

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional
25 de Julho de 2019 (25.07.2019)



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2019/140501 A1

- (51) Classificação Internacional de Patentes:
C12N 9/82 (2006.01) *C12N 15/66* (2006.01)
A61K 38/50 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional: PCT/BR2019/050017
- (22) Data do Depósito Internacional: 18 de Janeiro de 2019 (18.01.2019)
- (25) Língua de Depósito Internacional: Português
- (26) Língua de Publicação: Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade:
BR1020180010336
18 de Janeiro de 2018 (18.01.2018) BR
- (71) Requerente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ [BR/BR]; Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ (BR).
- (72) Inventores: DE SOUZA, Tatiana de Arruda Campos Brasil; Rua Tamoios 443. Apto 22, Paraná, 80320-290 Curitiba (BR). ZANCHIN, Nilson Ivo Tonin; Rua Coronel Otoni Maciel, 215, Apto 206-B, Vila Izabel, Paraná, 80320-000 Curitiba (BR). DE MORAIS, Stephanie Bath; Avenida Silva Jardim, 2265 Ap 401, Água Verde, Paraná, 80240-020 Curitiba (BR).
- (74) Mandatário: KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDA-DE INTELECTUAL; Rua Teófilo Otoni 63, 5th - 8th floors, 20090-080 Rio de Janeiro - RJ (BR).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes): AE, AG, AL, AM,

(54) Title: POLYPEPTIDE WITH ASPARAGINASE ACTIVITY, EXPRESSION CASSETTE, EXPRESSION VECTOR, HOST CELL, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, METHODS FOR PRODUCING A POLYPEPTIDE WITH ASPARAGINASE ACTIVITY AND FOR PREVENTING OR TREATING CANCER, AND USE OF A POLYPEPTIDE

(54) Título: POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE ASPARAGINASE, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE ASPARAGINASE E PARA PREVENIR OU TRATAR CÂNCER, E, USO DE UM POLIPEPTÍDEO

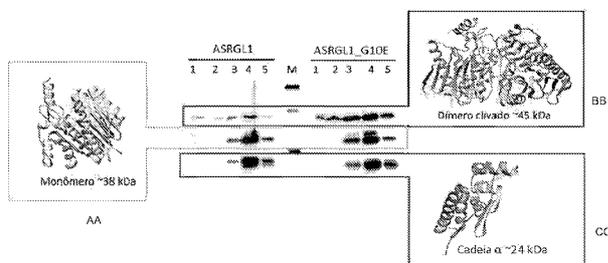


FIGURA 1

AA Monomer ~38 kDa
BB Cleaved dimer ~45 kDa
CC α chain ~24 kDa

(57) Abstract: The present invention relates to polypeptides with asparaginase activity, which have an increased self-processing rate in comparison to wild-type human L-asparaginase (ASRGL1), said polypeptides having a mutation in the glycine-rich loop of ASRGL1, denominated the HGG (Histidine 8-Glycine 9-Glycine 10) loop. Polynucleotides encoding the polypeptides of the invention, expression

(Continua na página seguinte)



WO 2019/140501 A1

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))
- em preto e branco; o pedido internacional tal como depositado contém cores ou níveis de cinza e pode ser baixado do PATENTSCOPE

cassettes comprising said polynucleotides, expression vectors, host cells, pharmaceutical compositions, uses of the polypeptide of the invention in manufacturing a medication for preventing or treating cancer, and methods for producing the polypeptide of the invention and for preventing or treating cancer are also described herein.

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a polipeptídeos com atividade asparaginase que possuem taxa de autoprocessamento aumentada em comparação à L-asparaginase humana selvagem (ASRGL1), com mutação no loop rico em glicinas da ASRGL1 denominado loop HGG (Histidina 8-Glicina 9-Glicina 10). São também aqui descritos polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos da invenção, cassetes de expressão compreendendo os ditos polinucleotídeos, vetores de expressão, células hospedeiras, composições farmacêuticas, usos do polipeptídeo da invenção na manufatura de um medicamento para prevenção ou tratamento de câncer e métodos para produzir o polipeptídeo da invenção e para prevenir ou tratar câncer.

“POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE ASPARAGINASE, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE ASPARAGINASE E PARA PREVENIR OU TRATAR CÂNCER, E, USO DE UM POLIPEPTÍDEO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se ao campo da oncologia e da biotecnologia. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a polipeptídeos com atividade asparaginase úteis na prevenção e tratamento de câncer.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A leucemia é uma doença maligna caracterizada pela proliferação excessiva e desregulada de células anormais na medula óssea, as quais, por serem células portadoras de um acúmulo de mutações que as impedem de completar a sua diferenciação, substituem as células hematopoiéticas normais. Dentre as principais consequências das leucemias em um indivíduo estão o risco aumentado para anemia e hemorragia e a maior susceptibilidade de contrações de infecções. Além disso, as células leucêmicas podem invadir vários outros tecidos através da circulação. Sem um efetivo tratamento, as leucemias são letais.

[003] De acordo com parâmetros clínicos e patológicos, a leucemia é subdividida de duas maneiras. A primeira divisão baseia-se no tempo de desenvolvimento e inclui as formas aguda e crônica. A segunda está relacionada ao tipo de célula afetada. Leucemias linfóide e mieloide são caracterizadas por modificações neoplásicas em célula progenitora linfóide e mieloide, respectivamente.

[004] O cenário mundial em 2012 mostrou que 2,5% de todos os tipos de câncer são leucemias, totalizando cerca de 352 mil novos casos neste ano. Com uma alta taxa de mortalidade, foram esperados para esse mesmo ano 265

mil mortes por leucemia no mundo. No Brasil, estimou-se a ocorrência de 10.070 novos casos dentre todos os tipos de leucemia para o ano de 2016, destacando-se a leucemia linfóide aguda (LLA) como o câncer mais comum na infância. Essa doença corresponde a 30% de todas as neoplasias malignas em crianças de 0 a 14 anos. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

[005] O tratamento atual da LLA é composto de três fases. O protocolo que descreve as fases do tratamento foi desenvolvido pelo grupo europeu Berlim-Frankfurt-Munique (BFM) e é utilizado pelo Sistema de Hematologia do INCA desde 1982 (INCA, 2001). Esse protocolo baseia-se na estratificação dos pacientes conforme os diferentes grupos de risco de recidiva da doença. Os pacientes no grupo de baixo risco são aqueles que possuem idade entre 1 e 10 anos incompletos, com contagem de leucócitos menor que 50.000/ μ L de sangue. Modificações cromossômicas ou genéticas nos linfócitos, variação na contagem de células após início do tratamento, presença de células leucêmicas no fluido cerebrospinal e a origem das células leucêmicas (se linfócitos T ou B) são fatores que também podem afetar o prognóstico (Instituto de Câncer dos Estados Unidos, 2015). Além disso, esse protocolo combina diferentes quimioterápicos com a finalidade de diminuir a resistência do paciente.

[006] A primeira fase é chamada de indução, dura de um a três meses e possui como objetivo alcançar a remissão, quando as contagens de células no sangue voltam ao normal e não são encontradas células leucêmicas na medula óssea. Na indução são usados um quimioterápico, um esteroide e a enzima asparaginase. A segunda fase é a consolidação, onde se procura eliminar completamente as células leucêmicas remanescentes impedindo que elas se tornem resistentes. Para isso são utilizados vários medicamentos quimioterápicos e asparaginase. Essa é a fase mais intensa do tratamento, com duração de dois meses. Após a remissão completa das células leucêmicas é iniciada a fase de manutenção, que pode durar de dois a três 5 anos e faz uso de

quimioterápicos e esteroides. (INCA, 2001; MÖRICKÉ et al., 2008; INSTITUTO ONCOGUIA, 2015).

[007] Nos últimos 40 anos houve notáveis avanços no tratamento da LLA infantil, resultando em uma sobrevida de até 90% para os pacientes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). A introdução da asparaginase no tratamento no final da década de 1970 contribuiu para o aumento de pelo menos 15% na taxa de sobrevida. Entretanto, significativos desafios subsistem, como o desenvolvimento de abordagens terapêuticas com uma menor toxicidade.

[008] A eficácia do uso da enzima asparaginase no tratamento da LLA baseia-se na deficiência apresentada pela maioria das células leucêmicas: ausência ou redução da expressão da proteína asparagina sintetase. A asparagina sintetase realiza a conversão de aspartato em asparagina. Por serem incapazes de sintetizar de novo a asparagina, as células leucêmicas são dependentes da asparagina circulante. As células tumorais, especialmente na LLA, requerem uma grande quantidade de asparagina para manter seu crescimento anormal característico dessas doenças malignas. Por esta razão, o uso da asparaginase contra a LLA torna-se vantajoso. A injeção intramuscular ou intravenosa da asparaginase causa um rápido esgotamento do aminoácido no plasma, levando à redução do metabolismo das células leucêmicas e, por fim, à morte por apoptose, enquanto que as células normais mantêm as suas funções por serem capazes de sintetizar asparagina. Dessa forma, a asparaginase possui um efeito seletivo sobre as células neoplásicas, diferentemente de um agente quimioterápico, por exemplo, que afeta o processo proliferativo tanto de células cancerosas como normais.

[009] A asparagina é um aminoácido não essencial importante para o crescimento e desenvolvimento de todas as células tanto saudáveis quanto neoplásicas. Por atuar na biossíntese proteica, sua depleção prejudica a proliferação celular (AVRAMIS, 2012). A redução da concentração circulante

de asparagina de 50 μM para 3 μM ou menos durante o tratamento com a asparaginase (AVRAMIS, 2012) impede as células leucêmicas de dar prosseguimento ao ciclo celular, ativando a sinalização por apoptose. Isso está em conformidade com as evidências de que a depleção de um aminoácido pode levar a indução de apoptose ou autofagia (SONG et al., 2015). Em outros tipos de câncer (câncer de ovário, leucemia mieloide crônica e adenocarcinoma pulmonar), a asparaginase tem sido relatada como capaz de induzir não só apoptose, mas também autofagia, visto que a asparagina funciona como um modulador negativo desse processo.

[0010] Apesar de seu uso primordial no tratamento da LLA, a asparaginase possui potencial terapêutico para uso em outros tipos de câncer, como leucemia mieloide aguda (WILLEMS et al., 2013), câncer de ovário (LORENZI et al., 2008; YU et al., 2012; PURWAHA et al., 2014), câncer cerebral, câncer de próstata, adenocarcinoma pulmonar (ZHANG et al., 2016), linfoma não Hodgkin, leucemia linfóide crônica e sarcomas como linfossarcoma, reticulosarcoma e melanossarcoma.

[0011] Atualmente são empregadas três asparaginases na terapia da LLA: a L-asparaginase II nativa de *Escherichia coli*, uma forma PEGuilada dessa enzima e a L-asparaginase isolada de *Erwinia chrysanthemi*. A seleção da asparaginase que irá compor o regime quimioterápico depende do país em que o tratamento é realizado. A escolha da versão da enzima a ser utilizada prioriza a diminuição dos efeitos colaterais e manutenção da eficácia do tratamento. No Brasil, a L-asparaginase II de *E. coli* é usada como primeira escolha (MÖRICKE et al., 2008; PIETERS et al., 2011).

[0012] A L-asparaginase II de *E. coli* é a que apresenta maior toxicidade e imunogenicidade dentre as três disponíveis. Inclusive, na última atualização do protocolo BFM houve redução de 50% na dose dessa enzima em função dos seus efeitos colaterais. Após a administração, a L-asparaginase II de *E. coli* é logo reconhecida pelas células do sistema imunológico por não se

difundir no espaço extracelular. Uma vez que a resposta imune esteja ativada, a enzima terá a sua ação neutralizada. Em 60% dos pacientes é gerada uma reação de hipersensibilidade associada à inativação da droga. Mas os anticorpos produzidos contra a L-asparaginase II de *E. coli* nem sempre são acompanhados dos sintomas característicos de uma reação de hipersensibilidade (anafilaxia, edema, doença do soro, broncoespasmo, urticária e erupção cutânea, prurido e inchaço das extremidades, eritema), em cerca de 30% dos pacientes ocorre uma inativação silenciosa (PIETERS *et al.*, 2011; AVRAMIS, 2012).

[0013] A enzima PEGuilada e a isolada de *E. chrysanthemi* são indicadas como substitutas nesses casos de hipersensibilidade e/ou inativação. A PEG-asparaginase apresenta uma imunogenicidade relativamente menor. Porém, sua administração posterior ao tratamento com a enzima nativa pode resultar em uma inativação silenciosa por causa de uma reação cruzada com anticorpos anti-asparaginase já presentes no paciente. A L-asparaginase de *E. chrysanthemi* soluciona em grande parte o problema da hipersensibilidade visto que as chances de desenvolvimento de anticorpos contra essa enzima são de 12-20%. No entanto, apresenta um tempo de meia-vida menor e estudos relatam uma quantidade significativamente maior de pacientes que não alcançam a remissão completa das células leucêmicas (PIETERS *et al.*, 2011; RYTTING, 2012; AVRAMIS, 2012).

[0014] Além dos efeitos decorrentes do despertar da resposta imunológica, a administração de múltiplas doses de asparaginase pode gerar efeitos de caráter tóxico. A alta toxicidade das asparaginases bacterianas está relacionada com sua inespecificidade hidrolítica, levando também à depleção da glutamina, que é convertida em glutamato e amônia por essas enzimas. Essa hidrólise inespecífica está relacionada a grande parte dos efeitos colaterais, como doenças hepáticas, pancreatite aguda, hiperglicemia, glicosúria, cetoacidose, distúrbios do sistema nervoso central, hipoalbuminemia,

hipofibrinonemia, hipercoagulação, entre outras disfunções. Tem sido descrito que a privação de glutamina pode ativar mecanismos intracelulares que atingem a mitocôndria e ativa as vias de apoptose, porém isso não alivia os efeitos tóxicos gerados pela hidrólise da glutamina e ainda pode induzir a expressão de fatores de crescimento (AVRAMIS, 2012).

[0015] Além de levar as células leucêmicas de forma seletiva à morte, a asparaginase potencializa o efeito antileucêmico de esteroides melhorando ainda mais os resultados do tratamento. Por isso, pesquisas com a asparaginase têm buscado a produção de uma enzima com alta afinidade para a asparagina e meia vida longa. Essas características podem ser encontradas em uma enzima asparaginase humana, uma opção de tratamento alternativo às asparaginases bacterianas.

[0016] A inclusão de L-asparaginase humana no tratamento da leucemia linfóide aguda poderia solucionar grande parte dos problemas enfrentados com as enzimas bacterianas. Entretanto, constitui-se uma solução desafiadora, pois a enzima humana é somente ativa após uma etapa de autoclivagem, que apresenta uma baixa eficiência *in vitro*, reduzindo sua atividade enzimática.

[0017] Os estudos sobre a L-asparaginase humana (ASRGL1) se intensificaram nos últimos anos devido aos interesses em seu potencial uso terapêutico em alguns tipos de câncer, especialmente nos casos de LLA.

[0018] Como uma proteína humana, ASRGL1 poderá reduzir drasticamente a imunogenicidade do tratamento; preenche o requisito de alta estabilidade térmica essencial para medicamentos; possui alta afinidade para asparagina e ainda não possui atividade glutaminase, ASRGL1 é incapaz de hidrolisar a glutamina, sendo sua especificidade a asparagina maior que a outros substratos (CANTOR *et al.*, 2009).

[0019] O grande desafio quanto a utilização de ASRGL1 no protocolo terapêutico da LLA está na sua atividade enzimática. O pré-requisito clínico

para o K_M de uma proteína asparaginase é um baixo valor na ordem de micromolar, enquanto as asparaginases bacterianas preenchem esse requisito, *in vitro*, a hASRGL1 possui um K_M na ordem de milimolar. As asparaginases bacterianas utilizadas no tratamento da LLA pertencem a uma subfamília diferente da proteína humana; enquanto ASRGL1 pertence a subfamília das L-asparaginases *plant-type*, as bacterianas pertencem a *bacterial-type*, que não apresentam a necessidade de passar por um autoprocessamento para se tornarem ativas (CANTOR *et al.*, 2009).

