAAS & MAYNARD, 2011; FOOD DRUG AND ADMINISTRATION, 2015):

a) Adagen® (pegademase bovine, Sigma-Tau, aprovado em 1990) para reposição enzimática em pacientes com imunodeficiência adquirida;
b) Krystexxa® (PEG-uricase, Savient, aprovado em 2010) para o tratamento de gota crônica;
c) Macugen® (pegaptanibe sódico, Valeant Pharms, aprovado em 2000) para tratamento de degeneração macular neovascular (úmida) relacionada à idade;

d) Mircera® (PEG-eritropoetina, Hoffmann-La Roche, aprovado em 2007) para o tratamento da anemia renal associada a insuficiência renal crônica;

e) Neulasta® (pegfilgrastim, Amgen, aprovado em 2002), para regular a produção e a liberação de neutrófilos da medula óssea;

f) Oncaspar® (PEG-asparaginase, Enzon, aprovado em 1994) para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda;

g) PEG-Intron® (peginterferon-α2b, Schering-Plough, aprovado em 2001) para o tratamento da hepatite C crônica;

h) Pegasys® (peginterferon-α2a, Hoffmann-La Roche, aprovado em 2002) para o tratamento da hepatite C crônica;

i) Somavert® (pegvisomanto, Pfizer, aprovado em 2003) para o tratamento da acromegalia (gigantismo).

Os polietilenoglicóis utilizados, independentemente da massa molecular, são em sua maioria metoxilados em uma das extremidades (Figura 4), metoxiPEG (ou monometoxi-PEG), originando a sigla empregada m-PEG-R em que “R” pode representar outros grupos reativos.

As principais características são: grande flexibilidade devido à ausência de substituintes volumosos ao longo da cadeia e a alta hidratação da estrutura polimérica (PASUT & VERONESE, 2012). O mPEG é utilizado como um bloqueador de sítios antigênicos e proteolíticos, impedindo o reconhecimento pelos anticorpos e proteases, aumentando assim a meia-vida de proteínas através da resistência ao pH, à temperatura, ação de outras enzimas e diminuindo a secreção renal (SOARES, 2012).

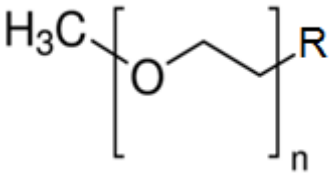


Figura 4 - Estrutura química básica do metoxi-polietilenoglicol (m-PEG-R). A sigla R, na extremidade da cadeia, representa o grupamento reativo.

Desta forma, a extremidade com o grupamento reativo, atua como ligante seletivo a resíduos específicos na superfície de proteínas, enquanto que a outra extremidade, metoxilada, é livre e permanece exposta à solução sem reagir (ZHANG et al., 2012). Essa estrutura de PEG monofuncionalizado é normalmente preferida por não conjugar duas proteínas com uma mesma cadeia do polímero. A extremidade reativa, também chamada de porção conectora, é escolhida dependendo da disponibilidade dos grupamentos alvos presentes na proteína (PFISTER & MORBIDELLI, 2014).

Os grupamentos alvo vão depender da estratégia de peguilação e da proteína alvo. Alguns exemplos de grupamentos alvo (Figura 5) são os grupos tiol de resíduos de cisteína (BROCCHINI et al., 2008) e grupos amínicos de lisina (LOUREIRO et al., 2012) ou *N*-terminal (KINSTLER et al., 1996) que exibem reatividade química significativamente maior que quaisquer outros resíduos naturais de aminoácidos e são, portanto, preferidos para peguilação com os típicos derivados de PEG ativados (ZHANG et al., 2012). Os grupos amínicos de arginina não são considerados grupamentos alvo por não reagirem com os derivados de PEG (PFISTER & MORBIDELLI, 2014).

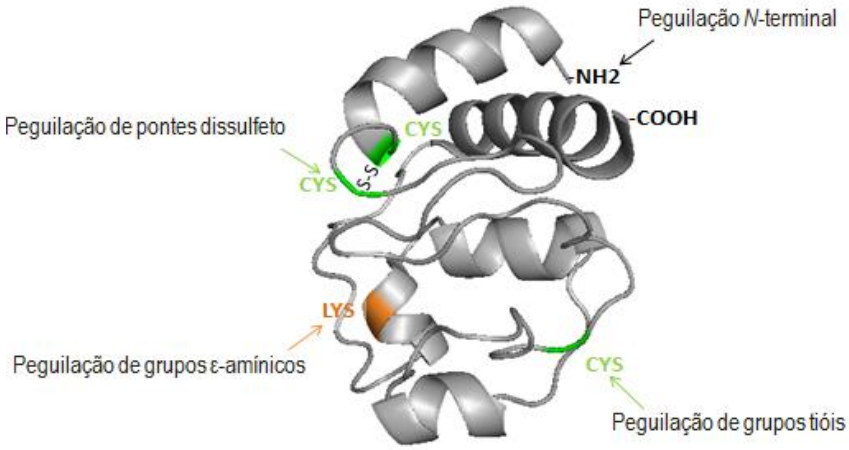


Figura 5 - Diferentes estratégias de peguilação em proteína. Peguilação em pontes dissulfeto (CYS-CYS), em grupos ε-amínicos (LYS), em grupos tióis (CYS) e região *N*-terminal (-NH_2).

O método mais comumente utilizado em peguilação refere-se à conjugação do PEG nas aminas livres, normalmente em resíduos de lisina ou no aminoácido *N*-terminal. Esta possibilidade tem sido utilizada para a peguilação de fator de crescimento epidermal, fator estimulante de colônias de granulócitos e interferon (SHANG, YU & GHOSH, 2011). Uma limitação importante desta abordagem é que as proteínas contêm tipicamente diversas lisinas, além do aminoácido *N*-terminal (LEE et al., 2003). Dessa maneira, a peguilação ocorre de forma aleatória e resulta em uma preparação extremamente polidispersa, ou seja, com moléculas de proteína com diferentes graus de peguilação e em diferentes resíduos amínicos. Uma maneira de minimizar esse problema refere-se à peguilação sítio-específica *N*-terminal.

A peguilação do grupo ε-amino da lisina nem sempre é considerada sítio-dirigida devido à baixa seletividade de resíduos de lisina específicos, resultando em acoplamento aleatório e uma variação de isômeros posicionais de difícil reprodução (PFISTER & MORBIDELLI, 2014; GINN et al., 2014). A peguilação *N*-terminal, entretanto, é considerada uma reação sítio-dirigida uma vez que existe apenas um grupo destes por cadeia e o número de sítios de peguilação é drasticamente reduzido (PFISTER & MORBIDELLI, 2014).

2.2.2. Peguilação sítio específica N-terminal

A estratégia de peguilação *N*-terminal baseia-se no fato do grupo *N*-terminal apresentar menor valor de pKa que os grupamentos amínicos de lisinas presentes na proteína (VERONESE & PASUT, 2005). A síntese de subprodutos indesejados como proteínas di e tri-peguiladas diminui significativamente com essa técnica.

A peguilação sítio específica *N*-terminal de proteínas tem sido realizada utilizando-se uma classe especial de derivados funcionalizados de PEG sob condições de conjugação específicas. Como representado na Figura 6, a conjugação baseia-se na acilação do PEG. Produzindo ligações amida estáveis em pH de 7 a 9, por meio do ataque nucelofílico do grupamento amínico da proteína ao cabono carbonílico do grupo carboxila do PEG reativo, com saída do grupo NHS (ROBERTS, BENTLEY & HARRIS, 2002). Os resíduos de aminas primárias em

proteínas têm diferentes valores de pKa: 7,6 a 9,2 para grupo α-amino *N*-terminal e 9,3 a 10,5 para o grupo ε-amino em resíduos de lisina (LEE et al., 2003; MUKHERJEE, 2007; SHANG, 2013).

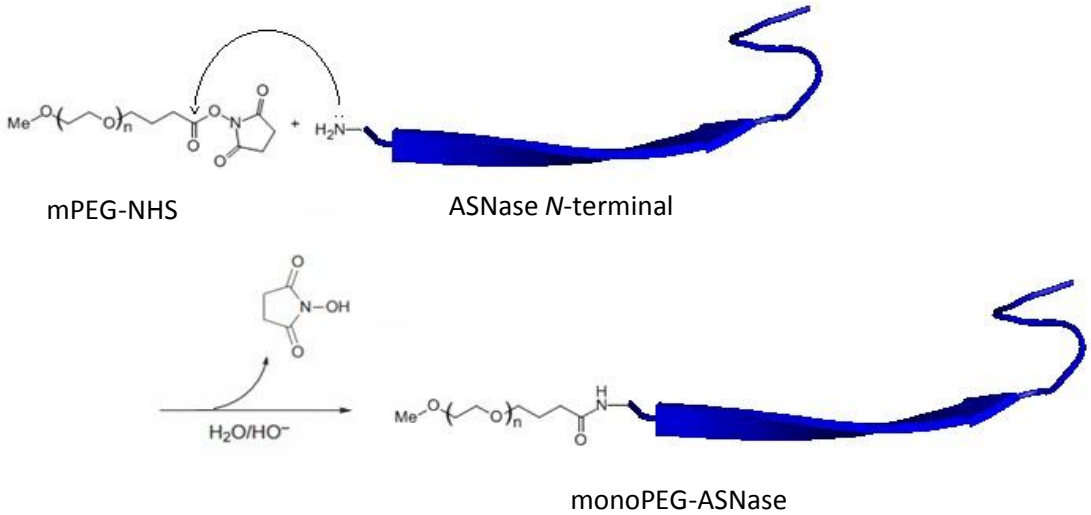


Figura 6 - Reação de peguilação sítio específica *N*-terminal da ASNase empregando-se *N*-hidroxi succinimidil éster de PEG (mPEG-NHS) em um monômero. Região *N*-terminal da proteína representada em fita (adaptado de IRIS BIOTECH GMBH, 2015).

O valor de pH determina a nucleofilicidade dos nucleófilos (por exemplo, grupos residuais amínicos de aminoácidos). O ataque nucleófilíco tem lugar quando o pH de operação é próximo ou superior ao valor de pKa do grupo residual do aminoácido em questão, de maneira que encontre-se prevalentemente desprotonado (ROBERTS, BENTLEY & HARRIS, 2002). Portanto, prevê-se que as reações de peguilação realizadas em pH entre 7,6 e 9,2 devem levar à peguilação prevalentemente no resíduo *N*-terminal. Nestas condições, resíduos de lisina encontram-se preferencialmente protonados e os grupos α-amínicos desprotonados, portanto, mais disponíveis para a conjugação. Um pH mais elevado facilitaria o ataque nucleofílico pelos abundantes grupos ε-amino, o que resulta na formação de proteínas altamente peguiladas.

Do ponto de vista industrial e legislatório, é importante que as reações forneçam produtos cada vez mais homogêneos com métodos de caracterização e reprodutibilidade lote a lote. A peguilação sítio específica *N*-terminal permite essa maior reprodutibilidade.

3. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consistiu na obtenção de uma nova molécula de L-asparaginase de *E. coli.* peguilada sítio-especificamente na porção *N*-terminal, visando à uma preparação enzimática mais uniforme porém presenvando as vantagens que a enzima polipeguilada apresenta.

Para alcançar esse objetivo, as seguintes etapas foram estabelecidas:

- Avaliação teórica dos resíduos de aminoácidos a serem explorados para peguilação da enzima;
- Desenvolvimento do protocolo de peguilação da ASNase;
- Desenvolvimento do protocolo de purificação das frações de enzima peguiladas e livres de PEG;
- Determinação de parâmetros cinéticos da monoPEG-ASNase e da ASNase;
- Determinação da resistência da monoPEG-ASNase e da ASNase às proteases plasmáticas asparagina endopeptídase (AEP) e catepsina B (CTSB);
- Determinação da citotoxicidade da monoPEG-ASNase em células leucêmicas (MOLT-4 e Reh) e em células saudáveis (HUVEC).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

A enzima L-asparaginase E.C.3.5.1.1. foi obtida comercialmente da ProSpec Tany (Ness-Ziona, ISR). Os polímeros empregados nos estudos de peguilação, Figura 7, metoxi-polietilenoglicol carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS) de diferentes massas moleculares (2 e 10 kDa), foram adquiridos da NANOCS (New York, USA). As proteases asparagina endopeptidase (AEP) e a catepsina B (CTSB) foram adquiridas da Abcam (Cambrigde, ENG). As linhagens celulares de leucemia MOLT-4 e Reh foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (RJ/Brasil) e a linhagem HUVEC foi concedida pela Profa. Dra. Sandra H. P. Farsky que conduziu a realização dos ensaios no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/USP, junto ao Dr. Christiano M. V. Barbosa seguindo as instruções da ATCC (http://www.atcc.org/).

O meio de cultivo celular Instituto Memorial Roswell Park (RPMI) foi adquiridos da Vitrocell (São Paulo, BRA). Todas as soluções tampão (fosfato salino, PBS e tris(hidroximetil)aminometano clorado, Tris-HCL) foram preparadas com água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

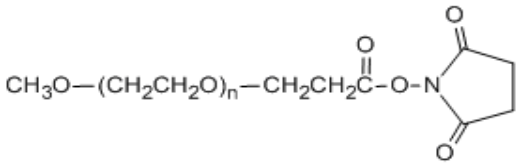


Figura 7 - Estrutura molecular do mPEG-NHS utilizado. O aumento da massa molecular é devido ao aumento da cadeia “n” (NANOCS, 2015).

4.2. Estudo computacional

A sequência Fasta (Figura 8) de *E. coli* foi obtida a partir do banco de dados *Protein Data Bank* (Brookhaven), código 3ECA (PROTEIN DATA BANK, PDB,

2003). A estrutura foi tratada no programa PyMol (Molecular Graphics System, version 1.3, Schrödinger, LLC), possibilitando a inspeção inicial dos resíduos amínicos presentes tanto no sítio ativo quanto na superfície da proteína. Desta forma, foi possível identificar, no programa PyMOL (DELANO, 2002) os grupos amínicos presentes e suas respectivas posições na estrutura 3D para então predizer possíveis efeitos estéricos de acesso ao PEG. A avaliação dos valores de pKa dos resíduos dos aminoácidos presentes na ASNase foi realizada empregando-se o software o*nline* H++ (BASHFORD, 1990), que permitiu a avaliação qualitativa dos resíduos quanto à probabilidade de reação de peguilação devido ao estado de protonação.

>3ECA:A|PDBID|CADEIA|SEQUÊNCIA
LPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVENLVNAVPQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDNVWLTLAKKINT
DCDKTDGFVITHGTDTMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAADKASANRGVLV
VMNDTVLDGRDVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYAN
ASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASG
TLNPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY
>3ECA:B|PDBID|CADEIA|SEQUÊNCIA
LPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVENLVNAVPQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDNVWLTLAKKINT
DCDKTDGFVITHGTDTMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAADKASANRGVLV
VMNDTVLDGRDVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYAN
ASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASG
TLNPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY
>3ECA:C|PDBID|CADEIA|SEQUÊNCIA
LPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVENLVNAVPQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDNVWLTLAKKINT
DCDKTDGFVITHGTDTMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAADKASANRGVLV
VMNDTVLDGRDVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYAN
ASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASG
TLNPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY
>3ECA:D|PDBID|CADEIA|SEQUÊNCIA
LPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVENLVNAVPQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDNVWLTLAKKINT
DCDKTDGFVITHGTDTMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAADKASANRGVLV
VMNDTVLDGRDVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYAN
ASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASG
TLNPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY

Figura 8 - Sequência Fasta da enzima L-asparaginase do tipo II de *E. coli*, código PDB 3ECA.

4.3. Peguilação da L-asparaginase

Inicialmente, foi estudada a reação com o polímero de 2 kDa, de maneira a definir as melhores condições de monopeguilação. Foram investigados a influência

da força iônica variando-se a molaridade do tampão PBS (0,01; 0,1 ou 0,2 M), a influência da proporção PEG:ASNase (25:1 ou 50:1) tanto para o polímero de 2 kDa quanto para o de 10 kDa de modo a evitar excesso de reagente livre no meio reacional. Investigou-se também a influência do pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ou 8,0) na peguilação sítio específica e estabilidade proteica. Ao final, investigou-se o tempo reacional de menor policonjugação.

Para as reações de peguilação, de maneira geral, uma solução de 1 $mg \cdot mL^{-1}$ de ASNase em tampão PBS, com diferentes valores de pH (6,5 a 8,0), foi adicionada à uma solução de mPEG-NHS, na proporção de 25:1 ou 50:1, retirando-se alíquotas a cada 15 minutos (0 a 90 min). A reação ocorreu sob agitação magnética à 22 ˚C por uma hora. Em seguida, adicionou-se hidroxilamina 0,2 M à mistura reacional de modo a clivar qualquer sítio instável de peguilação que tenha sido formado na proteína. O sistema foi mantido sob agitação magnética por mais uma hora. As amostras do meio reacional em diferentes condições foram analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, item 4.4) e então as bandas presentes em cada fração no gel foram analisadas e comparadas pela sua intensidade no software ImageJ (RASHBAND, 1997-2016).

4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

As amostras da etapa anterior foram analisadas por SDS-PAGE segundo Laemmli (1970) e as proteínas coradas com azul de Coomassie (Coomassie Brillant Blue R-250, CBB) pelo método de Blum et al. (1987) e por prata pelo método de Mattos et al*.,* 2012. O gel para a separação eletroforética foi preparado com 522 mM de Tris-HCl pH 8,8, 10% ou 12% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,09% (p/v) de persulfato de amônio (PSA), 0,19% (v/v) de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 0,1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS). Já o gel empacotador (aplicado sobre o gel de separação) foi preparado com 116 mM de Tris-HCl pH 6,8, 5% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,14% (p/v) de PSA, 0,29% (v/v) de TEMED e 0,1% (p/v) de SDS.

As amostras foram preparadas com tampão de proteína 4x (LAEMMLI, et al., 1970), e ditiotreitol (DTT) 25 mM e aquecidas por 5 min á 95 ºC. O tampão de

corrida utilizado foi Tris-Glicina com SDS 1x pH 8,3 e o gel permaneceu sob corrente de 80 mA, em 22 ºC.

