

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE DE BAIXA
MASSA MOLAR, L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE E USO DA MESMA**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se insere na área da biologia molecular, mais especificamente no que se refere à síntese de biofármacos, e faz referência ao método de obtenção de uma L-asparaginase recombinante, a qual apresenta elevada atividade específica sobre a L-asparagina.

[002] Adicionalmente, a invenção faz referência ao uso potencial da L-asparaginase recombinante no preparo de medicamentos para tratar diferentes tipos de câncer, além de neoplasias malignas leucêmicas.

Fundamentos da invenção:

[003] Células neoplásicas apresentam mutações genômicas que as diferem das células normais do organismo, gerando, assim, alterações em diversas funções celulares.

[004] O aminoácido L-asparagina (Asn ou N) é denominado não essencial, uma vez que muitas células são capazes de sintetizá-lo através da Asn sintase (ASNS).

[005] No entanto, alguns tecidos dependem de fontes extracelulares de Asn para desempenhar as suas atividades metabólicas, uma vez que este aminoácido é fundamental para a síntese de proteínas e, conseqüentemente, de DNA e RNA.

[006] Diversas células tumorais são dependentes da disponibilidade de Asn extracelular. Em vista deste fato, a administração de L-asparaginase (L-ASNase), a enzima que hidrolisa a Asn convertendo-a em aspartato (Asp) e amônia (NH₃), provoca a depleção da Asn na corrente sanguínea e impede a síntese de proteínas em células leucêmicas malignas.

[007] Desde 1970, a L-ASNase tornou-se um componente essencial na quimioterapia para o tratamento da Leucemia Linfóide Aguda. Ainda, é utilizada terapeuticamente para outros tipos de cânceres do sistema linfático, doença de Hodgkin, Leucemia Mielóide Aguda (LMA), leucemia linfocítica crônica (LLC), bem como reticulossarcoma e melanossarcoma.

[008] Hoje, existem no mercado três formas de L-ASNases terapeuticamente utilizadas: a L-ASNase nativa e a L-ASNase conjugada com polietilenoglicol (PEG-L-ASNase), obtidas de *Escherichia coli*, e a L-ASNase obtida a partir de *Erwinia chrysanthemi*.

[009] Reações de hipersensibilidade devido à produção de anticorpos anti-L-ASNase têm sido observadas em 60% dos pacientes que fazem uso da enzima nativa derivada de *E. coli*. Dentre os fatores imunogênicos, o próprio tamanho da enzima contribui para a presença de grande número de epítomos imunogênicos.

[010] Nesse contexto, desenvolveu-se a PEG-ASNase, que apresenta vantagem de ter período de meia-vida biológico superior a L-ASNase nativa e apresenta imunogenicidade mais baixa (pois o PEG oclui sítios imunogênicos). Entretanto, é comprovada a existência de reação-cruzada entre L-ASNase nativa e PEG-ASNase, inviabilizando a mudança de uma para outra e mesmo de anticorpos anti-PEG.

[011] Quando há reações a alguma das formulações de *E. coli*, opta-se pela L-ASNase obtida de *Erwinia chrysanthemi*. Esta última causa reduzida estimulação do sistema imune, mas apresenta meia vida biológica inferior às L-ASNase de *E. coli*, entretanto, 33% dos pacientes ainda apresentam

reações alérgicas à formulação.

[012] Os três tipos de L-ASNase possuem o mesmo mecanismo de ação, mas diferem nas suas propriedades farmacocinéticas, portanto, não é possível o intercâmbio com a mesma dose e frequência entre os três agentes.

[013] Estudos recentes têm demonstrado que as L-ASNases possuem potencial terapêutico em cânceres ovarianos e pancreáticos. Entretanto, sua utilização em outros tipos de tumores não é aplicada em razão da elevada massa molar da enzima (aproximadamente 140 kDa), em razão de barreiras físicas como capilares e a hematoencefálica.

[014] Indústrias farmacêuticas internacionais produzem L-ASNases de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, mas esse biofármaco não é produzido por indústrias farmacêuticas nacionais. Neste contexto, fontes alternativas desta enzima e autossuficiência em sua produção são importantes para evitar interrupções no tratamento devido a flutuações internacionais de sua produção.

[015] Uma vez que o uso de L-ASNases bacterianas no tratamento de leucemias está relacionado a diversos efeitos colaterais, uma alternativa terapêutica promissora é o uso de enzimas de outros organismos.

[016] Assim, a presente invenção descreve o método de obtenção de L-asparaginase de baixa massa molecular e, para tal, utiliza, alternativamente, a enzima Asp1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

[017] A Asp1 apresenta elevada homologia com as enzimas bacterianas (~38% de identidade e ~54 % de similaridade, tal como mostrado na Fig. 1) e possui todos os aminoácidos

envolvidos na catálise conservados em uma estrutura distinta.

[018] Dessa forma, utilizando metodologias de biologia molecular, a presente invenção provê um método no qual é possível obter uma enzima com características únicas, no que concerne à sua estrutura e atividade.

[019] A L-ASNase obtida é significativamente menor (1/4 do tamanho), o que pode indicar menor imunogenicidade e abre a possibilidade de utilização para o combate de tumores em tecidos e órgãos em que as L-ASNases bacterianas não podem ser utilizadas em razão de sua alta massa molar.

[020] Neste contexto, a enzima recombinante descrita na presente invenção apresenta elevado potencial para uso no preparo de medicamentos para tratar diferentes tipos de câncer, além de neoplasias malignas leucêmicas.

Estado da técnica:

[021] Alguns documentos do estado da técnica descrevem L-asparaginases recombinantes.