[0020] Como o autoprocessamento é um evento crucial para que a enzima tenha atividade enzimática e tem sido demonstrado que a atividade cinética é proporcional a taxa de autoprocessamento, entende-se que a baixa atividade enzimática de ASGRL1 seja em decorrência do mecanismo de autocatálise. O avanço na engenharia genética tem permitido a realização de diversas modificações a fim de aumentar a eficiência do autoprocessamento *in vitro*, porém sem ainda alcançar sucesso.

[0021] O mecanismo de autoclivagem inicia-se com uma base em solução aceptor de próton proveniente do grupo hidroxil de T168. Após a desprotonação, T168 (com caráter nucleofílico aumentado) ataca o grupo carbonila de G167 formando uma ligação covalente que será hidrolisada. A clivagem completa entre os dois resíduos deixa a grupamento amino de T168 livre para catalisar a hidrólise da asparagina (SU *et al.*, 2013). Observa-se que o resíduo essencial T168 de ASRGL1 desempenha um papel duplo: primeiro, sua cadeia lateral é necessária para a reação de autoclivagem. Em segundo lugar, com a ruptura da ligação peptídica entre G167 e T168, o grupo amino livre de T168 participa na catálise da hidrólise de asparagina.

[0022] A compreensão do mecanismo exato de autoprocessamento de ASRGL1 é imprescindível para que seja alcançada uma solução para a baixa atividade *in vitro* sobre o substrato. No entanto, os estudos bioquímicos e estruturais da enzima humana têm se demonstrado um desafio, visto que as

proteínas recombinantes geradas para estudo são uma mistura dos estados não processado (inativo) e processado (ativo). Dessa forma, a baixa taxa de ativação (é alcançado somente 50% de autoprocessamento com a enzima selvagem) dificulta tanto a caracterização estrutural como enzimática (CANTOR *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012).

[0023] Na proteína inativa, a distância entre a hidroxila de T168 e carbono da carbonila de G167 é de 4,0 Å, o que não favorece os eventos químicos necessários para o autoprocessamento, mostrando a necessidade de uma mudança conformacional para a clivagem (NOMME *et al.*, 2012). A inativação do autoprocessamento através da mutação T168A causou um grande aumento na estabilidade térmica da proteína mutante ($\Delta T_M = 10^\circ\text{C}$), dando indícios de um mecanismo de ativação por tensão estérica. Essa tensão é decorrente da orientação de T168 na proteína inativa. Os elétrons do seu grupamento metil estão muito próximos da hidroxila desse resíduo, criando forças repulsivas e interações desfavoráveis. O autoprocessamento causa um relaxamento na cadeia lateral de T168, levando a hidroxila de T168 mais próxima ao sítio ativo, visto que a distância entre essa hidroxila e o grupamento amino de T168 é de razoáveis 2,7 Å (LI *et al.*, 2012).

[0024] A alteração conformacional na região de autoclivagem pode ser facilitada pela glicina 9 (G9) (NOMME *et al.*, 2012). A comparação entre as estruturas de ASRGL1 antes e após o processamento indica uma rotação do grupo carboxílico de G9 em 180° (Figura 1.10 B). Essa mudança de conformação de G9 também foi observada na enzima asparaginase tipo III de porquinho-da-índia 47 e pode promover o reposicionamento de G167 (NOMME *et al.*, 2012) de forma a o aproximar de T168 e favorecer a autoclivagem (NOMME *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012).

[0025] G9 faz parte de um loop rico em glicinas denominado loop HGG (Histidina 8-Glicina 9-Glicina 10). Esse loop é fortemente conservado (~100%) ao longo de toda a filogenia das L-asparaginases *plant-type* (LI,

2012).

[0026] LI *et al.*, 2012 analisou mutações nos resíduos do loop HGG da ASRGL1, particularmente glicina 9 (G9) e glicina 10 (G10), para alanina, que resultaram em redução da taxa de autoprocessamento (6 e 30 vezes, respectivamente) e da atividade cinética (14 e 50 vezes, respectivamente).

[0027] LI *et al.*, 2016 também avaliou variantes de ASRGL1 com mutações nos resíduos asparagina (N62), treonina 186 (T186) e treonina 219 (T219) quanto à taxa de autoprocessamento e à atividade catalítica em comparação com a ASRGL1 selvagem. Em Nomme *et al.*, 2016, mutações nos resíduos treonina 168 (T168) e treonina 219 (T219) da ASRGL1 foram também estudadas com relação à taxa de autoprocessamento e à atividade catalítica em comparação com a ASRGL1 selvagem. Embora algumas dessas variantes tenham apresentado aumento da atividade catalítica, nenhuma das mutações realizadas resultaram no aumento da taxa de autoprocessamento,

[0028] Todas as mutações geradas em diferentes resíduos até o momento auxiliaram a compreensão das bases mecânicas do funcionamento de ASRGL1, porém todas falharam em aumentar sua taxa de autoprocessamento e sua atividade hidrolítica sobre a asparagina.

[0029] Neste contexto, a presente invenção descreve polipeptídeos com atividade asparaginase, variantes da enzima L-asparaginase humana, úteis no tratamento de câncer, os quais apresentam menores efeitos colaterais em virtude de sua baixa toxicidade e imunogenicidade em comparação com às enzimas bacterianas utilizadas terapêuticamente. Estas e outras vantagens da invenção, bem como as características inventivas adicionais unidas ao mesmo conceito inventivo, serão evidentes na descrição da invenção fornecida neste documento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0030] A presente invenção tem por objetivo prover um polipeptídeo com atividade asparaginase que solucione os principais problemas do estado da

técnica listados anteriormente.

[0031] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê um polipeptídeo com atividade asparaginase selecionado do grupo que consiste em:

(i) um polipeptídeo que possui taxa de autoprocessamento aumentada em comparação à L-asparaginase humana selvagem apresentada na SEQ ID NO: 1;

(ii) um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com as sequências de qualquer uma das SEQ ID Nos: 3-5;

(iii) um polipeptídeo em que o aminoácido glicina na posição 10 da SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido selecionado do grupo consistindo em ácido glutâmico, ácido aspártico e histidina;

(iv) um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido apresentada nas SEQ ID NO: 3-5; e

(v) um polipeptídeo de (i) a (iv) compreendendo uma ou mais substituições conservativas de aminoácidos.

[0032] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo com atividade asparaginase como acima definido.

[0033] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê um cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo como acima definido operacionalmente ligado a um promotor e a um terminador de transcrição.

[0034] Em um quarto aspecto, também é provido um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo ou um cassete de expressão como acima definidos.

[0035] Em um quinto aspecto, a presente invenção provê uma célula hospedeira compreendendo um cassete de expressão ou um vetor de expressão como acima definidos.

[0036] Em um sexto aspecto, é provida uma composição farmacêutica que compreende um polipeptídeo da invenção e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0037] Em um sétimo aspecto, é provido o uso do polipeptídeo da invenção na manufatura de um medicamento para prevenção ou tratamento de câncer.

[0038] Em um oitavo aspecto, a presente invenção provê um método para produzir um polipeptídeo com atividade asparaginase, compreendendo as etapas de: (a) fornecer uma célula hospedeira transformada; (b) cultivar dita célula em condições conducentes para a produção do polipeptídeo; e (c) isolar dito polipeptídeo de dita célula ou do meio de cultura circundando dita célula.

[0039] Em um nono aspecto, é provido um método para prevenir ou tratar câncer, compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo com atividade asparaginase a um indivíduo em necessidade da dita prevenção ou tratamento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0040] A Figura 1 mostra um ensaio *Western Blot* de ASRGL1 e ASRGL1_G10E purificadas por cromatografia de afinidade [M - Marcador de peso molecular (110, 48 e 25 kDa); 1 - *Flow through*; 2 - Eluição com 50 mM imidazol; 3 - Eluição com 100 mM imidazol; 4 - Eluição com 500 mM imidazol; 5 - Resina de níquel].

[0041] A Figura 2 mostra uma análise estrutural e do perfil eletroforético de dímeros de ASRGL1 em diferentes estados de clivagem.

[0042] A Figura 3 mostra os padrões de massa molecular usados para o ensaio de eletroforese em gel de agarose.

[0043] A Figura 4 mostra o perfil eletroforético dos produtos de PCR das sequências de ASRGL1 e ASRGL1_G10E.

[0044] A Figura 5 mostra o perfil eletroforético da digestão analítica após a clonagem dos produtos de PCR ASRGL1 e ASRGL1_G10E em pGEM-

T Easy.

[0045] A Figura 6 mostra o perfil eletroforético da digestão analítica após a subclonagem em vetor de expressão pET28a-TEV.

DEFINIÇÕES

[0046] Para garantir um melhor entendimento do escopo da invenção, sem que seja um fator limitante, os termos técnicos das áreas de tecnologia relacionadas, como usados na presente invenção, são definidos a seguir.

[0047] “Que compreende” ou variações tais como “compreendem”, “compreende” ou “compreendido de” são usados por todo o relatório descritivo e reivindicações em um sentido inclusivo, isto é, para especificar a presença dos recursos determinados, mas não para excluir a presença ou adição de recursos adicionais que podem aprimorar materialmente a operação ou a utilidade de qualquer uma das modalidades da invenção, a não ser que o contexto exija de outro modo devido à linguagem de expressão ou implicação necessária.

[0048] “Consiste essencialmente em” e variações tais como “consistem essencialmente em” ou “que consiste essencialmente em”, conforme usado por todo o relatório descritivo e reivindicações, indicam a inclusão de quaisquer elementos ou grupo de elementos citado e a inclusão opcional de outros elementos, de natureza similar ou diferente dos elementos citados, que não alteram materialmente as propriedades básicas ou inovadoras da matéria reivindicada.

[0049] Os termos “ácido nucleico” e “polinucleotídeo” são usados de forma intercambiável, e referem-se a RNA e DNA. Os polinucleotídeos podem ser simples ou dupla fita. Exemplos não limitantes de polinucleotídeos incluem genes, fragmentos de genes, exons, introns, RNA mensageiro, siRNA, miRNA, DNA complementar, DNA genômico, DNA sintético, DNA recombinante, cassetes, vetores, sondas e iniciadores. O termo “DNA recombinante” refere-se a qualquer sequência nucleotídica artificial que

resulta da combinação de sequências de DNA de diferentes origens.

[0050] O termo “sequência de nucleotídeos degenerada” denota uma sequência de nucleotídeos que inclui um ou mais códons degenerados quando comparada com uma molécula de ácido nucleico de referência que codifica um dado polipeptídeo. Códon degenerados contêm diferentes tripletes de nucleotídeos, mas codificam o mesmo resíduo de aminoácido (p.ex., GAU e GAC ambos codificam Asp).

[0051] O termo “quantidade terapêuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade de proteínas ou polipeptídeos que fornece atividade contra câncer, quando administrada de acordo com a dose e via de administração apropriada.

[0052] O termo “carreadores ou excipientes farmacologicamente aceitáveis” refere-se a ingredientes compatíveis com outros ingredientes contidos em preparações farmacêuticas e que não apresentam efeito terapêutico e não são prejudiciais a seres humanos ou animais.

[0053] “Agente quimioterápico” é um composto químico útil no tratamento de câncer. As classes de agentes quimioterápicos incluem, porém, sem limitação: agentes alquilantes, antimetabólitos, inibidores da quinase, alcaloides de planta de veneno antifuso, antibióticos citotóxicos/antitumorais, inibidores de topoisomerase, fotossensibilizadores, antiestrogênios e moduladores de receptor de estrogênio seletivos (SERMs), antiprogesteronas, reguladores descendentes de receptor de estrogênio (ERDs), antagonistas de receptor de estrogênio, agonistas de hormônio de liberação de hormônio luteinizante, antiandrógenos, inibidores de aromatase, inibidores de EGFR, inibidores de VEGF, oligonucleotídeos antissenso que inibem a expressão de genes implicados na proliferação celular anormal ou crescimento do tumor. Os agentes quimioterápicos úteis nos métodos de tratamento da presente invenção incluem agentes citostáticos e/ou citotóxicos.

[0054] O termo “indivíduo” refere-se a seres humanos e animais. Preferencialmente o indivíduo é um ser humano.

[0055] O termo “identidade” é definido como o grau de igualdade entre sequências de DNA ou de aminoácidos quando comparados nucleotídeo por nucleotídeo ou aminoácido por aminoácido com uma sequência de referência.

[0056] O termo “porcentagem de identidade de sequências” refere-se a comparações entre polinucleotídeos ou polipeptídeos e é determinado por duas sequências idealmente alinhadas, sob determinados parâmetros de comparação. Este alinhamento pode compreender *gaps* (espaços), gerando intervalos quando comparadas à sequência de referência, que facilitam uma comparação adequada das mesmas. De maneira geral, o cálculo da porcentagem de identidade considera o número de posições onde o mesmo nucleotídeo ou aminoácido ocorre nas sequências comparadas à sequência referência, sendo realizado através de diversos algoritmos de comparação de sequências e programas conhecidos no estado da arte. Tais algoritmos e programas incluem, mas não são limitados a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, CLUSTALW, FASTDB.

[0057] O termo “Reação da Polimerase em Cadeia” ou da sigla em inglês, PCR, refere-se a um método no qual um fragmento de ácido nucleico é amplificado como descrito na patente US 4.683.195. Geralmente, a informação contida nas extremidades 5’ e 3’ da sequência de interesse é utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores ou iniciadores que abrangem, em torno de 8 nucleotídeos sintéticos. Estes iniciadores apresentam sequências complementares à sequência a ser amplificada. A PCR pode ser utilizada para amplificar sequências de RNA, DNA ou cDNA.

[0058] Um “cassete de expressão” refere-se a uma construção de ácido nucleico compreendendo uma região codificante e uma região reguladora, ligadas de modo operacional que, quando introduzida em uma célula hospedeira, resulta na transcrição e/ou tradução de um RNA ou polipeptídeo, respectivamente. Geralmente, um cassete de expressão é

constituído ou compreendido por um promotor que permite iniciar a transcrição, um ácido nucleico de acordo com a invenção, e terminador de transcrição. A expressão “ligada de maneira operacional” indica que os elementos são combinados de modo que a expressão da sequência codificante esteja sob controle do promotor transcricional e/ou peptídeo sinal. Tipicamente, a sequência do promotor é colocada a montante do gene de interesse, a uma distância deste compatível com o controle da expressão. Do mesmo modo, a sequência de peptídeo sinal é fusionada geralmente a montante da sequência do gene de interesse, e em fase com este, e a jusante de qualquer promotor. Sequências de espaçamento podem estar presentes, entre os elementos reguladores e o gene, dado que não impedem a expressão e/ou a triagem. Em um modo de realização, o referido cassete de expressão compreende pelo menos uma sequência ativadora “*enhancer*” ligada de maneira operacional ao promotor.

[0059] O termo “vetor” refere-se a moléculas de ácidos nucléicos projetadas para transportar, transferir e/ou armazenar material genético, bem como expressar e/ou integrar o material genético ao DNA cromossomal da célula hospedeira, como por exemplo, os plasmídeos, cosmídeos, cromossomos artificiais, bacteriófagos e outros vírus. O vetor geralmente é composto por, no mínimo, três unidades básicas, a origem de replicação, um marcador de seleção e o sítio múltiplo de clonagem.

[0060] Os vetores utilizados nesta invenção apresentam preferencialmente pelo menos um “marcador de seleção”, que é elemento genético que permite a seleção dos organismos/células geneticamente modificados. Esses marcadores incluem genes de resistência a antibióticos tais como, mas não limitados a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, higromicina, bleomicina, fleomicina, puromicina e/ou genes de complementação de fenótipo, tais como, mas não limitados a metotrexato, dihidrofolato redutase, ampicilina, neomicina, ácido micofenólico, glutamina

sintetase.

[0061] O termo “vetor de expressão” refere-se a qualquer vetor que seja capaz de transportar, transferir e/ou armazenar material genético, e que, uma vez na célula hospedeira, seja utilizado como fonte de informação genética para produção de um ou mais produtos gênicos (expressão gênica).

[0062] Além disso, os vetores de expressão desta invenção podem incluir uma ou mais sequências nucleotídicas regulatórias para controle da replicação gênica, transferência, transporte, armazenamento e expressão do material genético, como por exemplo, origem de replicação, marcador de seleção, sítio múltiplo de clonagem, promotor (por exemplo, T7 pol, pL e pR fago lambda, SV40, CMV, HSV tk, pgk, T4 pol, ou EF-1 alfa e seus derivados), sítio de ligação ao ribossomo, sítio para *splice* de RNA, sítio de poliadenilação, peptídeo sinal para secreção e sequência de terminação de transcrição gênica. No entanto, os vetores de expressão dessa invenção não estão limitados a elas. A técnica de incorporação das sequências controle num vetor encontra-se bem caracterizada no estado da técnica.