4.5 Purificação da monoPEG-ASNase

Após definição dos parâmetros para maior rendimento de monopeguilação, realizou-se a purificação do meio reacional em 3 etapas diferentes, para remoção da enzima que não reagiu (ASNase) e de formas polipeguiladas (poliPEG-ASNase).

4.5.1. Ultrafiltração

A proteína (conjugada ou não ao PEG) foi separada da fração clivada (NHS) e do PEG não conjugado por ultrafiltração em membrana usando frasco filtrante Amico-Ultra 15 mL com corte de 30 kDa NMWL com membrana de celulose regenerada (Merck-Millipore) à 4 ºC, 2.906 xg. Além disto, a ultrafiltração foi utilizada para trocas de tampão entre as etapas de purificação cromatográfica (itens 4.5.2 e 4.5.3) e para concentrar a proteína.

4.5.2. Cromatografia de troca aniônica

A segunda etapa da purificação foi a separação cromatográfica em coluna de troca aniônica forte Resource Q 6 mL (GE Healthcare Life Science, Uppsala-SWE). A amostra da etapa anterior foi concentrada à 1 mL e filtrada em membrana de 22 µm. A coluna foi equilibrada com Bis-Tris-HCl 20 mM pH 7,0 e a proteína eluída com o mesmo tampão com adição de NaCl 1 M, ao final a coluna foi lavada com 1 M NaCl. A enzima foi purificada em gradiente linear, 12 volumes de coluna até 170 mM NaCl em fluxo de 2 $mL \cdot min^{-1}$.

O perfil de eluição da proteína foi monitorado por absorbância de UV a 280 nm, com coleta de frações de 1,5 mL e quantificação da concentração de proteína nas frações (item 4.6). Adicionalmente, para verificar se o processo de purificação desnaturou a enzima, as frações foram analisadas por eletroforese nativa (item 4.7).

4.5.3. Cromatografia de Exclusão Molecular

A terceira etapa foi realizada como etapa de polimento e também como forma de caracterização da enzima, estimando-se a massa molecular apresentada pela fração monopeguilada. A cromatografia de exclusão molecular ocorreu em coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences) empregando-se as frações da etapa anterior correspondentes à monoPEG-ASNase. Essas frações foram concentradas e o tampão foi trocado com filtros Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore) para Tris-HCL 50 mM, pH 8,8 e depois centrifugada a 16.000 xg por 5 min. Aliquotas de 500 µL foram injetadas na coluna e a eluição foi realizada no FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences), de maneira isocrática, com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, com fluxo de 0,5 $mL \cdot min^{-1}$ e monitoramento de absorbância a 280 nm. As frações coletadas foram avaliadas através de gel nativo e também foram utilizadas nos ensaios de caracterização enzimática, clivagem proteolítica e citotoxicidade.

4.6. Determinação da concentração de proteína

A quantificação da massa de proteína ASNase foi realizada empregando-se o método do ácido bicinconínico (BCA). Este ensaio é baseado na detecção de algumas ligações peptídicas entre aminoácidos específicos. As ligações peptídicas das proteínas reduzem o Cu^{2+} presente em um dos reagentes, desta forma o ácido bicinconínico liga-se ao cobre reduzido (Cu^{+}), formando uma coloração púrpura que pode ser lida em espectrofotômetro (562 nm) (SIGMA-ALDRICH, 2013).

O protocolo foi realizado conforme descrito pelo fabricante Sigma-Aldrich (2013). As amostras foram incubadas por 30 minutos à 37 °C e as absorbâncias medidas a 562 nm em espectrofotômetro Biophotometer Plus (Eppendorf). A concentração de proteína total foi obtida através da interpolação dos valores de absorbância em uma curva de calibração de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*), construída nas concentrações de 200 a 1000 $\mu g \cdot mL^{-1}$ (SIGMA-ALDRICH, 2013).

4.7. Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida (Native-PAGE)

O procedimento da eletroforese nativa é semelhante ao descrito anteriormente para SDS-PAGE, item 4.4, porém sem adição do SDS (ZHENG, MA & SU, 2007). Entretanto, o gel utilizado para concentração (empacotamento) foi de 5% (m/v) de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de corrida (separação) 6% ou 10% (m/v). O gel para a separação eletroforética foi preparado com 522 mM de Tris-HCl pH 8,8, 6% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,09% (p/v) de PSA e 0,19% (v/v) de TEMED. Já o gel empacotador (aplicado sobre o gel de separação) foi preparado com 116 mM de Tris-HCl pH 8,0, 5% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,14% (p/v) de PSA e 0,29% (v/v) de TEMED. As amostras foram preparadas com tampão de proteína 1x sem SDS (LAEMMLI et al., 1970) e o tampão de corrida foi o Tris-Glicina 1x pH 8,8 sem SDS. O gel permaneceu sob corrente de 100 mA, em 4 ºC.

A determinação da mobilidade relativa, foi calculada para o padrão de massa molecular (NativeMark da Life technologies), em gel a 10%. Este foi utilizado como curva padrão. A migração relativa (R_f) é a migração individual de cada proteína em função da migração total do tampão de proteína no gel (HAMES, 1998).

4.7.1. Atividade em Native-PAGE (Zimograma)

A zimografia permite detectar atividade da enzima de interesse em gel nativo pela adição do substrato na malha do gel ou após a corrida eletroforética. O protocolo de atividade em gel foi adaptado de Mesas et al. (1990). Após a corrida do Native-PAGE, o gel foi submerso em meio reacional (Tris-HCL 30 mM, L-asparagina 38 mM e 0,2 M de cloridrato de hidroxilamina pH 7,0) e incubado à 37 °C por 30 minutos. Subsequentemente, o gel foi lavado com água ultra-pura para ser revelado com solução de cloreto de ferro cromogênico (FeCl). Após 24 h o gel foi corado com azul de Coomassie (CBB).

Este método consiste na reação do aspartato formado na hidrólise da asparagina com a hidroxalamina, formando ácidos β-hidroxamato aspártico (AHA). O cloreto férrico reage com AHA formando β-hidroxamato aspártico férrico que possui uma coloração marrom. Considerando que AHA é um derivado da hidrólise de

L-asparagina pela enzima, a intensidade da coloração é proporcional à atividade (RODRIGUES, 2016).

4.8. Determinação da atividade enzimática de L-asparaginase

A determinação da atividade enzimática da ASNase foi realizada pelo método de Nessler, de acordo com protocolo adaptado de Imada et al. (1973). A metodologia baseia-se na liberação de amônio pela ação da enzima sobre a L-asparagina. O nitrogênio amoniacal liberado interage com o reagente de Nessler dando origem a um composto de coloração marrom. A intensidade de cor proveniente dessa interação é medida com o auxílio de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 436 nm e a seguinte relação é estabelecida: 1 Unidade Internacional (UI) enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de amônia por minuto a pH 7,3 e 37 °C. Para determinação do número de mols de amônia presente na amostra, uma curva de calibração empregando concentrações conhecidas de sulfato de amônio na presença do reagente de Nessler em função da absorbância foi preparada.

Em um tubo falcon, foram adicionados 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,6), 0,1 mL de L-asparagina 189 mM, 0,9 mL de água Milli-Q e 0,1 mL da amostra contendo enzima. A reação permaneceu em banho de água à 37 °C durante 30 minutos; a reação foi interrompida com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M. Após essa etapa, 0,2 mL dos tubos de reação foram adicionados em 4,3 mL de água ultrapura e, então, adicionados 0,5 mL do reagente de Nessler. Todos os ensaios foram realizados em duplicata com três repetições cada. As amostras foram então quantificadas por espectrofotometria a 436 nm, 25 °C, em espectrofotômetro SpectraMax plus 384 - Molecular Devices com auxílio do software Soft Max Pro. A determinação da atividade específica ($UI \cdot mg^{-1}$) foi calculada (eq. 1) com a quantificação por BCA (item 4.6) no mesmo dia deste ensaio de atividade enzimática.

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{A}}{\text{CP}} \quad (1)$$

Em que “A” corresponde à atividade enzimática ($UI \cdot mL^{-1}$) e “CP” corresponde à concentração de proteínas totais ($mg \cdot mL^{-1}$).

4.8.1. Estabilidade enzimática

A estabilidade da monoPEG-ASNase em comparação á ASNase foi estudada para verificar se a peguilação sítio-específica foi capaz de aumentar a estabilidade da enzima.

As frações purificadas de monoPEG-ASNase e ASNase livre foram mantidas à 4 ºC por 21 dias, de modo a verificar a estabilidade por meio da determinação da atividade enzimática ao final do processo de purificação e ao longo do tempo. A quantificação proteica (método de BCA, item 4.6) e a atividade enzimática (método de Nessler, item 4.8) foram realizados, em triplicata, em todos os dias (t) estudados ($t_{0\text{-}7}$; $t_{9e11;}$ $t_{15\text{-}18}$; t_{21}). A enzima comercial (ProSpec Tany) foi utilizada como controle.

Os dados obtidos foram ajustados pela curva de regressão não-linear de modelos matemáticos empregando-se o software GraphPad Prisma 5.0.

4.9. Determinação dos parâmetros cinéticos

As reações catalisadas por enzimas são saturáveis, e a sua velocidade de catálise não indica uma resposta linear face ao aumento de substrato. Se a velocidade inicial da reação é medida sobre uma escala de concentrações de substrato (denotada como [S]), a velocidade de reação (v) aumenta com o acréscimo de [S]. Todavia, à medida que [S] aumenta, a enzima satura-se e a velocidade atinge o valor máximo V_{max}. Para determinação de k_M e V_{max} empregamos o ensaio acoplado à glutamato desidrogenase, o qual mede a oxidação do cofator Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (β-NADH) à β-NAD^+ pela glutamato desidrogenase (GDH). A GDH oxida uma molécula de β-NADH para a síntese de cada molécula de glutamato a partir de uma molécula de

α-cetoglutarato e uma molécula de amônia. No ensaio acoplado, a molécula de amônia provém da hidrólise da asparagina pela L-asparaginase (BALCÃO et al. 2001).

Os ensaios acoplados à glutamato desidrogenase foram realizados conforme adaptação de Rodrigues (2016) ao protocolo sugerido por Balcão et al. (2001) em placas de 96 micropoços. Nos ensaios realizados para ASNase controle e monopeguilada utilizou-se GDH 400 mU, α-cetoglutarato 1 mM e β-NADH 131 μM. Todos os ensaios foram realizados em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, em triplicata ou sextuplicata.

Na cinética asparaginásica, variou-se a concentração de asparagina de 5 a 1470 μM, enquanto a enzima asparaginase pura (controle) foi utilizada em concentração fixa de 1,8 mUI e a monopeguilada de 1,6 mUI. A oxidação do β-NADH (*i.e.*, sua extinção) foi monitorada em tempo real em espectrofotômetro de placas (Spectra Max M2 - Molecular Devices), a 340 nm. O coeficiente de extinção molar foi calculado e determinado como 6,1 $\mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Em todos os ensaios foi descontada a desaminação espontânea da L-asparagina através de um controle contendo todos os componentes da reação com exceção da enzima L-asparaginase. O branco foi realizado com todos os componentes exceto o β-NADH.

A adequabilidade dos modelos matemáticos e o cálculo do k_{CAT} foi realizada pelo software GraphPad Prisma 5. O modelo de Michaelis-Menten (hipótese nula, $p < 0,5$) descrito por uma curva hiperbólica foi realizado. A constante de Michaelis-Menten (k_M) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram determinadas em tampão PBS 50 mM, pH 8,6 contendo diferentes concentrações de L-asparagina (5, 10, 20, 40, 60, 120 μM), à 37 °C.

4.10. Avaliação da resistência à clivagem proteolítica

A avaliação da resistência à clivagem proteolítica pela asparagina endopeptidase (AEP) e pela catepsina B (CTSB) foi realizada através de adaptação do protocolo proposto por Patel et al. (2009). Incubou-se 4 μg de L-asparaginase com 2 μg de CTSB ou 1,8 μg de AEP (ambas humanas, recombinantes, produzidas em células HEK), em 20 μL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,8, à 37 ºC em agitação

de 50 xg por 84 horas. Após a incubação, realizou-se avaliação das bandas por eletroforese em Native-PAGE (item 4.7 e 4.7.1).

4.11. Ensaio de citotoxicidade

A viabilidade mitocondrial (consequentemente a viabilidade celular) é quantificada pela redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) pela enzima succinato desidrogenase presente na membrana mitocondrial, resultando na formação de cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

O ensaio foi realizado conforme descrito por Costa (2015) com linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda de células T (MOLT-4) e de células B (Reh), e linhagem saudável de células endoteliais da veia umbilical (HUVEC). As linhagens celulares foram mantidas em RPMI 1640 com 10% soro fetal bovino (v/v), L-glutamina e piruvato de sódio, incubadas à 37 °C com 5% CO_2. O repique das células foi feito após atingirem uma alta densidade celular, confluência maior que 90%. A linhagem HUVEC teve suas células tripsinizadas com 0,05 mL/cm^2 de solução de Tripsina/EDTA, ressuspensas em meio fresco. As três linhagens (MOLT-4, Reh e HUVEC) foram centrifugadas à 600 xg em 4 °C por 10 minutos e ressuspensas em meio fresco. A visualização da viabilidade celular foi feita com azul de Trypan (Sigma-Aldrich, Darmstadt/GER). As células foram contadas em câmara de Neubauer.

Em microplacas de 96 poços foram incubadas 20^4 células leucêmicas e 10^4 células saudáveis. Em diferentes concentrações de ASNase e monoPEG (0,01; 0,05; 0,1; 0,3 e 0,6 $UI^{-1} \cdot mL^{-1}$, em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4) por 48 e 72 horas, à 37 °C com 5 % CO_2. Em seguida (48 ou 72 h), foi adicionada uma solução de MTT 0,25 $mg \cdot mL^{-1}$ e após 4 h, SDS 1% e incubadas nas mesmas condições por mais 24 h. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Os resultados foram expressos em percentual de redução do MTT, tendo como parâmetro o grupo controle, para o qual foi atribuído 100% de redução. O

ensaio foi feito em triplicata experimental e a análise dos dados com o programa GraphPad Prism 5.0.

4.12. Análise dos dados

As análises dos dados e as análises estatísticas (teste t-student e teste F) foram feitas utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*. Todos os ensaios tiveram no mínimo três repetições (triplicatas). Os resultados estão representados pela média ± desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo computacional

A estrutura cristalina de L-asparaginase do tipo II da *Escherichia coli* (código PDB 3ECA) corresponde à enzima encontrada comercialmente nos fármacos Elspar® e Oncaspar®, esse último correspondendo à forma peguilada da enzima.

Quando observada a estrutura 3D da molécula, no programa PyMol (Molecular Graphics System, version 1.3, Schrödinger, LLC) encontra-se a existência de quatro subunidades idênticas, formando um tetrâmero. Cada monômero com 326 resíduos de aminoácidos, sendo o primeiro (porção *N*-terminal) uma leucina e o último (porção *C*-terminal) uma tirosina. Dentre todos os aminoácidos presentes na proteína estudada, apenas a lisina e a arginina apresentam grupos aminos livres (Figura 9).

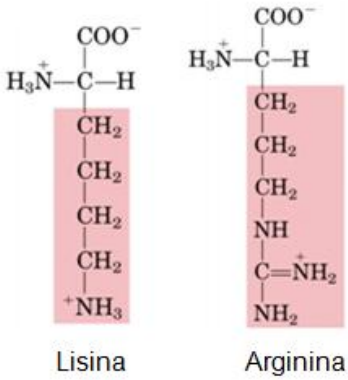


Figura 9 - Estrutura molecular da lisina e da arginina. O grupo radical, n-butilamina e guanidina, respectivamente, esta destacado (MONSIVAIS, 2014).

A conjugação de PEG aos resíduos de aminoácidos em proteínas é altamente dependente da nucleofilicidade de cada resíduo de aminoácido. O ataque nucleofílico só terá lugar quando o grupamento amínico encontrar-se desprotonado. Portanto, será muito mais favorável quando o pH da solução de proteína estiver perto ou acima do pKa do resíduo. Por conseguinte, a reatividade de cada resíduo depende também dos aminoácidos vizinhos (ROBERTS, BENTLEY & HARRIS, 2002).

Acredita-se que em meio ácido, lisinas e a argininas estejam protonadas e, consequentemente, não reativas para conjugação ao PEG (PASUT & VERONESE, 2012). Desta forma, os pKas dos aminoácidos com grupos amino teoricamente passíveis de conjugação foram estudados. Todas as sete argininas presentes estão totalmente protonadas em pH 7,6, não sendo possível sua conjugação ao mPEG-NHS.

Das 22 lisinas existentes, o menor valor de pKa 10,5 é igual ao maior valor encontrado na literatura para esse aminoácido (MUKHERJEE, 2007), o que confirma que trabalhar na faixa de pH sugerida anteriormente 7,6 a 9,2 é uma estratégia de monopeguilação em região *N*-terminal.

Os resultados referentes aos resíduos de lisina presentes e sua disponibilidade de conjugação ao PEG estão apresentados na Tabela 2. Criou-se diferentes termos, como “peguilação favorável”, “peguilação possível” e “peguilação dificultada” para descrever hipoteticamente quais resíduos de lisina que poderão, mesmo não estando em condições ideais, apresentar de alguma forma conjugação ao PEG. Neste contexto, “peguilação favorável”, refere-se à lisina que está na superfície e não totalmente protonada. O termo “peguilação possível” aplica-se à lisinas que não estão totalmente protonadas, entretanto fazem parte da interface entre subunidades, em que acredita-se sofrer impedimento estérico na interação com o PEG. O termo “peguilação dificultada”, por sua vez, refere-se à lisinas que estão totalmente protonadas (pKa > 12) e na região interna da enzima. Ou seja, de forma geral, estes termos foram criados como uma análise hipotética da dificuldade com que o polietilenoglicol terá de interagir nos resíduos. Especificamente, a região *N*-terminal apresenta-se desprotonada e muito acessível ao PEG (Figura 10).

Figura 10 - Tetrâmero da L-asparaginase de *E. coli* (PDB código 3ECA). Em destaque estão as regiões *N*-terminal (esferas) de cada monômero da ASNase *(representada em cartoon*).

