

(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 Junho de 2020 (25.06.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2020/124188 A1

- (51) Classificação Internacional de Patentes:
C12N 9/82 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
A61K 38/50 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional: PCT/BR2019/050552
- (22) Data do Depósito Internacional: 19 de Dezembro de 2019 (19.12.2019)
- (25) Língua de Depósito Internacional: Português
- (26) Língua de Publicação: Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade:
BR1020180765957
19 de Dezembro de 2018 (19.12.2018) 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, Vila Izabel, 80320-290 Curitiba, PR (BR). ZANCHIN, Nilson, Ivo, Tonin; Rua Coronel Otoni Maciel, 215, Apto 206-B, Vila Izabel, 80320-000 Curitiba, PR (BR). FARET, Marcele; Rua Flávio Dallegrave, 6174 - Boa Vista, 82540-010 Curitiba, PR (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, POLYNUCLEOTIDE, EXPRESSION CASSETTE, EXPRESSION VECTOR, HOST CELL, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, METHODS FOR PRODUCING A POLYPEPTIDE WITH ASPARAGINASE ACTIVITY AND FOR PREVENTING OR TREATING NEOPLASMS, AND USE OF A POLYPEPTIDE

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

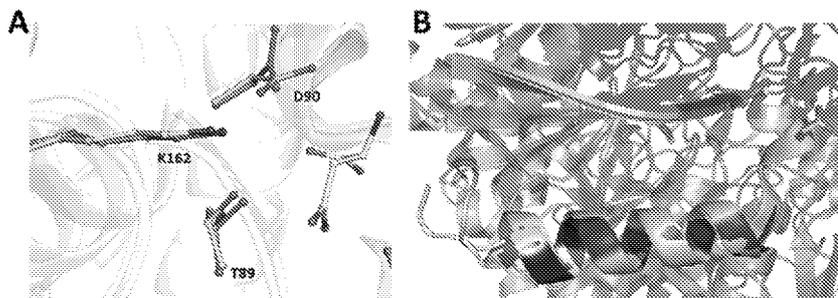


FIGURA 1

(57) Abstract: The present invention relates to an *E. coli* L-asparaginase that has been modified to reduce interaction thereof with amino acids other than asparagine, most preferably glutamine. Polynucleotides encoding the polypeptides of the invention, expression 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 neoplasms are also described herein.

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a L-asparaginase de *E. coli* modificada com o intuito de diminuir sua interação com diferentes aminoácidos que não asparagina, mais preferencialmente, glutamina. 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 neoplasias.

(Continua na página seguinte)



WO 2020/124188 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*

POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE ASPARAGINASE,
POLINUCLEOTÍDEO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE
EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA,
MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE
ASPARAGINASE E PARA PREVENIR OU TRATAR NEOPLASIAS, 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 neoplasias.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A leucemia é uma doença que afeta os órgãos hematopoiéticos (medula óssea, linfonodos, baço e fígado) e é caracterizada por uma predominância de precursores linfoides ou mieloides imaturos, chamados blastos. Essas células imaturas substituem a medula óssea normal e migram para outros tecidos. Os blastos sofrem uma transformação neoplásica, que torna essas células altamente replicativas, porém sem entrar em processo de diferenciação. Esses clones neoplásicos são independentes da ação de fatores estimuladores e inibidores da hematopoiese normal e permanecem cristalizadas numa fase de maturação. Como resultado dessa superprodução, ocorre uma disseminação através do organismo de glóbulos brancos anormais, o que ocasiona uma interferência nas funções vitais do corpo.

[003] Dependendo da origem da célula neoplásica, as leucemias podem ser divididas em leucemia mieloide aguda (LMA – células mieloides) ou leucemia linfóide aguda (LLA – células linfóides) (LORENZI *et al.*, 2006). As leucemias ditas agudas são de progressão mais rápida e as leucemias crônicas com progressão mais lenta.

[004] No caso da LLA, a medula óssea, ao invés de produzir células

que iriam diferenciar-se em linfócitos, produz células anormais que não podem combater infecções (PUI & EVANS, 2006). Os sintomas da doença são decorrentes principalmente do acúmulo das células anormais na medula óssea (ZANICHELLI *et al.*, 2010). Outras manifestações clínicas são secundárias à proliferação de células leucêmicas, que invadem outros tecidos do organismo, como amídalas, linfonodos, pele, baço, rins, sistema nervoso central e testículos. Os sinais e sintomas mais frequentes da doença são febre, adenomegalias, manifestações hemorrágicas, palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, fadiga e dor óssea (NEHMY *et al.*, 2011).

[005] A incidência de LLA corresponde à cerca de $\frac{3}{4}$ de todos os casos recém-diagnosticados de leucemia na infância e aproximadamente $\frac{1}{4}$ de todos os casos de neoplasia maligna da infância (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, 2015). Além disso, existe um segundo pico de incidência aos 50 anos de idade, que corresponde à $\frac{1}{3}$ da incidência em crianças. (PUI & EVANS, 2006). Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, surjam cerca de 6000 novos casos de LLA, tanto em adultos quanto em crianças (a cada 10 casos, 6 são diagnosticados em crianças), e aproximadamente 1500 morrem por conta da doença (de cada 5 mortes, 4 são de adultos) (Sociedade Norte-Americana de Câncer, 2015).

[006] O tratamento mais comum para a leucemia é a quimioterapia, consistindo das seguintes fases: indução da remissão, consolidação e fase de manutenção, compreendendo esquemas poliquimioterápicos, a fim de evitar o desenvolvimento de resistência. As diferentes etapas do tratamento têm intensidades variáveis, dependendo do grupo de risco do paciente, com regimes mais intensos nos casos de alto risco. Os quimioterápicos mais utilizados na fase de tratamento são os glucocorticóides, antraciclinas, vincristina e a L-asparaginase (L-ASNase).

[007] A L-ASNase é a enzima responsável pela hidrólise de asparagina em aspartato e amônia. A asparagina é um aminoácido crítico para a síntese

proteica em células leucêmicas, visto que essas não possuem a capacidade de sintetizar asparagina *de novo* devido ao baixo nível ou ausência de expressão da enzima asparagina sintetase (enzima que sintetiza asparagina a partir de aspartato) (LEE *et al.*, 1989). Dessa forma, as células tumorais requerem um nível alto e não usual de asparagina, e por possuírem baixos níveis de asparagina sintetase, são dependentes de níveis séricos do aminoácido para sua proliferação e sobrevivência (KIRIYAMA *et al.*, 1989). Já as células normais são capazes de sintetizar asparagina a partir do aspartato, através da enzima asparagina sintetase (RICHARDS & SCHUSTER, 1998), portanto, a atividade antineoplásica da L-ASNase é seletiva (UREN *et al.*, 1977). O efeito antitumoral da L-ASNase é decorrente do esgotamento de asparagina da corrente sanguínea, o que acarreta na inibição da síntese de DNA e proteínas em células leucêmicas, consequentemente impedindo o crescimento do tumor (PIETERS *et al.*, 2011). Para que a L-ASNase seja eficiente no tratamento contra a LLA, o nível de L-asparagina no meio deve ser reduzido a, pelo menos, 10^{-5} M para que a síntese proteica de células tumorais seja prejudicada (CEDAR & SCHWARTZ, 1967).

[008] Estudos clínicos indicam que o uso da L-ASNase em fases de indução da remissão e de consolidação são críticos para o tratamento da LLA infantil. O uso prolongado de altas doses da enzima vem sendo relatado como crucial para a redução da recaída e remissão completa, inclusive em pacientes de alto risco (SILVERMAN *et al.*, 2001; AMYLON *et al.*, 1999). Além disso, combinações entre L-ASNase e outros medicamentos (corticosteroide ou outros agentes quimioterápicos) podem potencializar a atividade da L-ASNase e, consequentemente, melhorar o prognóstico do paciente (ASSELIN *et al.*, 1999; ABSHIRE *et al.*, 2000). Durante o tratamento de pacientes classificados em grupos de risco básico, médio ou alto, é possível observar a presença da L-ASNase também nas etapas de indução da remissão e de consolidação, com variações na dosagem, dependendo da fase de tratamento e do grupo de risco do paciente (INCA, 2001; INCA, 2002).

[009] Atualmente, existem quatro L-ASNase licenciadas para terapia, sendo três delas amplamente comercializadas. A L-ASNase nativa de *E. coli* (Ec-A) teve aprovação pela agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de LLA em 1978 e foi o único produto comercial disponível por diversos anos. Em 1994, o FDA aprovou a PEG-asparaginase (PEG-Ec-A), um conjugado de uma porção de polietilenoglicol (PEG) com L-ASNase de *E. coli*. Em 2011, o FDA aprovou o uso da L-ASNase de *Erwinia chrysanthemi* (Ew-A) e em 2012, a Alizé Pharma licencia a Asparec[®], derivado peguilado da asparaginase de *E. chrysanthemi* para o tratamento de LLA para EUSA Pharma.

[0010] O uso bem-sucedido das L-ASNases no tratamento contra a LLA possui seu lado prejudicial, tornando seu uso limitado e constantemente reavaliado por conta dos efeitos colaterais graves gerados principalmente pela sua toxicidade. Reações imediatas ao uso da L-ASNase acontecem em 71% dos casos, incluindo náusea, vômito e febre. Por conta da diminuição da síntese proteica das células, decorrente da depleção do nível de asparagina no sangue, ocorre hiperglicemia, trombose e hemorragias. Em 1/3 dos casos, os órgãos sofrem disfunções, como no sistema nervoso central, resultando em cefaleia, desorientação, coma, convulsões e depressão. Aproximadamente 97% dos casos afetam o fígado, 68% afetam os rins e 15% afetam o pâncreas, causando pancreatite (GUILLERME *et al.*, 2013; HENRIKSEN *et al.*, 2015). Normalmente, crianças são mais tolerantes aos efeitos colaterais induzidos pela L-ASNase, enquanto adolescentes e adultos são mais sensíveis e muitas vezes podem desenvolver uma morbidade significativa (ALBERTSEN *et al.*, 2002; ALVAREZ & ZIMMERMANN, 2000; KEARNEY *et al.*, 2009; BARRY *et al.*, 2007).

[0011] Os efeitos colaterais estão associados principalmente à uma segunda especificidade da L-ASNase, que pode levar ao esgotamento do aminoácido glutamina, por conta da sua semelhança estrutural com a asparagina

e a produção de glutamato que é tóxico às células em concentrações maiores que 140 $\mu\text{M/L}$ (MULLER & BOSS, 1998; NARTA *et al.*, 2007). Os efeitos colaterais provocados pela atividade glutaminase de L-ASNase são pancreatite, anormalidades da hemostasia, trombose e complicações neurológicas. Ademais, são também observadas reações de hipersensibilidade clínica e inativação por anticorpos contra Ec-A, que ocorre em cerca de 60% dos casos, quase exclusivamente em regimes pós-indução.

[0012] A L-ASNase de *E. carotovora* (ECAR-LANS) é muito mais específica à asparagina que à glutamina e tal atividade glutaminase reduzida seria vantajosa no uso dessas enzimas para tratamento de neoplasias. Entretanto, essa enzima possui um tempo mais curto de meia-vida na corrente sanguínea (KRASOTKINA *et al.*, 2004), característica que impede que a enzima ECAR-LANS seja eficiente como um biofármaco.

[0013] Assim, apesar dos efeitos secundários conhecidos de Ec-A, PEG-Ec-A e Ew-A, essas ainda são as enzimas comercialmente disponíveis. Entretanto, desenvolvimentos são ainda necessários para a construção de L-ASNases que causem menos efeitos colaterais quando administradas para tratamento de neoplasias.