[0063] O vetor de expressão utilizado nesta invenção também poderá ter sequências “*enhancer*”, também denominados elementos “cis” que podem influenciar positiva ou negativamente a expressão gênica dependente do promotor.

[0064] Uma “sequência codificadora” refere-se a uma sequência nucleotídica que é transcrita em mRNA (RNA mensageiro) e traduzida em um polipeptídeo quando estiver sob o controle de sequências regulatórias adequadas. Os limites da sequência codificadora são determinados por um códon de iniciação de tradução na extremidade 5’ da fita senso de DNA e por um códon de terminação de tradução na extremidade 3’ da fita senso de DNA. Como resultado da degeneração do código genético, diferentes sequências de DNA podem codificar uma mesma sequência polipeptídica. Por isso, considera-se que tais substituições degeneradas na região codificante estejam

inseridas nas sequências descritas nesta invenção.

[0065] O termo “promotor” é uma sequência mínima de DNA suficiente para direcionar a transcrição gênica, isto é, uma sequência que direciona a ligação da enzima RNA polimerase promovendo assim a síntese do RNA mensageiro. Promotores podem ser específicos para o tipo de célula, tipo de tecido e espécie, além de serem modulados, em determinados casos, por elementos regulatórios em resposta a algum agente externo físico ou químico denominado indutor.

[0066] Os termos “transformação” e “transfecção” referem-se ao ato de se inserir um vetor ou outro veículo carreador de material genético exógeno em uma célula hospedeira, procariótica ou eucariótica, para transporte, transferência, armazenamento e/ou expressão gênica do material genético de interesse.

[0067] O termo “expressão recombinante” refere-se à expressão do polipeptídeo recombinante em células hospedeiras.

[0068] O termo “célula hospedeira” refere-se à célula que irá receber o material genético através de um vetor e/ou células que já receberam o material genético através de um vetor (células transformadas ou transfectadas). Essas células hospedeiras podem ser tanto de origem procariótica (microrganismos procarióticos) como eucariótica (células ou microrganismos eucarióticos).

[0069] No presente pedido, os termos “peptídeo”, “polipeptídeo” ou “proteína” podem ser utilizados intercambiavelmente, e fazem referência a um polímero de aminoácidos conectado por ligações peptídicas, independentemente do número de resíduos de aminoácido que constituem esta cadeia. Os polipeptídeos, como aqui usados, incluem “variantes” ou “derivados” dos mesmos, que se referem a um polipeptídeo que inclui variações ou modificações, por exemplo, substituição, deleção, adição ou modificações químicas em sua sequência de aminoácido em relação ao

polipeptídeo de referência, desde que o polipeptídeo derivado apresente atividade imunossupressora, estabilidade, meia vida, características farmacocinéticas e/ou características físico-químicas iguais ou superiores à inicialmente observada para o polipeptídeo original. Exemplos de modificações químicas são glicosilação, PEGilação, PEG alquilação, alquilação, fosforilação, acetilação, amidação, etc. Os aminoácidos dos polipeptídeos da invenção, dependendo da orientação do grupo amino do átomo de carbono alfa pode pertencer à série L ou D. O polipeptídeo pode ser produzido artificialmente a partir de sequências nucleotídicas clonadas através da técnica de DNA recombinante (“polipeptídeo recombinante”) ou pode ser preparado através de uma reação de síntese química conhecida (“polipeptídeo sintético”).

[0070] O termo “substituições de aminoácidos” refere-se à substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido de polipeptídeos visando à produção de derivados com atividade asparaginase, estabilidade, meia vida, características farmacocinéticas e/ou características físico-químicas iguais ou superiores à inicialmente observada para os polipeptídeos originais. Os aminoácidos substituintes podem ser naturais, modificados ou incomuns.

[0071] A este respeito, o termo “substituição conservativa de aminoácidos” refere-se à substituição de aminoácidos em um polipeptídeo por aqueles com cadeias laterais similares e, portanto, com propriedades físico-químicas muito próximas. Por exemplo, a troca de uma alanina por uma valina ou leucina ou isoleucina é considerada conservativa, já que os aminoácidos envolvidos possuem como característica comum uma cadeia lateral alifática. O grupo que contém como característica uma cadeia lateral básica é composto por lisina, arginina e histidina. O grupo que contém enxofre na cadeia lateral abrange os aminoácidos cisteína e metionina. Os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano contêm uma cadeia lateral

aromática. A asparagina e a glutamina fazem parte dos aminoácidos com cadeia lateral contendo amida, já a serina e a treonina contém uma hidroxila ligada a sua cadeia lateral alifática. Outros exemplos de substituição conservativa incluem a substituição de um aminoácido apolar ou hidrofóbico como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro também apolar. Da mesma forma, a invenção aqui descrita contempla a substituição de aminoácidos polares ou hidrofílicos como arginina por lisina, glutamina por asparagina e treonina por serina. Adicionalmente, a substituição entre aminoácidos de caráter básico como lisina, arginina ou histidina ou a substituição entre aminoácidos de caráter ácido como ácido aspártico ou ácido glutâmico também é contemplada. Exemplos de substituição conservativa de aminoácidos são as seguintes: valina por leucina ou por isoleucina, fenilalanina por tirosina, lisina por arginina, alanina por valina e asparagina por glutamina.

[0072] Além disso, exemplos ilustrativos de aminoácidos modificados ou incomuns incluem ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiônico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmosina, aloisoleucina, N-metil glicina, N-metil isoleucina, 6-N-metil-lisina, N-metil valina, norvalina, norleucina, ornitina, etc.

[0073] Os objetos da presente invenção serão melhor compreendidos a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações anexas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0074] A não ser que sejam definidos de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado

entendido por um técnico no assunto ao qual a invenção pertence. A terminologia utilizada na descrição da invenção tem finalidade de descrever concretizações particulares somente, e não tem a intenção de limitar o escopo dos ensinamentos. A não ser que seja indicado de forma diferente, todos os números expressando quantidades, porcentagens e proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Assim, a não ser que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades a serem obtidas.

[0075] Os presentes inventores solucionaram o problema do estado da técnica provendo polipeptídeos com atividade asparaginase pela modificação da L-asparaginase humana (SEQ ID NO:1), possuindo em sua sequência um acceptor de prótons na posição ocupada pela glicina livre na proteína selvagem e, conseqüentemente, com mecanismo de autoprocessamento aperfeiçoado.

[0076] O mecanismo de autoclivagem inicia-se com uma base em solução acceptora do próton proveniente do grupo hidroxil de T168. Após a desprotonação, T168 (com caráter nucleofílico aumentado) ataca o grupo carbonila de G167 formando uma ligação covalente que será hidrolisada. A clivagem completa entre os dois resíduos deixa a grupamento amino de T168 livre para catalisar a hidrólise da asparagina.

[0077] Observa-se que o resíduo essencial T168 de ASRGL1 desempenha um papel duplo: primeiro, sua cadeia lateral é necessária para a reação de autoclivagem e, em segundo lugar, com a ruptura da ligação peptídica entre G167 e T168, o grupo amino livre de T168 participa na catálise da hidrólise de asparagina.

[0078] Na proteína inativa, a distância entre a hidroxila de T168 e carbono da carbonila de G167 é de 4,0 Å, o que não favorece os eventos químicos necessários para o autoprocessamento, mostrando a necessidade de

uma mudança conformacional para a clivagem. O autoprocessamento causa um relaxamento na cadeia lateral de T168, levando a hidroxila de T168 mais próxima ao sítio ativo, visto que a distância entre essa hidroxila e o grupamento amino de T168 é de razoáveis 2,7 Å.

[0079] A proximidade da glicina ao grupamento hidroxil da T168 proporciona seu funcionamento como um iniciador extrínseco do autoprocessamento. Um iniciador intrínseco seria vantajoso por ativar esse processo desde a tradução da proteína. Nesse contexto, os inventores da presente invenção introduziram um acceptor de prótons na posição ocupada pela glicina livre e assim aperfeiçoar o mecanismo de autoprocessamento *in vitro*.

[0080] Embora a glicina livre atue satisfatoriamente como um acceptor de prótons, o mesmo não é observado para glicina incluída em uma estrutura proteica. Em uma proteína, seus grupos amino e carboxil formam a ligação peptídica, não estando livres para atuar na acepção de prótons. Além disso, sua cadeia lateral formada apenas por hidrogênio não desempenha essa função.

[0081] Tendo em vista que o pH sanguíneo é 7,4, ácido glutâmico, ácido aspártico e histidina poderiam funcionar como acceptor de prótons no sangue. Esses aminoácidos têm em comum o pKa da cadeia lateral menor que o pH sanguíneo, assim nessas condições há uma predominância de radicais COO⁻ em relação à COOH.

[0082] A alteração conformacional na região de autoclivagem pode ser facilitada pela glicina 9 (G9). G9 faz parte de um loop rico em glicinas denominado loop HGG (Histidina 8-Glicina 9-Glicina 10). Esse loop é fortemente conservado (~100%) ao longo de toda a filogenia das L-asparaginases *plant-type*.

[0083] Na estrutura da proteína inativa, a posição da carbonila de G10 favorece a ligação de hidrogênio entre G11 e T219 e bloqueia o loop HGG

numa conformação fechada. Além disso, a grande proximidade (1,6 Å) entre G9 do loop HGG e L166 contribui para a conformação fechada. Em contraste, na enzima ativa, a rotação de G9 modifica a posição da carbonila de G10 resultando na mudança de posição do loop HGG.

[0084] Face à flexibilidade do loop HGG e sua importância para ativação do autoprocessamento, essa região foi considerada para fins de mutação visando o aperfeiçoamento do mecanismo de autoprocessamento.

[0085] Através de modificações *in silico* nas estruturas de ASRGL1 os inventores observaram que uma mutação em G10 para um aminoácido funcionando como acceptor de prótons poderia colocar a carboxila da cadeia lateral próxima ao sítio ativo, em uma posição semelhante à glicina livre que otimiza a reação de autoprocessamento.

[0086] Os estudos mostraram que a proteína mutada apresentou uma maior proporção de autoprocessamento em relação à proteína selvagem. As mutações propostas na presente invenção foram capazes de elevar as taxas de autoprocessamento e de atividade enzimática da L-asparaginase humana, alcançando o objetivo de aperfeiçoar as reações de autoclivagem e hidrólise, conforme demonstrado por meio dos exemplos aqui apresentados.

[0087] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê um polipeptídeo com atividade asparaginase selecionado do grupo que consiste em:

(i) um polipeptídeo que possui taxa de autoprocessamento aumentada em comparação à L-asparaginase humana selvagem apresentada na SEQ ID NO: 1;

(ii) um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com as sequências de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3-5;

(iii) um polipeptídeo em que o aminoácido glicina na posição 10 da SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido selecionado do grupo

consistindo em ácido glutâmico, ácido aspártico e histidina;

(iv) um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido apresentada em qualquer uma das SEQ ID NO: 3-5; e

(v) um polipeptídeo de (i) a (iv) compreendendo uma ou mais substituições conservativas de aminoácidos.

[0088] Em um aspecto, os polipeptídeos da presente invenção são pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idênticos às sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 3-5.

[0089] Em uma concretização, o polipeptídeo da invenção compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 3-5, em que o aminoácido glicina na posição 10 da SEQ ID NO: 1 é, respectivamente, substituído por ácido glutâmico, ácido aspártico e histidina.

[0090] Em uma concretização preferida, o polipeptídeo da invenção compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3, em que o aminoácido glicina na posição 10 da SEQ ID NO: 1 é substituído por ácido glutâmico (mutação G10E).

[0091] A indução da expressão recombinante de ASRGL1 (SEQ ID NO: 1) e ASRGL1_G10E (SEQ ID NO: 3) em *E. coli* permitiu a produção de uma maior quantidade de proteína para análise do autoprocessamento. Uma banda de ~38 kDa, indicada na Figura 1 corresponde à proteína não processada e a banda de ~24 kDa corresponde à cadeia α . A cadeia β não é visualizada, pois a cauda de histidina encontra-se na porção N-terminal da proteína. Além das bandas de 38 kDa e 24 kDa, foi observada uma terceira banda de ~45 kDa.

[0092] Acredita-se que a banda de ~45 kDa corresponda a um dímero da cadeia α ligada por uma ponte dissulfeto (ponte SS). Isso baseado nos relatos do estado da técnica (Li *et al.* (2016)), no seu tamanho correspondente

ao dobro do tamanho da cadeia α e baseado também na existência de três cisteínas nessa cadeia que poderiam formar pontes dissulfeto (Figura 2a). Sabe-se que por se tratar de uma ligação covalente forte, muitas vezes os agentes redutores do tampão de amostra de eletroforese não são suficientemente eficientes em quebrar essa forte interação e assim observa-se uma banda no gel correspondente à dímeros com ponte dissulfeto. Se essa fração dimerizada fosse não processada teríamos uma banda de aproximadamente 75 kDa, no entanto, como se vê apenas uma migração de 45 kDa, conclui-se que se trata do estado processado com ponte dissulfeto (Figura 2b).

[0093] Na Figura 2a, a representação em *cartoon* de dímeros de ASRGL1 processados e não processados. Cadeia α em bege, cadeia β em verde, cisteínas em esferas coloridas de acordo com o átomo onde C- cinza, N- azul, O- vermelho e S- amarelo. O círculo oval em vermelho descreve a mais provável região de formação de ponte dissulfeto entre os monômeros.

[0094] Na Figura 2b, é mostrado o perfil eletroforético teórico de dímeros em diferentes situações do processamento, onde: 1- dímeros conectados por ligação dissulfeto composto por dois monômeros clivados (banda de 45 kDa - cadeia α com ponte SS, banda de 15 kDa - cadeia β), 2- dímeros não conectados por ligação dissulfeto composto por dois monômeros clivados (banda de 24 kDa - cadeia α , banda de 15 kDa - cadeia β), 3- dímeros conectados por ligação dissulfeto composto por dois monômeros não clivados (banda de 75 kDa que corresponde a proteína contínua de 38 kDa conectada por ponte dissulfeto), 4- amostra inativa dimerizada sem ponte dissulfeto (banda de 35 kDa que corresponde a cadeia polipeptídica contínua), 5- dímeros conectados por ligação dissulfeto parcialmente clivados (apenas um monômero está clivado, banda de 65 kDa correspondente à duas cadeias α e uma β e banda de 15 kDa correspondente à cadeia β), 6- dímeros não conectados por ligação dissulfeto parcialmente clivados (apenas um

monômero está clivado, banda de 38 kDa correspondente a proteína não clivada, banda de 24 kDa corresponde a cadeia α e banda de 15 kDa correspondente à cadeia β do monômero clivado).

[0095] Pela análise do conteúdo de cada estado, concluiu-se que a proteína mutada apresentou uma maior proporção de autoprocessamento em relação à proteína selvagem. Além disso, a mutação G10E favoreceu a formação do intermediário de 45 kDa.

[0096] As frações de ASRGL1 (SEQ ID NO: 1) e ASRGL1_G10E (SEQ ID NO: 3) apresentaram diferentes valores de k_{cat} , conforme já era esperado visto que foram encontrados diferentes estados de autoprocessamento intramolecular.

[0097] Considerando que k_{cat} é o número máximo de mols de substrato que pode ser convertido em produto por mol de enzima em uma determinada unidade de tempo, observou-se que ASRGL1_ativa apresentou a maior eficiência enzimática dentre os três estados da asparaginase selvagem, sendo que ASRGL1_inativa_a e ASRGL1_inativa_b apresentaram valores de k_{cat} similares (vide Exemplo 5).

[0098] A mutação proposta pela presente invenção é a primeira modificação da ASRGL1 capaz de elevar as taxas tanto de autoprocessamento como de atividade enzimática. As duas frações de ASRGL1_G10E apresentaram os maiores valores de k_{cat} . A substituição G9A apresentou k_{cat} 0,0126 s⁻¹ e G10A k_{cat} 0,0053 s⁻¹.

[0099] A mutação G10E alcançou o objetivo de aprimorar as reações *in vitro* de autoclivagem e de hidrólise sobre a asparagina, porém estudos posteriores ainda se fazem necessários com o intuito de esclarecer por completo o mecanismo pelo qual essa mutação promoveu tal efeito.