Dos 22 resíduos de lisina estudados, 50% foram considerados como "peguilação favorável" e 41% considerados como "peguilação dificultada". Mesmo sabendo que para valores de pH entre 7,0 - 8,5 os resíduos amínicos de lisinas da L-asparaginase encontram-se preferencialmente protonados, 50% deles são favoráveis à peguilação aleatória.

Tabela 2 - Classificação dos resíduos com grupo amino passível de ataque nucleofílico baseado nos valores de pKa e respectivas localizações na estrutura quaternária da L-asparaginase: Peguilação favorável **(**parcialmente protonada e localizada na superfície proteica), Peguilação possível (parcialmente protonada e localizada na interface de subunidades) e Peguilação dificultada (totalmente protonada e/ou no interior da proteína).

Peguilação	**Favorável (resíduo nº)**		**Possível (resíduo nº)**	**Dificultada (resíduo nº)**	
***N*-terminal pKa ≈ 7,6**	1		-	-	
Lisina pKa ≥ 10,5	29 43 49 79 107 139	196 207 251 288 314	22 262	71 72 104 162 172	186 213 229 301
TOTAL	23		2	9	

Legenda: "-" sem resíduos

5.2. Peguilação da L-aspaginase

Inicialmente, estudamos a força iônica do tampão PBS, pois uma das principais características determinadas pelos íons dissolvidos em uma solução é a sua força iônica e esta é afetada pela concentração total de eletrólitos em solução (GLASSONE, 2007).

A peguilação *N-t*erminal em lisozima com mPEG-ALD (metoxipolietilenoglicol aldeido) foi favorecida com maior concentração de íons, 100 mM de PBS e 20 mM de cianoboroidreto de sódio (YU & GHOSH, 2010). Quando comparado à estratégia de peguilação aleatória em L-asparaginase de *Aspergillus terreus* com mPEG-NHS que ocorreu em menor concentração de íons, 50 mM de PBS (LOUREIRO et al., 2012) e em hemoglobina, alpha 1 (HbA) com MalPhePEG (maleimidofenil polietilenoglicol) que ocorreu em 0,5 mM de PBS (MANJULA et al., 2003). Portanto, o efeito da força iônica na conjugação do PEG à proteína foi investigado, variando-se a molaridade do tampão empregado, PBS pH 7,4 (Figura 11).

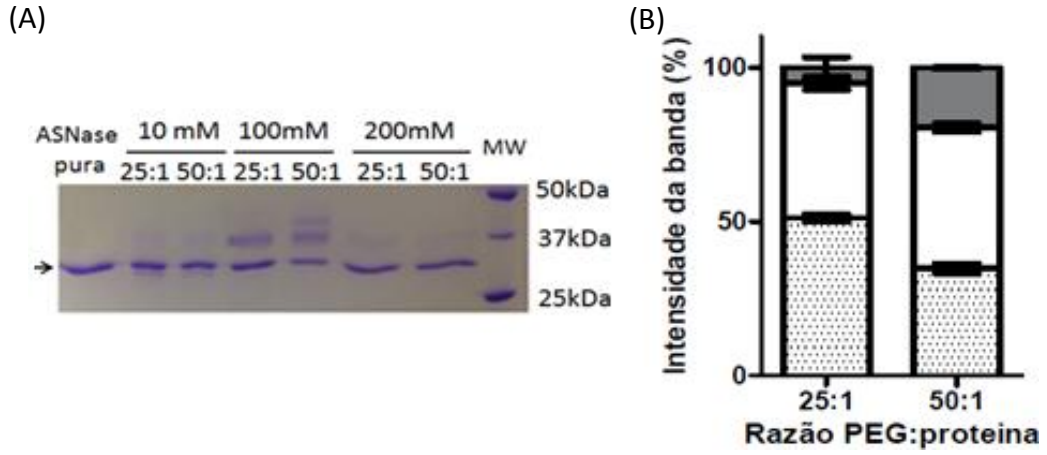


Figura 11 - L-asparaginase conjugada ao PEG 2 kDa em diferentes molaridades do tampão PBS pH 7,6. (A) Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) corado com CBB. Coluna 1: L-asparaginase pura (2 µg). Coluna 2 e 3: L-asparaginase conjugada ao mPEG-NHS de 2 kDa com proporção PEG:enzima de 25:1 e 50:1, respectivamente, em PBS 10 mM. Coluna 4 e 5: L-asparaginase conjugada ao mPEG-NHS de 2 kDa com proporção PEG:enzima de 25:1 e 50:1, respectivamente, PBS 100 mM. Coluna 6 e 7: L-asparaginase conjugada ao mPEG-NHS de 2 kDa com proporção PEG:enzima de 25:1 e 50:1, respectivamente, em PBS 200 mM.

Coluna 8: Padrão molecular BioRad (MW). (B) Porcentagem de peguilação baseada na intensidade de banda da reação em PBS 100 mM. ASNase polipeguilada (▬), ASNase monopeguilada (▭) e ASNase livre (▭). Barras de erro representam o desvio-padrão.

Os fatores que influenciam fortemente reações sítio-dirigidas na região *N*-terminal entre mPEG-NHS e proteínas são pH, temperatura, tempo de reação e força iônica (SOARES et al. 2002). Em uma modificação simples, como alteração da força iônica, o fornecimento de contra-íons para grupamentos protonados da proteína é alterado, estabilizando essas cargas (GLASSTONE, 2007). Consequentemente, favorece-se a peguilação sítio específica com a conjugação do mPEG no α-amino do *N*-terminal.

Corroborando o que foi observado por Yu e Ghosh (2010), a peguilação *N*-terminal em ASNase foi favorecida com tampão PBS 100 mM para as duas proporções de PEG:enzima (Figura 11). Os demais valores de molaridade, 10 e 200 mM, não apresentaram bandas de peguilação muito aparentes.

Bandas similares (correspondendo a 42-45% de rendimento) foram observadas para as duas razões PEG:ASNase estudadas. Entretanto, proporção PEG:enzima de 25:1, apresentou menos formas polipeguiladas em comparação com 50:1 (7% e 19%, respectivamente). Na maioria dos casos, é adicionada uma razão molar em excesso de PEG em relação à proteína com o objetivo de converter a proteína nativa, relativamente dispendiosa, tanto quanto possível na forma peguilada, ou devido à problemas associados com alguns PEG reativos (por exemplo, hidrólise rápida) (VERONESE, 2001).

A fim de confirmar qual a melhor razão PEG:enzima, realizou-se novo ensaio utilizando-se o PEG de 10 kDa em tampão PBS 100 mM pH 7,5, nas razões 25:1 e 50:1 (Figura 12). Também foi possível realizar a monopeguilação nas condições estabelecidas empregando-se o PEG de 10 kDa. Porém, não foram observadas, diferenças significativas entre as duas proporções de PEG:enzima estudadas e, portanto, optou-se por continuar os próximos ensaios com a proporção de 25:1.

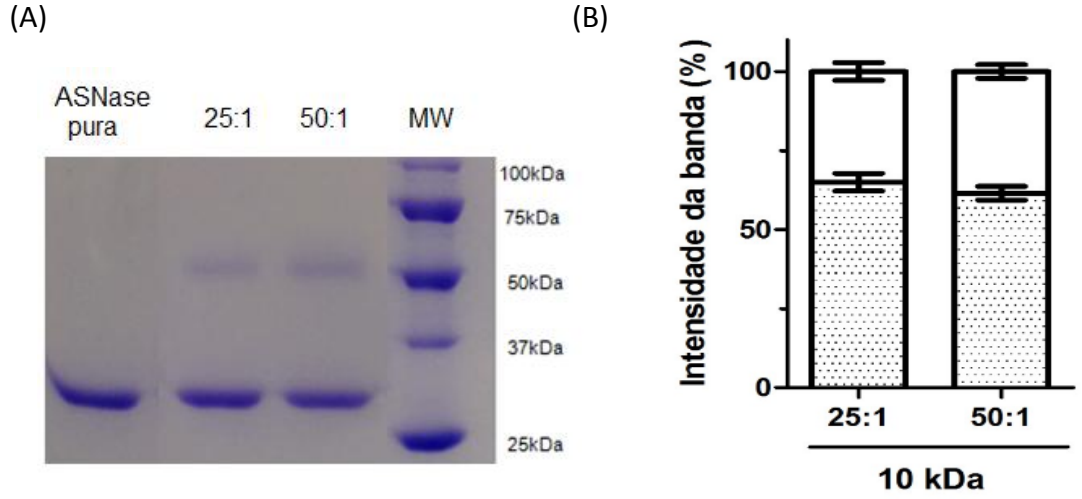
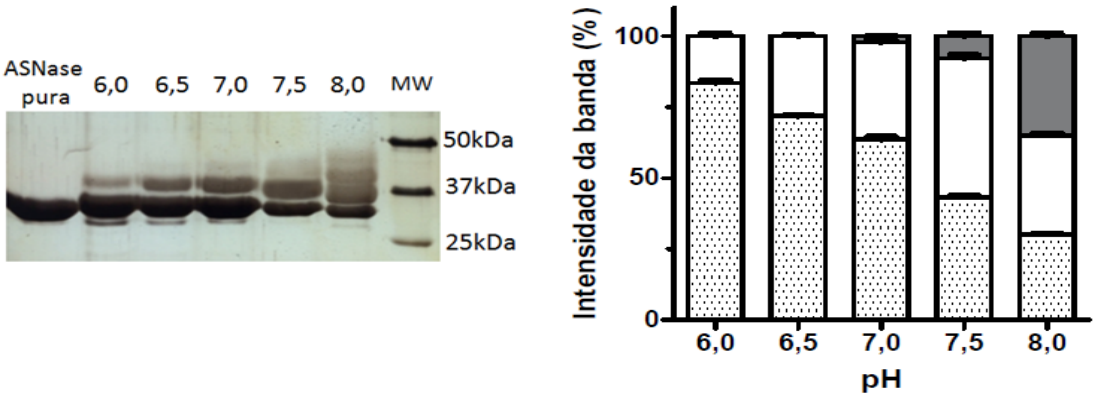


Figura 12 - L-asparaginase conjugada ao PEG 10 kDa em tampão PBS 100 mM pH 7,5 nas razões de PEG:enzima 25:1 e 50:1. (A) Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) corado com CBB. Coluna 1: L-asparaginase pura (2 μg). Coluna 2 e 3: L-asparaginase conjugada ao mPEG-NHS de 10 kDa 25:1 e 50:1, respectivamente. Coluna 4: Padrão molecular BioRad (MW). (B) Porcentagem de peguilação baseada na intensidade de banda da reação em PBS 100 mM pH 7,5. ASNase monopeguilada (▩) e ASNase livre (▭). Barras de erro representam o desvio-padrão.

É importante ressaltar que a migração da proteína peguilada em gel de poliacrilamida com SDS ocorre de forma mais lenta do que o esperado para a sua massa molecular, pois o PEG forma um complexo com o SDS (ZHENG, MA & SU, 2007). Este complexo ocorre em três níveis: nenhuma interação (baixas concentrações de SDS), o tensoativo liga-se à cadeia polimérica formando agregados (concentração crítica) e acima deste intervalo estes agregados coexistem com micelas de SDS livres (DHARA & CHATTERJI, 1999). Na elaboração do protocolo de eletroforese, a menor concentração de SDS utilizada foi 1% (p/v). Nesta concentração, as micelas de SDS coexistem com o complexo PEG-SDS. Dessa forma, como um guia, considera-se duas vezes a massa do PEG na proteína peguilada (BROCCHINI, et al., 2006). O ideal em amostras peguiladas, são padrões moleculares conjugados a diferentes massas moleculares de PEGs (HARDY et. al. 2008). Entretanto, esses não foram empregados no presente estudo.

Após definir a melhor molaridade do tampão PBS e a razão PEG:enzima, a influência do pH foi investigada. Como descrito anteriormente, Roberts et al. (2002) mencionaram que o ataque nucleofílico tem lugar quando o pH de operação é próximo ou superior ao valor de pKa do grupo aminoácido em questão. De acordo com o fabricante do PEG, estes ésteres de NHS reagem com grupos amina primários em pH 7 ~ 8,5, para formar ligações amida estáveis, sendo que a reação pode ser finalizada em 1 hora. Lembrando que o pKa *N*-terminal da ASNase é 7,6 optou-se por testar diferentes valores de pH na faixa de 6,5 a 8,0 (Figura 13).

Figura 13 - L-asparaginase conjugada ao PEG 2 kDa em PBS 100 mM em diferentes pHs. Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) corado com prata. Coluna



1: L-asparaginase pura (20 μg). Coluna 2: pH 6,0. Coluna 3: pH 6,5. Coluna 4: pH 7,0. Coluna 5: pH 7,5. Coluna 6: pH 8,0. Coluna 7: Padrão de massa molecular BioRad (MW). (B) Porcentagem de peguilação baseada na intensidade de coluna de cada pH. ASNase polipeguilada (▬), ASNase monopeguilada (▭) e ASNase livre (▭). Barras de erro representam o desvio-padrão.

A figura 13 mostra que à medida que o pH da reação aumenta, a polidispersão também aumenta e a quantidade de enzima livre diminui. Este fato pode ser explicado, pois o ataque nucleofílico a tem lugar quando o pH é próximo ou superior ao valor de pKa e, portanto, quanto maior o pH menor a especificidade, ocorrendo reações aleatórias nos resíduos de lisina da proteína. Portanto, considera-se mais adequada a reação em menores valores de pH que mantenham a estabilidade da proteína e resultem em menos formação de espécies polipeguiladas. De acordo com os resultados apresentados, a realização da reação em pH próximo

ao pKa 7,6 da leucina *N*-terminal demonstrou ser a melhor condição para o PEG 2 kDa, tanto para a estabilidade da proteína que apresentou degradação em pH ≤ 7,0, quanto para diminuir a polidispersão observada em pH 8,0.

Outro fator importante a ser estudado é o tempo reacional. A hidrólise do mPEG-NHS, ou seja, a meia vida de hidrólise do grupo succinimidil por ataque nucleofílico ao éster depende diretamente de sua estrutura molecular e o local de ligação éster na cadeia estrutural (ZALIPSKY, 1998). A meia-vida de hidrólise do polietilenoglicol com característica estrutural de ligação éster C4 alifático, por exemplo, é de 20 a 25 minutos, enquanto que com ligação éster C3 é de 10 a 15 minutos (Figura 14) (CREATIVE PEG WORKS, 2015). Portanto, investigamos diferentes tempos reacionais de 0 até 90 minutos (Figura 15).

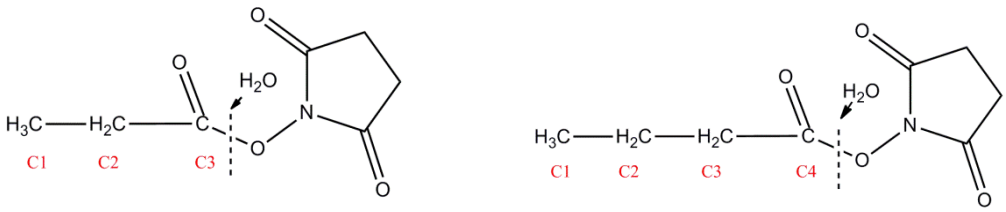


Figura 14 - Esquema da hidrólise do polietilenoglicol em duas estruturas moleculares diferentes. Cadeia alifática de três carbonos (C1-C3) e cadeia alifática de quatro carbonos (C1-C4).

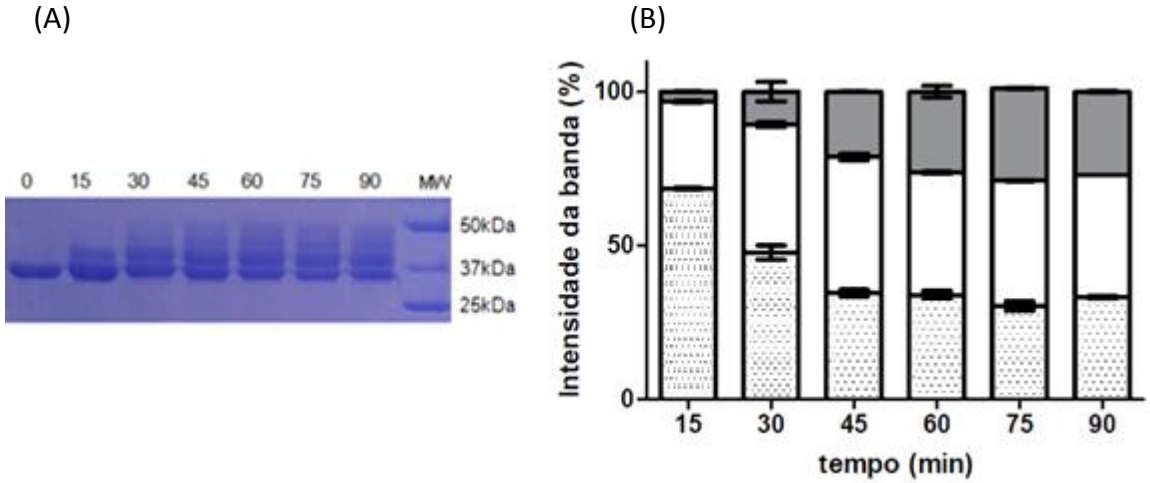


Figura 15 - L-asparaginase conjugada ao PEG 2 kDa em PBS 100 mM pH 7,5 em diferentes tempos de reação. (A) Gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) corado com CBB. Coluna 1: 0 min, Coluna 2: 15 min, Coluna 3: 30 min, Coluna 4: 45 min, Coluna 5: 60 min, Coluna 6: 75 min, Coluna 7: 90 min, Coluna 8: Padrão de massa molecular (MW). (B) Porcentagem de peguilação baseada na intensidade da coluna de cada tempo de reação. ASNase polipeguilada (▬), ASNase monopeguilada (▭) e ASNase livre (▭). Barras de erro representam o desvio-padrão.

Nos primeiros 15 minutos de reação foi possível identificar a conjugação do PEG com a ASNase, formando 28% de espécie monopeguilada. A amostra que apresentou maior monopeguilação, 41%, correspondeu ao tempo de reação de 30 minutos. Adicionalmente, a polipeguilação aumentou com o tempo, alcançando em 75 minutos, 30% de estruturas polipeguiladas. A reação de hidrólise do PEG reativo ocorre paralelamente à reação com a amina primária da enzima.