[0014] Algumas tentativas de reduzir a atividade glutaminase da enzima L-ASNase são encontradas no estado da técnica. Contudo, todos os estudos disponíveis fazem referência a substituições de aminoácidos específicos e em nenhum deles uma porção de mais de 5 resíduos foi substituída.

[0015] É sabido no estado da técnica que a substituição de apenas um resíduo de aminoácido na estrutura primária de uma enzima pode levar a completa inativação da mesma. Não só o número de resíduos substituídos, como suas posições na estrutura primária do polipeptídeo e a natureza dos resíduos substituídos influenciam diretamente na atividade catalítica da enzima.

[0016] DERST *et al.* (2000), por exemplo, testa o efeito na especificidade da enzima à glutamina da substituição dos resíduos de

aminoácido nas posições 11, 27, 57 e 88 por aminoácidos apolares. O trabalho mostra que a substituição de uma glicina na posição 11 e 88 praticamente aboliu completamente a catálise, enquanto na posição 57 apresentou pouco efeito na especificidade ao substrato.

[0017] No WO2015038639, é citada uma substituição na posição 58 ou 59, enquanto em CN103060299 as mutações são especificamente nas posições 48, 49, 152 e/ou 283.

[0018] O WO2014170811 revela L-ASNases mutantes de *E. coli* em que a mutação induz uma menor imunogenicidade e maior estabilidade da enzima, que compreende menos do que cinco substituições de aminoácidos.

[0019] O WO2017151707 revela L-ASNases mutantes de *E. chrysanthemi* com substituições em apenas uma ou mais das posições 31, 63 e 254 visando redução da atividade L-glutaminase e aumento de estabilidade enzimática.

[0020] O WO2013055699 se refere a L-ASNases mutantes de *W. succinogenes* com pouca ou nenhuma atividade glutaminase, as quais apresentam apenas uma mutação na posição 121.

[0021] As vantagens da invenção serão evidentes na descrição da invenção fornecida neste documento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0022] A presente invenção tem por objetivo prover um polipeptídeo com atividade asparaginase que solucione os principais problemas do estado da técnica listados anteriormente.

[0023] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê um polipeptídeo com atividade asparaginase que compreende substituições na região do sítio ativo da sequência de aminoácidos do peptídeo com atividade asparaginase de *Escherichia coli* (EC-A) por resíduos de aminoácidos correspondentes na sequência de aminoácidos do peptídeo com atividade asparaginase de *Erwinia carotovora* (ECAR-LANS), em que o polipeptídeo da

presente invenção (EC-A_mut) apresenta menor afinidade por diferentes aminoácidos que não asparagina quando comparada com o peptídeo com atividade asparaginase de *E. coli* parental.

[0024] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo com atividade asparaginase como acima definido.

[0025] 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.

[0026] Em um quarto aspecto, também é provido um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo ou um cassete de expressão como acima definidos.

[0027] Em um quinto aspecto, a presente invenção provê uma célula hospedeira compreendendo um cassete de expressão ou um vetor de expressão como acima definidos.

[0028] Em um sexto aspecto, é provida uma composição farmacêutica que compreende um polipeptídeo da invenção e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0029] Em um sétimo aspecto, é provido o uso do polipeptídeo da invenção na manufatura de um medicamento para prevenção ou tratamento de neoplasias.

[0030] 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.

[0031] Em um nono aspecto, é provido um método para prevenir ou tratar neoplasias, 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

[0032] A Figura 1 mostra a análise estrutural para geração de Ec-A_mut.

[0033] A Figura 2 mostra cromatograma de gel filtração de Ac-A (Figura 2A) e ECAR-LANS (Figura 2B).

A Figura 3A mostra um cromatograma de curva de calibração de coluna de gel filtração. Volume de eluição dos picos: 1 (Ferritina, 440 kDa) – 45,99 mL; 2 (Aldolase, 158 kDa) – 51,22 mL; 3 (Conalbumina, 75 kDa) – 86,47 mL; 4 (Ovalbumina, 44 kDa) – 102,98 mL. A Figura 3B mostra um gráfico relacionado relacionando o valor K_{av} e log MW da curva de calibração da coluna utilizada para os ensaios de gel filtração.

[0034] A Figura 4 mostra o resultado da cromatografia de gel filtração de Ec-A_mut.

[0035] A Figura 5 mostra um gráfico duplo recíproco da atividade de ECAR-LANS (Figura 5A) e Ec-A (Figura 5B).

[0036] A Figura 6 mostra o espectro de dicroísmo circular de Ec-A e ECAR-LANS, sendo a análise do enovelamento de Ec-A (vermelho) e ECAR-LANS (preto).

[0037] A Figura 7 mostra o espectro de dicroísmo circular das enzimas Ec-A, ECAR-LANS e Ec-A_mut.

[0038] A Figura 8 mostra uma análise estrutural de Ec-A_mut.

[0039] A Figura 9 mostra o espectro de dicroísmo circular observado no comprimento de onda 222 nm durante gradiente de temperatura, variando entre 20° e 90° das enzimas nativa e mutada de *E. coli* e nativa de *E. carotovora*.

DEFINIÇÕES

[0040] 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.

[0041] “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.

[0042] “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.

[0043] 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, éxons, íntrons, 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.

[0044] 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).

[0045] 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.

[0046] 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.

[0047] O termo “indivíduo” refere-se a seres humanos e animais. Preferencialmente o indivíduo é um ser humano.

[0048] 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.

[0049] 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.

[0050] O termo “Reação em Cadeia da Polimerase” 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.

[0051] 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.

[0052] O termo “vetor” refere-se a moléculas de ácidos nucleicos 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.

[0053] 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.

[0054] 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).

[0055] 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.

[0056] 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.

[0057] 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.

[0058] 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.

[0059] 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.

[0060] O termo “expressão recombinante” refere-se à expressão do polipeptídeo recombinante em células hospedeiras.

[0061] 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).

[0062] 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”).

[0063] 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. Os aminoácidos substituintes podem ser naturais, modificados ou incomuns.

[0064] 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 contêm 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.

[0065] 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.

[0066] Os objetos da presente invenção serão melhor compreendidos a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações anexas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0067] 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.

[0068] Os presentes inventores solucionaram o problema do estado da técnica provendo polipeptídeos com atividade asparaginase que apresentam reduzida afinidade por outros aminoácidos que não asparagina, particularmente glutamina. Os polipeptídeos da presente invenção com atividade glutaminase reduzida foram obtidos pela substituição de resíduos de aminoácidos localizados na região do sítio ativo da L-asparaginase de *E. coli* (EC-A) por resíduos de aminoácido correspondentes na L-asparaginase de *E. carotovora* (ECAR-LANS).

[0069] O mecanismo preciso da ação de L-asparaginase é ainda desconhecido, embora seja sabido que a hidrólise acontece em duas etapas através de um intermediário beta-acil-enzima. No primeiro passo, a treonina nucleofílica ataca o radical carbonil do substrato para gerar um intermediário acil-enzima. Uma molécula de amônia é liberada. No segundo passo, uma molécula de água ataca o intermediário acil-enzima para produzir L-aspartato. Resultados disponíveis no estado da técnica propõe uma tríade catalítica conservada envolvendo resíduos T (posição 89 da L-ASNase de *E. coli*), K (posição 162 L-ASNase de *E. coli*) e D (posição 90 da L-ASNase de *E. coli*). A treonina atua como nucleófilo primário que ataca o substrato e o resíduo de lisina proximal, estabilizada por aspartato, atua como uma base para aumentar a nucleofilicidade do resíduo de treonina catalítico.

[0070] Resíduos responsáveis pela ligação ao substrato formam a parte rígida do sítio ativo. A parte flexível do sítio ativo (resíduos 14-33, de *E. coli*) controla o acesso ao sítio de ligação. Esta região é muitas vezes desordenada nos cristais das L-ASNases, indicando elevada mobilidade desta alça. O estado da técnica demonstra ainda que a ligação do substrato induz o rápido

fechamento da parte flexível, enquanto que na ausência de ligantes, a parte flexível do sítio ativo permanece na conformação aberta predominantemente.

[0071] Avaliação de contatos na estrutura da asparaginase de *E. carotovora* mostra que alterações conformacionais ou diferente flexibilidade na alça formada pelos resíduos G61-E63 pode afetar a atividade glutaminase de uma L-ASNase, assim como um resíduo mais volumoso pode reduzir ainda mais a área do sítio ativo, possivelmente levando a uma redução adicional da atividade de glutaminase.

[0072] Para diminuir a atividade glutaminase tóxica da L-ASNase de *E. coli*, os inventores propuseram substituir resíduos da região do sítio ativo da L-ASNase desse organismo pelos resíduos correspondentes na L-ASNase de *E. carotovora*, os quais englobam a alça sugerida como possível alvo da especificidade dessa enzima.

[0073] Em uma concretização, a sequência mutada da L-ASNase de *E. coli* é a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 com substituições por resíduos correspondentes da L-ASNase de *E. carotovora* de SEQ ID NO:2.

[0074] Em uma concretização, as modificações feitas na sequência de aminoácidos da L-ASNase de *E. coli* compreendem substituições nos resíduos 53-75 da SEQ ID NO:1.

[0075] Em uma concretização, as substituições são realizadas em resíduos de aminoácidos em pelo menos uma das posições 54, 55, 59, 60, 62, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 73 e 75 da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

[0076] Particularmente, as substituições compreenderem pelo menos uma das seguintes substituições na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1: V54A, N55S, Q59E, D60N, N62T, D63S, N64D, W66L, T68K, A70S, K72R, I73V e T75E.

[0077] Em uma concretização particular, o polipeptídeo com atividade asparaginase aqui pleiteada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3.

[0078] Em uma concretização particular, o polipeptídeo com atividade asparaginase aqui pleiteada consiste da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3.

[0079] São ainda incluídas no escopo de proteção da presente invenção sequências de aminoácidos contendo as modificações conforme estabelecidas na SEQ ID NO:3 e outras substituições conservativas em diferentes resíduos de aminoácidos.

[0080] A análise estrutural da asparaginase da presente invenção é mostrada na Figura 1. Na Figura 1A, é identificado o sítio ativo conservado das L-ASNases, principalmente, os resíduos T89, D90 e K162. Na Figura 1B, é identificada a região modificada na enzima da presente invenção, onde os resíduos de aminoácidos da enzima de *E. coli* (regiões em azul) foram substituídos pelos correspondentes em *E. carotovora* (região em verde).

[0081] Em ensaios de desnaturação térmica, observou-se que a L-ASNase de *E. coli* é mais estável que as de *E. carotovora*. Essa diferença de estabilidade já é descrita por outros trabalhos, onde foi feita a incubação por 3 minutos a 35°C, o que levou a 60% de diminuição irreversível da atividade de ECAR-LANS, enquanto Ec-A manteve grande parte da sua atividade inicial após incubação nas mesmas condições. ECAR-LANS também apresentou uma baixa estabilidade em solução com ureia e a atividade catalítica foi totalmente perdida após uma hora de incubação com 2 M de ureia. Em contraste, não houve observação de atividade em Ec-A com até 4 M de ureia (PAPAGEORGIU *et al.*, 2008).

[0082] A análise de desnaturação térmica também mostrou que as substituições de aminoácidos que diferem Ec-A de Ec-A mut não afetam a estabilidade térmica das enzimas de *E. coli*. Ambas possuem T_m (temperatura onde 50% da amostra está desnoveada) de 60°C.