[00100] Em uma concretização, o polipeptídeo da invenção é para uso na prevenção ou tratamento de câncer. Em uma concretização preferida, o câncer é selecionado a partir de leucemia mieloide aguda (LLA), leucemia

linfoide crônica, câncer de ovário, câncer cerebral, câncer de próstata, adenocarcinoma pulmonar, linfoma não Hodgkin e sarcoma (linfosarcoma, reticulosarcoma e melanosarcoma). Em uma concretização mais preferida, câncer é leucemia mieloide aguda (LLA).

[00101] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos aqui descritos.

[00102] Os polinucleotídeos de acordo com a invenção compreendem as sequências de ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID NO: 6-8 e suas degenerações.

[00103] Um técnico no assunto reconheceria que as degenerações são integralmente suportadas com base nas informações fornecidas no pedido e no conhecimento comum do estado da técnica. Por exemplo, a degeneração do código genético (isto é, diferentes códons podendo codificar os mesmos aminoácidos) é um conhecimento comum na técnica e a identidade do aminoácido codificado por cada códon é bem estabelecida.

[00104] Com base nas informações bem conhecidas e estabelecidas no estado da técnica, o técnico no assunto é capaz de identificar as substituições de nucleotídeos que não alteram a sequência de aminoácidos resultante. Por exemplo, se uma sequência de nucleotídeos contiver o códon CTA que codifica para uma leucina, um técnico no assunto entenderia que substituir o "A" por qualquer outro nucleotídeo (ou seja, T, C ou G) ainda resultaria em um códon que codifica para leucina. Assim, quando em posse tanto da sequência de nucleotídeos de um gene quanto da sequência de aminoácidos da proteína codificada, o técnico no assunto identificará facilmente as degenerações que codificam a mesma proteína, com a mesma sequência de aminoácidos.

[00105] O uso dos códons preferidos pode ser adaptado de acordo com a célula hospedeira na qual o ácido nucleico deve ser transcrito. Estas etapas podem ser realizadas de acordo com métodos bem conhecidos do versado na

técnica e dos quais alguns são descritos no manual de referência Sambrook *et al.* (Sambrook et al, 2001).

[00106] Neste sentido, diferentes espécies podem exibir um “códon usage” preferencial. Vide Grantham et al., *Nuc. Acids Res.* 8:1893 (1980), Haas et al. *Curr. Biol.* 6:315 (1996), Wain-Hobson *et al.*, *Gene* 13:355 (1981), Grosjean and Fiers, *Gene* 18:199 (1982), Holm, *Nuc. Acids Res.* 14:3075 (1986), Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158:573 (1982), Sharp and Matassi, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:851 (1994), Kane, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:494 (1995), and Makrides, *Microbiol. Rev.* 60:512 (1996). Como usado aqui, o termo “códon usage preferencial”, ou “códon preferenciais” é um termo usado na arte referindo-se a códon que são mais frequentemente utilizados em células de certas espécies. Por exemplo, o aminoácido treonina (Thr) pode ser codificado por ACA, ACC, ACG, ou ACT, mas em células de mamífero, o ACC é o códon mais comumente utilizado. Em outras espécies, por exemplo, diferentes códon Thr podem ser preferenciais. Códon preferenciais para uma espécie em particular podem ser introduzidos nos polinucleotídeos da presente invenção por uma variedade de métodos conhecidos na arte. A introdução de sequências de códon preferenciais em um DNA recombinante pode, por exemplo, aumentar a produção do polipeptídeo ao tornar a tradução mais eficiente em um determinado tipo de célula. Assim, as sequências de polinucleotídeo da invenção podem ser otimizadas para diferentes espécies.

[00107] Os polinucleotídeos desta invenção são obtidos por métodos já conhecidos no estado da técnica, como aqueles descritos por Sambrook et al. (2001). Por exemplo, sequências adicionais podem ser identificadas e funcionalmente anotadas por comparação de sequências. Portanto, um técnico no assunto pode prontamente identificar uma sequência funcionalmente equivalente aos polinucleotídeos da presente invenção em um banco de dados adequado como, por exemplo, GenBank, usando programas de análise de sequências e parâmetros publicamente disponíveis.

[00108] Em outro exemplo, polinucleotídeos da invenção podem ser obtidos através de uma reação de transcrição-reversa seguida por uma amplificação por PCR. Tanto iniciadores oligo-dT como randômicos podem ser empregados na reação de transcrição reversa para preparar cDNAs de fita simples, a partir do RNA isolado da serpente *L. muta*, que contêm as sequências de interesse. O RNA pode ser isolado por métodos conhecidos como o uso do reagente Trizol (GIBCO-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Maryland).

[00109] Gobinda et al. (PCR Methods Applic. 2:318-22, 1993), descreve “PCR de sítio de restrição (“restriction-site PCR”) como um método direto que utiliza iniciadores universais para obter sequências desconhecidas adjacentes a um locus conhecido. Primeiramente, o DNA genômico é amplificado na presença de um adaptador-*iniciador*, que é homólogo a uma sequência adaptadora ligada às extremidades dos fragmentos de DNA genômico, e na presença de um *iniciador* específico para uma região conhecida. As sequências amplificadas são submetidas a uma segunda rodada de PCR com o mesmo adaptador-*iniciador* e outro iniciador específico, interno ao primeiro. Os produtos de cada rodada de PCR são transcritos com uma RNA polimerase adequada e sequenciada usando uma transcriptase reversa.

[00110] Ainda de forma ilustrativa, o PCR inverso permite a obtenção de sequências desconhecidas começando com iniciadores baseados em uma região conhecida (Triglia, T. et al., Nucleic Acids Res 16:8186, 1988). O método utiliza várias enzimas de restrição para gerar um fragmento na região conhecida do gene. O fragmento é então circularizado por ligação intramolecular e usado como molde para PCR. Iniciadores divergentes são desenhados a partir da região conhecida.

[00111] Além disto, é conhecido que sequências com graus reduzidos de identidade também podem ser obtidos com o auxílio de iniciadores

degenerados e metodologias baseadas em PCR.

[00112] Tipicamente, a sequência de ácido nucleico de um iniciador útil para amplificar moléculas de ácido nucleico por PCR pode ser baseada nas sequências de aminoácidos dos polipeptídeos da invenção representadas, por exemplo, pelas SEQ ID NOs: 3 a 5. Na presente invenção, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as amplificações dos genes codificantes para L-asparaginase humana selvagem (ASRGL1) e L-asparaginase humana mutada (ASRGL1_G10E; SEQ ID NO: 3) estão representados pelas SEQ ID NOs: 9-11.

[00113] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê um cassete de expressão compreendendo um polinucleotídeo de acordo com a invenção operacionalmente ligado às sequências necessárias à sua expressão. Tipicamente, as regiões codificantes e reguladoras são heterólogas entre si.

[00114] Em um quarto aspecto da presente invenção, a presente invenção provê um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo ou um cassete de expressão de acordo com a invenção. Este vetor de expressão pode ser utilizado para transformar uma célula hospedeira e permitir a expressão do ácido nucleico de acordo com a invenção na referida célula.

[00115] Com vantagem, o vetor de expressão compreende elementos reguladores que permitem a expressão do ácido nucleico e elementos que permitem a sua seleção na célula hospedeira de acordo com a invenção. Os métodos para selecionar estes elementos em função da célula hospedeira na qual a expressão é desejada, são bem conhecidos do versado na técnica e amplamente descritos na literatura.

[00116] Os vetores podem ser construídos por técnicas clássicas de biologia molecular, bem conhecidas do versado na técnica. Exemplos não limitantes de vetores de expressão adequados para expressão em células hospedeiras são plasmídeos e vetores virais ou bacterianos.

[00117] Em um quinto aspecto da presente invenção, a presente

invenção provê um polinucleotídeo, cassete de expressão ou um vetor de expressão de acordo com a invenção para transformar ou transfectar uma célula. A célula hospedeira pode ser transformada/transfectada de maneira transitória ou estável e o ácido nucleico, o cassete ou o vetor pode estar contido na célula sob a forma de epissoma ou sob forma cromossômica.

[00118] O polinucleotídeo, cassete de expressão ou o vetor é inserido em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas competentes. Os clones recombinantes são selecionados e então, submetidos à análise por enzimas de restrição e sequenciamento de DNA, possibilitando a confirmação da sequência clonada, utilizando-se para isso métodos, kits e equipamentos amplamente conhecidos por um técnico no assunto.

[00119] Assim, os polipeptídeos da invenção podem ser preparados usando tecnologia de DNA recombinante, em que um cassete ou vetor de expressão compreendendo uma sequência de polinucleotídeo da invenção, por exemplo, que codifica qualquer um dos polipeptídeos de SEQ ID Nos: 3 a 5, é operacionalmente ligada a um promotor. As células hospedeiras são cultivadas em condições apropriadas e o polipeptídeo é expresso. A célula hospedeira pode ser uma célula de bactéria, fungo, planta ou animal. O polipeptídeo é recuperado a partir da cultura, em que a recuperação pode incluir uma etapa de purificação do polipeptídeo. O polipeptídeo recombinante obtido é analisado e tratado de modo a solubilizá-lo, quando pertinente. O polipeptídeo solubilizado é, então, purificado e caracterizado bioquimicamente, utilizando-se, por exemplo, métodos comuns ao campo da bioquímica, como HPLC, SDS-PAGE, *Western Blotting*, focalização isoeletrica com gradiente de pH, dicroísmo circular. Por meio desses métodos, é possível determinar características como, por exemplo, o rendimento da expressão do polipeptídeo recombinante; a determinação das características das estruturas secundárias, além de outras características cuja determinação é importante para o desenvolvimento de um fármaco biotecnológico.

[00120] Os polipeptídeos podem ser expressos “fusionados” à uma etiqueta. O termo “etiqueta” ou o termo em inglês “tag” refere-se a sequências codificadoras incorporadas próximas ao sítio múltiplo de clonagem de um vetor de expressão, possibilitando a sua tradução concomitante e adjacente à sequência do polipeptídeo recombinante clonada. Assim, a etiqueta é expressa fusionada ao polipeptídeo recombinante. Tais etiquetas são bem conhecidas no estado da técnica e incluem compostos e peptídeos como poli-histidina, poli-arginina, FLAG, glutationa-S-transferase, proteína ligante a maltose (MBP), domínio ligante a celulose (CBD), Beta-Gal, OMNI, tioredoxina, NusA, mistina, domínio ligante a quitina, cutinase, compostos fluorescentes (como GFP, YFP, FITC, rodamina, lantanídeos), enzimas (como peroxidase, luciferase, fosfatase alcalina), compostos quimioluminescentes, grupos biotinila, epítomos reconhecidos por anticorpos como zíper de leucina, c-myc, domínios ligantes a metais e sítios de ligação para anticorpos secundários.

[00121] Os polipeptídeos também podem ser obtidos sinteticamente usando métodos conhecidos na arte. Síntese direta dos polipeptídeos da invenção pode ser realizada usando síntese em fase sólida, síntese em solução ou outros meios convencionais, utilizando geralmente grupos de proteção do α -aminogruppo, da α -carboxila e/ou dos grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos. Por exemplo, na síntese em fase sólida, um resíduo de aminoácido adequadamente protegido é ligado através do seu grupo carboxila a um suporte polimérico insolúvel, tais como uma resina reticulada de poliestireno ou poliamida. Métodos de síntese em fase sólida incluem tanto métodos BOC e FMOC, que utilizam tert-butiloxicarbonil, e 9-fluorenilmetiloxicarbonila como grupos protetores α -amino, respectivamente, ambos bem conhecidos pelos técnicos no assunto (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1995).

[00122] Os seguintes grupos protetores podem ser exemplos utilizados para a síntese dos polipeptídeos da invenção: 9-fluorenilmetiloxicarboil (Fmoc), tert-butiloxicarbonil (Boc), carbobenziloxi (Cbz), 2-cloro-3-indenilmetoxicarbonil (Clmoc), benz(f)indeno-3-il-metóxicarbonil (Bimoc), 1,1-dioxobenzo[b]tiofeno-2-il-metoxicarbonil (Bsmoc), 2,2,2-tricloroetóxicarbonil (Troc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonil (Teoc), homobenziloxicarbonil (hZ), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetóxicarbonil (TCBoc), 1-metil-1-(4-bifenil)etoxicarbonil (Bpoc), 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletoxicarbonil (t-Bumeoc), 2-(2'- or 4'-piridil)etoxicarbonil (Pyoc), viniloxicarbonil (Voc), 1-isopropilaliloxicarbonil (Ipaoc), 3-(piridil)aliloxicarbonil (Paloc), p-metoxibenziloxicarbonil (Moz), p-nitrocarbamato (PNZ), 4-azidobenziloxycarbonyl (AZBZ), Benzil (Bn) MeO, BnO, Metoximetil (Mom), metiltiometil (MTM), fenildimetilsililmetoximetil (SMOM), t-butildimetilsilil (TBDMS), benziloximetil (BOM), p-metoxibenziloximetil (PMBM), nitrobenziloximetil (NBOM), p-anisiloximetil (p-AOM), pBuOCH₂O-, 4-penteniloximetil (POM), 2-metoxietóximetil (MEM), 2-(trimetilsilil)etoximetil (SEM), mentoximetil (MM), tetrahidropiranil (THP), -OCOCOPh, Acetil, ClCH₂CO₂-, -CO₂CH₂CCl₃, 2-(Trimetilsilil)etil (TMSE), 2(p-toluenosulfonil)etil (Tse). (Greene T.W. Wuts P.G.M., Protective groups in organic synthesis, 3rd ed., John Wiley & Sons, INC, Nova York, EUA, 1999).

[00123] Após a reação química, os polipeptídeos podem ser separados e purificados por um método de purificação conhecido. Um exemplo de tais métodos de purificação pode incluir uma combinação de extração por solvente, destilação, cromatografia por coluna, cromatografia líquida, recristalização e similares.

[00124] Em um sexto aspecto, é aqui fornecida uma composição farmacêutica que compreende um polipeptídeo com atividade asparaginase de acordo a invenção e pelo menos um carreador ou um excipiente

farmaceuticamente aceitáveis.

[00125] Os carreadores ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis são selecionados em função da apresentação final da composição da presente invenção que pode ser na forma de cápsulas, comprimidos ou solução para a administração oral, solução para administração nasal, solução injetável para administração intramuscular, intravenosa, cutânea ou sub-cutânea.

[00126] Excipientes, carreadores ou estabilizadores farmaceuticamente aceitáveis não apresentam toxicidade ao organismo receptor nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes como ácido ascórbico e metionina; conservantes como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, fenol, álcool butílico, álcool benzílico, alquil parabenos como metil- e propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol e m-cresol; proteínas como albumina, gelatina ou imunoglobulinas; aminoácidos, monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos como glicose, manose, sucrose, manitol ou sorbitol; excipientes poliméricos como polivinilpirrolidonas, Ficoll®, dextrinas e polietileno glicóis; agentes de sabor; adoçantes; agentes anti-estáticos; agentes quelantes como EDTA ou EGTA; sais liberadores de íons como sódio; complexos metálicos; surfactantes não-iônicos como polissorbatos 20 e 80; lipídeos como fosfolipídeos, ácidos graxos e esteroides como colesterol. Métodos para preparação de várias composições farmacêuticas são bem conhecidos, ou serão aparentes à luz da presente invenção, pelo especialista da arte em tecnologia farmacêutica.

[00127] Além disto, as composições podem compreender aditivos com o objetivo de aumentar a facilidade de administração, a capacidade de serem estocadas, a resistência à degradação, a biodisponibilidade, a meia vida, prover preparações isotônicas, etc. Aditivos usais para a preparação de composições farmacêuticas são bem conhecidas na arte.

[00128] Em uma concretização, a composição de acordo com a presente invenção compreende pelo menos um agente quimioterápico adicional selecionado dentre agentes alquilantes, antimetabólitos, inibidores da quinase, alcaloides de planta de veneno antifuso, antibióticos citotóxicos/antitumorais, inibidores de topoisomerase, fotossensibilizadores, antiestrogênios e moduladores de receptor de estrogênio seletivos (SERMs), antiprogesteronas, reguladores descendentes de receptor de estrogênio (ERDs), antagonistas de receptor de estrogênio, agonistas de hormônio de liberação de hormônio luteinizante, antiandrógenos, inibidores de aromatase, inibidores de EGFR, inibidores de VEGF, oligonucleotídeos antissenso que inibem a expressão de genes implicados na proliferação celular anormal ou crescimento do tumor. Os agentes quimioterápicos úteis nos métodos de tratamento da presente invenção incluem agentes citostáticos e/ou citotóxicos.