Considerou-se 30 minutos o melhor tempo de reação por apresentar banda mais concentrada de monoPEG-ASNase comparado à de 15 minutos e menor presença de espécies polipeguiladas em comparação com os tempos superiores.

As reações de peguilação sítio-específica *N*-terminal em condições otimizadas resultaram rendimentos de aproximadamente 41-45%. Devido à rápida hidrólise do mPEG-NHS, acredita-se que algumas moléculas de PEG não consigam se conjugar à proteína. Desta maneira, a reação de conjugação do mPEG-NHS à proteína é descrita na literatura com rendimento de 27 a 36% (SHANG & GHOSH, 2014).

5.3. Purificação da monoPEG-ASNase

Mesmo com o protocolo de peguilação sítio-específica *N*-terminal, múltiplas estruturas de enzimas peguiladas podem ser produzidas (YU, SHANG & GHOSH, 2010). A purificação de espécies peguiladas é complicada, devido à natureza polar do grupamento modificado do PEG e pelo número limitado de métodos de separação da proteína peguilada de sua precursora não modificada (FEE & VAN ALSTINE, 2006; SHANG, 2013). Uma técnica comumente utilizada é a cromatografia de exclusão molecular também chamada de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC, do inglês *Size Exclusion Cromatography*) (ZHENG, MA & SU, 2007; PASUT, SERGI & VERONESE, 2008).

Entretanto, apesar da coluna cromatográfica utilizada, Superdex™ 200 Increase (GE Life Sciences), possuir alto poder de resolução, amostras com estruturas muito parecidas como a ASNase e a monoPEG-ASNase tornam a separação ineficiente. Na maioria dos casos, é necessária uma diferença de tamanho entre as amostras de três vezes para obter separação razoável (GUTTMAN, 2012). A diferença de tamanho da monoPEG-ASNase (172 kDa) em relação L-asparaginase (132 kDa) é de aproximadamente ⅓. Portanto, como forma de purificação do meio reacional, esta metodologia não apresenta boa resolução, sobrepondo os picos (Figura 16). Mesmo com o auxílio de técnicas, sugeridas pelo frabricante para melhorar a resolução de separação entre amostras, como diminuição do fluxo de eluição (de 1 $mL \cdot min^{-1}$ para 0,3 $mL \cdot min^{-1}$) e diminuição da concentração de amostra (de 2 $mg \cdot mL^{-1}$ para 1 $mg \cdot mL^{-1}$) a purificação não foi eficiente.

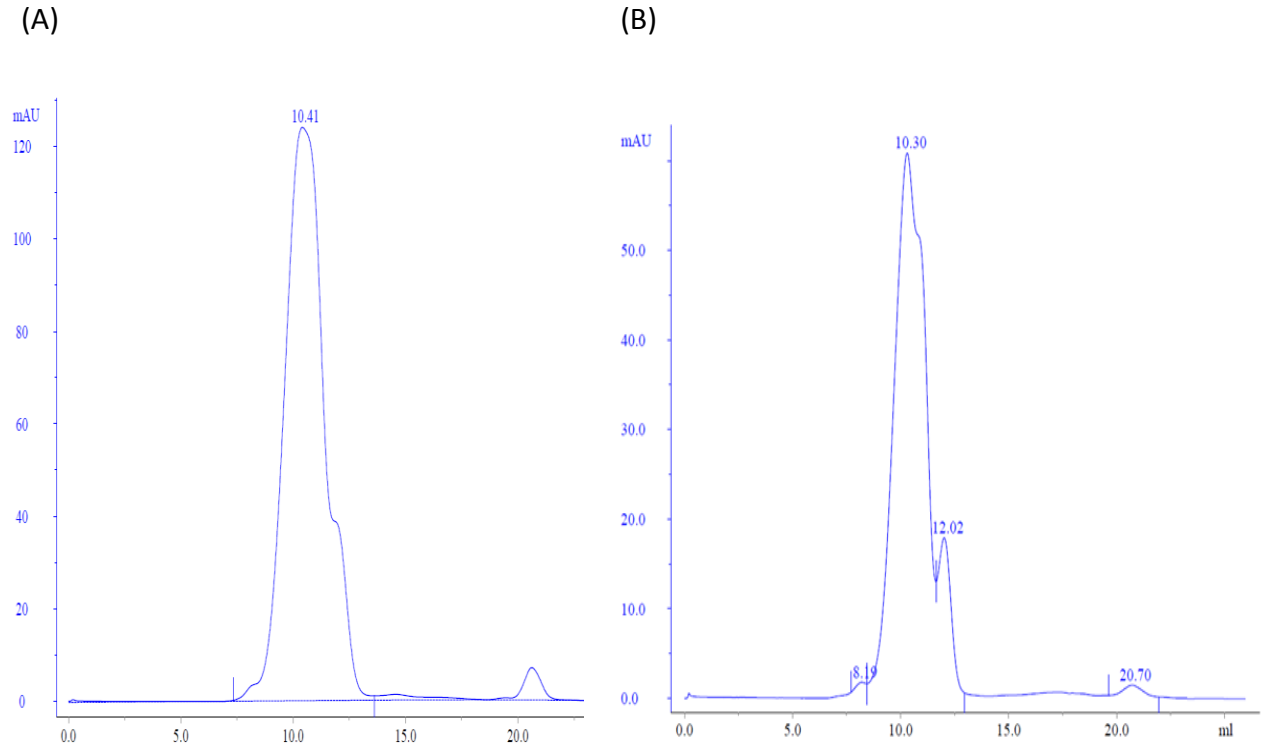
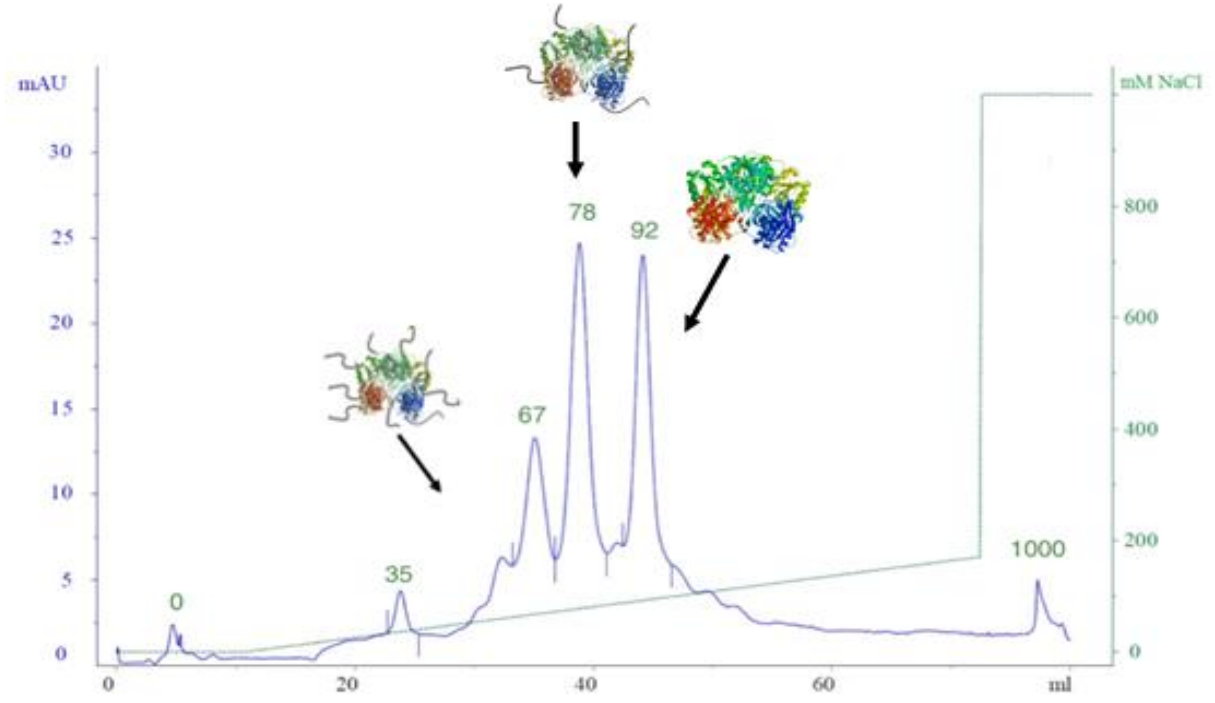


Figura 16 - Cromatograma de purificação por exclusão molecular do meio reacional. Em coluna Superdex 200 10/300 GL, GE Life Sciences, eluição isocrática de (A) 1 mL·min^{-1} (2 mg·mL^{-1} do meio reacional) e (B) 0,3 mL·min^{-1} (1 mg·mL^{-1} do meio reacional) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6, monitorada a 280 nm.

De forma alternativa, a purificação baseada na diferença de carga eletrostática por cromatografia de troca iônica é uma metodologia muito utilizada e que proporciona em média 97% de pureza (ROBERTS, BENTLEY & HARRIS, 2002). A peguilação altera o ponto isoelétrico (pI) da proteína. A mudança de carga depende do tamanho da proteína, da forma, do número de moléculas de PEG conjugadas e dos resíduos aos quais as cadeias de PEG se ligam (FEE & VAN ALSTINE, 2011). Assim que o PEG conjuga-se à amina livre da proteína (lisina e *N*-terminal), sua carga positiva é neutralizada. Considerando uma monopeguilação *N*-terminal, quatro cargas positivas serão neutralizadas na enzima ASNase. Além disso, o PEG também exerce um efeito estérico sobre os resíduos carregados da proteína. Desta maneira, foi utilizada uma coluna de troca aniônica forte (Resource Q, GE Healthcare) para purificar a monoPEG-ASNase com gradiente linear de

12 volumes de coluna até NaCl 170 mM e eluição isocrática de NaCl 1 M para fazer a limpeza da coluna, caso ainda restasse amostra ligada à resina da coluna (Figura 17).

(A)



(B)

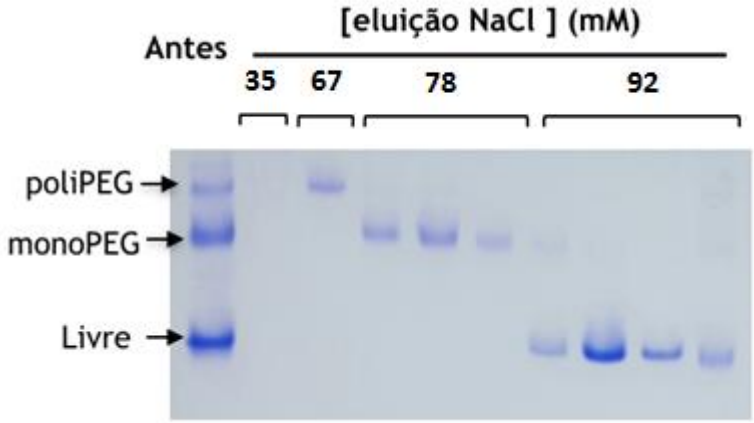


Figura 17 - Purificação da L-asparaginase peguilada por coluna de troca aniônica. (A) Cromatograma da purificação realizada com coluna de troca aniônica forte (Resource Q) com gradiente linear de sal (——), 12 volumes de coluna, até 170 mM NaCl em tampão Bis-Tris-HCl pH 7,0 1M NaCl. Os picos do gradiente encontram-se em 35 mM, 67 mM, 78 mM e 92 mM de NaCl. (B) Gel de poliacrilamida 6% (Native-PAGE) corado com CBB. Coluna 1: Reação de peguilação antes de purificar, Coluna 2: eluição com NaCl 35 mM, Coluna 3: eluição com NaCl 67 mM, Colunas 4 a 6: frações da eluição com NaCl 78 mM, Colunas 7 a 10: frações da eluição com NaCl 92 mM.

Nesta etapa da purificação foi possível separar todas as formas diferentes presentes no meio reacional: enzima livre (ASNase que não reagiu com o PEG), enzima monopeguilada e enzima polipeguilada. De modo a eliminar o complexo PEG-SDS, mencionado anteriormente (ZHENG, MA & SU, 2007) e verificar a ocorrência de desnaturação da enzima após o processo de purificação, optou-se por utilizar o gel nativo para a confirmação da purificação por eletroforese. O padrão de massa molecular não pôde ser aplicado para estimar a massa da monoPEG-ASNase, uma vez que a enzima peguilada apresenta tamanho hidrodinâmico maior ao que corresponde à sua massa estimada, resultado da redução da mobilidade de conjugados de PEG-proteína em comparação à proteínas globulares de massa molecular semelhantes (PABST et al., 2007). Desta forma, foi realizado em gel nativo, a comparação do meio reacional (contendo ASNase e frações peguiladas) com proteínas globulares de massa molecular conhecida: BSA (66,5 kDa), ASNase (132 kDA) e catalase (240 kDA) (Figura 18). A partir da mobilidade relativa (R_f), que corresponde à migração individual de cada proteína dividida pela migração total do tampão de proteína no gel (HAMES, 1998).

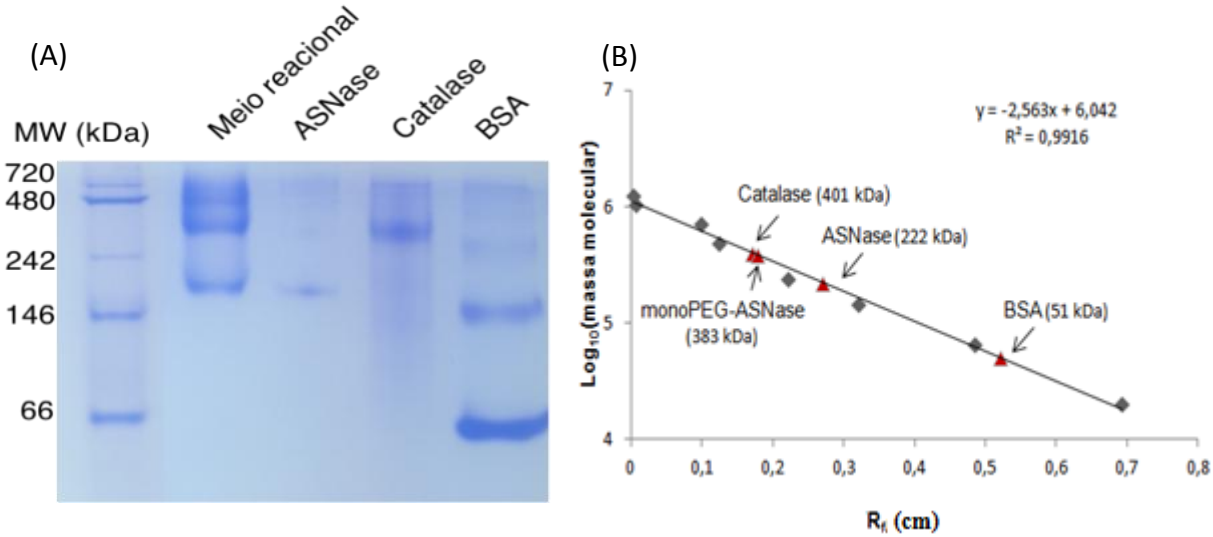


Figura 18 - Comparação de diferentes proteínas e suas respectivas massas moleculares. (A) Gel de poliacrilamida 10% (Native-PAGE) corado com CBB. Coluna 1: Padrão de massa molecular (MW, NativeMark, Life). Coluna 2: meio reacional de peguilação, Coluna 3: ASNase (132 kDa), Coluna 4: catalase (240 kDa), Coluna 5: Albumina de soro bovino, BSA (66,5 kDa). (B) Curva padrão do log_{10} da massa molecular das proteínas em função da mobilidade relativa (R_f) de

cada banda do padrão ( ). A massa molecular de cada proteína foi determinada com base na equação da reta ( ).

Com a equação da reta obtida, $\log_{10}$ (MM) = - 2,563 ˙ R_f + 6,042, as respectivas massas moleculares de cada banda foram determinadas. Após estimada a massa molecular das amostras (BSA, catalase e ASNase), foi possível verificar que as proteínas utilizadas apresentaram desvio médio de ± 40% em relação à massa molecular referência. A BSA possui massa molecular teórica de 66,5 kDa e apresentou massa molecular experimental de 51 kDa, a catalase possui massa molecular teórica de 240 kDa e apresentou 401 kDa; a ASNase (132 kDa) apresentou massa molecular experimental de 222 kDa. Quando observada a banda da monoPEG-ASNase presente no meio reacional a massa molecular experimental foi de 383 kDa. Portanto, não foi possível estimar com confiança (desvio médio < 5%) a massa molecular das proteínas com o padrão molecular NativeMark.

De modo a estabelecer a massa molecular da monoPEG-ASNase e refinar a purificação, as frações eluídas no pico com 78 mM NaCl, foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (SEC, Figura 19). A monoPEG-ASNase foi eluída em 10,65 mL, enquanto que a ASNase controle (enzima pura) eluíu em 11,39 mL.

A determinação da massa molecular foi estimada com a curva de calibração (Anexo A) e a constante de distribuição (Kav) do pico, foi calculada de acordo com a eq. 2 (RODRIGUES, 2016).

$$Kav = \frac{\text{volume eluído} - \text{volume morto}}{\text{volume coluna} - \text{volume morto}} \tag{2}$$

$$Kav = \frac{\text{volume eluído} - 8{,}08\ \text{mL}}{24{,}00\ \text{mL} - 8{,}08\ \text{mL}}$$

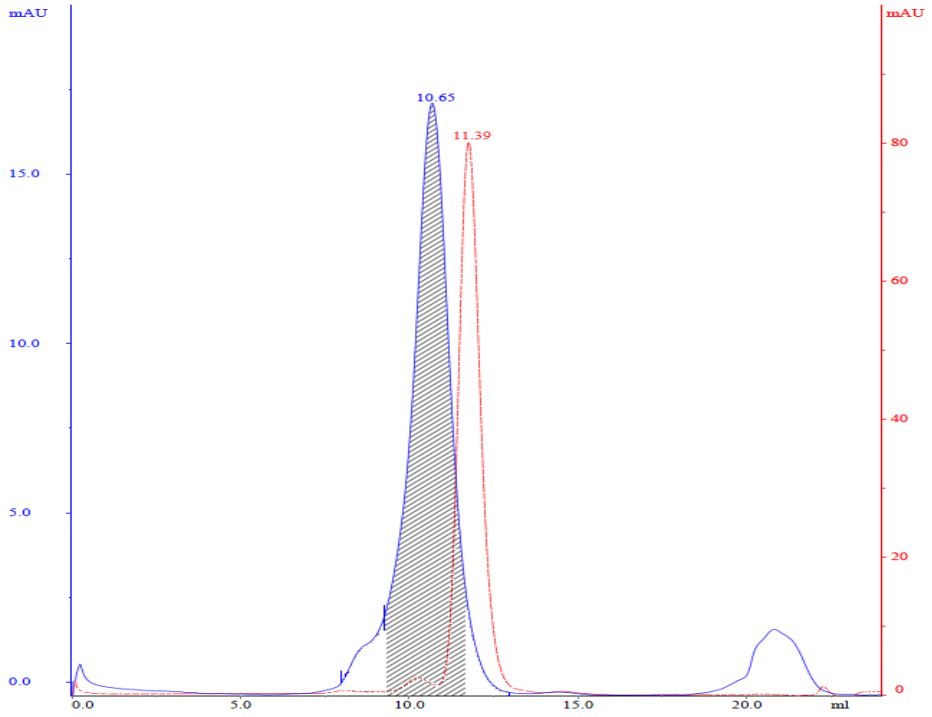


Figura 19 - Cromatograma de purificação por exclusão molecular (coluna Superdex 200 10/300 GL, GE Life Sciences) das frações eluídas em NaCl 78 mM obtidas na troca aniônica. Em hachurado (70% da área), monoPEG-ASNase (——) eluída em 10,65 mL. Em, 11,39 mL, ASNase pura (controle, ——). Eluição ocorreu de forma isocrática, 1 mL·min^{-1}, com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6, monitorada a 280 nm.