[0083] Esses dados permitem concluir que o motivo β-loop-α, formado pela região 53-75, não está envolvida na estabilidade térmica de Ec-A, pois sua

ausência não modifica o perfil de desnaturação da enzima. A substituição de aminoácidos entre os resíduos 53-75, embora altere o conteúdo de estrutura secundária em relação à enzima sem modificações, produz uma enzima com enovelamento e com estrutura quaternária similar as demais L-ASNses.

[0084] A L-ASNase da presente invenção não se mostrou tão específica à asparagina quando a L-ASNase de *E. carotovora* parental, a qual, segundo o estado da técnica, é 12.000 vezes mais específica para L-asparagina do que para L-glutamina. Entretanto, as substituições propostas aumentaram a especificidade da enzima da presente invenção em relação a L-ASNase de *E. coli* parental.

[0085] Assim, os inventores surpreendentemente obtiveram uma enzima de *E. coli* modificada, corretamente enoveladas, com estruturas secundária e quaternária conservadas. Além disso, os valores cinéticos e de atividade enzimática apresentados pela L-ASNase recombinante da presente invenção aumentaram a especificidade da enzima em comparação com a L-ASNase de *E. coli* parental.

[0086] Esses dados indicam ainda que a L-ASNase da presente invenção tem meia vida na corrente sanguínea similar a L-ASNase de *E. coli* parental.

[0087] Tendo em vista que as propriedades desejadas para as L-ASNases terapêuticas incluem uma alta atividade enzimática, baixa especificidade para glutamina e um tempo longo de meia vida na corrente sanguínea, a enzima da presente invenção se mostra uma excelente alternativa para as L-ASNase do estado da técnica que apresentam todos os problemas já discorridos aqui.

[0088] Em uma concretização, o polipeptídeo da invenção é para uso na prevenção ou tratamento de neoplasias. Em uma concretização preferida, a neoplasia é leucemia, sendo particularmente selecionada de leucemia mieloide aguda ou leucemia linfóide aguda.

[0089] Em um outro aspecto, a presente invenção provê polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos aqui descritos.

[0090] Em uma concretização, os polinucleotídeos de acordo com a invenção compreendem a sequência de ácidos nucleicos da SEQ ID NO:4 e suas degenerações.

[0091] 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 códon podendo codificar os mesmos aminoácidos) é um conhecimento comum na técnica e a identidade do aminoácido codificado por cada códon é bem estabelecida.

[0092] 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.

[0093] O uso dos códon 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, 2001.

[0094] Neste sentido, diferentes espécies podem exibir um “códon usage” preferencial. Vide Grantham et al., 1980, Haas et al., 1996, Wain-Hobson et al., 1981, Grosjean and Fiers, 1982, Holm, 1986, Ikemura, 1982, Sharp and

Matassi, 1994, Kane, 1995 e Makrides 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.

[0095] Os polinucleotídeos desta invenção são obtidos por métodos já conhecidos no estado da técnica. 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.

[0096] 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 contém as sequências de interesse. O RNA pode ser isolado por métodos conhecidos como o uso do reagente Trizol (GIBCO-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Maryland).

[0097] 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.

[0098] Ainda de forma ilustrativa, o PCR inverso permite a obtenção de sequências desconhecidas começando com iniciadores baseados em uma região conhecida. 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.

[0099] 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.

[00100] 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. Na presente invenção, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as ampliações dos genes codificantes para L-asparaginase mutada de *E. coli*, e selvagem de *E. coli* e *E. carotovora* estão representados pelas SEQ ID NOs:7-12.

[00101] Em um outro 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.

[00102] Em um outro 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.

[00103] 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.

[00104] 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.

[00105] Em um outro 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.

[00106] 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.

[00107] 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 o polipeptídeo compreendendo ou consistindo da SEQ ID No:4 ou suas degenerações, 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.

[00108] 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.

[00109] 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-butiloxycarbonil, e 9-fluorenilmetiloxycarbonila como grupos protetores α -amino, respectivamente, ambos bem conhecidos pelos técnicos no assunto (Sambrook *et al.*, 1995).

[00110] Os seguintes grupos protetores podem ser exemplos utilizados para a síntese dos polipeptídeos da invenção: 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc), tert-butiloxycarbonil (Boc), carbobenzyloxi (Cbz), 2-cloro-3-indenilmetoxycarbonil (Clmoc), benz(f)indeno-3-il-metóxicarbonil (Bimoc), 1,1-dioxobenzo[b]tiofeno-2-il-metoxycarbonil (Bsmoc), 2,2,2-tricloroetóxicarbonil (Troc), 2-(trimetilsilil)etoxycarbonil (Teoc), homobenziloxycarbonil (hZ), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetóxicarbonil (TCBoc), 1-metil-1-(4-bifenil)etoxycarbonil (Bpoc), 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletoxycarbonil (t-Bumeoc), 2-(2'- or 4'-piridil)etoxycarbonil (Pyoc), viniloxycarbonil (Voc), 1-isopropilaliloxycarbonil (Ipaoc), 3-(piridil)aliloxycarbonil (Paloc), p-metoxibenziloxycarbonil (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., 1999).

[00111] 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.

[00112] Em uma concretização, a purificação do polipeptídeo da presente invenção possui três etapas: afinidade, troca iônica e gel filtração, sendo essa última a responsável por separar do extrato total aquelas formas da enzima que não estão na forma ativa tetramérica.

[00113] Em um outro 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 farmacêuticamente aceitáveis.

[00114] Os carreadores ou excipientes farmacêuticamente 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 injetável para administração intramuscular ou intravenosa.

[00115] Excipientes, carreadores ou estabilizadores farmacêuticamente 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.

[00116] 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.

[00117] A composição de acordo com a presente invenção pode compreender pelo menos um agente quimioterápico adicional selecionado dentre agentes alquilantes, antimetabólitos, inibidores da quinase, alcaloides de planta de veneno antifuso, antibióticos citóxicos/antitumorais, inibidores de topoisomerase, fotossensibilizadores, antiestrogênicos 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.

[00118] As composições farmacêuticas da presente invenção devem compreender uma quantidade terapêuticamente efetiva do polipeptídeo. Para qualquer composto, a dose terapêuticamente 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.

[00119] 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. Em uma concretização particular, a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção compreende 10000UI dos polipeptídeos da presente invenção.

[00120] Conforme a presente invenção, a administração das ditas composições farmacêuticas pode ser realizada pelas vias de administração intravenosa e intramuscular. Em uma concretização preferida, a composição da presente invenção é para administração intravenosa.

[00121] Em um outro aspecto, a presente invenção provê o uso dos polipeptídeos da invenção na manufatura de um medicamento para prevenção ou tratamento de neoplasias. Em uma concretização preferida, a neoplasia é uma leucemia. Particularmente, a leucemia é leucemia mieloide aguda ou leucemia linfoide aguda.

[00122] 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.

[00123] Sistemas de expressão particularmente adequados incluem microrganismos, 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.

[00124] 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., 1986) e Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989).

[00125] 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.

[00126] De acordo com um outro aspecto da invenção é fornecido um método para produzir um polipeptídeo com atividade asparaginase de acordo com a invenção compreendendo:

(a) fornecer uma célula hospedeira compreendendo um cassete de expressão ou vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo com atividade asparaginase de acordo com a presente invenção;

(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.

[00127] 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”.

[00128] Em um aspecto particular da invenção, a célula hospedeira é uma bactéria. Em um aspecto particular da invenção, a bactéria é do gênero *Escherichia*. Em um aspecto particular da invenção, a célula hospedeira é *E. coli*.

[00129] Em um outro aspecto da invenção, é fornecido um método de prevenção ou tratamento de neoplasias, caracterizado por compreender a administração a um indivíduo em necessidade da dita prevenção ou tratamento, de uma quantidade terapêuticamente efetiva de um polipeptídeo de acordo com a invenção.

[00130] 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.

[00131] 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 das L-ASNases selvagem e com modificações

[00132] As construções das enzimas derivadas de *E. coli* foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se de DNA genômico de *E. coli* cepa C43 (região de amplificação: 430-1044pb – fragmento 3) e DNA sintético com as modificações inseridas produzido pela empresa IDT (região de amplificação: 66-429pb – fragmento 2). Os produtos das ampliações foram clonados em vetor pGEM T-easy (Promega) e analisados por sequenciamento.

[00133] O resultado do sequenciamento foi comparado à sequência depositada no banco de dados utilizada como sequência molde. Na sequência nucleotídica de *E. coli* utilizada na presente invenção há uma substituição (C321T). Esta é uma mutação silenciosa para a criação de um sítio de restrição *NcoI* que será utilizada para junção de Ec-A_frag1 e Ec-A_frag2 ao vetor.

[00134] Após a confirmação da sequência correta, foram subclonadas em vetores de expressão pET28a-TEV (CARNEIRO *et al.*, 2006) para transformar bactérias *E. coli* de diferentes linhagens para os testes de expressão.

[00135] Já as sequências codificadoras das construções derivadas de *E. carotovora* foram otimizadas para expressão em *E. coli*, utilizando o algoritmo

OptimumGene™, quanto a utilização de códons, remoção de sítios de restrição indesejados, adequação do conteúdo CG, remoção de ORFs (*Open Reading Frames*, em inglês) secundárias e estruturas secundárias do mRNA que possam interferir com a eficiência da tradução. O processo de otimização consistiu na modificação de 80 nucleotídeos, as quais não alteraram a sequência de aminoácidos nativa.

[00136] As construções de *E. carotovora* foram sintetizadas e adquiridas comercialmente da empresa GenScript (Nova Jersey, Estados Unidos) no vetor pUC57. Na etapa de otimização, foram inseridos sítios de restrição para enzimas *NdeI* e *XhoI* nas extremidades dos genes de *E. carotovora*. O vetor ECAR-LANS-pUC57 foi sintetizado contendo a sequência do peptídeo sinal para secreção periplasmática, de forma que oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificação de ECAR-LANS sem peptídeo sinal (Tabela 3) e subclonagem em pET28a-TEV.

[00137] A metodologia empregada para a obtenção dos clones seguiu a seguinte ordem:

- Desenho dos oligonucleotídeos;
- Amplificação dos genes por PCR;
- Eletroforese em gel de agarose;
- Extração de DNA do gel de agarose;
- Ligação dos genes de interesse em pGEM T-easy;
- Transformação em *E. coli* Dh5 α ;
- Seleção dos transformantes e sequenciamento;
- Extração de DNA plasmidial;
- Digestão de DNA plasmidial;
- Digestão e ligação em vetor pET28a_TEV;
- Transformação em *E. coli* Dh5 α ;
- Seleção dos transformantes e sequenciamento;
- Extração de DNA plasmidial; e

Transformação em cepa da expressão.

1.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

[00138] Para a clonagem da construção de Ec-A, foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) com base na sequência gênica depositada no banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sítio para enzima de restrição *NdeI* (BioLabs) foi adicionado na região 5' de cada oligonucleotídeo, permitindo a subclonagem em vetor pET28a-TEV.

[00139] O mesmo par de oligonucleotídeos iniciadores foi utilizado para amplificação do gene que codifica para ECAR-LANS com e sem modificações (Tabela 2), o que diferiu na reação de amplificação foi o DNA molde, que se tratava de ECAR-LANS_pUC57 sem modificações para amplificação do gene selvagem e ECAR-LANS_pUC57 com modificações para amplificação do gene com modificações.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de L-ASNases derivadas de *E. coli*. Os sítios para enzimas de restrição estão sublinhados.