[00129] As composições farmacêuticas da presente invenção devem compreender uma quantidade terapeuticamente efetiva do polipeptídeo. Para qualquer composto, a dose terapeuticamente efetiva pode ser estimada inicialmente, quer em ensaios de cultura de células, por exemplo, de células neoplásicas, quer em modelos animais, usualmente camundongos, coelhos, cães ou porcos. O modelo animal também pode ser usado para se determinar a faixa de concentração apropriada e a via de administração. Informação desse tipo pode então ser usada para se determinar doses úteis e vias para administração em humanos.

[00130] A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção compreende de 0,1% a 99% p/p, preferivelmente 1% a 60% p/p, particularmente 10% a 50% p/p dos polipeptídeos da presente invenção.

[00131] Conforme a presente invenção, a administração das ditas composições farmacêuticas pode ser realizada pelas vias de administração: oral, sublingual, nasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intra-articular, subcutânea, cutânea, transdérmica, não sendo limitada a estas. Em

uma concretização preferida, a composição da presente invenção é para administração intravenosa.

[00132] Em um sétimo aspecto, a presente invenção provê o uso dos polipeptídeos da invenção na manufatura de um medicamento para prevenção ou tratamento de câncer. Em uma concretização preferida, o câncer é selecionado a partir de leucemia mieloide aguda (LLA), leucemia linfóide crônica, câncer de ovário, câncer cerebral, câncer de próstata, adenocarcinoma pulmonar, linfoma não Hodgkin e sarcoma. Em uma concretização, o sarcoma é selecionado a partir de linfossarcoma, reticulosarcoma e melanosarcoma. Em uma concretização preferida, o câncer é leucemia mieloide aguda (LLA).

[00133] A presente invenção refere-se ainda a um método para produzir polipeptídeo de acordo com a invenção com atividade asparaginase compreendendo a inserção de um polinucleotídeo, um cassete ou um vetor de expressão de acordo com a invenção em um sistema de expressão *in vivo* e a coleta do polipeptídeo produzido pelo referido sistema. Numerosos sistemas de expressão *in vivo*, compreendendo o uso de células hospedeiras adequadas, estão disponíveis no comércio e a utilização destes sistemas é bem conhecida do versado na técnica.

[00134] Sistemas de expressão particularmente adequados incluem microorganismos, como bactérias transformadas com vetores de expressão de DNA recombinante de bacteriófago, plasmídeo ou cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de células de insetos infectadas com vetores de expressão de vírus (por exemplo, baculovírus); sistemas de células de plantas transformados com vetores de expressão de vírus (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV [*cauliflower mosaic virus*]; vírus do mosaico do tabaco, TMV [*tobacco mosaic virus*]) ou com vetores de expressão bacterianos (por exemplo, plasmídeos Ti ou pBR322); ou sistemas de células animais. Também é

possível empregar sistemas de tradução isentos de células para produzir os polipeptídeos da invenção.

[00135] A introdução de polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo da presente invenção em células hospedeiras pode ser realizada por meio de métodos descritos em muitos manuais de laboratório padrão, como Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) e Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989).

[00136] A célula hospedeira transformada ou transfectada descrita acima é depois cultivada em um meio nutriente adequado sob condições conducentes que permitam a expressão dos polipeptídeos imunossupressores da invenção. O meio usado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para desenvolver as células hospedeiras, tal como meio mínimo ou complexo contendo suplementos apropriados. Os meios adequados estão disponíveis a partir de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com receitas publicadas (por exemplo, nos catálogos da American Type Culture Collection). Os polipeptídeos da invenção produzidos pelas células podem ser depois recuperados da célula ou do meio de cultura por procedimentos convencionais incluindo separar as células hospedeiras do meio pela centrifugação ou filtração, precipitando os componentes aquosos de proteína do sobrenadante ou filtrado por meio de um sal, por exemplo, sulfato de amônio, purificação por uma variedade de procedimentos cromatográficos, por exemplo cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia por filtração em gel, cromatografia por afinidade ou similares, dependente do tipo de polipeptídeo em questão.

[00137] De acordo com um oitavo aspecto da invenção é fornecido um método para produzir um polipeptídeo com atividade asparaginase de acordo com a invenção compreendendo:

(a) transferir para uma célula hospedeira um polinucleotídeo da presente invenção para obter uma célula hospedeira transformada ou transfectada;

(b) cultivar a célula hospedeira transformada ou transfectada para obter uma cultura de células;

(c) expressar o polinucleotídeo da presente invenção em uma célula hospedeira transformada ou transfectada para produzir um polipeptídeo; e

(e) isolar o polipeptídeo da presente invenção da célula ou da cultura de célula.

[00138] Em um aspecto particular da invenção, a célula hospedeira é um microrganismo procariótico ou uma célula ou microrganismo eucariótico. Em um aspecto adicional da invenção, dito polipeptídeo é fornecido com uma “tag”.

[00139] Em um nono aspecto da invenção, é fornecido um método de prevenção ou tratamento de câncer, caracterizado por compreender a administração a um indivíduo em necessidade da dita prevenção ou tratamento, de uma quantidade terapeuticamente efetiva de um polipeptídeo de acordo com a invenção.

[00140] A quantidade efetiva precisa para um indivíduo humano dependerá da gravidade do estado de doença, da saúde geral do indivíduo, da idade, do peso, e do sexo do sujeito, da dieta, do tempo e da frequência de administração, da combinação/combinções de drogas, das sensibilidades de reação, e da tolerância/resposta à terapia. Assim, doses a serem fornecidas dependem de um número de fatores que não podem ser mensuradas antes que os estudos de testes clínicos sejam feitos. O técnico no assunto, no entanto, sabe como chegar a doses adequadas para diferentes tratamentos.

[00141] Os exemplos citados a seguir são meramente ilustrativos, devendo ser empregados somente para uma melhor compreensão dos

desenvolvimentos constantes na presente invenção, não devendo, contudo, serem utilizados com o intuito de limitar os objetos descritos.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Clonagem

[00142] O gene sintético para a ASRGL1 foi desenhado com sítios de restrição para as enzimas NdeI e XhoI utilizando a sequência depositada no GenBank (GI:20799289). A síntese do gene e a clonagem no vetor pUC57 (ASRGL1-pUC57) foram realizadas pela empresa GenScript (Nova Jersey, Estados Unidos).

1.1 Desenho dos oligonucleotídeos

[00143] A mutação G10E foi inserida na etapa de amplificação do gene *ASRGL1*, visto que a região alvo encontra-se no início da sequência. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as amplificações dos genes codificantes para L-asparaginase humana selvagem (ASRGL1) e L-asparaginase humana mutada (ASRGL1_G10E) estão descritos na Tabela 1. Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação das L-asparaginases humanas selvagem (ASRGL1) e mutada (ASRGL1_G10E) com seus respectivos sítios de restrição.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Sítio de Restrição	SEQ ID NO:
ASRGL1 <i>Forward</i>	CATATGAATCCCATCGTAGTGGTC	NdeI	SEQ ID NO: 9
ASRGL1_G10E <i>Forward</i>	CATATGAATCCCATCGTAGTGGTCCACG <u>GCGAAGGAGCC</u>	NdeI	SEQ ID NO: 10
ASRGL1 <i>Reverse</i>	CTCGAGTTAGGGAAGGTCGGTGATAGT	XhoI	SEQ ID NO: 11

Nota: O iniciador *ASRGL1 Reverse* foi utilizado para a amplificação de ambas as construções selvagem e mutada. O códon sublinhado no iniciador *ASRGL1_G10E Forward* corresponde a mutação G10E.

1.2 Amplificação gênica por PCR

[00144] As construções ASRGL1 e ASRGL1_G10E foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS et al., 1986) a partir do gene sintético ASRGL1-pUC57 para um volume total de 20 µL, utilizando-se 6,75 ng de DNA, 2 µL de 10X PCR Buffer (Invitrogen), 1,6

μ L de 10 mM dNTPs (Invitrogen), 5 μ M de cada oligonucleotídeo do par, 0,8 μ L de 50 mM MgCl₂, 1 μ L de Taq DNA Polymerase. O programa foi iniciado a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de: 94°C/30s, X°C/30s, 72°C/60s e finalizado a 72°C por 15 minutos. As temperaturas de anelamento (X) utilizadas em cada reação estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Temperaturas de anelamento para a reação de PCR.

Construção	Temperatura de anelamento (X °C)
ASRGL1	58,9
ASRGL1_G10E	86,7

1.3 Eletroforese em gel de agarose

[00145] As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose 1%. Foram utilizados como padrão de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) e MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). As eletroforeses foram realizadas a 90 V por 1 hora. Na Figura 3 são mostrados os referidos padrões de massa molecular, sendo A), 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); B) O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) e C) MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

[00146] A amplificação da sequência codificante de ASRGL1 e ASRGL1_G10E por PCR amplificou uma sequência de tamanho aproximado de 950 pb que corresponde ao tamanho do gene *ASRGL1* (944 pb). Na Figura 4 é mostrado o perfil eletroforético dos produtos de PCR das sequências de ASRGL1 e ASRGL1_G10E. Em A, ASRGL1 (944 pb) (MW: 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) e em B, ASRGL1_G10E (944 pb) (M: O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).

1.4 Extração de DNA do gel de agarose

[00147] Após a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR, as bandas referentes às sequências nucleotídicas desejadas foram excisadas e purificadas utilizando-se eletroforese em agarose de baixa fusão. O DNA foi separado da agarose após incubação a 65°C por 15 minutos e posterior adição de fenol à temperatura ambiente.

1.5 Ligação em vetor de clonagem

[00148] A ligação do inserto em vetor pGEM®-T Easy (Promega), foi feita utilizando-se 3 µL de amostra purificada do gel, 5 µL do Tampão de Ligação 2X (Promega), 1 µL de pGEM®-T Easy (Promega) e 1 µL de T4 DNA Ligase (Promega). A incubação foi a 4°C por 16 horas.

1.6 Preparação de bactérias cálcio-competente

[00149] Para o preparo de bactérias cálcio-competentes, foi utilizado o método de CaCl₂ descrito por Sambrook *et al.* (2001). Uma colônia de *E. coli DH5α* foi inoculada em 5 mL de meio de cultura *Luria-Bertani* (LB; 10,0 g/L de Bacto-triptona; 5,0 g/L de NaCl e 5,0 g/L de Extrato de levedura) contendo antibiótico apropriado. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. Um volume de 1 mL desta cultura foi transferido para 250 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37°C sob as mesmas condições de agitação até alcançar a fase de crescimento exponencial (D.O.600 de 0,6).

[00150] A cultura foi centrifugada a 2.700 x g por 10 minutos a 4°C e as células foram suspensas em 30 mL de Tampão de transformação I e mantidas no gelo durante 15 minutos. A suspensão foi submetida à uma centrifugação de 580 x g por 15 minutos a 4°C, as células foram suspensas em 10 mL de Tampão de transformação II, mantidas no gelo seco por 2 horas e em seguida aliquotadas e armazenadas a -70°C.

1.7 Transformação de bactérias cálcio-competente

[00151] Reações de recombinação ou ligação foram incubadas com 70 µL da suspensão de *E. coli* cálcio-competentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico através da incubação a 42°C por 2 minutos, seguido de incubação por 2 minutos em gelo e posterior adição de 1 mL de meio LB para incubação sob agitação constante de 200 rpm a 37°C por uma hora. Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em meio LB-ágar (meio LB com adição de 1,5% de ágar-ágar) adicionado de

antibiótico (meio seletivo) de acordo com a resistência conferida pelo vetor utilizado na transformação de bactérias e incubadas a 37°C por 16 horas.

[00152] Particularmente no caso de clonagem em pGEM-T Easy, o meio LB-ágar foi adicionado de 100 µg/mL de ampicilina, 0,04 mg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) e 0,4 mM de indutor isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Neste caso, a seleção dos clones positivos foi feita pela análise da cor das colônias, devido à presença ou ausência da expressão da enzima β-galactosidase. Esta, cuja expressão é induzida por IPTG, degrada o substrato X-gal produzindo um substrato azul. Caso o fragmento seja incorporado ao vetor, a enzima β-galactosidase não é expressa e as colônias permanecem brancas, facilitando a identificação dos clones positivos, que posteriormente foram sequenciados.

1.8 Extração do DNA plasmidial em pequena escala

[00153] Os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial extraído. Para tal, uma colônia foi selecionada e incubada em 5 mL de meio LB sob agitação de 200 rpm a 37 °C durante 16 horas. As células bacterianas foram centrifugadas e suspensas em 250 µL de Tampão contendo 50 mM glucose, 25 mM Tris HCl pH 8,0 e 10 mM EDTA pH 8,0. Foi adicionado 250 µL de Tampão contendo NaOH 0,2N, SDS 1% seguido de agitação para rompimento das células, e adição imediata de Tampão Acetato de Potássio 3 M, Ácido Acético Glacial 11.5%(v/v). Após centrifugação para remoção dos restos celulares, a fração contendo ácido nucléico foi separada pela incubação com fenol:clorofórmio (1:1). A precipitação dos plasmídeos ocorreu por adição de Etanol e posterior suspensão em 10 mM Tris-HCl pH 8.5.

1.9 Seleção dos plasmídeos

[00154] A seleção primária foi realizada por ensaio de digestão analítica, em que os vetores previamente extraídos foram incubados com as enzimas de restrição flanqueando a região de interesse. As enzimas utilizadas para os genes de ASRGL1 e ASRGL1_G10E foram as enzimas

FastDigest™ *NdeI* e *XhoI* (Thermo Scientific), com tampão e concentração de reagentes indicadas pelo fabricante. Para seleção dos plasmídeos as reações foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose.

[00155] Os plasmídeos selecionados foram sequenciados pelo serviço de sequenciamento do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR. O sequenciamento usado é o Single Extension. Após preparação da amostra realizada pela empresa Macrogen (Coreia), a amostra é precipitada com etanol e sequenciada utilizando *Automatic Sequencer 3730xl*. O resultado comprovou a identidade das L-asparaginases humanas contidas nesses clones.

[00156] A Figura 5 mostra o perfil eletroforético da digestão analítica após a clonagem dos produtos de PCR ASRGL1 e ASRGL1_G10E em pGEM-T Easy. Em A, ASRGL1_pGEM-T Easy (inserto com 944 pb) (M: 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); e em B, ASRGL1_G10E_pGEM-T Easy (inserto com 944 pb) (M: MassRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific).

1.10 Ligação de insertos ao vetor de expressão e transformação

[00157] Após a confirmação da identidade das construções plasmidiais (vetor de clonagem recombinante contendo o inserto) enviadas ao sequenciamento, foi realizada a digestão preparativa em que os vetores pGEM-T Easy foram incubados com as enzimas FastDigest™ *NdeI* e *XhoI* (Thermo Scientific) de acordo com as indicações do fabricante. Após a eletroforese em gel de agarose os insertos foram purificados pelo QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN).

[00158] Os insertos purificados foram subclonados no vetor de expressão pET28a-TEV. Utilizou-se 2 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen), 2 µL de 5X DNA Ligase Buffer (Invitrogen) e inserto:plasmídeo na proporção 1:1,5. O volume final foi de 10 µL e a reação incubada por 16 horas a 4 °C. O vetor pET28a-TEV havia sido previamente digerido com as mesmas enzimas. Após a ligação do inserto no vetor, fez-se a transformação na cepa DH5α ({F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+)

supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1 phoA}), seguindo o protocolo de transformação por choque térmico descrito no item 1.7. A confirmação dos vetores de expressão contendo os insertos foi realizada também por digestão analítica seguida de submissão a sequenciamento.

[00159] A Figura 6 mostra o perfil eletroforético da digestão analítica após a subclonagem em vetor de expressão pET28a-TEV. Em A, ASRGL1_pET28a-TEV (inserto com 944 pb) e B, ASRGL1_G10E_pET28a-TEV (inserto com 944 pb).