De acordo com o esperado teórico, a enzima pura apresentaria massa molecular de aproximadamente 132 kDa e a monopeguilada 172 kDa devido às cadeias de PEG 10 kDa conjugadas em cada *N*-terminal da ASNase. De acordo com o perfil cromatográfico, a enzima monopeguilada apresentou massa molecular de 187 kDa ± 10 enquanto que a enzima controle apresentou massa de 146 kDa ± 6, diferença de aproximadamente 41 kDa. Podemos afirmar que esta diferença de 41 kDa é referente às quatro moléculas de PEG conjugadas à ASNase.

Na figura 19, em hachurado está destacada a fração contendo apenas monoPEG-ASNase, que representa 70% ± 1 da área total dos dois picos.

A cromatografia de troca aniônica possibilitou a purificação da fração monopeguilada com um grau de pureza aproximado de 70% e rendimento de 57% (Tabela 3). O grau de pureza após purificação por exclusão de tamanho, coletando

as frações da região hachurada (eluídas entre 8,80 mL até 11,20 mL), aumenta para 99% ± 3, com um rendimento final de 45%. Pabst et al. (2007) por cromatografia de troca aniônica alcançaram rendimento de 50% para a monoPEG-BSA. Upadhyay et al. (2014) recuperaram após duas etapas cromatográficas (troca aniônica e posterior exclusão por tamanho), 66% e 50% de ASNase, respectivamente.

Tabela 3 - Etapas de purificação do meio reacional, rendimento (%) e grau de pureza da fração monoPEG-ASNase (%). Etapas de purificação: troca aniônica forte e exclusão por tamanho. O meio reacional antes das etapas de purificação foi considerado com rendimento de 100%. Todos os ensaios foram em triplicatas e barras de erro representam o desvio-padrão.

Amostra	[enzima] ($mg^{-1} \cdot mL^{-1}$)	Volume (mL)	Rendimento (%)	Pureza da monoPEG-ASNASE (%)
Meio reacional	1,1 ± 0,01	1,0	100	57
Troca aniônica	0,21 ± 0,02	3,0	57	70
Exclusão por tamanho	0,33 ± 0,03	1,5	45	99

5.4. Estabilidade da ASNase e da monoPEG-ASNase frente ao tempo

O grande número de moléculas de PEG conjugadas à enzima em peguilação aleatória acabam sobrepondo os sítios ativos da enzima e causam um efeito estérico, podendo diminuir significativamente a atividade enzimática (VERONESE, et al., 2007; LOUREIRO, 2010). A enzima pegaspargase comercial (Oncaspar®), polipeguilada, possui atividade de aproximadamente 85 $UI \cdot mg^{-1}$ (ASSELIN, 1993). Todavia, a conjugação do PEG à proteína está intimamente correlacionada à estabilidade proteica, tornando sua meia-vida plasmática cinco vezes maior em

relação à forma não peguilada (ASSELIN, 1993). Considerando que a enzima monopeguilada, possui no mínimo 15 vezes menos PEG que a polipeguilada, foi estudada a estabilidade enzimática (*in vitro*) por 21 dias (Figura 20).

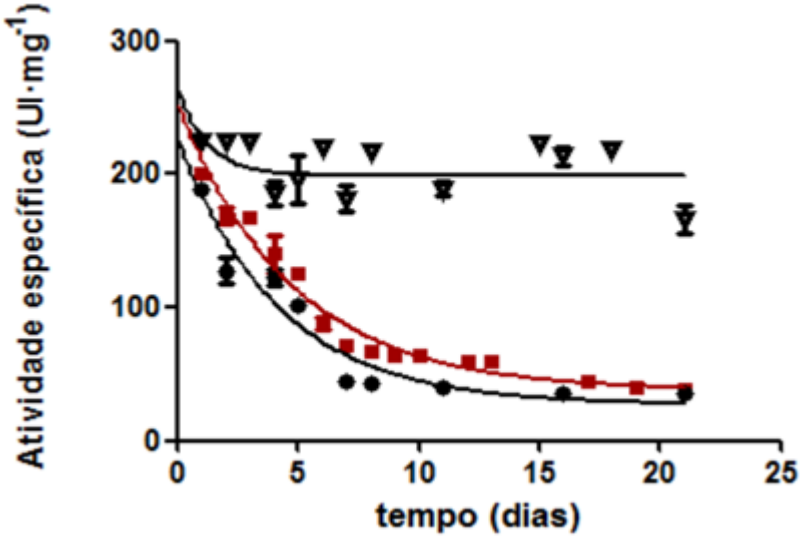


Figura 20 - Estudo da estabilidade enzimática frente ao tempo de armazenamento. ASNase controle (—■—), monoPEG-ASNase (—▼—) e ASNase purificada do meio reacional que não reagiu (ASNase livre —●—), mantidas à 4 ºC por 21 dias. As barras de erro representam o desvio padrão.

Após a purificação (exclusão por tamanho) a monoPEG-ASNase manteve sua atividade específica inicial (233 UI·mg^{-1} ± 8,1), ao contrário da ASNase livre que no processo de purificação perdeu 15% ± 4. Diminuição de atividade que também ocorre na pegaspargase, comercializada com 85 UI·mg^{-1} (ENZON PHARMACEUTICAL, INC., 2013).

Após uma semana (sete dias) tanto a ASNase pura (controle) quanto a ASNase livre perderam significativamente a atividade, 53% e 77% respectivamente. Enquanto que a monoPEG-ASNase manteve-se estável (p-valor = 0,005). Dessa maneira, a reação sítio específica *N*-terminal manteve a atividade específica inicial e influenciou positivamente na estabilidade enzimática por 21 dias.

A ASNase utilizada na terapêutica é liofilizada e ressuspendida apenas no momento de seu uso, já a pegaspargase é comercializada na forma solúvel em

tampão salino, com validade de 8 meses quando armazenada em 2 - 8 °C (AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTOs, EMA, 2007). Desta forma, estudos com maiores tempos de armazenagem devem ser realizados para verificar em qual momento a monoPEG-ASNase perde a estabilidade.

Um possível motivo para a queda de atividade em menos de uma semana da ASNase é a agregação proteica. As preparações de ASNase possuem 20% de agregados, estes por sua vez, podem ser mais imunogênicos que a própria enzima. Ocasionando diminuição da eficiência terapêutica e rápida depuração sanguínea (AVRAMIS et al., 2002). Motivos pelo o qual a ASNase nativa não é aceita em vários países (PIETERS et al., 2008).

Nicolson et al. (2011), observaram que após uma semana inicia-se agregação da ASNase à 4 ºC em tampão PBS 10 mM pH 7,3, acarretando em diminuição de atividade específica. Acredita-se que o PEG tenha inibido a agregação de proteínas, devido ao fato de aumentar a solubilidade e a estabilidade conformacional das proteínas (AVRAMIS et al., 2002; BAUER et al., 2017). Este efeito estabilizador está parcialmente associado ao aumento da viscosidade dinâmica das soluções proteicas (GALM, MORGENSTERN & HUBBUCH, 2015). Para o processo de produção biofarmacêutica, este fenômeno de agregação proteica deve ser impedido para garantir processos estáveis e formulações seguras.

5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos da ASNase e monoPEG-ASNase

A cinética enzimática estuda as reações químicas catalisadas pelas enzimas, em especial a velocidade de reação. O estudo da cinética de uma enzima permite elucidar seu mecanismo catalítico, o seu papel no metabolismo e como é controlada a sua atividade na célula.

O modelo matemático de Michaelis-Menten, proposto em 1913 (EBBING, 1993), foi utilizado para determinação dos parâmetros cinéticos. A enzima (E) liga-se a um substrato (S) para formar o complexo Enzima-Substrato (ES) que por sua vez resulta no produto (P) e na enzima livre (Figura 21).

$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

Figura 21 - Esquema de reação enzimática proposta por Michaelis-Menten. Em que as setas duplas entre Substrato (S) e complexo Enzima-Substrato (ES) representam o fato de que a ligação enzima-substrato é um processo reversível e a única seta de sentido único representa a formação de P (produto). A taxa catalítica, k_{CAT}, indica constante de velocidade (NELSON & COX, 2005).

As propriedades cinéticas classicamente consideradas para enzima são: velocidade máxima de saturação (V_{max}), a concentração de substrato para a qual a velocidade da reação enzimática é metade de V_{max} (k_M), número de renovação (k_{CAT}), eficiência catalítica (k_{CAT}/k_M). Com uma maior quantidade de substrato, mais centros catalíticos estarão ocupados, até ao momento em que todos os sítios possíveis estejam ocupados. Nesse momento alcança-se o ponto de saturação da enzima e, embora se adicione mais substrato, a velocidade da reação não aumentará (EBBING, 1993). Já o número de renovação é o número máximo de mols de substrato que podem ser convertidos em produto por mol de enzima em uma unidade de tempo, dada pelo recíproco do tempo em segundos (s^{-1}). Como exemplo temos a catalase que possui um número de renovação de $4 \cdot 10^7$ s^{-1} e é uma das enzimas mais eficientes conhecidas (WILSON & WALKER, 2010).

O conhecimento destas propriedades torna possível formular hipóteses sobre o comportamento de uma enzima no ambiente celular e prever como responderá frente a mudanças nessas condições (NELSON & COX, 2005).

As diferentes concentrações de substrato (L-asparagina) e as respectivas velocidades de saturação das frações de L-asparaginase foram estudados. O controle do ensaio foi realizado com a ASNase sem peguilar, apenas dissolvida em tampão Tris-HCL 20 mM pH 8,6. A cinética foi realizada pelo ensaio acoplado de oxidação de β-NADH com 1,8 mUI de ASNase (controle) e 1,6 mUI de monoPEG-ASNase, a concentração de L-asparagina variou de 5 a 1470 μM. As curvas de velocidade em função da concentração de substrato estão apresentadas na figura 22.

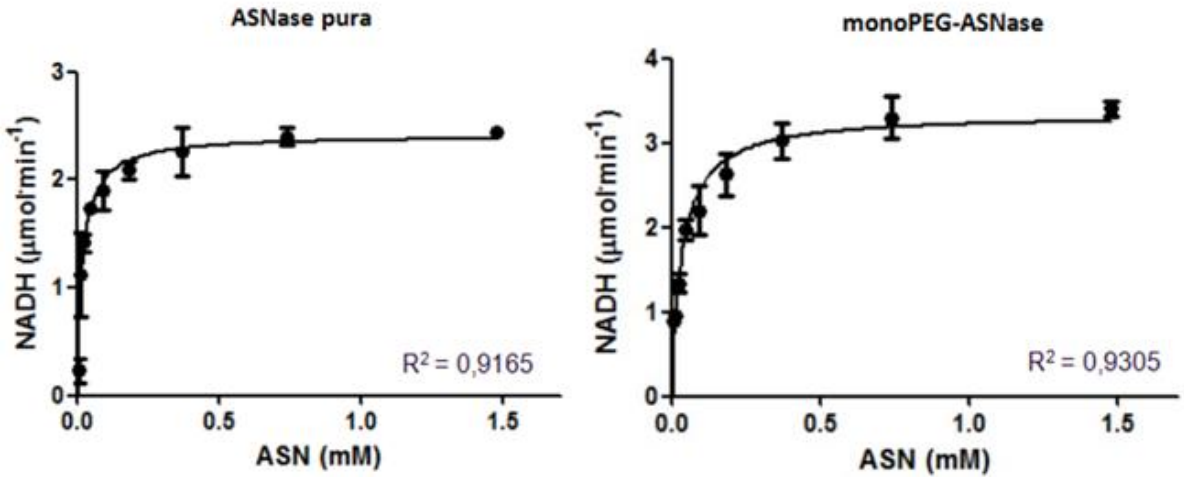


Figura 22 - Cinética enzimática da ASNase pura (controle) e da monoPEG-ASNase. Ensaio realizado com concentração fixa de enzima, 1,8 mUI e 1,6 mUI, respectivamente, e em um intervalo de 0,005 a 1,476 mM do substrato L-asparagina. As análises dos dados e as análises estatísticas (teste F) foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Todos os ensaios foram em triplicatas e barras de erro representam o desvio-padrão.

A ASNase é descrita como uma enzima michaeliana com alta afinidade pelo substrato (k_M na faixa de µM) e o seu k_M varia de 12,5 a 22 µM (DERST, HENSELING & RÖHM, 2000; ANISHKIN et al. 2015).

Da mesma forma que descrito na literatura, tanto a ASNase controle quanto a monopeguilada apresentaram comportamento michaeliano com $R^2 \geq 0,9164$ e com k_M na mesma ordem de grandeza, em µM. A enzima pura apresentou k_M = 20 µM e V_{max} = 2,36 µmol·min^{-1} e a enzima monopeguilada apresentou menor afinidade à L-asparagina, k_M = 35 µM e V_{max} = 3,34 µmol·min^{-1} (Tabela 4). Todavia, esta pequena diferença entre as constantes de Michaelis-Menten associada ao tempo de meia-vida da enzima peguilada justificam o seu uso. Dados da literatura relatam valores de k_M variando de 12 a 40 µM para a pegaspargase comercial (AVRAMIS et al., 2002; DOUER et al. 2007).

Subsequentemente, determinou-se a constante catalítica, k_{CAT} (eq. 3):

$$k_{CAT} = \frac{V_{max}}{[Enzima]} \quad (3)$$

Os parâmetros cinéticos relevantes de uma enzima são k_{CAT} (constante catalítica para a conversão de substrato ao produto) e k_M (a constante de Michaelis, que é definida, como a concentração de substrato em que a velocidade inicial é a metade do máximo da velocidade) (EISENTHAL, DANSON & HOUGH, 2007). Todavia o potencial catalítico de um alto valor de número de renovação só pode ser atingido em altas concentrações de substrato (concentração saturante) e isso é raramente atingido em condições celulares. Uma constante alternativa, chamada de constante de especificidade, definida como k_{CAT}/k_M, é uma medida de quão eficientemente uma enzima converte substrato em produto em baixas concentrações de substrato (WILSON & WALKER, 2010). Os parâmetros cinéticos obtidos para a ASNase e monoPEG-ASNase estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - **Parâmetros cinéticos da ASNase e da monoPEG-ASNase**. Valores de constante de Michaelis-Mentem (k_M), velocidade máxima (V_{max}), número de renovação (k_{CAT}), eficiência catalítica (k_{CAT}/k_M). Todos os ensaios foram em triplicatas e barras de erro representam o desvio-padrão. Os parâmetros cinéticos foram calculados por análise de regressão não-linear, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

Enzima	k_M (μM)	V_{max} ($\mu mol \cdot min^{-1}$)	k_{CAT} s^{-1}	k_{CAT}/k_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
ASNase	19,58 ± 0,003	2,36 ± 0,015	22 ± 0,7	$1,1 \cdot 10^6$
monoPEG-ASNase	34,67 ± 0,005	3,34 ± 0,007	35 ± 1,0	$1,0 \cdot 10^6$

A velocidade limitante de reação catalisada pela L-asparaginase em condições de saturação é descrita com k_{CAT} variando de 24 a 54 s^{-1} (AGHAIYPOUR,

WLODAWER & LUBKOWSKI, 2001; COVINI et al., 2012), tanto a monoPEG-ASNase quanto a ASNase comercial apresentaram valores de renovação semelhantes ao encontrado na literatura 35 e 22, respectivamente. Ambas enzimas demonstraram alta eficiência catalítica, $1{,}0 \cdot 10^6$ e $1{,}1 \cdot 10^6$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$. Resultados próximos aos descritos para ASNase, na faixa de $1{,}6 \cdot 10^6$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ (DERST, HENSELING & RÖHM, 2000). Indicando que a peguilação não alterou significativamente o número de renovação da enzima e a sua eficiência catalítica, mantendo suas características cinéticas para o tratamento da LLA. Não foram encontrados na literatura valores de k_{CAT} e k_{CAT}/k_M para pegaspargase.

5.6. Degradação proteolítica

Existem duas proteases sanguíneas humanas que estão relacionadas á diminuição da meia-vida plasmática da L-asparaginase: a asparagina endopeptidase (AEP) e a catepsina B (CTSB) (OFFMAN et al., 2011). A protease AEP cliva especificamente resíduos de asparagina e de aspartato (PATEL et al., 2009). Até o momento não foram definidos os sítios proteolíticos para a CTSB, porém sabe-se que é capaz de reconhecer uma vasta gama de combinações de resíduos (MEER et al., 2014). De acordo com Rodrigues (2016), utilizando a plataforma SitePrediction, existem doze sítios proteolíticos preditos com mais de 95% de especificidade na ASNase de *E. coli* nativa. Acredita-se que um dos motivos da pegaspargase possuir maior meia vida plasmtática seja o fato de que a clivagem da CTSB em sítios proteolícos da ASNase não ocorra, uma vez que esta clivagem acontece intracelularmente, após a captura da enzima por células fagocíticas (MEER et al. 2014). Determinou-se o efeito da degradação proteolítica para a monoPEG-ASNase (Figura 23).