CONSTRUÇÃO	OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQ ID NO:
Ec-A_frag1	F - 5'- <u>CATATGTTACCCAATATCACCATTTTAGCA</u> -3'	SEQ ID NO:7
	R - 5'-CATG <u>CCATGGGTAATCACAAACCATC</u> -3'	SEQ ID NO:8
Ec-A_frag2	F - 5'- <u>CATATGTTACCCAATATCACCATTTTAGCA</u> -3'	SEQ ID NO:7
	R - 5'-CATG <u>CCATGGGTAATCACAAACCATC</u> -3'	SEQ ID NO:8
Ec-A_frag3	F - 5'- <u>CATGCCATGGCACCGACACGATGGAAGA</u> -3'	SEQ ID NO:9
	R - 5'- <u>CTCGAGTCAGTATTGATTGAAGATTTG</u> -3'	SEQ ID NO:10

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de L-ASNases derivadas de *E. carotovora*. Os sítios para enzimas de restrição estão sublinhados.

CONSTRUÇÃO	OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQ ID NO:
ECAR-LANS	F - 5'- <u>CATATGAACCTGCCGAACATTGTGATT</u> -3'	SEQ ID NO: 11
	R - 5'- <u>CTGGAGTTAGTAAGCGTGGAAGTAGTCTTG</u> -3'	SEQ ID NO: 12

1.2. Amplificação gênica por PCR

[00140] Para amplificação, utilizou-se a enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). A concentração final dos iniciadores, específicos para cada sequência, foi de 5 pmol. A temperatura de anelamento foi de 55°C para amplificar Ec-A_frag1 e Ec-A_frag2, 58°C para ECAR-LANS e 64°C para Ec-

A_frag3. A amplificação foi feita em 30 ciclos, com 30 segundos de extensão para Ec-A_frag1 e Ec-A_frag2 e um minuto de extensão para Ec-A_frag3 e ECAR-LANS.

1.3. Extração de DNA em gel de agarose

[00141] Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) foi utilizado como marcador de massa molecular e MassRuler Loading Dye Solution 6X (Fermentas) suplementado com de GelRed™ (Biotium) 1:500 como tampão de amostra. A eletroforese foi realizada a 100 V por 35 minutos.

[00142] Após a eletroforese em gel de agarose, as bandas referentes às sequências nucleotídicas desejadas foram extraídas e purificadas utilizando QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN).

1.4. Ligação em vetor de clonagem

[00143] A ligação do inserto em vetor pGEM T-easy (Promega) foi feita utilizando 25 ng da amostra purificada do gel, 50 ng de vetor e 3 U de enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação foi mantida à 16°C por 18 horas e em seguida transformada em célula competente de *Escherichia coli* Dh5 α , como descrito abaixo.

1.5. Preparo de bactérias e transformação por choque térmico

[00144] Uma colônia isolada de *E. coli* Dh5 α foi inoculada em meio de cultura Luria-Bertani (LB) sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 16 horas a 37°C. Após esse período, foi realizada uma diluição 1:100 em meio LB. A cultura foi incubada a 37°C até OD₆₀₀ de 0,6 – 0,8. Após 10 minutos à 4°C, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 g por 10 minutos a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 10 mL de solução 0,1 M CaCl₂ e 10% de glicerol. Após 15 minutos a 4°C, as células foram centrifugadas a 4000 g por 15 minutos a 4°C. Alíquotas em 1 mL de solução 0,1 M CaCl₂ e 10% de glicerol foram conservadas a -80°C.

[00145] A transformação foi realizada adicionando aproximadamente

100 ng do plasmídeo. Após 30 minutos de incubação a 4°C, o choque térmico foi realizado incubando as células por 2 minutos a 42°C, seguido de 2 minutos a 4°C. 1 mL de meio LB foi adicionado às células. Após 60 minutos, a 37°C e 200 rpm, as células foram centrifugadas por 2 minutos a 5000 g e o pellet ressuspense em aproximadamente 70 µL de meio LB. Foram então plaqueados 2 em meio LB sólido contendo antibiótico apropriado. As placas foram incubadas por 16 horas em estufa a 37°C.

1.6. Seleção dos transformantes

[00146] A seleção de transformantes foi realizada por amplificação gênica por PCR ou digestão plasmidial. Para amplificação, 1 colônia bacteriana isolada foi diluída em 30 µL de água e aquecida a 94°C por 10 minutos. 2 µL dessa suspensão foi utilizado como molde de DNA.

[00147] Para a seleção digestão plasmidial, os vetores purificados foram incubados por 1 hora a 37°C com as enzimas de restrição flanqueando a região de interesse (Tabela 2) e a liberação do fragmento avaliada por eletroforese em gel de agarose.

[00148] 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*.

1.7. Extração de DNA plasmidial em pequena escala

[00149] A etapa de extração foi realizada através do uso do kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), onde o DNA presente no lisado bacteriano adsorve na membrana de sílica disponível no kit. Após etapas de lavagens para separação do DNA dos contaminantes do cultivo bacteriano, há eluição do DNA adsorvido na sílica em água ou tampão.

1.8. Subclonagem em vetor de expressão

[00150] Para expressão das enzimas de *E. carotovora*, o DNA plasmidial

purificado foi utilizado para a subclonagem no vetor de expressão pET28a (Qiagen). Para isso, o inserto do plasmídeo pGEM-T easy foi clivado com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Utilizou-se 2 U de T4 DNA ligase (Fermentas), e plasmídeo:inserto na proporção 1:3. O volume final foi de 10 µL e a reação incubada por 16 horas a 16°C. O vetor pET28a havia sido previamente digerido com as mesmas enzimas. Após a ligação do inserto no vetor, fez-se a transformação na cepa DH5α, seguindo o protocolo de transformação por choque térmico.

[00151] A sequência de nucleotídeos de ECAR-LANS selvagem é conforme mostrada na SEQ ID NO:6.

[00152] A sequência que codifica a L-ASNase de *E. coli* foi clonada em pGEM T-easy em duas partes separadas: sequência de nucleotídeos 1-267 sem (*Ec-A_frag1*) ou com modificações (*Ec-A_frag2*) e a sequência de nucleotídeos 268-978 (*Ec-A_frag3*).

[00153] *Ec-A_frag3* foi digerido com as enzimas *NcoI* e *XhoI* e ligado ao vetor pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas. Após seleção dos clones positivos, foi feita nova digestão com as enzimas *NdeI* e *NcoI*. Então, *Ec-A_frag2*, previamente selecionado e digerido com as enzimas *NcoI* e *NdeI*, foi ligado ao vetor pET28a-TEV + *Ec-A_frag3*. A combinação de *Ec-A_frag1* e *Ec-A_frag3* em pET28a-TEV resultou no vetor *Ec-A* (gene sem modificações – SEQ ID NO:5). Já a combinação *Ec-A_frag2* e *Ec-A_frag3* em pET28a-TEV resultou no vetor *Ec-A_mut* (gene com as modificações – SEQ ID NO:4).

[00154] Os DNA sintéticos utilizados como moldes na presente invenção foram sintetizados pela Genscript.

EXEMPLO 2: Teste de expressão das L-ASNases

[00155] A expressão das enzimas *Ec-A*, *Ec-A_mut*, ECAR-LANS foi avaliada em diferentes temperaturas de indução nas seguintes cepas de *E.coli*: BL21(DE3)-Star, Rosetta-Gami 2, Tuner e pLysS. Para indução, colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB com antibiótico apropriado e

incubadas por 16 horas, a 37°C e 200 rpm. Em seguida, uma diluição 1:40 foi realizada e as células cultivadas a 37°C até OD_{600nm} de 0.6. Para indução da expressão, 0,1 mM de IPTG foi adicionado aos inóculos, exceto nas culturas controle, e a incubação foi continuada em 20°C por 16 horas, 30°C e 37°C por 4 horas.

[00156] Após o período de indução, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos, a 5000 g e 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de tampão A (20 mM fosfato, 500 mM NaCl, pH 7.5) suplementado com 1 mM PMSF e 5 mM benzamidina. Após incubação de 30 minutos com lisozima (10 µg/mL), a lise celular foi feita por sonicação (8 pulsos, 20% de potência). As amostras foram centrifugadas a 20.000 g durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram separados (fração solúvel) e os *pellets* ressuspensionados em 1 mL de tampão A (fração insolúvel).

[00157] A análise da solubilidade foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram preparados géis de separação 13% e de empilhamento 5% de acordo com protocolo pré-estabelecido (LAEMMLI, 1970). Em 15 µL de alíquota retirada em cada passagem (*pellet* e sobrenadante), foram adicionados 5 µL de tampão de amostra (240 mM Tris-HCl, 6% SDS, 30% glicerol, 16% β-mercaptoetanol, 0,6 mg/mL azul de bromofenol, pH 6.8), e foram incubados a 95°C por 5 minutos para posterior aplicação nos géis. Foram aplicados 10 µL de amostra preparada em cada poço do gel. Os marcadores de peso molecular utilizados foram *Unstained/Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas) ou *BenchMark™ Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). A coloração do gel foi feita com azul de Coomassie R-250 ou G-250, dependendo do caso, e descoloração com solução apropriada (45% metanol e 10% ácido acético).

[00158] Após a análise da melhor condição de expressão para cada proteína (Tabela 4), realizou-se a expressão das proteínas em maior escala, mantendo as proporções de volume e condições de indução. Dessa forma, foram

obtidas frações solúveis de cada uma das proteínas para posterior purificação.

Tabela 4: Condição de expressão das L-ASNases. Cepas de *E. coli* usadas na expressão de cada uma das enzimas em estudo, com a melhor temperatura de indução e tempo de crescimento para as L-ASNases de *E. coli* e *Erwinia carotovora*.

	Ec-A	ECAR-LANS	Ec-A_mut
Cepa de expressão	BL21(DE3)-Star	BL21(DE3)-Star	BL21(DE3)-Star
Temperatura de indução	20°C	20°C	20°C
Tempo de crescimento	18 horas	18 horas	18 horas

EXEMPLO 3: Purificação das proteínas recombinantes

3.1. Cromatografia de afinidade

[00159] O vetor de expressão pET28a-TEV permite que a proteína recombinante seja expressa fusionada a uma cauda de histidina, viabilizando o uso de colunas cromatográficas contendo níquel imobilizado em fase sólida. Portanto, as frações solúveis obtidas de cada uma das enzimas foram purificadas por uma primeira etapa de cromatografia de afinidade com a coluna HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare). Os tampões utilizados foram tampão A (20 mM fosfato de sódio, 500 mM NaCl, pH 7.5) e tampão B (20 mM fosfato de sódio, 500 mM NaCl, 1 M imidazol, pH 7.5). A coluna e o sistema Äkta (modelos Äkta Pure M25 ou Äkta Purifier UPC 100) de purificação foram lavados primeiramente com 5 volumes de coluna (CV) de água milliQ e depois com 5 CV de tampão A. Em seguida, a amostra foi injetada com fluxo variando entre 0,3 – 1 mL/min, dependendo da pressão do sistema. Após injeção da amostra, a coluna foi lavada com 2 CV de tampão A para remoção das proteínas não ligadas à coluna e em seguida, deu-se início à eluição com gradiente segmentado de 0 – 100% de tampão B em 20 CV.

[00160] A eluição de Ec-A, ECAR-LANS e Ec-A_mut foi realizada com 160 mM, 220 mM e 180 mM de imidazol, respectivamente. A eluição foi coletada em frações de 1,5 mL. Após o final da corrida cromatográfica, a pureza

das frações obtidas foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida. As asparaginases de *E. coli* e *E. carotovora*, bem como da asparaginase mutada conforme descrito na presente invenção foram purificadas na presença de contaminantes e, portanto, uma segunda cromatografia foi realizada.