EXEMPLO 2: Teste de expressão

[00160] Os vetores de expressão ASRGL1-pET28a-TEV e ASRGL1_G10E-pET28a-TEV foram utilizados para transformar as cepas *E. coli* BL21 Star (DE3; {F-*ompT hsdSB* (rB-, mB-) *galdcmrne131* (DE3)}) e/ou *E. coli* C43 (DE3; {F-*ompT hsdSB* (rB-, mB-) *galdcm* (DE3)}) e, assim, testar a expressão nas temperaturas de 37, 30 e 20°C.

[00161] A cepa BL21 Star (DE3), derivada da cepa usada para expressão da ASRGL1 por Cantor *et al* (2009), é indicada para altos níveis de expressão baseada em vetores regulados pelo promotor T7 (como o pET28a-TEV). Isso por apresentarem uma mutação no gene *rne131* que codifica para a enzima RNase E, uma endonuclease que participa da degradação do mRNA. A mutação no gene dessa endonuclease permite uma maior estabilidade ao mRNA transcrito e, assim, um aumento na expressão da proteína de interesse (GRUNBERG-MANAGO *et al*, 1999).

[00162] A cepa *E. coli* C43 (DE3) foi também testada por estar em conformidade com o protocolo descrito por Nomme *et al* (2012). Essa é uma cepa efetiva na expressão de proteínas tóxicas de todos os organismos, inclusive mamíferos. O nível de atividade da T7 RNAP é reduzido através de uma mutação, reduzindo assim a morte celular associada a super expressão de muitas proteínas tóxicas (DUMON-SEGNOVERT *et al*, 2004).

[00163] Uma colônia isolada foi crescida por 16 horas a 37°C sob

agitação de 200 rpm em 5 mL de meio LB contendo canamicina (25 µg/ml). Após esse período uma diluição (1:100) foi realizada e a cultura crescida a 37°C até a fase log de crescimento ser atingida (D.O.600 0.8). Neste ponto, uma alíquota foi separada e a cultura foi induzida com 0,5 mM de indutor isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A incubação foi continuada por 4 horas a 37°C, 30°C e 20°C. Para o teste a temperatura de 20°C a cultura foi induzida com IPTG somente ao atingir D.O.600 1,2.

[00164] As células foram coletadas por centrifugação a 6.000 x g por 15 minutos a 4°C e ressuspendidas em 1 mL de Tampão A (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM). Após incubação de 30 minutos com lisozima (10 µg/mL), a lise foi feita por sonicação, dando-se 2 pulsos de 15 segundos com intervalo de 30 segundos (Ultrasonic Processor 500, Cole Parmer). Após centrifugação por 30 minutos a 20.000 x g a 4°C foram separados pellet e sobrenadante, referentes às frações insolúvel e solúvel, respectivamente. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de Tampão A com adição de ureia 8 M. Para a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) foram adicionados 5 µL de tampão de amostras de proteínas 4X a 15 µL de alíquota retirada em cada passagem (extrato total e, após a centrifugação, pellet e sobrenadante, correspondendo às frações insolúvel e solúvel respectivamente), incubando-se a 95°C por 5 minutos para aplicação em géis preparados pelo protocolo tradicional (LAEMMLI, 1970). As amostras preparadas foram aplicadas em géis separador (13% de bis acrilamida) e concentrador (5% de bis acrilamida). O marcador de peso molecular utilizado foi Precision Plus Protein™ Standards Unstained (BioRad).

EXEMPLO 3: Ensaio de autoprocessoamento

3.1 Expressão e purificação por resina de níquel

[00165] Para a avaliação da eficiência de autoclivagem das proteínas recombinantes foi realizada a expressão em *E. coli* BL21 Star (DE3; {F-ompT hsdSB (rB-, mB-) galdcmrne131 (DE3)}). Inoculou-se uma colônia isolada

em 5 mL de meio LB contendo 25 µg/mL de canamicina. Após crescimento por 16 horas a 37°C e 200 rpm foi realizada uma diluição 1:100 dessa cultura em 500 mL de meio LB acrescidos de 25 µg/mL de canamicina. O crescimento da cultura até o alcance da fase exponencial de crescimento (D.O.600 0,8) ocorreu sob agitação de 200 rpm a 37°C. Foi então adicionado 0,5 mM do indutor IPTG e o crescimento prosseguiu por mais 4h nas mesmas condições.

[00166] As culturas foram centrifugadas a 6.000 x g por 15 minutos a 4°C e suspensas em Tampão A com adição de 10 mg/ml de lisozima. Após uma incubação de 30 minutos em gelo, a lise foi realizada através de 8 ciclos de sonicação com pulsos de 30 segundos e intervalos de 60 segundos. Pellet e sobrenadante foram separados como fração insolúvel e solúvel, respectivamente, por centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos a 4°C.

[00167] As frações solúveis foram submetidas à purificação em resina com níquel (Ni-NTA Superflow, QIAGEN) através das seguintes etapas: incubação da fração solúvel com a resina de níquel por 1 hora sob agitação; centrifugação e remoção do sobrenadante (denominado *Flow through*, por corresponder a fração que não se ligou à coluna); lavagem por incubação com Tampão A acrescido de imidazol 50 mM; centrifugação e remoção do sobrenadante (eluição com 50 mM imidazol); lavagem por incubação com Tampão A mais imidazol 100 mM; centrifugação e remoção do sobrenadante (eluição com 100 mM imidazol); eluição com Tampão B (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM); centrifugação e remoção do sobrenadante (eluição com 500 mM imidazol). *Flow through* e as frações da eluição foram avaliados por eletroforese SDS-Page 13%.

3.2 Western blot

[00168] A eficiência do autoprocessamento foi verificada através da visualização das bandas correspondentes a cada estado na técnica de *Western blot* (TOWBIN *et al.*, 1979). Inicialmente as amostras foram submetidas à

eletroforese em gel SDS-Page 13%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas por 50 minutos a 20 V para uma membrana de PVDF, previamente sensibilizada com metanol 100%, em sistema Semidry. Terminada a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau para verificação da qualidade da transferência e, em seguida, decorada com água para incubação por 30 minutos com solução de bloqueio em temperatura ambiente. Após esse período foram realizadas três lavagens de 5 minutos com Tampão PBS – TWEEN 20.

[00169] A membrana contendo as proteínas foi então incubada em Tampão PBS - TWEEN 20 (PBS -Tween 20 0,1%) contendo o anticorpo primário (anti-his) em diluição 1:3.000. Essa incubação foi realizada sob agitação a 4°C por 2 horas. Após as etapas de lavagem conforme descrito acima, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-mouse conjugado a peroxidase, Sigma) em diluição 1:10.000 em Tampão PBS – TWEEN 20 por 1 hora sob agitação a 4°C.

[00170] A membrana então foi novamente lavada para revelação por quimioluminescência. A solução de luminol e peroxidase na proporção 1:1 (SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) foi distribuída sobre a membrana conforme as indicações do fabricante e revelada por meio de exposições de 5 a 20 minutos no fotodocumentador L-Pix Chemi Express (Loccus) através do Software L-Pix Image.

EXEMPLO 4: Expressão e Purificação das proteínas recombinantes

4.1 Expressão

[00171] A expressão em larga escala de ASRGL1 e ASRGL1_G10E em *E. coli* BL21 Star (DE3; {F-ompT hsdSB (rB-, mB-) galdcmrne131 (DE3)}) foi realizada da seguinte forma: Uma colônia isolada foi crescida por 16 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm em 5 mL de meio LB contendo canamicina (25 µg/ml). Após esse período uma diluição (1:100) foi realizada e a cultura crescida a 37°C até a fase log de crescimento ser atingida (D.O.600

0.8). Neste ponto, uma alíquota foi separada e a cultura foi induzida com 0,5 mM de indutor isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A incubação foi continuada por 4 horas a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação a 6.000 x g por 15 minutos a 4°C.

4.2 Preparo da amostra

[00172] Após ressuspensão dos pellets em Tampão C (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM), fez-se a lise através de 8 a 12 passagens sob uma pressão de 80 psi em microfluidificador (M-110L Microfluidizer®, Microfluidics) seguida de centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos a 4°C. Para a purificação foram reservadas as frações solúveis.

4.3 Purificação de ASRGL1

4.3.1 Cromatografia de afinidade

[00173] O vetor de expressão pET28a-TEV permite que a proteína recombinante seja expressa fusionada a uma cauda N-terminal de histidina, o que viabiliza o uso de colunas cromatográficas contendo níquel imobilizado em fase sólida para o processo de purificação, uma vez que a cauda de histidina apresenta afinidade por este metal. Para realização desse método cromatográfico foram utilizados os tampões C (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM) e D (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, Imidazol 1M).

[00174] A cromatografia de afinidade em coluna de níquel foi realizada no sistema Äkta (modelos Äkta Pure M25 ou Äkta Purifier UPC 100, GE Healthcare) FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography, Amersham Bioscience) em coluna HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare). A coluna foi primeiramente equilibrada em tampão C (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM). Em seguida a amostra foi injetada e a coluna foi lavada com tampão C para remoção das proteínas não ligadas. Durante a purificação foi utilizado um gradiente de 0-100% de tampão D (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, Imidazol 1M) para eluição das proteínas em 20 volumes de coluna, visto que o imidazol compete com a histidina pela ligação ao Níquel imobilizado na

coluna. Dependendo da amplitude do sinal de absorvância, o gradiente de tampão D foi retido visando melhorar a eficiência de separação na cromatografia. As frações provenientes da cromatografia foram coletadas com um fluxo de 1 mL por minuto e analisadas através de SDS-Page. As frações que continham a proteínas de interesse na sua forma mais pura foram unidas e concentradas por centrifugação a 3.000 x g utilizando-se filtros Amicon Ultra 10 (10000 MWCO, Millipore).

4.3.2 Cromatografia de troca iônica

[00175] Para alcançar um maior nível de pureza das amostras de ASRGL1, foi necessária a realização da cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q FF (GE Healthcare). Para tanto as amostras foram diluídas 10X em tampão E (TrisHCl 50 mM pH 7,4) para redução da concentração de sal. O pH 7,4 do tampão E foi escolhido considerando-se a carga positiva da resina e observando-se que o pI teórico de ASRGL1 é igual a 6,27 (software ExPASy ProtParam), quando então a proteína se encontrará carregada negativamente (troca aniônica) possibilitando uma interação eficiente com a coluna.

[00176] Em sistema Äkta FPLC a coluna foi equilibrada em tampão E e após a injeção da amostra foi lavada com tampão E. A eluição ocorreu em 20 volumes de coluna através de um gradiente 0-100% de tampão F (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 1 M), cuja alta concentração de sal promove o desligamento das proteínas da coluna. Novamente, fez-se uso de retenções no gradiente conforme a absorvância. As frações que continham a proteínas de interesse na sua forma mais pura foram unidas e concentradas por centrifugação a 3.000 x g utilizando-se filtros Amicon Ultra 10 (10000 MWCO, Millipore).

4.3.3 Cromatografia de gel filtração

[00177] Para remoção completa dos contaminantes, as frações de ASRGL1 concentradas na etapa cromatográfica anterior foram submetidas à

cromatografia de gel filtração utilizando-se coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) em sistema Äkta FPLC. O volume de amostra aplicado variou entre 320 e 450 μL e a eluição da proteína selvagem foi feita em 1,5 volumes de coluna de tampão G (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 180 mM) ou H (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 470 mM) de acordo com a concentração de sal observada na cromatografia de troca iônica, com fluxo de 0,5 mL por minuto. A cromatografia de gel filtração é um método de análise de macromoléculas e que consiste na separação de biomoléculas de acordo com seu tamanho e forma. A coluna neste processo contém um polímero com ligações cruzadas com poros de tamanho definido. As moléculas maiores irão migrar mais rapidamente que as menores, pois não são capazes de penetrar no interior dos poros da resina, eluindo diretamente da coluna. As moléculas menores, por entrarem pelos poros da coluna, e levarem mais tempo percorrendo os poros, são eluídas tardiamente em relação as moléculas maiores.

4.4 Purificação de ASRGL1_G10E

4.1 Cromatografia de afinidade

[00178] A cromatografia de afinidade de ASRGL1_G10E foi realizada em sistema Äkta FPLC em coluna HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare). A coluna foi primeiramente equilibrada em tampão C. Em seguida a amostra foi injetada e a coluna foi lavada com tampão C ((TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM) para remoção das proteínas não ligadas. Foram realizadas duas etapas de eluição, a primeira em 10 volumes de coluna com um gradiente de 0-15% de tampão D (TrisHCl 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, Imidazol 1M), e a segunda etapa com 15-100% de tampão D em 10 volumes de coluna.

[00179] As frações de interesse foram unidas e concentradas, mas por apresentaram consistente presença de contaminantes foi realizada uma segunda cromatografia de afinidade, valendo-se da mesma metodologia. Apenas foi alterada a primeira etapa de eluição, na qual houve um aumento

para 20 volumes de coluna. As frações resultantes foram analisadas por SDS-Page e *Western blot*, seguidas de concentração por centrifugação.

4.2 Cromatografia de troca iônica

[00180] A cromatografia de troca iônica de ASRGL1_G10E apresentou o mesmo caráter aniônico da cromatografia realizada com ASRGL1, pois em pH 7,4 do tampão E ASRGL1_G10E (pI 5,81) encontra-se carregada negativamente. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.8.3.2, inclusive a preparação da amostra para aplicação na coluna HiTrap Q FF (GE Healthcare). As frações provenientes dessa cromatografia foram concentradas individualmente para utilização nos ensaios descritos nos Exemplos 5 e 6.

EXEMPLO 5: Ensaios enzimáticos

[00181] A atividade cinética das enzimas foi avaliada através do ensaio AHA (FRAER; BURREL, 1955; VERMA, 2005; LI *et al.*, 2012).

[00182] As reações com as enzimas ASRGL1 e ASRGL1_G10E foram realizadas com 0,004 mg de cada fração, 10 µL de solução de AHA (AHA 10 mM) e quantidade suficiente do tampão de reação para um volume total de 200 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 10 minutos seguidas da adição da solução de TCA para interromper a reação. Após a adição de 1000 µL da solução Oxin as amostras foram aquecidas a 95°C por 1 minuto e em seguida resfriadas por 10 minutos a 4°C para posterior leitura a 705 nm (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek).

[00183] Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em µmols de aspartato gerados na reação através da equação:

$$\mu\text{mol de aspartato na reação} = \left(\frac{DO_{705}}{1,77 \cdot 10^4} \right) \cdot 0,26 \cdot 10^6$$

[00184] A quantidade de aspartato gerado na reação é então convertido em atividade enzimática experimental (µmols de aspartato gerado por mL de enzima) pela equação:

$$\text{Atividade enzimática experimental} = \frac{\mu\text{mol de aspartato na reação}}{\text{volume de enzima} \cdot \text{tempo de reação} \cdot \text{volume total da reação}}$$

[00185] Para cálculo dos valores de *k_{cat}* de cada fração é dividida a velocidade de reação pela concentração total de enzima na reação, onde a velocidade é calculada através da divisão da quantidade em μmols de aspartato gerado na reação pelo tempo total de reação em segundos.

[00186] Os parâmetros cinéticos da hidrólise de AHA das frações de ASRGL1 e ASRGL1_G10E são conforme indicados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos da hidrólise de AHA das frações de ASRGL1 e ASRGL1_G10E. Os valores de atividade enzimática experimental encontram-se em μmols de aspartato gerado por ml de enzima.

Amostra	<i>K_{cat}</i> (s ⁻¹)	Atividade enzimática experimental
ASRGL1_inativa_a	0,1 ± 0,05	5,87 ± 2,94
ASRGL1_inativa_b	0,13 ± 0,04	7,83 ± 2,61
ASRGL1_ativa	0,32 ± 0,12	9,55 ± 3,67
ASRGL1_G10E_ativa_a	4,73 ± 0,13	143,95 ± 3,92
ASRGL1_G10E_ativa_b	3,35 ± 0,07	101,85 ± 2,28

EXEMPLO 6: Fluorimetria de varredura diferencial

[00187] Cada fração das proteínas selvagem e mutante foram diluídas a 2 μM no tampão de eluição da última etapa cromatográfica e dispensada em uma microplaca de PCR de 96 poços (Axygen). 200X de SYPRO *Orange* (SYPRO® *Orange* protein gel stain, Life Technologies) foram adicionados a cada poço para um volume final de 25 μL . Cada fração foi testada em triplicata. As placas foram seladas com selo adesivo (Adhesive PCR Film, Thermo Scientific) para prevenir qualquer evaporação. O experimento foi conduzido em máquina de PCR Real-Time 7500 (Applied Biosystems).