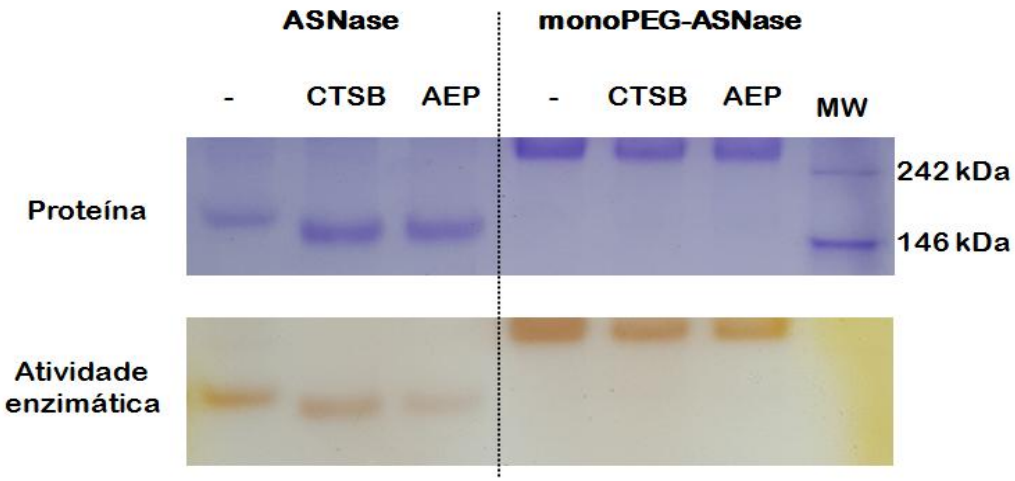


Figura 23 - Estudo da degradação proteolítica da asparagina endopeptidase (AEP) e da catepsina B (CTSB), por 84 h á 37 °C, em agitação de 50 xg. Gel de poliacrilamida 10% (Native-PAGE) corado com CBB (gel superior) e corado com cloreto férrico (gel inferior). Coluna 1: ASNase livre de protease, Coluna 2: ASNase com CTSB e Coluna 3: ASNase com AEP. Coluna 4: monoPEG-ASNase livre de protease, Coluna 5: monoPEG-ASNase com CTSB e Coluna 6: monoPEG-ASNase com AEP. Coluna 7: Padrão de massa molecular (MW, NativeMark, Life).

A cadeia de polietilenoglicol é conhecida por proteger sítios proteolíticos, possibilitando a redução da degradação proteolítica (SHANG, 2013). Este efeito protetor foi observado para a monoPEG-ASNase quando incubadas com as duas proteases testadas, AEP e CTSB. Esse efeito não foi observado na ASNase em mesmas condições de estudo, 84 h à 37 ºC em agitação de 50 xg. A monoPEG-ASNase demonstrou ser mais resistente às proteases sanguíneas humanas, corroborando com o efeito protetor da conjugação das cadeias de PEG. Este estudo também sugere que a monoPEG-ASNase possa ser menos imunogênica, visto que estas proteases podem levar à inativação da enzima circulante evidenciando epítopos que funcionam como mediadores da resposta imune em pacientes (PATEL et al., 2009).

É possível observar, na figura 23, que mesmo com resíduos clivados a ASNase permaneceu com alguma atividade enzimática. Acredita-se que a clivagem

de alguns resíduos tenha modificado a estrutura da ASNase, fazendo-a diminuir sua massa molecular, porém sem inativar completamente a enzima, como no caso da catepsina B. Já em presença da AEP, a ASNase apresentou maior perda de atividade enzimática, indicando que possivelmente a protease interagiu com a asparagina (resíduo 248) e aspartato (resíduo 90) que fazem parte do sítio ativo da enzima (ANISHKIN et al., 2015).

5.7. Citotoxicidade

Ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular têm o objetivo de testar a atividade citotóxica de compostos, soluções e materiais frente a diferentes tipos celulares. Nesse trabalho, um ensaio preliminar utilizando as linhagens leucêmicas MOLT-4 e Reh foi realizado para testar o potencial citotóxico da monoPEG-ASNase. Ambas as linhagens são células de leucemia linfoblástica aguda, a primeira é derivada de linfócitos T e a segunda de linfócitos B. A linhagem Reh é considerada resistente ao tratamento com ASNase, pois possui níveis consideráveis de expressão de asparagina sintetase (ASNS) (HERMANOVA et al., 2012). Já a MOLT-4 é descrita como uma linhagem sensível a ASNase (ASLANIAN, FLETCHER & KILBERG, 2001). Como controle, utilizamos a linhagem de células endoteliais saudáveis que cobrem a parede dos vasos sanguíneos (HUVEC).

A sensibilidade da linhagem MOLT-4 à ASNase já foi descrita, sendo que com 10 $UI \cdot mL^{-1}$ de enzima foi possível inviabilizar 95% a 100% das células MOLT-4 em 72 h (COSTA et al., 2016; PAPAGEORGIOU et al., 2008). Com 5 $UI \cdot mL^{-1}$ de L-asparaginase de *Saccharomyces cerevisiae* e *E. coli* encapsuladas e livres, foi possível inviabilizar 70 e 75%, respectivamente, em 72 h (KARAMITROS et al., 2013). Neste trabalho optou-se por utilizar a mesma concentração utilizada na terapêutica. A correlação entre a desaminação sérica e a atividade da L-asparaginase, deve ser no mínimo entre 0,1 a 0,2 $UI \cdot mL^{-1}$ para esgotar significativamente a asparagina em 90% por 21 dias, quando comparado a células saudáveis (AVRAMIS et al., 2002; DOUER et al., 2007).

Ambas as amostras estudadas não apresentaram citotoxicidade para células saudáveis HUVEC (Figura 24) e sim para as células leucêmicas (Figura 25).

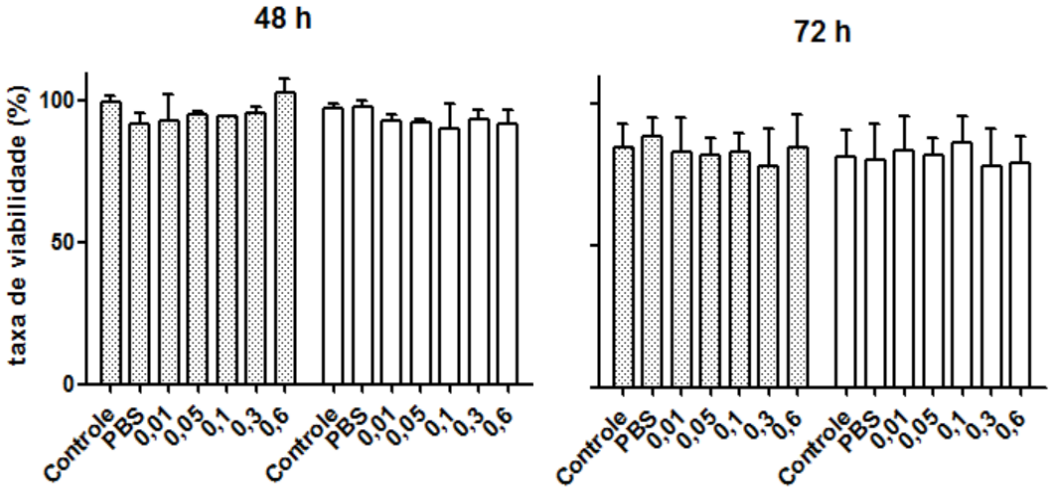


Figura 24 - Estudo de citotoxicidade em células HUVEC. Ensaios realizados em 48 e 72 h, apenas com células (controle), sem enzima (PBS) e com diferentes concentrações de atividade enzimática (0,01; 0,05; 0,1; 0,3 e 0,6 $UI \cdot mL^{-1}$). ASNase monopeguilada (▭) e ASNase livre (▭). Barras de erro representam o desvio-padrão.

Costa et al. (2016), demonstraram que com 10 $UI \cdot mL^{-1}$ de ASNase foi possível inviabilizar 100% das células MOLT-4 e 20% das células Reh em 72 h. Neste trabalho, com atividade enzimática dez vezes menor, foi possível obter reduções de 48 e 62% de viabilidade celular para 48 e 72 h, respectivamente, para a linhagem MOLT-4 tratada com monoPEG-ASNase. Não houve diferença estatística entre as duas enzimas testadas. A linhagem Reh que possui resistência ao tratamento com L-asparaginase por ser capaz de sintetizar a L-asparagina, apresentou redução de 23 e 33% da viabilidade celular em 48 e 72 h, respectivamente, tanto para a ASNase controle quanto para a monoPEG-ASNase. Portanto, a peguilação manteve o perfil de atividade citotóxica da ASNase frente às linhagens leucêmicas, sem perda significativa de atividade.

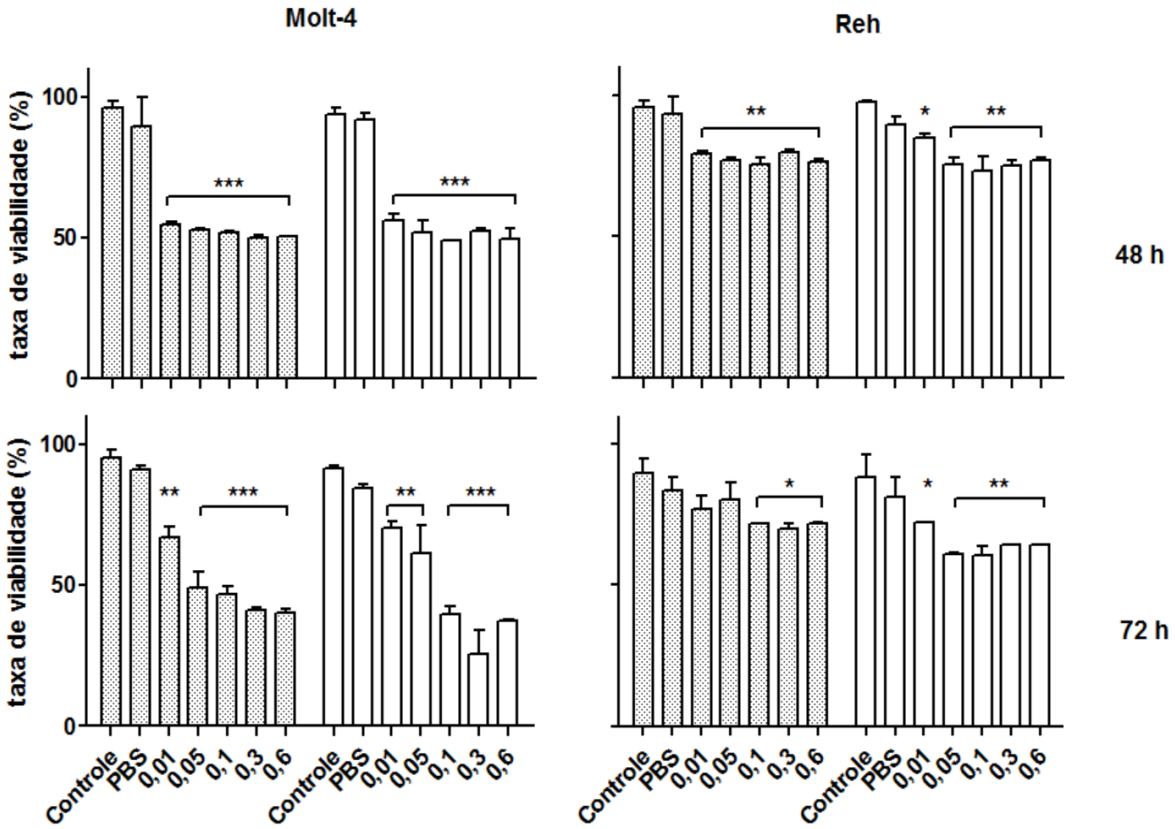


Figura 25 - Estudo de citotoxicidade em células MOLT-4 e Reh. Ensaios realizados em 48 e 72 h, apenas com células (controle), sem enzima (PBS) e com diferentes concentrações de atividade enzimática (0,01; 0,05; 0,1; 0,3 e 0,6 $UI \cdot mL^{-1}$). ASNase monopeguilada (▭) e ASNase livre (▭). Barras de erro representam o desvio-padrão. Probabilidade de significância menor do que 0,05 (*), menor do que 0,01 (**) e menor do que 0,001 (***) em relação ao controle. Barras de erro representam desvio-padrão.

Portanto, a monoPEG-ASNase apresentou o mesmo potencial terapêutico do que a ASNase nativa, indicando que o PEG conjugado à ASNase além de proporcionar maior estabilidade e proteção proteolítica não apresenta citotoxicidade para as células saudáveis e mantém a atividade citotóxica da ASNase em células leucêmicas MOLT-4 e Reh.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolvemos um protocolo de peguilação *N*-terminal da L-asparaginase de *E. coli*, enzima que atualmente é utilizada no tratamento de leucemia linfóide aguda na sua forma nativa causando reações imunogênicas e na sua forma peguilada com alto grau de polidispersão.

Os estudos para o desenvolvimento de um protocolo de peguilação indicaram que a condição mais adequada para favorecer a reação de monopeguilação corresponde a tampão PBS 100 mM pH 7,5, razão PEG:proteína de 25:1 e um tempo de reação de 30 minutos.

A enzima monopeguilada com PEG de 10 kDa foi purificada por cromatografia de troca aniônica forte (rendimento de 55%) seguida de cromatografia de exclusão pelo volume (rendimento de 45%), alcançando um grau de pureza aproximado de 99%. A monoPEG-ASNase permaneceu com sua atividade estável por 21 dias, enquanto que a ASNase livre apresentou queda significativa de atividade de aproximadamente 50-70% em uma semana. Além disso, a monoPEG-ASNase apresentou parâmetros cinéticos próximos à forma comercial de ASNase, $k_M = 35$ µM e $k_{CAT} = 1{,}0 \cdot 10^6$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$, indicando que a peguilação preservou as características necessárias para o emprego terapêutico da enzima monopeguilada. Ensaios *in vitro* de citotoxicidade celular frente à linhagem celulares leucêmicas (MOLT-4 e REH) demonstraram que a monoPEG-ASNase mantém atividade citotóxica frente a essas linhagens em comparação à enzima livre.

Portanto, esse trabalho possibilitou o desenvolvimento de melhorias das ASNases existentes no mercado. A reação de peguilação sítio específica *N*-terminal proporciona controle lote a lote, em relação á pegaspargase que apresenta variação no grau de peguilação, além de manter a estabilidade por pelo menos três vezes mais que a ASNase nativa e demonstrar proteção à clivagem pelas proteases séricas AEP e CTSB.

Considerando o potencial da L-asparaginase monopeguilada para o desenvolvimento de um novo biofármaco (*biobetter*), sugere-se como perspectiva

futura a realização de estudos *in vitro* da imunogenicidade da enzima monopeguilada, uma vez que espera-se que essa nova variante seja menos imunogênica que a ASNase nativa.

REFERÊNCIAS

ABUCHOWSKI, A., VAN ES, T., PALCZUK, N.C. & DAVIS, F.F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **Journal of Biological Chemistry**, v.10, 252(11):p.3578-81,1977.

ABUCHOWSKI, A., VAN ES, T., PALCZUK, N.C., MCCOY, J.R. & DAVIS, F.F. Treatment of L5178Y tumor-bearing BDF1 mice with a nonimmunogenic L-glutaminase-L-asparaginase. **Cancer Treat. Rep**., v.63, p.1127–32, 1979.

AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTO (EMA). Resumo das características do medicamento. **Informação do Produto**, 2001. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003789/WC500200735.pdf>. Acesso em: 02 de dezembro, 2016.

AGHAIYPOUR, K., WLODAWER, A. & LUBKOWSKI, J**.** Do bacterial L-asparaginases utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu?. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1550, n. 2, p. 117-28 , 2001.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M. & ROBERTS, K. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALCONCEL, S.N.S., BAAS, A.S. & MAYNARD, H.D. FDA approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs. **Polym Chem**. v.2 p.1142-48, 2011.

ANISHKIN, A., VANEGAS, J.M., ROGERS, D.M., LORENZI, P.L, CHAN, P.L., PURWAHA, P., WEINSTEIN, J.N., SUKHAREV, S. & REMPE, S.B. Catalytic Role of the Substrate Defines Specificity of Therapeutic L-Asparaginase. **J Mol Biol**, v. 427 p.2867-85, 2015.

ASLANIAN, A.M., FLETCHER. B.S., KILBERG, M.S. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. **Biochem. J.**, v.357, n.1, p.321-8, 2001.

ASSELIN, B.L., WHITIN, J.C., COPPOLA, D.J., RUPP., I.P., SALLA, S.E. & COHEN, H.J. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **J. Clin. Oncol.,** n.11, v.9, p.1780-6, 1993.

AVRAMIS, V.I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. **Anticancer Res**., v.32, n.7SI, p.2423-37, 2012.

AVRAMIS V.I., SENCER, S., PERICLOU, A.P., SATHER, H., BOSTROM, B.C., COHEN, L.J. & ETTINGER, A.G. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethyleneglycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **American Soc. of Hem**., v.99, n.6., p.1986-94, 2002.

BALCÃO, V.M., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., MALCATA, F.X. & GUISÁN, J.M. Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. **Biotechnology Progress**, v.17, p.537-42. 2001.

BASHFORD, D. & KARPLUS, M. pKa of Ionizabe Groups in Proteins: Atomic detail from a continuum electrostatic model. **Biochemistry,** v.29, p.19219-10225, 1990.

BARAN, E.T., OZER, N. & HASIRCI, V. Solid-phase enzyme modification via affinity chromatography. **Journal of Chromatography B.,** v.794, p.311–22, 2003.

BAUER, K.C., SUHM, S, WOLL, A.K. & HUBBUCH, J. Impact of additives on the formation of protein aggregates and viscosity in concentrated protein solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.516, p.82–90, 2017.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-9, 1987.

BROCCHINI, S., BALAN, S., GODWIN, A., CHOI, J., ZLOH, M. & SHAUNAK, S. PEGylation of native disulfide bonds in proteins. **Nature protocols,** v.1, n.5, p.2241-5, 2006.