3.1. Cromatografia de troca iônica

[00161] As frações da cromatografia de afinidade que continham a proteína de interesse foram dialisadas contra tampão C (20 mM Tris-HCl pH 8) para remoção do sal. A coluna utilizada nessa etapa de purificação foi a HiTrap Q 1 mL (GE Healthcare). A eluição ocorreu por gradiente segmentado de 0 – 100% tampão D (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8). Após o final da corrida cromatográfica, a pureza das frações obtidas foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

[00162] No caso da proteína Ec-A_mut, o balanço de cargas da proteína é negativo (pI Ec-A_mut = 4.95). A coluna foi então equilibrada com tampão C. A amostra foi injetada na coluna e a eluição ocorreu devido ao aumento gradativo da concentração de NaCl, chegando a 1M. A eluição foi realizada em 300 mM.

3.2. Cromatografia de gel filtração

[00163] As amostras provenientes da cromatografia de troca iônica que continham a proteína de interesse foram concentradas através de filtração. A solução foi colocada em filtro Amicon Ultra MWCO 10.000 (Milipore) e centrifugada a 4.000 rpm a 4°C até o volume de amostra ser igual a 500 µL.

[00164] O experimento foi realizado em sistema Äkta Pure M25 (GE Healthcare), usando-se coluna HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare), em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl.

[00165] As frações provenientes da cromatografia foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Com esse ensaio, é possível separar as proteínas contidas na amostra de acordo com o tamanho molecular. A coluna utilizada na cromatografia é composta de uma matriz com poros de diferentes diâmetros, portanto, quanto menor a partícula, maior será o caminho

percorrido e maior o volume de eluição. Além disso, a técnica também permite estimar o tamanho das moléculas eluídas, baseando-se no raio hidrodinâmico e no volume de eluição, comparados com curva padrão feita com amostras de tamanhos já conhecidos.

[00166] O grau de pureza das amostras necessário para posterior caracterização enzimática e estrutural foi alcançado após a cromatografia de gel filtração. O rendimento de cada uma das proteínas foi de 15 mg e 8 mg por litro de cultura de *E. coli* BL21(DE3)-Star produzindo as L-ASNase de *E. coli* e *E. carotovora* nativas, respectivamente.

[00167] À título comparativo, A L-ASNase comercial Ew-A é expressa por 16 horas, a 23°C com indução feita por IPTG. A purificação dessa enzima é feita por uma cromatografia de troca catiônica e gel filtração em coluna Superdex 200 pg (Alize Pharma II, 2011). Já a expressão de Ec-A comercial é feita em vetor pET27b em cepa de *E. coli* EN538, para permitir o controle da produção de proteína. A cultura em meio LB em 37°C até atingir OD_{600 nm} igual a 0.8 é induzida com 1 mM de IPTG e mantida a 37°C por mais 4 horas. A purificação é feita por etapa de cromatografia por troca catiônica e em seguida por uma purificação por troca aniônica.

[00168] O volume de eluição de Ec-A, e ECAR-LANS foi de 68,95 e 70,29 mL, respectivamente (Figura 2). Através de uma curva de calibração (Figura 3) que relaciona o volume de eluição e massa molecular de proteínas padrão, é possível constatar que a estrutura quaternária das proteínas recombinantes *E. coli* e *E. carotovora* é composta por 4 monômeros.

[00169] Pelo resultado da cromatografia de gel filtração (Figura 4), com volume de eluição de aproximadamente 79 ml, é possível confirmar que as enzimas Ec-A-mut foi produzida na forma tetramérica em solução, assim como Ec-A e ECAR-LANS.

EXEMPLO 4: Ensaios enzimáticos e análise cinética

[00170] Os ensaios de atividade enzimática foram realizados através da

detecção de amônia pelo reagente de Nessler. Sendo que primeiramente, foi necessário realizar uma curva padrão para relacionar OD_{436 nm} e concentração de amônia gerado na reação. Para tal, diferentes concentrações de solução de sulfato de amônio (0,03 - 0,075 - 0,15 - 0,3 - 0,45 - 0,6 - 1,05 - 1,5 mM) em 50 mM Tris-HCl pH 8.6 foram incubadas por 30 minutos à 37°C. Foi então adicionado 60 mM TCA em cada um dos tubos. Foi feita centrifugação por 2 minutos a 5.000 rpm e 0,2 mL do sobrenadante foi coletado e adicionado em tubos com 4,3 mL de água miliQ. Em seguida, foi adicionado 500 µL de reagente de Nessler (Sigma). Foi transferido o volume de 200 µL de cada tubo para placas de ELISA de 96 poços para realização da leitura no comprimento de onda de 436 nm.

[00171] Para avaliar a cinética enzimática com o cálculo da velocidade máxima (V_{máx}) e do coeficiente de Michaelis-Menten (K_m), os ensaios de atividade asparaginase foram realizados incubando 1.5 µM de cada uma das proteínas com diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) de asparagina ou glutamina em 50 mM Tris-HCl pH 8.6. As medidas de atividade foram mensuradas por 30 minutos a cada 2 minutos.

[00172] Os dados obtidos na leitura foram processados para determinação dos valores de atividade enzimática em IU/mg de proteína, K_m e V_{max}. Foi utilizado como controle negativo uma mistura de todos os componentes da reação sem a presença da enzima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

[00173] As equações utilizadas para determinação da atividade enzimática foram as seguintes:

$$\frac{U}{mL} \text{ de prot.} = \frac{(\mu M \text{ NH}_3 \text{ liberado})(\text{vol. de reação 1})}{(\text{vol. da reação 1 usada no passo 2})(\text{tempo de reação})(\text{vol. de enzima})}$$

$$\frac{IU}{mg} \text{ de proteína} = \frac{U/mL}{\frac{\text{concentração de proteína}}{\text{volume de enzima}}}$$

onde o volume (vol.) é apresentado em mL, massa em mg e tempo de reação em minutos.

[00174] A velocidade máxima (V_{max}) da asparaginase de *E. coli* é 25,1 $\mu\text{M}/\text{min}$ e o coeficiente de dissociação (K_m), 26,5 μM (Figura 5B). A atividade enzimática apresentada foi de 149,3 IU/mg. Esses dados estão de acordo com o valor descrito por PHILIPS *et al.*, 2013.

[00175] A velocidade máxima (V_{max}) da asparaginase de *E. carotovora* é 27,4 $\mu\text{M}/\text{min}$ e o coeficiente de dissociação (K_m), 75 μM (Figura 5A). A atividade enzimática apresentada foi de 340 IU/mg. Esses resultados estão de acordo com o já descrito por WARANGKAR & KHOBRAGADE, 2010.

[00176] A verificação da atividade L-glutaminase de Ec-A_mut em comparação com Ec-A e ECAR-LANS foi realizada. Os dados de análise cinética das enzimas quando incubadas com asparagina e glutamina são mostrados nas Tabelas 5 e 6 a seguir:

Tabela 5: Dados da análise cinética das enzimas incubadas com o substrato asparagina.

Asparagina	Ec-A	Ec-A_mut	ECAR-LANS
K_m (μM)	26,5	8,54	75

Tabela 6: Dados da análise cinética das enzimas incubadas com o substrato glutamina.

Glutamina	Ec-A	Ec-A_mut	ECAR-LANS
K_m (μM)	35	51	102

EXEMPLO 5: Espectroscopia de dicroísmo circular

[00177] O espectro de dicroísmo circular foi coletado usando o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corporation, Japão). Os dados foram coletados em cubetas de quartzo, com variações no caminho ótico (0,2 – 1 mm), dependendo da necessidade de cada proteína e dos componentes do tampão. A elipsidade molar em graus foi medida na região UV distante, no intervalo do comprimento de onda de 190 – 260 nm, podendo esse valor ser limitado dependendo da voltagem no detector do equipamento, que não deve ultrapassar de 800 V. A velocidade de leitura foi de 100 nm/min, com 10 leituras para as proteínas e 6 leituras para os tampões, com resposta de 1 segundo em varredura

contínua. Os valores obtidos em miligraus foram convertidos para elipsidade molar por resíduo ($[\theta]MRW$), em miligraus.cm²/dmol, que é definida pela equação (ADLER *et al.*, 1974):

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs} \cdot MRW}{10 \cdot d \cdot c}$$

onde θ_{obs} é a elipsidade molar observada em graus, MRW é o peso molecular médio dos resíduos da proteína, d é o caminho óptico da cubeta em centímetros e c é a concentração da proteína em mg/mL. O MRW foi calculado dividindo-se o peso molecular da proteína pelo número de resíduos.

[00178] Os espectros de dicroísmo circular das asparaginases de *E. coli* e *E. carotovora* indicam a presença de fitas- β e de α -hélices (Figura 6). Isso pode ser observado pelos valores mínimos nos comprimentos de onda 208 e 222 nm, além de valores positivos em 190 nm, padrão decorrente da presença de α -hélices na estrutura. Além disso, valores negativos em 218 nm e valores positivos em 196 nm são verificados devido à contribuição de fitas- β . A presença de fitas- β também é evidenciada pelo valor em 208 nm ser menor que em 222 nm. No caso de amostras desestruturadas, seria possível identificar uma banda positiva em 212 nm e negativa em 195 nm. Esses dados são fortes indícios de que as proteínas recombinantes estão corretamente enoveladas.

[00179] O espectro de dicroísmo circular de Ec-A_mut indica a presença de estruturas secundárias na proteína, forte indicio que está enovelada (Figura 7). No entanto, a sobreposição dos espectros de Ec-A, ECAR-LANS e Ec-A_mut indica que a substituição da região 53-75 de Ec-A pela região conservada em ECAR-LANS resultou em alterações estruturais em comparação com as enzimas Ec-A e ECAR-LANS.

[00180] A principal alteração em Ec-A_mut é observada pela diminuição de sinal em comprimentos de onda menores 215 nm, isso reflete alterações principalmente em α -hélices (208 nm) e fitas- β (desvio do espectro para direita em comprimentos de onda menores que 208 nm). O modelo estrutural mostra que as interações que estabilizam a hélice formada pelos resíduos 64-76

(numeração de Ec-A_mut) são mantidas ainda com as modificações nessa região. Ainda existem interações com os resíduos K79, T95, A81, T26-N35, D208-L215 da mesma molécula e com a região formada por G245-K251 da molécula adjacente. Modificações estruturais nessas regiões devem ser responsáveis pelas diferenças nos espectros de dicroísmo circular entre Ec-A_mut, Ec-A e ECAR-LANS.

[00181] A Figura 8 mostra a região que difere de Ec-A em azul escuro. A região modificada pode interagir tanto com regiões do mesmo monômero (intra cadeia) ou com regiões do monômero de outra cadeia (inter cadeia). Regiões do mesmo monômero (em vermelho) ou do monômero adjacente (em laranja) que interagem com a parte modificada de Ec-A_mut estão coloridas de vermelho e laranja, respectivamente. As interações entre essas regiões estão evidenciadas como linhas tracejadas.

EXEMPLO 6: Desnaturação térmica por espectroscopia de dicroísmo circular

[00182] Para os ensaios de desnaturação térmica, foi feita uma variação de temperatura de 20 a 90°C, e os dados foram adquiridos em espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corporation, Japão) em comprimento de onda de 222 nm.