[00188] A determinação da T_M de cada fração foi realizada através do software OriginProB. Para isso, foi feito o ajuste dos dados pelo modelo de regressão sigmoidal de Boltzmann, onde o ponto de inflexão representa a T_M .

REFERÊNCIAS

1. DOLOWY, W.C., HEMNISON, D., CORNET, J., SELLIN, H. Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. *Cancer* **19**, 1813–1819 (1966).

2. Hill, J. M. *et al.* L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **202**, 882–8 (1967).
3. Pejovic, T. & Schwartz, P. E. Leukemias. *Clin. Obstet. Gynecol.* **45**, 866–878 (2002).
4. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. *Ministério da Saúde* (2015). Available at: <http://www.inca.gov.br>. (Accessed: 1st July 2016)
5. Rose-Inman, H. & Kuehl, D. Acute leukemia. *Emerg. Med. Clin. North Am.* **32**, 579–96 (2014).
6. Avramis, V. I. Asparaginases: Biochemical pharmacology and modes of drug resistance. *Anticancer Res.* **32**, 2423–2437 (2012).
7. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. *INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva* (2016). doi:978-85-7318-283-5
8. Moghrabi, A. *et al.* Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood J.* **109**, 896–905 (2007).
9. Carroll, W. L. *et al.* Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Program* 102–131 (2003). doi:10.1182/asheducation-2010.1.363
10. Cooper, S. L. & Brown, P. A. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Clin. North Am.* **62**, 61–73 (2015).
11. Hunger, S. P. *et al.* Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: A report from the children's oncology group. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1663–1669 (2012).
12. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. *Cancer Facts Fig.* 1–72 (2014). doi:10.1177/0300985809357753
13. Richards, N. G. J. & Kilberg, M. S. Asparagine synthetase chemotherapy.

Annu. Rev. Biochem. **75**, 629–54 (2006).

14. Li, B. S. *et al.* The downregulation of asparagine synthetase expression can increase the sensitivity of cells resistant to l-asparaginase. *Leukemia* **20**, 2199–201 (2006).

15. Song, P. *et al.* Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget* **6**, 3861–73 (2015).

16. Li, B. S. *et al.* The downregulation of asparagine synthetase expression can increase the sensitivity of cells resistant to L-asparaginase. *Leukemia* **20**, 2199–2201 (2006).

17. Pieters, R., Hunger, S. P., Boos, J., Rizzari, C. & Pui, C. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *Cancer* **117**, 238–249 (2011).

18. Ueno, T. *et al.* Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* **11**, 1858–61 (1997).

19. Yu, M. *et al.* L-asparaginase inhibits invasive and angiogenic activity and induces autophagy in ovarian cancer. **16**, 2369–2378 (2012).

20. Willems, L. *et al.* Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. **122**, 3521–3532 (2013).

21. Zhang, B. *et al.* Targeting asparagine and autophagy for pulmonary adenocarcinoma therapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 9145–9161 (2016).

22. Lorenzi, P. L., Claerhout, S., Mills, G. B. & Weinstein, J. N. A curated census of autophagy-modulating proteins and small molecules. *Autophagy* **10**, 1316–1326 (2014).

23. Panosyan, E. H. *et al.* Asparaginase depletion potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors. *Mol Cancer Res* **12**, 694–702 (2014).

24. Sircar, K. *et al.* Integrative molecular profiling reveals asparagine synthetase is a target in castration-resistant prostate cancer. *Am. J. Pathol.* **180**, 895–903 (2012).
25. Kobrinsky, N. L. *et al.* Outcomes of Treatment of Children and Adolescents With Recurrent Non-Hodgkin ' s Lymphoma and Hodgkin ' s Chemotherapy , and Transplantation : Children ' s Cancer Group Study CCG-5912. *J. Clin. Oncol.* **19**, 2390–2396 (2001).
26. Bansal, S. *et al.* Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity: structural insights on their mechanism of action. *FASEB J.* **26**, 1161–1171 (2012).
27. Roth, G. *et al.* L-ASPARAGINASE II PRODUCTION IN *Escherichia coli* FED-BATCH CULTURES. *Braz. J. Chem. Eng.* **30**, 245–256 (2013).
28. Rytting, M. E. Role of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: focus on adult patients. *Blood Lymphat. Cancer Targets Ther.* **2**, 117–124 (2012).
29. Müller, H. J. & Boos, J. Use of L -asparaginase in childhood ALL. *Oncology/Hematology* **28**, 97–113 (1998).
30. Patel, N. *et al.* A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *J. Clin. Invest.* **119**, 1964–1973 (2009).
31. Avramis, V. I. & Tiwari, P. N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 241–254 (2006).
32. Oinonen, C., Tikkanen, R., Rouvinen, J. & Peltonen, L. Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 1102–1108 (1995).
33. Sugimoto, H., Odani, S. & Yamashita, S. Cloning and expression of cDNA encoding rat liver 60-kDa lysophospholipase containing an asparaginase-like region and ankyrin repeat. *J. Biol. Chem.* **273**, 12536–12542

(1998).

34. Cantor, J. R., Stone, E. M., Chantranupong, L. & Georgiou, G. The Human Asparaginase-Like Protein 1 hASRGL1 is an Ntn-Hydrolase with β -aspartyl Peptidase Activity. *Biochemistry (Mosc.)* **48**, 11025–11031 (2009).
35. Böhme, L. *et al.* Isoaspartate residues dramatically influence substrate recognition and turnover by proteases. *Biol. Chem.* **389**, 1043–1053 (2008).
36. Michalska, K. & Jaskólski, M. Structural aspects of L -asparaginases , their friends and relations. *Acta Biochim. Pol.* **53**, 627–640 (2006).
37. Dieterich, D. C. *et al.* Gliap) a novel untypical L -asparaginase localized to rat brain astrocytes. 1117–1125 (2003). doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01766.x
38. Evtimova, V., Zeillinger, R., Kaul, S. & Weidle, U. H. Identification of CRASH, a gene deregulated in gynecological tumors. *Int. J. Oncol.* **24**, 33–41 (2004).
39. Brannigan, J. A. *et al.* A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**, 416–419 (1995).
40. Bush, L. A. N. N. *et al.* A Novel Asparaginase-Like Protein Is a Sperm Autoantigen in Rats. **247**, 233–247 (2002).
41. 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. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 6816–6826 (2012).
42. Li, W. *et al.* Intramolecular Cleavage of the hASRGL1 Homodimer Occurs in Two Stages. *Biochemistry (Mosc.)* **55**, 960–969 (2016).
43. Nomme, J., Su, Y. & Lavie, A. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human L-Asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **426**, 2471–2485 (2014).
44. Su, Y. *et al.* Free glycine accelerates the autoproteolytic activation of human asparaginase. *Chem. Biol.* **20**, 533–540 (2013).

45. Li, W., Cantor, J. R., Yogesha, S. D., Yang, S. & Chantranupong, L. Uncoupling Intramolecular Processing and Substrate Hydrolysis in the N-terminal Nucleophile Hydrolase hASRGL1 by Circular Permutation. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1840–1847 (2012).
46. Karamitros, C. S. & Konrad, M. Bacterial co-expression of the alpha and beta protomers of human l-asparaginase-3: Achieving essential N-terminal exposure of a catalytically critical threonine located in the beta-subunit. *Protein Expr. Purif.* **93**, 1–10 (2014).
47. Schalk, A. M. & Lavie, A. Structural and Kinetic Characterization of Guinea Pig. *Biochemistry (Mosc.)* **53**, 2318–2328 (2014).

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo com atividade asparaginase, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo que consiste em:

(i) um polipeptídeo que possui taxa de autoprocessamento aumentada em comparação à L-asparaginase humana selvagem apresentada na SEQ ID NO: 1;

(ii) um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com as sequências de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3-5;

(iii) um polipeptídeo em que o aminoácido glicina na posição 10 da SEQ ID NO: 1 é substituído por um aminoácido selecionado do grupo consistindo em ácido glutâmico, ácido aspártico e histidina;

(iv) um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido apresentada em qualquer uma das SEQ ID NO: 3-5; e

(v) um polipeptídeo de (i) a (iv) compreendendo uma ou mais substituições conservativas de aminoácidos.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de ser para uso na prevenção ou tratamento de câncer.

4. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia mieloide aguda (LLA), leucemia linfóide crônica, câncer de ovário, câncer cerebral, câncer de próstata, adenocarcinoma pulmonar, linfoma não Hodgkin ou sarcoma.

5. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o sarcoma é linfosarcoma, reticulosarcoma ou melanosarcoma.

6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia mieloide aguda.

7. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica o polipeptídeo como definido na reivindicação 1 ou 2.

8. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por compreender a sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID NO: 6-8 e suas degenerações.

9. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo como definido na reivindicação 7 ou 8 operacionalmente ligado a um promotor e a um terminador de transcrição.

10. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo como definido na reivindicação 7 ou 8 ou um cassete de expressão como definido na reivindicação 9.

11. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de compreender um cassete de expressão como definido na reivindicação 9, ou um vetor de expressão como definido na reivindicação 10.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido na reivindicação 1 ou 2 e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que é para administração intravenosa.

14. Composição de acordo com a reivindicação 12 e 13, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um agente quimioterápico adicional.

15. Uso de um polipeptídeo como definido na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para prevenção ou tratamento de câncer.

16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia mieloide aguda (LLA), leucemia linfóide crônica, câncer de ovário, câncer cerebral, câncer de próstata, adenocarcinoma pulmonar, linfoma não Hodgkin ou sarcoma.

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o sarcoma é linfossarcoma, reticulosarcoma ou melanosarcoma.

18. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia mieloide aguda.

19. Método para produzir um polipeptídeo com atividade asparaginase, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) fornecer uma célula hospedeira como definida na reivindicação 11;

(b) cultivar dita célula em condições conducentes para a produção do polipeptídeo; e

(c) isolar dito polipeptídeo de dita célula ou do meio de cultura circundando dita célula.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é fornecido com uma etiqueta.

21. Método para prevenir ou tratar câncer, caracterizado pelo fato de compreender administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo como definido na reivindicação 1 e 2 a um indivíduo em necessidade da dita prevenção ou tratamento.

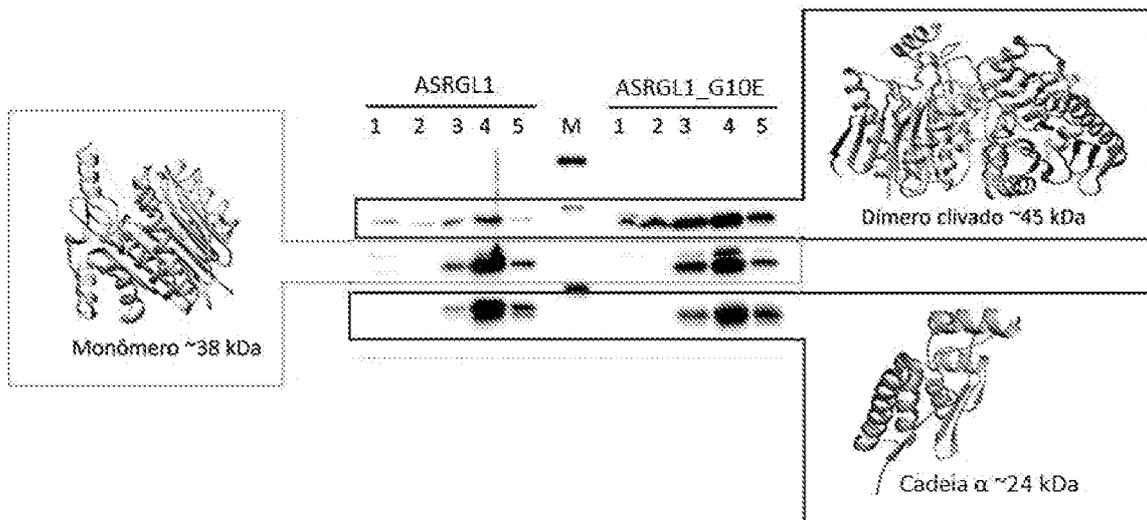
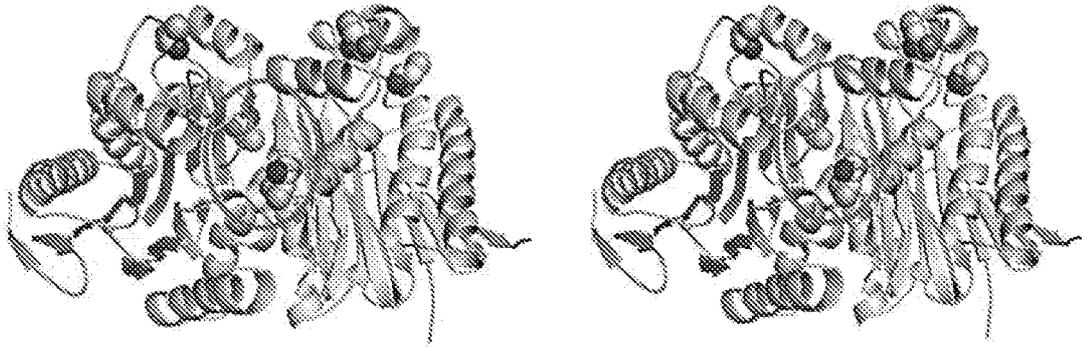