BROCCHINI, S., GODWIN, A., BALAN, S., CHOI, J., ZLOH, M. & SHAUNAK, S. Disulfide bridge based PEGylation of proteins. **Ad. Drug Del. Rev**., v.60, p.3–12, 2008.

BROCHADO, P.M.D.S.C. **Nanotecnologia e a sua aplicação à terapêutica oncológica.** 2013. 93f.. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.

CANCER. **Facts and Figures**. 2016 72f. Disponível em: < http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>. Acesso em: 07 de agosto, 2016.

COSTA, I.M. **Produção, caracterização cinética e engenharia de proteína Asparaginase 1 de *Saccharomyces cerevisiae* para avaliação de seu uso como**

biofármaco. 2015. 80... Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

COSTA, I.M., SCHULTZ, L., PEDRA, B.A.B., LEITE, M.S.M., FARSKY, S.H.P., OLIVEIRA, M.A., PESSOA, A. & MONTEIRO, G. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, p1-11, 2016.

COVINI, D., TARDITO, S., BUSSOLATI, O., CHIARELLI, L.R., PASQUETTO, M.V., DIGILO, R., VALENTINI, G. & SCOTTI, C. Expanding Targets for a Metabolic Therapy of Cancer: L-Asparaginase. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v.7,n.1, p.4-13, 2012.

CREATIVE PEG WORKs. **PEG products.** Disponível em: <http://www.creativepegworks.com/PEG_Acid_NHS.html>. Acesso em: 01 de setembro, 2015.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. DeLano, Palo Alto, CA, 2002.

DERST, C., HENSELING, J. & RÖHM, K. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. **Protein Science**, v. 9, p. 2009–17, 2000.

DHARA, D. & CHATTERJI, P.R. Electrophoretic Transport of Poly(ethylene glycol) Chains through Poly(acrylamide) Gel. **J. Phys. Chem. B,** n.103, p.8458-61, 1999.

DOUER, D. Is asparaginase a critical component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia? **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v.21, n.4, p.647-58, 2008.

DOUER, D., YAMPOLSKY, H., COHEN, L. J., WATKINS, K., LEVINE, A. M., PERICLOU, A.P. & AVRAMIS, V. Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Blood Journal**. v.109, n.7, p.2744-50, 2007.

EBBING, D.D. **General chemistry**. 4th ed. Houghton: Mifflin Co. 1993, ISBN 0-395-63696-5

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

EISENTHAL, R., DANSON, M.J. & HOUGH, D.W., Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator?. **TRENDS in Biotechnology,** v.25 n.6, p.246-9, 2007.

ENZON PHARMACEUTICALS, INC. **Pegaspargase, ONCASPAR® (PEG-L-asparaginase)** Physicians Prescribing Information, Solution for Injection, Bula do fármaco, 2013. Disponível em: <https://www.old.health.gov.il/units/pharmacy/trufot/alonim/739.pdf>. Acesso em: 02 de agosto, 2015.

FOOD DRUG AND ADMINISTRATION (FDA). Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. 36thed. USA, 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/UCM071436.pdf>. Acesso em: 02 de janeiro, 2017.

FEE, J. C. & VAN ALSTINE, J.M. PEG-Proteins: Reaction Engineering and Separation Issues. **Chemical Engineering Science**, v.61, n.3, p.924-39, 2006.

FEE, J. C. & VAN ALSTINE, J.M. **Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications**. 3th ed. New Jersey: Jan-Christer Janson, 2011.

FU, C.H. & SAKAMOTO, K.M. PEG-asparaginase. **Exp. Opin. Pharmacotherapy**, v.8, n.12, p.1977-84, 2007.

GALM, L., MORGENSTERN, J. & HUBBUCH, J. Manipulation of lysozyme phase behavior 515 by additives as function of conformational stability. **Int. J. Pharm**., v.516 n.494, p.370–80, 2015.

GINN, C. KHALILI, H., LEVER, R. & BROCCHINI S. PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines. **Future Medicinal Chemistry**, v.6, n.16, p.1829-46, 2014.

GLASSTONE, S. An Introduction to Electrochemistry. **Litton Educational Publishing INC.**, p.140, 2007.

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-for-improving-your-protein-purification-capabilities/>. Acesso em: 02 de novembro, 2016.

HAMES B.D. **Gel Electrophoresis of Proteins:** A Practical Approach. 3rd ed, Oxford: University Press, New York, 1998.

HARDY, E., RAMON, J., SAEZ, V., BÁEZ, R., TEJEDA, Y. & RUIZ, A. Detection of PEGylated proteins in polyacrylamide gels by reverse staining with zinc and imidazole salts. **Electrophoresis,** v.29, p.2363–71, 2008.

HERMANOVA, I., ZALIOVA, M., TRKA, J. & STARKOVA, J. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. **Experimental Hematology**, v.40, n.1, p.657-65, 2012.

IMADA, A., IGARASI, S., NAKAHAMA, K. & ISONO, M. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms, **SGM**, v.76, p.85-99, 1973.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativas 2016**: Incidência de câncer no Brasil. 2016. 126f.. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf >. Acesso em: 05 de janeiro, 2017.

IRIS BIOTECH GMBH. **Reagents for PEGylation and Hydrophobic Spacer Molecules**. Disponível em: <www.iris-biotech.de/info_pegylation>. Acesso em: 09 de setembro, 2015.

KARAMITROS, C.S., YASHCHENOK, A.M., MÖHWALD, H., SKIRTACH, A.G. & KONRAD, M. Preserving catalytic activity and enhancing biochemical stability of the therapeutic enzyme asparaginase by biocompatible multilayered polyelectrolyte microcapsules. **Biomacromolecules**, v.14, n.1, p.4398-406, 2013.

KEATING, J.M., HOLMES, R., LERNER, S. & HO, S.H.W. L-asparaginase and PEG asparaginase, past, present and future. **Leuk. Lymphoma**, v.10, p.153-7, 1993.

KINSTLER, O.B., BREMS, D.N., LAUREN, S.L., PAIGE, A.G., HAMBURGER, J.B. & TREUHEIT, M.J. Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. **Pharm. Res.**, v.13, n.7, p.996-1002, 1996.

KINSTLER, O., MOLINEUX, G., TREUHEIT, M., LADD, D. & GEGG, C. Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)–protein conjugates. **Adv. Drug Deliv. Rev**. n.54, p.477–85, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v.227, p.690-85, 1970.

LEE, H., JANG, I.H., RYU, S.H., PARK, T.G. N-Terminal Site-Specific Mono-PEGylation of Epidermal Growth Factor. **Pharmaceutical Research,** v.20, n.5, p.818-25, 2003.

LOUREIRO, C.B. **Purificação, conjugação e avaliação "*in vitro*" da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A).** 2010. 67f.. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LOUREIRO, C.B., BORGES, K.S., ANDRADE, A.F., TONE, L.G. & SAID, S. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-asparaginase produced by *Aspergillus terreus*: evaluation *in vitro* of antineoplasic activity. **Adv. Microbiol.**, v.2, p.138–45, 2012.

MANJULA, B.N., TSAI A., UPADHYA, R., PERUMALSAMY, K., SMITH, P.K, MALAVALLI, A., VANDEGRIFF, K., WINSLOW, R.M., INTAGLIETTA, M., PRABHAKARAN, M., FRIEDMAN, J.M. & ACHARYA, A.S. Site-Specific PEGylation of Hemoglobin at Cys-93(â): Correlation between the Colligative Properties of the PEGylated Protein and the Length of the Conjugated PEG Chain. **Bioconjugate Chem.**, n.14, p.464−72, 2003.

MATTOS, A., DE JAGER-KRIKKEN, A., DE HAAN, M., BELJAARS, L. & POELSTRA, K. PEGylation of interleukin-10 improves the pharmacokinetic profile and enhances the antifibrotic effectivity in CCl4-induced fibrogenesis in mice. **J. Control. Rel**., v.162, n.1, p.84-91, 2012.

MEER, L.T. DER, WAANDERS, E., LEVERS, M., VENSELAAR, H., ROELEVELD, D., BOOS, J., LANVERS, C., BRÜGGEMANN, R.J., KUIPER, R.P., HOOGERBRUGGE, P.M., LEEUWEN, F.N.VAN, & LOO, D.M. A germ line mutation in cathepsin B points toward a role in asparaginase pharmacokinetics, **Blood**, v.124, n.19, p.3027-3029, 2014.

MELO, C.S., CUNHA, A.S. & FIALHO, S.L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.,** v.33, n.4, p.469-77, 2012.

MENG, F., MANJULA, B.N., SMITH, P.K., ACHARYA, S.A. PEGylation of Human Serum Albumin: Reaction of PEG-Phenyl-Isothiocyanate with Protein. **Bioconjugate Chem.,** v. 19, n.7, p.1352–60, 2008.

MESAS, J.M., JOSK., A.G & MARTIN, J.F. Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebaeterium glutamicurn.* **Journal of General Microbiology***, v.*136, p.515-519, 1990.

MONSIVAIS, S. **Tema 6: PROTEINAS Área Química Biológica**. 2014. 53 slides. Disponível em: <http://slideplayer.es/slide/149901/>. Acesso em: 01 de setembro, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MUKHERJEE, M. Protonation States and pKa. **Alb. Einstein Coll. Med,** v.1, p.4-26, 2007.

NANOCS. **Amine Pegylation PEG Derivatives**. Disponível em < http://www.nanocs.com/
PEG/APEG.htm>. Acesso em: 01 de Janeiro, 2015.

NARAZAKI, H., KAIZU, K., MIYATAKE, C., KOIZUMI, S., ASANO, T. & FUJINO, O. Delayed-type Hypersensitivity in Response to L-asparaginase in a Case of Acute Lymphoblastic Leukemia. **J. Nipp. Med. School**, v.79, n.6, p.489-93, 2012.

NARTA, U., KANWAR, S.S. & AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Crit. Rev. Onc. Hemat**., v.61, n.3, p.208-21, 2007.

NATIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY COUNCIL (NSTC). **National Nanotechnology Initiative Strategic Plan**, Engineering, and Technology. 2014. Disponível em < http://www.nano.gov/sites/default/files/pub_resource/2014_nni_strate- gic_plan.pdf >. Acesso em: 26 de dezembro, 2014.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed., New York: W. H. Freeman, 2005. ISBN 978-0716743392.

NICOLSON, O., D'HAYER, B., VIEILLARD, V., DOLLET, S., ASTIER, A. & PAUL, M. **Stability of diluted L-asparaginase in normal saline solution.** Poster presented at the ECCO Congress Stockholm, 2011. Disponível em <http://www.stabilis.org/FichesBiblio/3243.pdf>. Acesso em: 12 de dezembro, 2016,

NOMME, J., SU, Y., KONRAD, M. & LAVIE, A. Structures of Apo and Product-Bound Human L- Asparaginase: Insights into the Mechanism of Autoproteolysis and Substrate Hydrolysis. **Biochem**., v.51, n.34, p.6816-26, 2012.

OFFMAN, M.N., KROL, M., PATEL, N., KRISHNAN, S., LIU, J., SAHA, V. & BATES, P.A. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood**, v.117, n.5, p.1614-21, 2011.

PABST, T.M., BUCKLEY, J.J., RANASUBRAMANYAN, N. & HUNTER, A.K. Comparison of strong anion-exchangers for the purification of a PEGylated protein. **Journal of Chromatography A**, n.1147, p.172–82, 2007.

PAPAGEORGIOU, A.C., POSYPANOVA, G.A., ANDERSSON., G.A., SOKOLOV, N.N., KRASOTKINA, J. Structural and functional insights into Erwinia carotovora L-asparaginase. **FEBS Journal**, v. 275, n. 1, p. 4306–4316, 2008.

PASUT, G. & VERONESE, F.M. Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies. **Prog. Polym. Sci**., n.32, p.933–61, 2007.

PASUT, G. & VERONESE, F.M. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, n.161, p.461–72, 2012.

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, p.69–78, 2008.

PATEL, N., KRISHNAN, S., OFFMAN, M.N., KROL, M., MOSS, C.X., LEIGHTON, C., VAN DELF, F.W., HOLLAND, M., LIU, J., ALEXANDER, S., DEMPSEY., C., ARIFFIN, H., ESSINK, M., EDEN, T.O.B., WATTS, C, BATES, P. & SAHA, V. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug l-asparaginase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1964-1973. 2009.

PFISTER, D. & MORBIDELLI, M. Process for protein PEGylation. **Journal of Controlled Release**, v.180, p.134-49, 2014.

PIETERS, R., APPEL, I., KUEHNEL, H.J., TETZLAFF-FOHR, I., PICHLMEIER, U., VAN DER VAART, I., VISSER, E. & STIGTER, R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial**. Blood**, v.112, n.13, p. 4832-8, 2008.

PROTEIN DATA BANK (PDB). **Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase I**. Código PDB 3ECA, 2006. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3ECA>. Acesso em: 20 de maio, 2014.

RAETZ, E.A. & SALZER, W.L. Tolerability and Efficacy of L-asparaginase Therapy in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. **J. Ped. Hematol. Oncol.**, v.32, n.7, p.554-63, 2010.

RASHBAND, W.S., **ImageJ,** U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.

RIZZARI, C., CONTER, V., STARY, J., COLOMBINI, A., MOERICKE, A. & SCHRAPPE, M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr. Opin. Oncol**., v.25, p.S1-S9, 2013.

ROBERTS, M.J., BENTLEY, M.D., HARRIS, J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Adv. Drug Delivery Rev.,** v.54, p.459– 76, 2002.

RODRIGUES, M.A.D. **Avaliação da Atividade e Resistência à Clivagem Proteolítica de L-asparaginases Recombinantes Obtidas por Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro**. 2016. 138f.. Dissertação (Mestrado em

Tecnologia de Fermentações) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SHANG, X. **Synthesis and purification of pegylated proteins**. 2013. 196 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - McMaster University, Ontario.

SHANG, X. & GHOSH, R. Membrane reactor for continuous and selective protein mono-PEGylation. **Journal of Membrane Science,** v.451, p.177–84, 2014.

SHANG, X., YU, D. & GHOSH, R. Integrated solid-phase synthesis and purification of PEGylated protein. **Biomacromolecules**, v.12, ed.7, p.2772-9, 2011.

SIGMA-ALDRICH. M6768 SIGMA/ **Methoxypolyethylene glycol 350**. CAS Number 9004-74-4. 2013. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m6768?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 05 de maio, 2015.

SIGMA-TAU. Pharmaceuticals. **Oncaspar®.** Highlights of prescribing information U.S. License No. 1850 I-301-21-US-B. 1994.

SOARES, A.L., GUIMARAES, G.M., POLAKIEWICZ, B., PITOMBO, R.N.M. & ABRAHAO-NETO, J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. **Int. J. Pharm**., v.237, p.163–70, 2002.

STEPHANO, M.A. **Veneno de Bothrops jararaca modificado com mPEG (monometoxi- polietileno glicol) para elaboração de um adjuvante complexado à partícula antigênica**. 2005. 120f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo.

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.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase Revisited. **Leukemia & Lymphoma**, v.52, n.2, p.168–78, 2011.

VERONESE, F.M., Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. **Biomaterials,** v. 22 p.405-17, 2001.

VERONESE, F.M., MERO, A., CABOI, F., SERGI, M., MARONGIU, C. & PASUT, G. Site-specific pegylation of G-CSF by reversible denaturation. **Bioconjug. Chem**., n.18, p.1824-30, 2007.

VERONESE, F.M. & PASUT, G. PEGylation: successful approach to drug delivery. **Drug Discovery Today**, v.10, n.21, p.1451-8, 2005.

WILSON, K. & WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p.581-93. ISBN-13: 9780521731676.

YU, D. & GHOSH, R. Purification of PEGylated protein using membrane chromatography. J. **Pharm. Sci**., v.99, n.8, p.3326-33, 2010.

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.

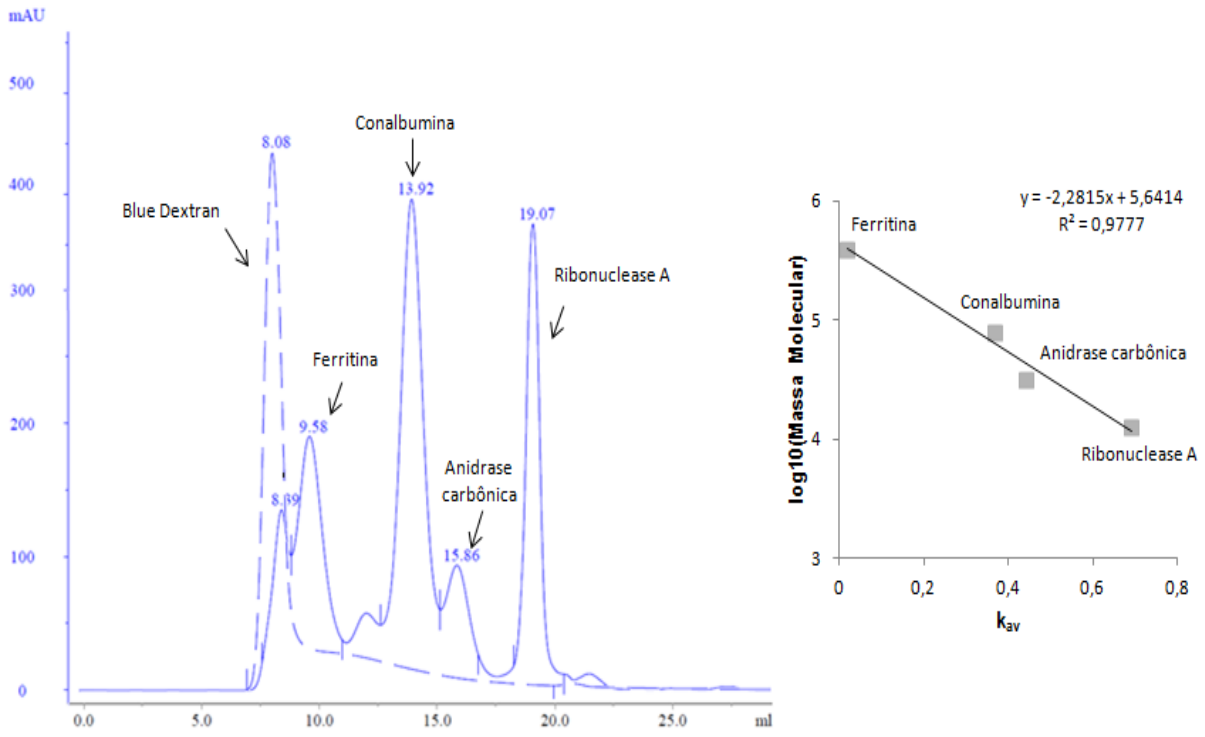
ZALIPSKY, S. Alkyl succinimidyl carbonates undergo Lossen rearrangement in basic buffers. **Chem. Commun**., p. 69-70, 1998.