[00183] De acordo com o valor de dicroísmo circular em 222nm foi inferida a porcentagem de proteína enovelada nas temperaturas analisadas, que resultou em um gráfico que descreve a % de fração enovelada presente na amostra em função da temperatura (Figura 9). Para análise comparativa dos efeitos das substituições encontradas em Ec-A_mut, o mesmo experimento foi realizado com as enzimas Ec-A e ECAR-LANS.

[00184] Os resultados obtidos no ensaio de desnaturação térmica ilustram bem que a L-ASNase de *E. coli* é mais estável que as de *Erwinia*. Em 40°C, aproximadamente 50% da amostra de ECAR-LANS está desenovelada, enquanto apenas 3.2% de Ec-A perderam estrutura. Estudos de farmacocinética

das L-ASNases comerciais Ec-A e Ew-A mostram que a meia vida de Ec-A (24-30 horas) é aproximadamente o dobro da meia vida de Ew-A (16 horas), o que resulta em menor número de doses ao longo do tratamento (HemOnc Today, 2012).

REFERÊNCIAS

ABSHIRE, T.C., POLLOCK, B.H., BILLET, A.L., BRADLEY, P., BUCHANAN, G.R. **Weekly polyethylene glycol conjugated l-asparaginase compared with biweekly dosing produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukaemia: a Pediatric Oncology Group Study.** Blood. 2000;96:1709–15.

ADLER, A. J., ROSS, D. G., CHEN, K. *et al.* **Interaction of deoxyribonucleic acid with histone f2b and its half-molecules** Circular dichroism studies. Biochem. 1974;13:616-622.

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos [EPA – *United States Environmental Protection Agency* em inglês] (www.epa.gov), acessado em outubro de 2015.

ALBERTSEN, B. K., SCHRODER, H., INGERSLEV, J. *et al.* **Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase-Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system** Br J Haematol. 2001;115:983-90.

ALVAREZ, O.A., ZIMMERMAN, G. **Pegaspargase-induced pancreatitis.** Med Pediatr Oncol. 2000;34:200–5.

AMYLON, M.D., SHUSTER, J., PULLEN, J., *et al.* **Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study** Leukemia 1999;13(3):335-42.

ASSELIN, B.L., KREISSMAN, S., COPPOLA, D.J., *et al.*, **Prognostic**

significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia J Pediatr Hematol Oncol. 1999;21:6–12.

BARRY, E., DE ANGELO, D.J., NEUBERG, D., *et al.* **Favourable outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on Dana-Farber cancer institute acute lymphoblastic leukemia consortium protocols.** J Clin Oncol. 2007;25:813–9.

CARNEIRO, F. R., SILVA, T. C., ALVEZ, A. C., *et al.* **Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1** Biochem Biophys Res Commun. 2006;1:241-54.

CEDAR, H., SCHWARTZ, J. H. **Localization of the two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*** J Biol Chem. 1967;242:3753-4.

DAVIS, L. G., DIBNER, M. D., BATTEY, J. F. **Basic methods in molecular biology.** New York: Elsevier. 1986.

GREENE T.W. WUTS P.G.M., **Protective groups in organic synthesis**, 3rd ed., John Wiley & Sons, INC, Nova York, EUA, 1999.

GUILLERME, C. M., DELGADO, R. F., NAVARRO, J. S. *et al.* **Uptade on L-asparaginase treatment in pediatrics** An Pediatr (Barc). 2013;79(5):329-40.

GRANTHAM, R., GAUTIER, C. AND GUOY, M. **Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type.** Nucleic Acids Res. 1980; 8:1893–1912.

T. W. GREENE AND P. G. M. WUTS, **Protective Groups in Organic Synthesis**, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd., New York, 1999.

GROSJEAN, H., FIERS, W. **Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon energy hypothesis.** Gene. 1982; 18:199.

HAAS, J. PARK, E.C., SEED, B. **Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein.** Curr. Biol. 1996; 6:315-324

HENRIKSEN, L. T., HARILA-SAARI, A., RUUD, E. *et al.* **PEG-asparaginase allergy in children with acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL 2008 protocol** *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(3):427-33.

HOLM L. **Codon usage and gene expression.** *Nucleic Acids Res*. 1986; 14:3075–3087.

IKEMURA, T. **Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codond in protein genes.** *J. Mol. Biol*. 1982; 158:573.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) - Ministério da Saúde –**Leucemia linfoide aguda em adulto** *Rev Bras Cancer*. 2002;48(3):309-12.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) - Ministério da Saúde –**Leucemias agudas na infância e adolescência** *Rev Bras Cancer*. 2001;47(3):245-57.

KANE J.F. **Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli.** *Curr. Opin. Biotechnol*. 1995;6:494.

KEARNEY, S.L., DAHLBERG, S.E., LEVY, D.E., VOSS, S.D., SALLAN, S.E., SILVERMAN, L.B. **Clinical course and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia and asparaginase-associated pancreatitis.** *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53:162–7.

KIRIYAMA, Y., *et al.* **Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase** *Leukemia*. 1989;3(4):294-7.

KRASOTKINA, J., *et al.* **One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*** *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;39(2):215-21.

LEE, S.M., WROBLE, M.H., ROSS, J.T., **L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. An improved recovery and purification process using affinity chromatography** *Appl Biochem Biotechnol*. 1989;22(1):1-11.

LORENZI, P.L., *et al.* **Asparagine synthetase as a casual, predictive**

biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells Mol Cancer Ther. 2006;5(11):2613-23.

MAKRIDES, S.C. **Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli***. Microbiol Rev; 1996; 60:512-538.

MULLER, H.J., BOOS, J. **Use of l-asparaginase in childhood ALL**. Crit Rev Oncol Hematol. 1998;282:97–113.

NARTA, U.K., KANWAR, S.S., AZMI, W., **Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia** Crit Rev Oncol Hematol. 2007;61(3):208-21.

NEHMY, R.M.Q. *et al.*, **A perspectiva dos pais sobre a obtenção do diagnóstico de leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes: uma experiência no Brasil** Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil. 2011;11(3):293-9.

PAPAGEORGIOU, A.C., *et al.* **Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase** FEBS Journal. 2008;275(17):4306-16.

PHILLIPS, R. M., SALEEM, M. U., WILLIAMS, A., *et al.* **Abstract C154: Kinetic analysis of the glutaminase activity of L-asparaginases derived from *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase[®]) and *Escherichia coli* (Kidrolase)**. Mol Cancer Ther. 2013;12:C154.

PIETERS, R., HUNGER, S.P., BOOS, J., *et al.* **L-Asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase**. Cancer. 2011;117:238–49.

PUI, C.H., EVANS, W.E., **Treatment of acute lymphoblastic leukemia** N Engl J Med. 2006;354:166-78.

RICHARDS, N.G., SCHUSTER, S.M., **Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis** Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1998;72:145-98.

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.

SAMBROOK et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SHARP PM, MATASSI G. **Codon usage and genome evolution**. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4:851–860.

SILVERMAN, L.B., GELBER, R.D., DALTON, V.K., *et al.*, **Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 191-01** *Blood*. 2001;97:1211-8.

Sociedade Norte-Americana do Câncer [ACS – *American Cancer Society* em inglês] (www.cancer.org), acessado em novembro de 2015.

UREN, J.R., CHANG, P.K., HANDSCHUMACHER, R.E., **Effects of asparagine synthetase inhibitors on asparaginase resistant tumors** *Biochem Pharmacol*. 1977;26(15):1405-10.

WAIN-HOBSON S, NUSSINOV R, BROWN RJ, SUSSMAN JL. **Preferential codon usage in genes**. *Gene*. 1981;13(4):355–364.

WARANGKAR, S. C., KHOBRAGADE, C. N. **Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase**. *Enzyme Res*. 2010:165878.

ZANICHELLI, M.A., COUTURATO, V.R., SOBRINHO, J., **Indications for hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010;32(1):54-60.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo com atividade asparaginase, caracterizado pelo fato de compreender substituições na região do sítio ativo da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 por resíduos de aminoácidos correspondentes na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, em que o referido polipeptídeo apresenta menor afinidade por diferentes aminoácidos que não asparagina quando comparada com o peptídeo com atividade asparaginase parental.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a referida região do sítio ativo compreender os resíduos de aminoácido nas posições 53 a 75 da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de as substituições serem realizadas em resíduos de aminoácidos em pelo menos uma das posições 54, 55, 59, 60, 62, 63, 64, 66, 70, 72, 73 e 75 da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

4. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de as substituições compreenderem pelo menos uma das seguintes substituições na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1: V54A, N55S, Q59E, D60M, N62T, D63S, N64D, W66L, A70S, K72R, I73V e T75E.

5. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de compreender a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:3.

6. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de ser adicionalmente conjugado covalentemente a polietilenoglicol (PEG).

7. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de ser para uso na prevenção ou tratamento de neoplasias.

8. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado

pelo fato de que a neoplasia é leucemia mieloide aguda ou leucemia linfóide aguda.

9. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica o polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

10. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por compreender a sequência de ácidos nucleicos da SEQ ID NO:4 e suas degenerações.

11. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo como definido na reivindicação 9 ou 10, operacionalmente ligado a um promotor e a um terminador de transcrição.

12. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo como definido na reivindicação 9 ou 10 ou um cassete de expressão como definido na reivindicação 11.

13. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de compreender um cassete de expressão como definido na reivindicação 11, ou um vetor de expressão como definido na reivindicação 12.

14. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

15. Uso de um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para prevenção ou tratamento de neoplasias.

16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a neoplasia é leucemia mieloide aguda ou leucemia linfóide aguda.

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

(a) fornecer uma célula hospedeira como definida na reivindicação 13;

(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.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo é covalentemente conjugado a polietilenoglicol (PEG).

19. Método para prevenir ou tratar neoplasias, caracterizado pelo fato de compreender administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 a um indivíduo em necessidade da dita prevenção ou tratamento.