FIGURA 1

A



B

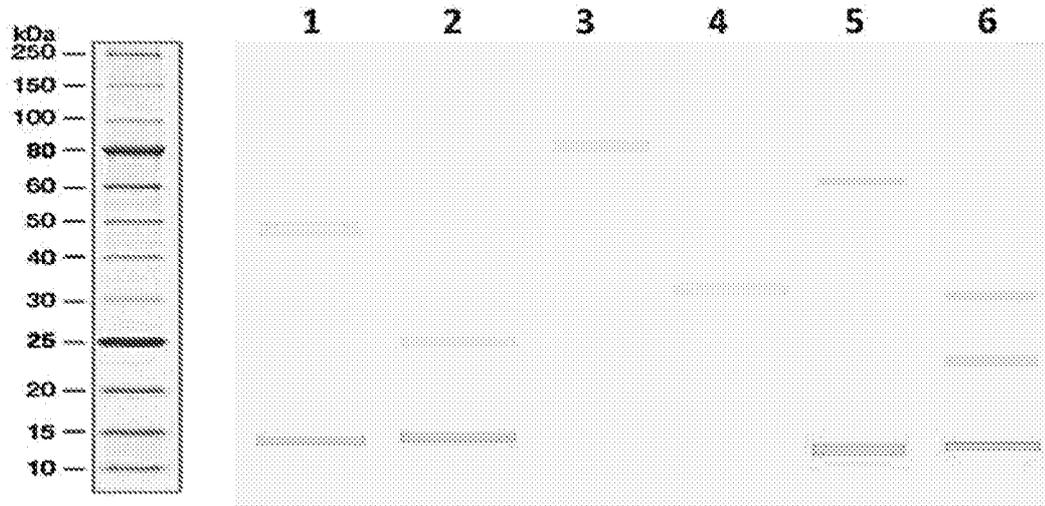


FIGURA 2

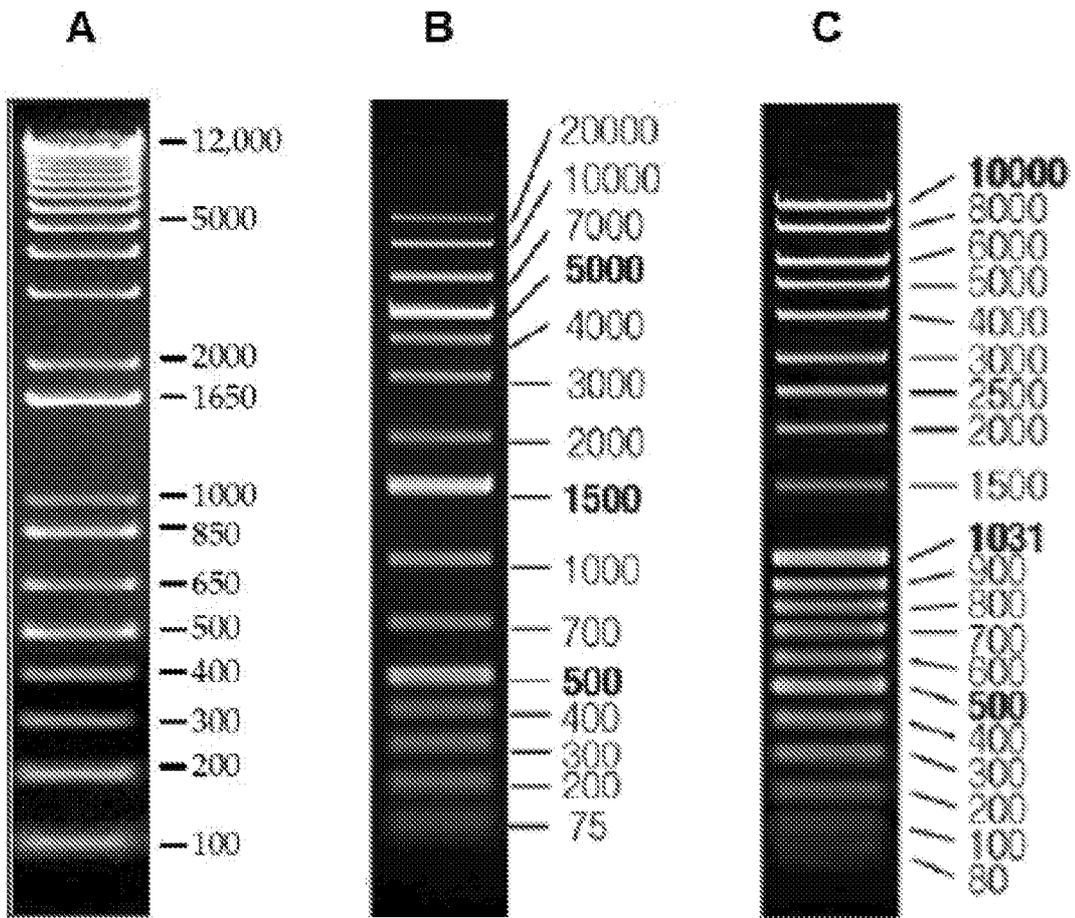


FIGURA 3

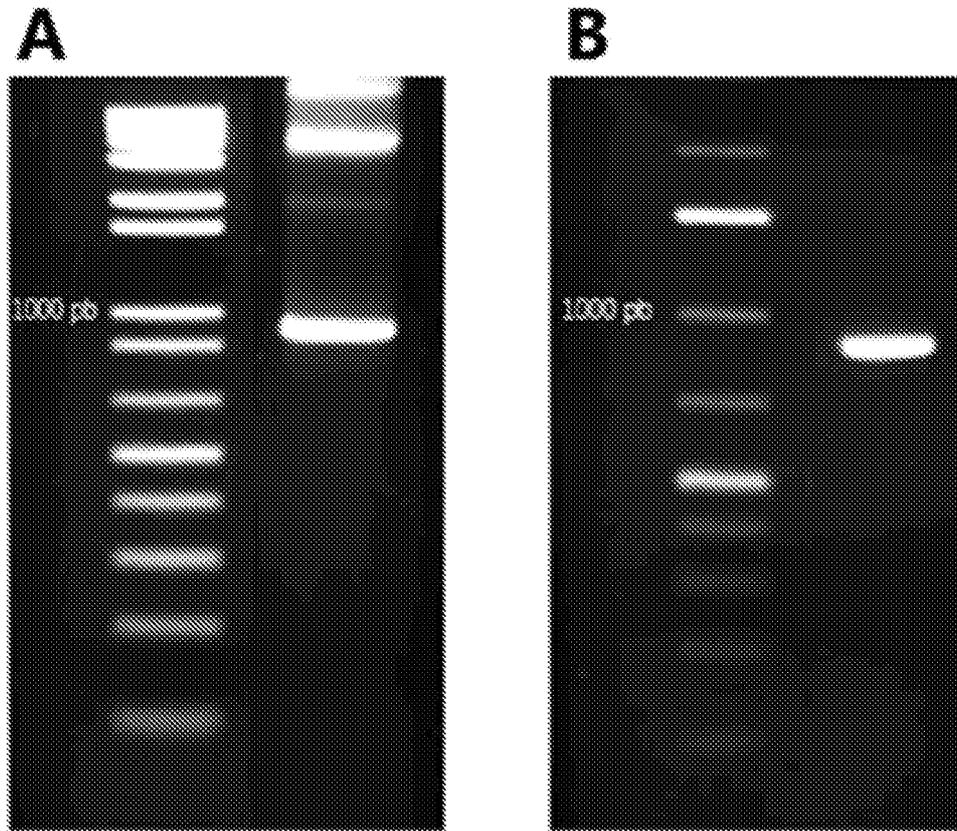


FIGURA 4

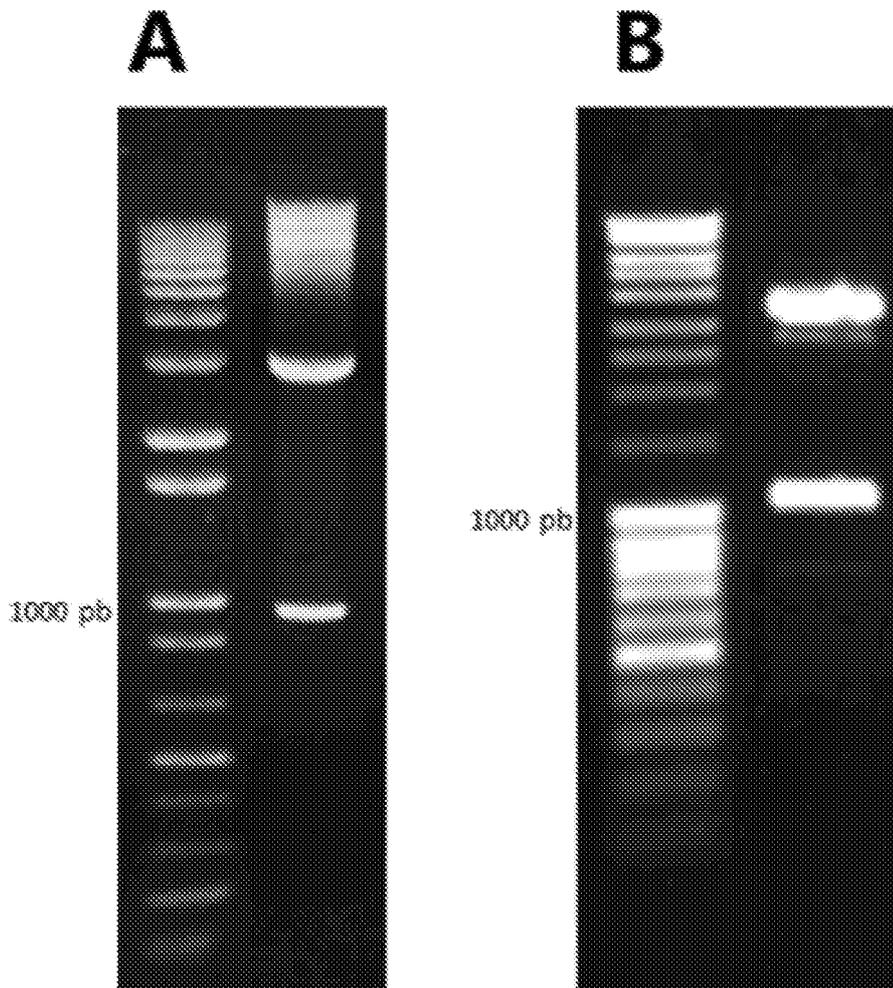


FIGURA 5

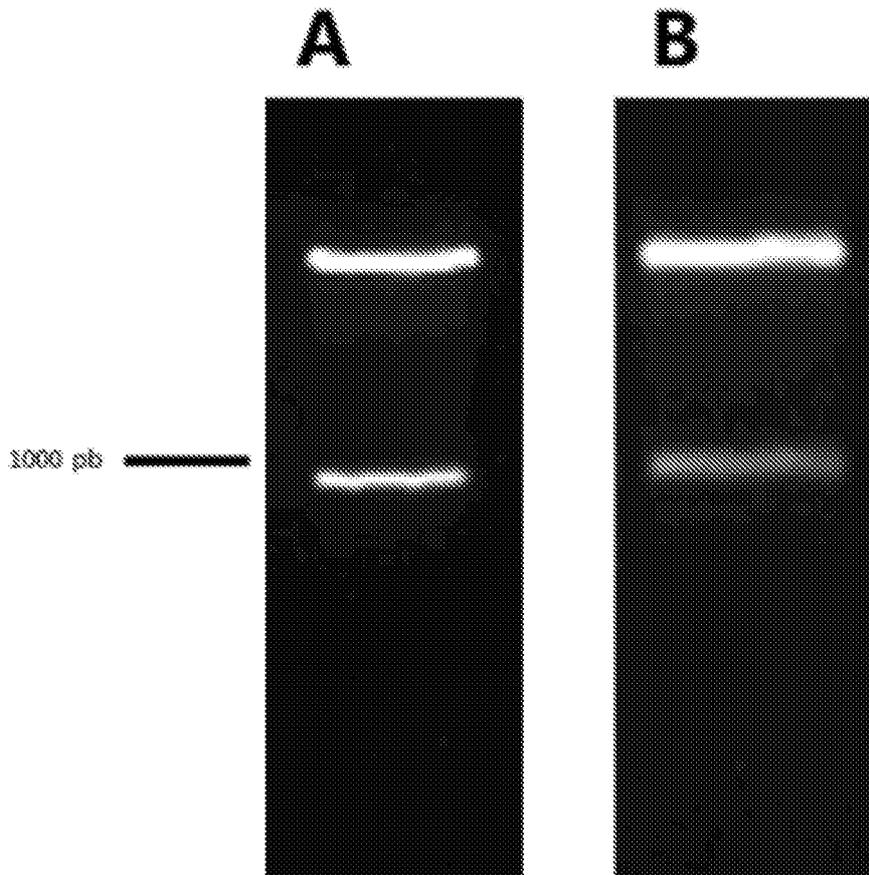


FIGURA 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/82 (2006.01), A61K 38/50 (2006.01), C12N 15/55 (2006.01), C12N 15/66 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 35/02 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/82

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Base de patentes do INPI-BR (SINPI), Plataforma Lattes (<http://lattes.cnpq.br/>)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENESEQ, USGENE, WOGENE, GenBank (continua em Quadro Suplementar)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2006088880 AI (MILLENNIUM PHARM INC) 27 April 2006 (2006-04-27) Abstract, paragraphs [0011] to [0023], [0045] to [0048], [0128] to [0137], [0157] to [0169], [0197], SEQ ID n°s 1, 2 and 3.	1, 3 and 7 and 9 to 20 to 2, 8
X A	LI, W. et ai. Uncoupling intramolecular processing and substrate hydrolysis in the N-terminal nucleophile hydrolase bASRGLI by circular permutation. ACS Chem Biol. 2012. Vol. 7, No. 1, pages: 1840-1847 (18 páginas), doi: 10.1021/cb300232n. Cited in the description. Abstract, first paragraph on page 2, first paragraph of the page 5, section "Materiais e Métodos", Table 3, Figures 2B and 2C.	1, 7 to 11 and 19 2 to 6, 12 to 18, 20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27/02/2019

Date of mailing of the international search report

15/03/2019

Name and mailing address of the ISA/BR

INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Mayrink Veiga nº 9, 6º andar
cep: 20090-910, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Facsimile No.

+55 21 3037-3663

Authorized officer

Flávia Riso Rocha**+55 21 3037-3493/3742**

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050017

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CN 106434612 A (UNIV JIANGNAN) 22 February 2017 (2017-02-22) (tradução) In: Google Patents. Recovered from Internet: <URL: ">https://patents.google.com/patent/CN106434612A/en?q=CN106434612+(A)> Abstract, Exemples.</p> <p>-----</p>	1 to 20
A	<p>BELVISO, S. et al. The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. PLoS One. 2017. Vol 12, No. 5:e0178174 (14 pages), doi: 10.1371/journal.pone.0178174. Abstract, sections "Materiais e Métodos" and "Discussão".</p> <p>-----</p>	1 to 20
A	<p>NOMME, J. et al. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human L-asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. J Mol Biol. 2014. Vol. 426, No. 13, 27 pages, doi: 10.1016/j.jmb.2014.04.016. Cited in the description. Abstract, second paragraph of the page 7, first paragraph of the page 8, second paragraph of the page 9, first paragraph of the page 10.</p> <p>-----</p>	1 to 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050017

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.: **21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

[Empty search report content area]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2019/050017

US 2006088880 A1	2006-04-27	AU 2002350053 A1	2003-05-12
		EP 1440165 A2	2004-07-28
		JP 2005507669 A	2005-03-24
		US 2003124593 A1	2003-07-03
		WO 03038113 A2	2003-05-08

CN 106434612 A	2017-02-22	None	

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C12N 9/82 (2006.01), A61K 38/50 (2006.01), C12N 15/55 (2006.01), C12N 15/66 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 35/02 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C12N 9/82

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de patentes do INPI-BR (SINPI), Plataforma Lattes (<http://lattes.cnpq.br/>)

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

GENESEQ, USGENE, WOGENE, GenBank (continua em Quadro Suplementar)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X A	US 2006088880 A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 27 abril 2006 (2006-04-27) Resumo, parágrafos [0011] a [0023], [0045] a [0048], [0128] a [0137], [0157] a [0169], [0197], SEQ ID n°s 1, 2 e 3.	1, 3 a 7 e 9 a 20 2, 8
X A	LI, W. <i>et al.</i> Uncoupling intramolecular processing and substrate hydrolysis in the N-terminal nucleophile hydrolase hASRGL1 by circular permutation. ACS Chem Biol. 2012. Vol. 7, No. 1, páginas: 1840-1847 (18 páginas). doi: 10.1021/cb300232n. Citado na descrição. Resumo, primeiro parágrafo da página 2, primeiro parágrafo da página 5, seção "Materiais e Métodos", Tabela 3, Figuras 2B e 2C.	1, 7 a 11 e 19 2 a 6, 12 a 18, 20

Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C

Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

27/02/2019

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

15/03/2019

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Marink Veiga nº 9, 6º andar
cep: 20090-910, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax:

+55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Flávia Riso Rocha

Nº de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
A	<p>CN 106434612 A (UNIV JIANGNAN) 22 fevereiro 2017 (2017-02-22) (tradução) <i>In</i>: Google Patents. Retirado da Internet: <URL: ">https://patents.google.com/patent/CN106434612A/en?q=CN106434612+(A)> Resumo, Exemplos.</p> <p>-----</p>	1 a 20
A	<p>BELVISO, S. <i>et al.</i> The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. PLoS One. 2017. Vol 12, No. 5:e0178174 (14 páginas). doi: 10.1371/journal.pone.0178174. Resumo, seções “Materiais e Métodos” e “Discussão”.</p> <p>-----</p>	1 a 20
A	<p>NOMME, J. <i>et al.</i> Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human L-asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. J Mol Biol. 2014. Vol. 426, No. 13, 27 páginas. doi: 10.1016/j.jmb.2014.04.016. Citado na descrição. Resumo, segundo parágrafo da página 7, primeiro parágrafo da página 8, segundo parágrafo da página 9, primeiro parágrafo da página 10.</p> <p>-----</p>	1 a 20

Quadro II Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2).a), pelas seguintes razões:

1. Reivindicações: **21**

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

Métodos de tratamento do corpo humano ou animal pela cirurgia ou terapia, assim como métodos de diagnóstico, conforme a Regra 39.1(iv) do PCT.

2. Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3. Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com a segunda e terceira frase da Regra 6.4.a).

Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

1. como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.

2. como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.

3. como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:

4. as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

Observações da reclamação

as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.

as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.

o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

Quadro Suplementar

No caso do espaço em qualquer quadro precedente não for suficiente.

Continuação de: Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional

BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, CAPLUS, CNFULL, EPFULL, JPFULL, PCTFULL, USPATFULL.

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2019/050017

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
US 2006088880 A1	2006-04-27	AU 2002350053 A1 EP 1440165 A2 JP 2005507669 A US 2003124593 A1 WO 03038113 A2	2003-05-12 2004-07-28 2005-03-24 2003-07-03 2003-05-08
----- CN 106434612 A	----- 2017-02-22	----- Nenhum	-----