ZHANG, C., YANG, X., YUAN, Y., PU, J. & LIAO, F. Site-specific PEGylation of Therapeutic Proteins via Optimization of Both Accessible Reactive Amino Acid Residues and PEG derivatives. **Biodrugs**, v.26, n.4, p.209-15, 2012.

ZHENG, C.Y., MA, G. & SU, Z. Native PAGE eliminates the problem of PEG–SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation. **Electrophoresis**, n.28, p.2801–7, 2007.

ANEXO A - CURVA DE CALIBRAÇÃO (CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR)

(A) (B)



Anexo A – Curva de calibração da coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences), em fluxo isocrático de 1 mg·mL^{-1}, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6. (A) Padrões (—): ferritina (440 kDa, eluída em 9,58 mL), conalbumina (75 kDa, eluída em 13,92 mL), anidrase carbônica (29 kDa, eluída em 15,86 mL) e ribonuclease A (13,7 kDa, eluída em 19,07 mL). Para determinação do volume morto foi utilizado o padrão blue dextran 2000 (– –), 2000 kDa e eluído em 8,08 mL. (B) Curva padrão do $\log_{10}$ da massa molecular das proteínas em função de suas constantes de distribuição (k_{av}).

ANEXO B - DISPENSA DA ANÁLISE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

São Paulo, 09 de janeiro de 2017

.

DECLARAÇÃO

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

Cordialmente

Giovanna Pastore Meneguetti

Profa. Dra. Carlota Rangel Yagui
Depto. de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Semi-Industrial-Bl.16
CEP: 05508-000 Tel: 55 11 3091-2381 e-mail: corangel@usp.br

ANEXO C - FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9135 - 8767261/1 - Giovanna Pastore Meneguetti

Email:	meneguetti@usp.br
Data de Nascimento:	05/09/1990
Cédula de Identidade:	RG - 33.827.842-4 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharela em Bioquímica - Universidade Federal de São João Del-Rei - Minas Gerais - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia Químico-Farmacêutica
Data de Matrícula:	11/09/2014
Início da Contagem de Prazo:	11/09/2014
Data Limite para o Depósito:	09/01/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Carlota de Oliveira Rangel Yagui - 11/09/2014 até o presente. Email: corangel@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 11/09/2014
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 11/09/2016 até 09/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 05/11/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 11/09/2014 Prorrogação em 02/09/2016

ANEXO C - FICHA DO ALUNO (CONTINUAÇÃO)

9135 - 8767261/1 - Giovanna Pastore Meneguetti

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
PQI5882-1/1	Nanotecnologia Aplicada à Engenharia Química (Escola Politécnica - Universidade de São Paulo)	15/09/2014	12/12/2014	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5805-1/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5754-1/2	Atualização em Ciências Farmacêuticas	20/10/2014	26/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
TNA5801-1/3	Purificação de Proteínas e Peptídeos (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	23/02/2015	05/04/2015	120	0	-	-	N	Turma cancelada
FBT5738-1/1	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	02/03/2015	10/05/2015	30	2	90	A	N	Concluída
EDM5100-2/1	A Formação do Professor Universitário (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	01/06/2015	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
NEC5719-3/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	11/03/2015	29/04/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/11	Aprimoramento Didático	14/04/2015	11/05/2015	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
TNM5791-3/1	Metodologia da Pesquisa Científica (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	02/06/2015	24/08/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5700-3/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/04/2016	09/06/2016	90	6	95	A	N	Concluída
ICB5752-1/1	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	14/09/2016	27/09/2016	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 02/09/2016
Impresso em: 04/01/2017 13:12:10

ANEXO D - CURRÍCULO LATTES

Giovanna Pastore Meneguetti

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6846577815979822

Última atualização do currículo em 04/01/2017

Graduada em Bioquímica pela Universidade Federal de São João del Rei (2013) com experiência em laboratórios de Microbiologia de Alimentos (Análise de alimentos e produção de mini-curso de Boas Práticas de Fabricação), de Bioinformática (Modelagem Molecular, principalmente com Dinâmica Molecular) e de Bioquímica Microbiana (Análise de digitálicos e desenvolvimento de monografia). Atualmente desenvolve mestrado na linha da Nanobiotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e faz parte do grupo de Novos Talentos do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). Reconhecida por atingir resultados, possuir capacidade de pensar de forma analítica e por fundar a empresa júnior, β-Tech, de bioquímica e farmácia da UFSJ. Pontos fortes incluem: superar expectativas, organizar e desenvolver projetos, cursos e palestras. Excelente apresentação e relacionamento interpessoal, oral e escrito. Habilidades em inglês, francês, alemão e libras. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Giovanna Pastore Meneguetti

Nome em citações bibliográficas

MENEGUETTI, G. P.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2014

Mestrado em andamento em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: DESENVOLVIMENTO NANOTECNOLÓGICO DA L-ASPARAGINASE EMPREGANDO-SE METODOLOGIAS DE PEGUILAÇÃO,Orientador: Prof. Dr. Carlora de Oliveira Ranguel Yagui.
Palavras-chave: L-asparaginase; peguilação; Leucêmia Linfóide Aguda.
Grande área: Outros

2009 - 2013

Graduação em Bioquímica.
Universidade Federal de São João Del-Rei, UFSJ, Brasil.
Título: Análise de digitálicos como possíveis reversores de resistência múltipla a drogas em cepas de fungos.
Orientador: Antonio Ferreira Perreira.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

1993 - 2008

Ensino Médio (2º grau).
Escola Suiço-Brasileira de São Paulo, ESBSP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestrado, Carga horária: 30

ANEXO D - CURRÍCULO LATTES (CONTINUAÇÃO)

Atividades

09/2014 - Atual

Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Linhas de pesquisa
Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, IPT, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Novos Talentos, Carga horária: 30

Outras informações

O Programa Novos Talentos do IPT tem como objetivo apoiar atividades de P&D conduzidas por estudantes de mestrado e doutorado matriculados em programas de pós-graduação de Universidades ou Institutos de Pesquisa públicos ou privados, e projetos de pós-doutorado de jovens pesquisadores, em temas científicos e tecnológicos de interesse do IPT. Os participantes receberão apoio e orientação de pesquisadores do IPT, além de acesso à infraestrutura laboratorial para desenvolver suas atividades. Poderão ainda receber bolsas de estudo integrais ou suplementares. (Fonte: IPT, 2015)

Universidade Federal de São João Del-Rei, UFSJ, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2013

Vínculo: Aluna, Enquadramento Funcional: Pesquisadora, Carga horária: 20

Atividades

03/2010 - 03/2012

Pesquisa e desenvolvimento , Acadêmico, .

Linhas de pesquisa
Avaliação das condições higiênico-sanitárias das padarias de Divinópolis-MG

08/2010 - 12/2011

Pesquisa e desenvolvimento , Acadêmico, .

Linhas de pesquisa
Triagem Virtual Inversa de compostos oriundos do Cerrado
Modelagem Molecular da alfa-amilase de Criptococcus flavus
Atividade anti-inflamatória do óleo de copaiba por DFT

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

Vínculo institucional

ANEXO D - CURRÍCULO LATTES (CONTINUAÇÃO)

2013 - 2013

Vínculo: Pesquisadora, Enquadramento Funcional: Monografia, Carga horária: 50, Regime: Dedicação exclusiva.

B-Tech (Empresa Junior de Bioquímica e Farmácia da UFSJ), B-TECH, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2013

Vínculo: Diretora de Marketing, Enquadramento Funcional: Fundadora da Empresa, Carga horária: 10

Linhas de pesquisa

1.

Avaliação das condições higiênico-sanitárias das padarias de Divinópolis-MG

2.

Triagem Virtual Inversa de compostos oriundos do Cerrado

3.

Modelagem Molecular da alfa-amilase de Criptococcus flavus

4.

Atividade anti-inflamatória do óleo de copaiba por DFT

5.

Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase

Projetos de pesquisa

2014 - Atual

DESENVOLVIMENTO NANOTECNOLÓGICO DA L-ASPARAGINASE EMPREGANDO-SE METODOLOGIAS DE PEGUILAÇÃO

Descrição: O principal objetivo deste projeto consiste no desenvolvimento de um protocolo de peguilação N-terminal da enzima L-asparaginase de E. coli, para o qual as seguintes etapas foram estabelecidas: ? Obtenção e purificação da L-ASPase a partir de E. coli recombinante (cepa BL21); ? Estudos de modelagem molecular para avaliação de resíduos de aminoácidos a serem explorados para peguilação da enzima. Dessa maneira, outros protocolos de peguilação também poderão ser empregados, em função dos resíduos passíveis de reação e sua localização em relação ao sítio ativo da enzima; ? Desenvolvimento de protocolo de peguilação da L-ASPase; ? Determinação de parâmetros cinéticos da PEG-ASPase purificada..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Giovanna Pastore Meneguetti - Coordenador / Carlota de Oliveira Rangel Yagui - Integrante.

2013 - 2013

Análise de digitálicos como possíveis reversores de resistência múltipla a drogas em cepas de fungos

Descrição: Iniciou, projetou, desenvolveu, defendeu sua monografia em um período curto de tempo, 3x menor que o normal, com excelência. Demonstrou capacidade de trabalhar com alta demanda de trabalho em menos tempo que o esperado. Reconhecida, pela banca avaliadora por formar raciocínio dinâmico, rápido e preciso na solução de problemas inesperados. Alcançou resultados surpreendentes no desenvolvimento de sua pesquisa, quando avaliou o efeito de 7 compostos digitálicos na reversão do fenótipo MDR mediante presença da Pdr5p em S. cerevisiae e antifúngico. Adaptou, rapidamente, o estilo e a tática as circunstâncias de um novo local de trabalho..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Giovanna Pastore Meneguetti - Integrante / Antionio Pereira Ferreira - Integrante / Ana Claudia Tessis - Integrante / Leandro Augusto de Oliveira Barbosa - Coordenador / Jose Augusto Ferreira Perez Villar - Integrante.

ANEXO D - CURRÍCULO LATTES (CONTINUAÇÃO)

2010 - 2012

Avaliação das Condições Higiênico Sanitárias das padarias do município de Divinópolis

Descrição: Coletou mais de 500 amostras, dos 20 estabelecimentos em estudo, para análises laboratorial e avaliou presença ou ausência de Salmonella sp., NMP/mL de Escherichia coli, e UFC/mL de Staphylococcus aureus, nos alimentos e utensílios. Elaborou, organizou, divulgou e ministrou ?Mini-curso para conscientização das Boas Praticas de Fabricação? (Divinópolis/MG, 2011) aos manipuladores das padarias. Adquiriu conhecimentos de implementação de Sistemas de Qualidade, Análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), Boas Práticas de Fabricação (BPF), Perigos biológicos, físicos e químicos. Ministrou aula sobre ?Doencas Transmissíveis por Alimentos (DTA)?, focando os critérios de segurança em cada uma das etapas da produção e manipulação de alimentos. Expôs e apresentou os resultados obtidos em ?Simpósio Brasileiro de Microbiologia? (Foz do Iguaçu/PR, 2011)..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (3) .

Integrantes: Giovanna Pastore Meneguetti - Integrante / Marina Mendes - Integrante / Yuri, Dias - Integrante / Juliana Teixeira - Coordenador / Bruna Mara - Integrante.

2010 - 2011

Modelagem Molecular e simulação da amilase de Cryptococcus flavus expressa em Saccharomyces cerevisea

Descrição: Determinação da estrutura 3D da amilase de Cryptococcus flavus por modelagem comparativa (SWISS-MODEL) e avaliação da energia do campo empírico do modelo e visualização das regiões favoráveis e permitidas da estrutura (Procheck)..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Giovanna Pastore Meneguetti - Integrante / Moacyr Comar Junior - Coordenador / Alex Guttierrez Taranto - Integrante / Alexsandro Galdino Sobreira - Integrante.

2010 - 2011

Triagem Virtual Inversa (TVI) de compostos oriundos do cerrado

Descrição: Propôs modificações estruturais nos compostos naturais para que estes se tornem compostos protótipos, e candidatos a fármacos. Aplicação da metodologia de Triagem Virtual Inversa (TVI), seguido por estudos de Docking e refinamento pela Mecânica Molecular (MM) e QM/MM, para neurotransmissores cujos receptores encontram-se descritos no PDB; Posterior validação da metodologia de TVI para uso em compostos naturais..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Integrantes: Giovanna Pastore Meneguetti - Integrante / Moacyr Comar Junior - Integrante / Alex Guttierrez Taranto - Coordenador / Ana Paula Carregal - Integrante / Bruna Mara - Integrante / Márcio Souza Dâmaso - Integrante / Stênio Nunes Alves - Integrante / Luciana A. Lima - Integrante.

2010 - 2011

Atividade anti-inflamatório dos compostos do óleo de Copaiba: Estudo DFT e PCA

Descrição: ida pelo seu superior, por sua competência e dedicação, entre 50 alunos para desenvolver o projeto. Analisou os resultados, de 17 compostos presentes no óleo de copaiba, através de técnicas estatísticas (análise PCA, pelo software SAS). Verificou a existência de correlação entre as propriedades moleculares de compostos inibidores da COX-2 para futura avaliação anti-inflamatória. Expôs e apresentou seu trabalho no ?Simpósio Brasileiro de Química Teórica? (Outro Preto/MG, 2011)..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Giovanna Pastore Meneguetti - Integrante / Moacyr Comar Junior - Coordenador / Alex Guttierrez Taranto - Integrante / Bruna Mara - Integrante / Márcio Souza Dâmaso - Integrante.

Projetos de extensão

2010 - 2012

Avaliação das Condições Higiênico Sanitárias das padarias do município de Divinópolis

Descrição: Análise das condições higiênico Sanitárias das padarias do município de Divinópolis através de check-list; Estudos microbiológicos de presença ou ausência de Salmonella sp., de NMP/mL permitido para Escherichia coli, de UFC/mL permitido para Staphylococcus aureus, para bolores e leveduras e para aeróbios e mesófilo; Elaboração de mini-curso para conscientização das Boas Praticas de Fabricação..
Situação: Concluído; Natureza: Extensão.
Alunos envolvidos: Graduação: (3) .

Integrantes: Giovanna Pastore Meneguetti - Integrante / Marina Mendes - Integrante / Yuri, Dias - Integrante / Juliana Teixeira - Coordenador.

ANEXO D - CURRÍCULO LATTES (CONTINUAÇÃO)

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Francês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Alemão

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1.

MENEGUETTI, G. P.; TORRES, K. M. ; OLIVEIRA, A. M. ; PESSOA-JR, A. ; RANGEL-YAGUI, C. O. . N-terminal pegylation of L-asparaginase - Reaction conditions and purification process. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2.

MENEGUETTI, G. P.; RANGEL-YAGUI, C. O. . Efeito da força iônica na peguilação N-terminal da L-asparaginase de E. coli. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3.

MENEGUETTI, G. P.; TORRES, K. M. ; PESSOA-JR, A. ; RANGEL-YAGUI, C. O. . IONIC STRENGTH AND REACTION TIME EFFECT ON THE SITE-SPECIFIC N-TERMINUS L-ASPARAGINASE PEGYLATION. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4.

MENEGUETTI, G. P.. Nanobiotecnologia a favor da saúde. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

5.

MENEGUETTI, G. P.; CARREGAL, A. P. ; DAMASO, M. S. ; COMAR JUNIOR, M. ; ALVES, S. N. ; SIQUEIRA, J. M. ; LIMA, L. A. ; TARANTO, A. G. . Triagem Virtual Inversa (TVI) de compostos oriundos do cerrado. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6.

MENEGUETTI, G. P.; SOBREIRA, A. G. ; TARANTO, A. G. ; COMAR JUNIOR, M. . Modelagem Molecular e simulação da amilase de Cryptococcus flavus expressa em Saccharomyces cerevisea. 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).

7.

MENEGUETTI, G. P.; Dias, Y. ; MENDES, M. ; Mara, B. ; TEIXEIRA, J. . Avaliação das Condições Higiênico Sanitárias das padarias do município de Divinópolis. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

8.

MENEGUETTI, G. P.; DAMASO, M. S. ; Mara, B. ; TARANTO, A. G. ; COMAR JUNIOR, M. . ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF COPAIBA OIL COMPOUNDS: A DFT. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

9.

Dias, Y. ; **MENEGUETTI, G. P.** ; MENDES, M. ; Mara, B. ; TEIXEIRA, J. . Verificação das boas práticas de fabricação em padarias a partir da aplicação de um check-list. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Produção técnica

ANEXO D - CURRÍCULO LATTES (CONTINUAÇÃO)

Assessoria e consultoria

1.

MENEGUETTI, G. P.. Monitoria em Bioestatística. 2011.

Trabalhos técnicos

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1.

MENEGUETTI, G. P.; HACKER, S. ; ARIAS, C. D. . Entrevista com Mirian Lopes. 2015. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

Demais tipos de produção técnica

1.

MENEGUETTI, G. P.. Eletroforese: Tornando o invisível em visível. 2015. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

2.

ARIAS, C. A. D. ; SANTOS, J. C. F. ; **MENEGUETTI, G. P.** ; FREIRE, R. K. . Informativo do II Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. 2015. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - revista).

3.

MENEGUETTI, G. P.; LIMA, P. O. . Conceitos básicos para apresentação Prezi. 2013. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

4.

MENEGUETTI, G. P.; LIMA, P. O. . Biologia Molecular e Diagnóstico Clínico Molecular. 2012. .

5.

MENEGUETTI, G. P.. Doenças Transmitidas por Alimentos. 2012. (Curso de curta duração ministrado/Especialização).

6.

MENEGUETTI, G. P.; LIMA, P. O. . Avanços da Biologia Molecular no Diagnóstico Clínico. 2012. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).