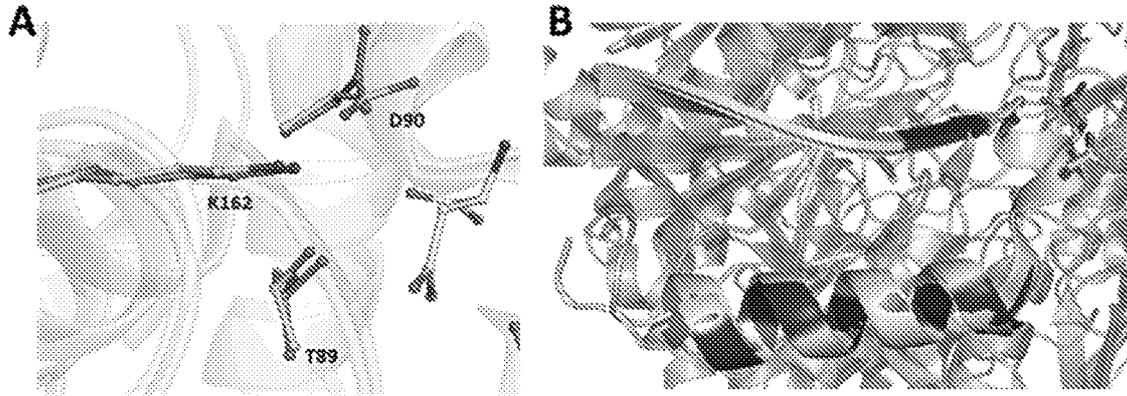


FIGURA 1

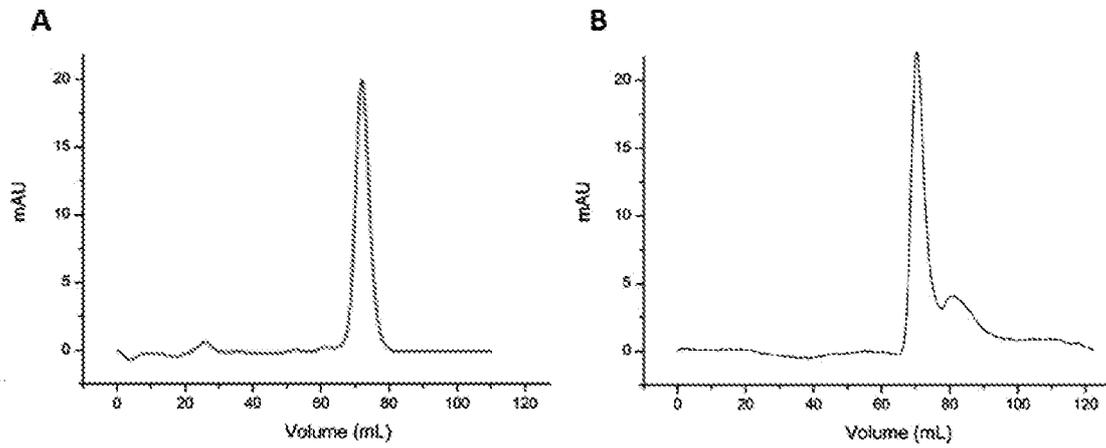
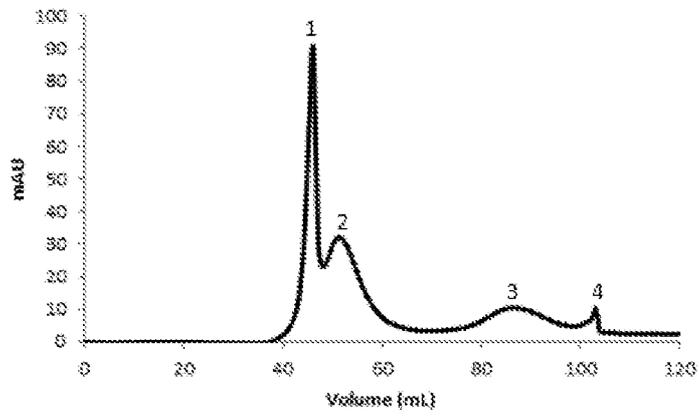


FIGURA 2

A



B

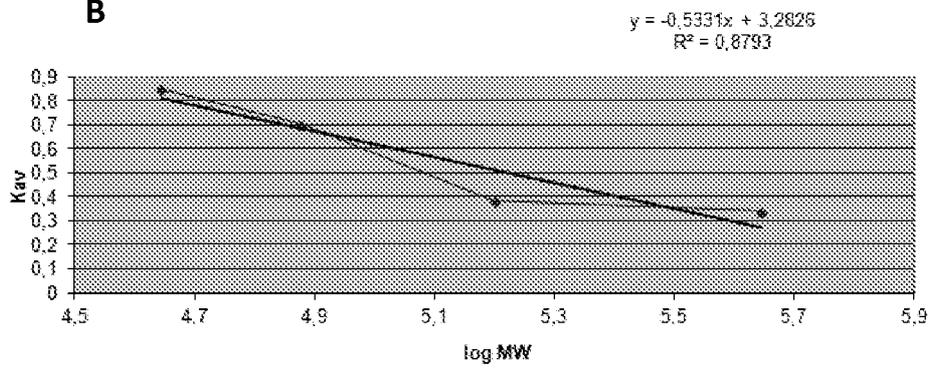


FIGURA 3

3/6

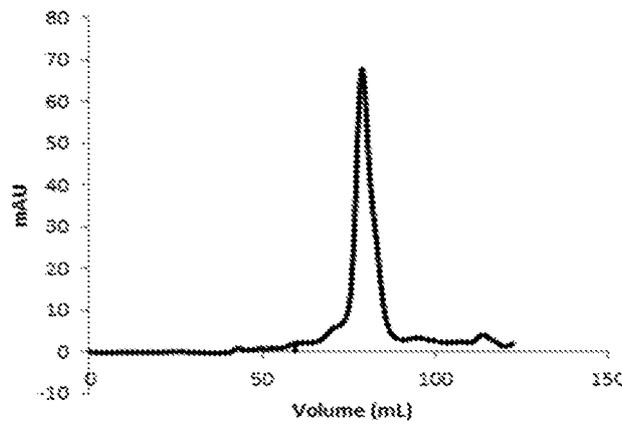


FIGURA 4

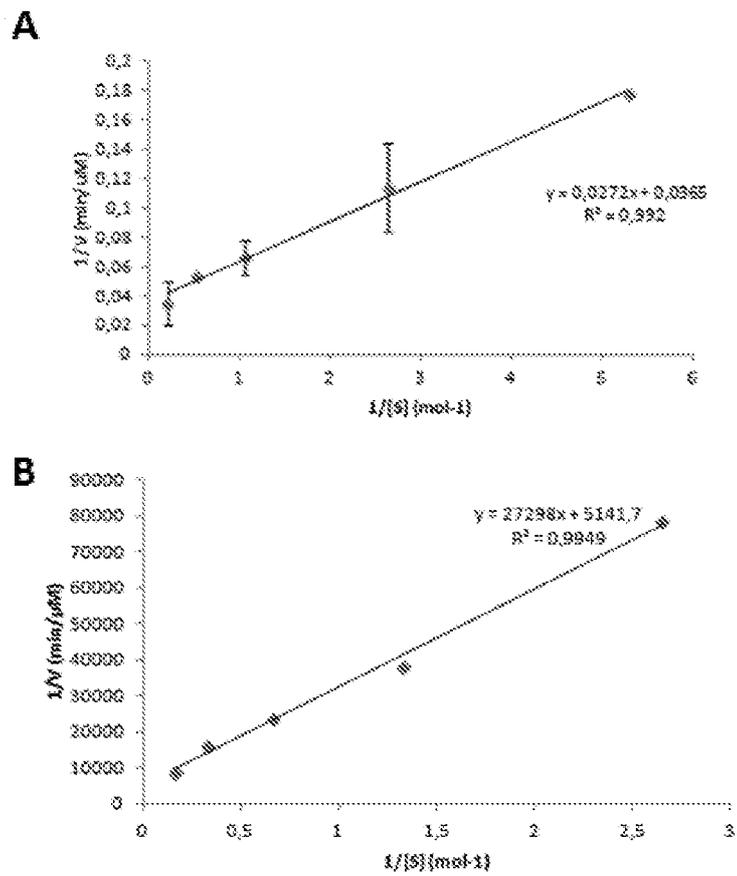


FIGURA 5

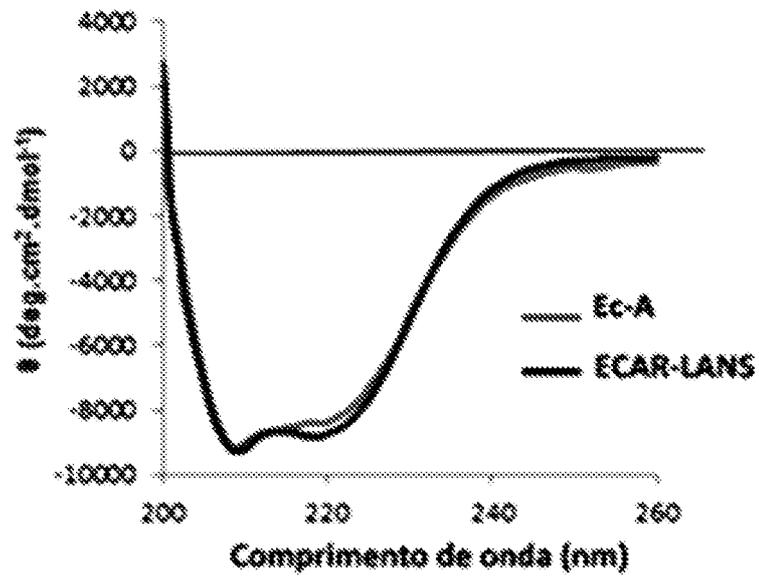


FIGURA 6

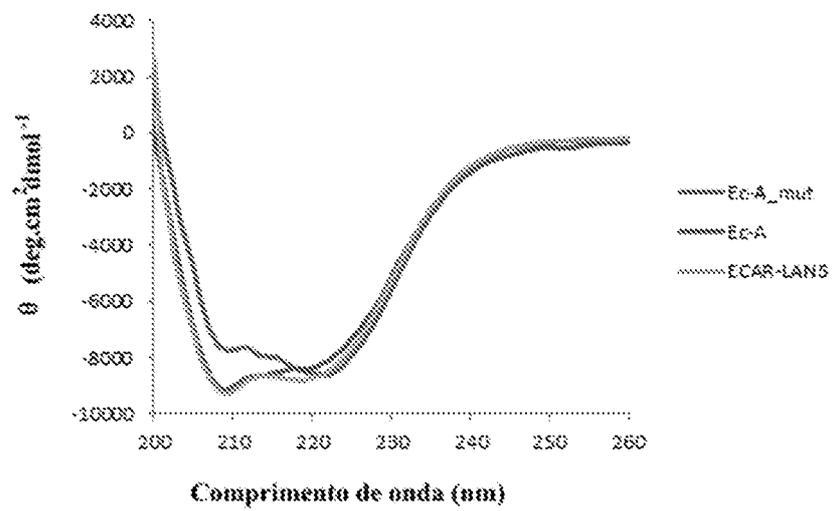


FIGURA 7

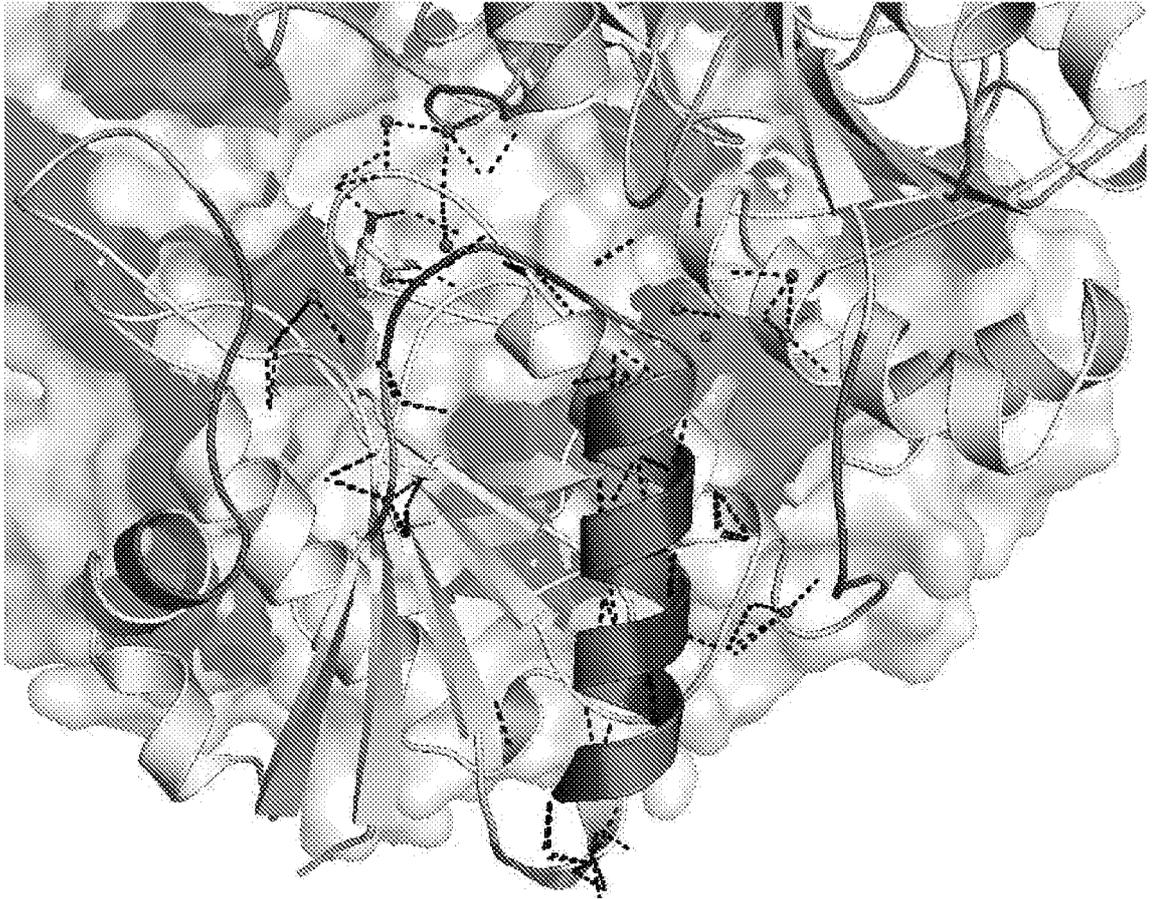


FIGURA 8

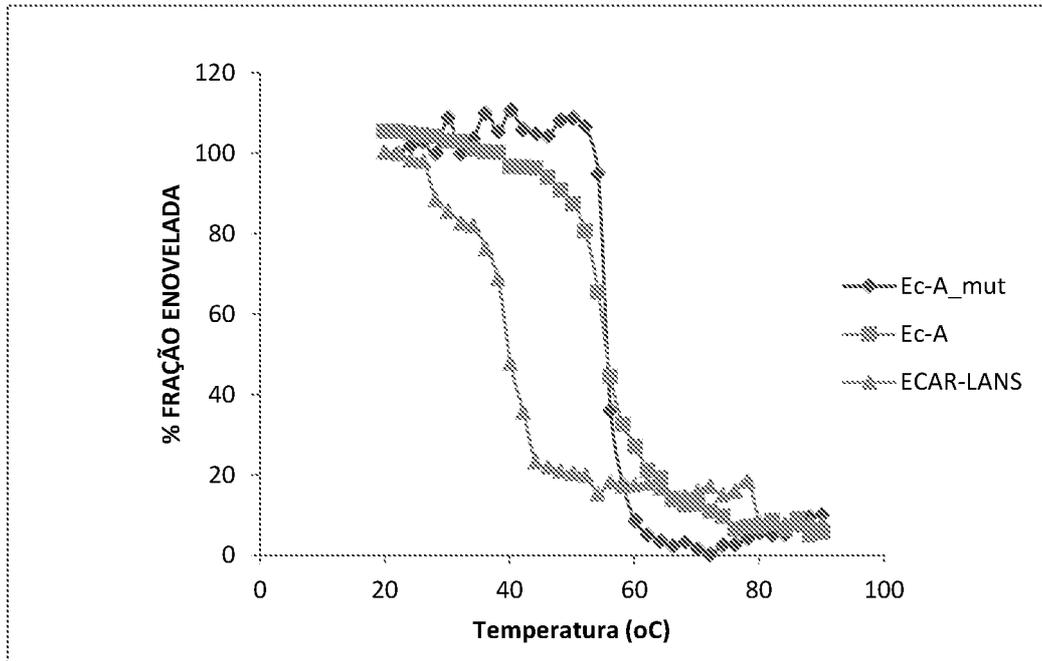


FIGURA 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/82 (2006.01), A61K38/50 (2006.01), C12N15/55 (2006.01), C12N 15/63 (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)

CPC: C12N 9/82, A61K38/50

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

Base de patentes do INPI-BR, 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, EPODOC, NPL, MEDLINE (continues in supplementary sheet)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015038639 A1 (UNIV TEXAS [US]) 19 March 2015 (2015-03-19) Cited in the application.	1 to 4, 6 to 9, 11 to 18
A	Abstract, paragraphs [0005], [0007], [0011], [0014], [0068], [0069], [0097], [00206], [00210], Figures 2 to 4, SEQ ID No. 9.	5, 10
X	DERST, C. <i>et al.</i> Engineering the substrate specificity of <i>Escherichia coli</i> asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. <i>Protein Sci.</i> 2000. Vol. 9, No. 10, pages: 2009-2017. https://doi.org/10.1110/ps.9.10.2009 . Cited in the application.	1 to 4, 7 to 9, 11 to 17
Y		6, 18
A	Abstract, first column of the page 2011, last paragraph of the page 2013, Figures 2 to 3, Table 1.	5, 10

 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

19/02/2020

Date of mailing of the international search report

28/02/2020

Name and mailing address of the ISA/BR


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

Facsimile No. +55 21 3037-3663

Authorized officer

Flávia Riso Rocha

Telephone No. +55 21 3037-3493/3742

In the case of space in any preceding table it is not sufficient

Continuation of : Electronic database consulted during international research

BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPEU, TXPEY, TXPMTCEA, TXPMTCEB, TXPMTCEU, TXPMTEA, TXPMTEB, TXPMTEC, TXPMTEE, TXPMTET, TXPMTEU, TXPMTEW, TXPMTEY, TXPMTEZ, TXPMTJEA, TXPMTJEB, TXPMTJEU, TXPMTJEY, TXPMTKEA, TXPMTKEB, TXPMTKEU, TXPMTKEY, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, XP3GPP, XPCPVO, XPIETF, XPIPCOM, XPJPEG, XPMISC, XPOAC, XPTK, TDB.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050552

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENBANK [Online] Fevereiro 2015 'periplasmic L-asparaginase II [Escherichia coli UMN026]', Access number (CAR14475).	1 to4, 7 to9, 11 to 17
Y	Document as a whole .	6, 18
A		5, 10
Y	MOLINEUX, G. Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy. <i>Cancer Treat Rev.</i> 2002. Vol. 28 Suppl A, pages: 13-16. doi: 10.1016/s0305-7372(02)80004-4.	6, 18
A	Abstract, first paragraph of the page 16.	1 to5, 7 to17
A	ALI, U. <i>et al.</i> L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. <i>Eur J Pharmacol.</i> 2016. Vol. 771, pages: 199-210. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.12.023.	1 to18
	Abstract, items 6.1 to6.2, Tables 1 to2.	
A	FARET, M. <i>et al.</i> l-Asparaginase from <i>Erwinia carotovora</i> : insights about its stability and activity. <i>Mol Biol Rep.</i> 2019. Vol. 46, No. 1, pages: 1313-1316. doi: 10.1007/s11033-018-4459-2. Epub 16/11/2018.	1 to18
	Abstract, "methods" section	
A	ARDALAN, N. <i>et al.</i> Novel mutant of <i>Escherichia coli</i> asparaginase II to reduction of the glutaminase activity in treatment of acute lymphocytic leukemia by molecular dynamics simulations and QM-MM studies. <i>Med Hypotheses.</i> Janeiro de 2018. Vol. 112, pages: 7-17. doi: 10.1016/j.mehy.2018.01.004.	1 to18
	Abstract, "methods" section. Tables 1 to2.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050552

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.: 19
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2019/050552

WO 2015038639 A1

2015-03-19

US 2016213759 A1

2016-07-28

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO		
C12N 9/82 (2006.01), A61K38/50 (2006.01), C12N15/55 (2006.01), C12N 15/63 (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)		
CPC: C12N 9/82, A61K38/50		
Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados		
Base de patentes do INPI-BR, 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, EPODOC, NPL, MEDLINE (continua em Folha Suplementar)		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	WO 2015038639 A1 (UNIV TEXAS [US]) 19 março 2015 (2015-03-19) Citado na descrição.	1 a 4, 6 a 9, 11 a 18
A	Resumo, parágrafos [0005], [0007], [0011], [0014], [0068], [0069], [0097], [00206], [00210], Figuras 2 e 4, SEQ ID No. 9.	5, 10
X	DERST, C. <i>et al.</i> Engineering the substrate specificity of <i>Escherichia coli</i> asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. Protein Sci. 2000. Vol. 9, No. 10, páginas: 2009-2017. https://doi.org/10.1110/ps.9.10.2009 . Citado na descrição.	1 a 4, 7 a 9, 11 a 17
Y	No. 10, páginas: 2009-2017. https://doi.org/10.1110/ps.9.10.2009 . Citado na descrição.	6, 18
A	Resumo, primeira coluna da página 2011, último parágrafo da página 2013, Figuras 2 e 3, Tabela 1.	5, 10
<input checked="" type="checkbox"/> Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C <input checked="" type="checkbox"/> 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 confita 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		Data do envio do relatório de pesquisa internacional:
19/02/2020		28/02/2020
Nome e endereço postal da ISA/BR		Funcionário autorizado
 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Marink Veiga nº 9, 6º andar cep: 20090-910, Centro - Rio de Janeiro/RJ +55 21 3037-3663		Flávia Riso Rocha
Nº de fax:		Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

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, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPEU, TXPEY, TXPMTCEA, TXPMTCEB, TXPMTCEU, TXPMTEA, TXPMTEB, TXPMTEC, TXPMTEE, TXPMTET, TXPMTEU, TXPMTEW, TXPMTEY, TXPMTEZ, TXPMTJEA, TXPMTJEB, TXPMTJEU, TXPMTJEY, TXPMTKEA, TXPMTKEB, TXPMTKEU, TXPMTKEY, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, XP3GPP, XPCPVO, XPIETF, XPIPCOM, XPJPEG, XPMISC, XPOAC, XPTK, TDB.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	DATABASE GENBANK [Online] Fevereiro 2015 'periplasmic L-asparaginase II [Escherichia coli UMN026]', Número de acesso (CAR14475).	1 a 4, 7 a 9, 11 a 17
Y	Documento como um todo.	6, 18
A	-----	5, 10
Y	MOLINEUX, G. Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy. <i>Cancer Treat Rev.</i> 2002. Vol. 28 Suppl A, páginas: 13-16. doi: 10.1016/s0305-7372(02)80004-4.	6, 18
A	Resumo, primeiro parágrafo da página 16. -----	1 a 5, 7 a 17
A	ALI, U. <i>et al.</i> L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. <i>Eur J Pharmacol.</i> 2016. Vol. 771, páginas: 199-210. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.12.023. Resumo, itens 6.1 e 6.2, Tabelas 1 e 2. -----	1 a 18
A	FARET, M. <i>et al.</i> l-Asparaginase from <i>Erwinia carotovora</i> : insights about its stability and activity. <i>Mol Biol Rep.</i> 2019. Vol. 46, No. 1, páginas: 1313-1316. doi: 10.1007/s11033-018-4459-2. Epub 16/11/2018. Resumo, seção "Métodos". -----	1 a 18
A	ARDALAN, N. <i>et al.</i> Novel mutant of <i>Escherichia coli</i> asparaginase II to reduction of the glutaminase activity in treatment of acute lymphocytic leukemia by molecular dynamics simulations and QM-MM studies. <i>Med Hypotheses.</i> Janeiro de 2018. Vol. 112, páginas: 7-17. doi: 10.1016/j.mehy.2018.01.004. Resumo, seção "Métodos", Tabelas 1 e 2. -----	1 a 18

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: 19

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. Conseqüentemente, 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.

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

Depósito internacional Nº
PCT/BR2019/050552

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 2015038639 A1 -----	2015-03-19 -----	US 2016213759 A1 -----	2016-07-28 -----