[022] O documento WO 2015/103681A1 descreve um método de obtenção de L-asparaginase de *Zymomonas* através da expressão heteróloga em *E. coli*. Apesar de ser expressa em *E. coli*, a asparaginase é oriunda de outro organismo e nenhuma menção a massa molecular é apresentada, o que indica alta massa molecular, assim como as demais asparaginases conhecidas.

[023] No BR 0406168, descreve-se um método de obtenção da enzima asparaginase II codificada pelo gene ASP3 de *S. cerevisiae*. Embora o microrganismo seja o mesmo, a proteína utilizada e o sistema de expressão são distintos.

[024] Em US 2015/093472, é descrito um método de

obtenção da enzima asparaginase através do fungo *Basidiomycete* e expressão heteróloga do mesmo em *E. coli*. Diferentemente, a enzima recombinante é utilizada na indústria alimentícia.

[025] Nenhum destes documentos faz referência a uma L-asparaginase de baixo peso molecular, capaz de ser utilizada no preparo de medicamentos para tratar diferentes tipos de câncer e neoplasias malignas leucêmicas.

Breve descrição da invenção:

[026] Esta invenção descreve um método de obtenção de uma L-asparaginase recombinante, bem como a enzima obtida e seu uso potencial no preparo de medicamentos para tratar diferentes tipos de câncer, além de neoplasias malignas leucêmicas.

[027] O método da presente invenção foi obtido de acordo com metodologias de biologia molecular e a L-ASNase recombinante obtida é uma L-ASNase de levedura de baixa massa molar, um indicativo de baixa atividade imunogênica. Ainda, foi demonstrado que a enzima apresenta elevada atividade específica sobre asparagina.

Breve descrição das figuras:

[028] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[029] A Fig. 1 representa o alinhamento das sequências proteicas de Asp1 de *Saccharomyces cerevisiae* e L-ASNases de bactérias.

[030] As Figs. 2A e 2B representam graficamente a análise da estrutura secundária das enzimas Asp1 e AspS de *S. cerevisiae* por espectroscopia de dicroísmo circular.

[031] As Figs. 3A e 3B representam graficamente a cromatografia de exclusão molecular de amostras das enzimas Asp1 e AspS e da enzima comercial Kidrolase.

[032] As Figuras 4A e B representam graficamente a determinação da atividade específica da enzima comercial Kidrolase e AspS.

Descrição detalhada da invenção:

[033] A presente invenção descreve um método de obtenção de uma L-asparaginase (L-ASNase) recombinante, bem como a referida enzima recombinante e seu uso potencial no preparo de medicamentos para tratar diferentes tipos de câncer, além de neoplasias malignas leucêmicas.

[034] Inicialmente, as sequências de proteínas das L-ASNases foram analisadas e revelaram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* contém uma enzima, denominada Asp1 (Seq. ID. 1), com elevada homologia com seus representantes bacterianos e que possui todos os aminoácidos envolvidos na catálise conservados.

[035] O alinhamento das sequências de proteínas das L-ASNases é mostrado na Fig. 1. Nesta figura, os aminoácidos estritamente conservados entre as L-ASNases de levedura e bactérias estão realçados em azul escuro, os aminoácidos que apresentam propriedades físico-químicas ou espaciais semelhantes estão realçados em roxo claro, os aminoácidos envolvidos na catálise em *E. coli* estão destacados nas caixas verdes, o resíduo de Tyr25 está destacado na caixa preta e os resíduos de Cys presentes em Asp1 estão apontados nas setas laranja.

[036] Adicionalmente, a Asp1 também possui uma extensão N-terminal, de aproximadamente 50 aminoácidos, única desta

enzima, sugerindo características estruturais distintas das L-ASNases já caracterizadas.

[037] Sendo assim, o método de obtenção da L-asparaginase recombinante compreende as etapas de:

a) Amplificação do gene *Asp1* por PCR e inserção deste em plasmídeo;

b) Expressão da enzima em *E. coli*;

c) Purificação; e

d) Seleção da enzima monomérica.

[038] Na etapa (a), o gene *Asp1* da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* é amplificado pela técnica de PCR e inserido em plasmídeos de expressão comercialmente disponíveis selecionados dos grupos que consistem em plasmídeos oriundos da família pET, tais como, por exemplo, pET14, pET15b e pET28pp; ou pPROEX, os quais proporcionam a fusão da proteína com uma cauda de histidina (6 × His) e possui sítios de clivagem para proteases como a HRV3C ou trombina entre a cauda e a enzima, o que possibilita a remoção da cauda após purificação.

[039] Para amplificação do gene foram utilizados os oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, Seq. ID. 3 e Seq. ID. 4 respectivamente, contendo adaptadores para sítios de restrição para Nde I e Bam HI. A amplificação consistiu de um ciclo inicial e desnaturação de 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C/30s, 50°C/20s e 72°C/60s. Após a amplificação, o gene foi digerido com as enzimas de restrição Nde I e Bam HI e ligados em plasmídeos descritos anteriormente.

[040] Em seguida, na etapa (b), os plasmídeos foram utilizados para transformação em diferentes linhagens de *E.*

coli por eletroporação e expressão heteróloga utilizando linhagens pro-oxidantes comerciais (tais como, por exemplo, Origami B21 (DE3) e K12 SHuffle T7) e purificada por cromatografia na etapa (c).

[041] É oportuno ressaltar que o citosol, tanto de procariotos quanto de eucariotos, é predominantemente redutor, no entanto, as linhagens bacterianas supracitadas apresentam mutações que as impedem de expressar proteínas redutoras no citosol (Δtrx , Δgrx , Δglr) e /ou expressam proteínas pro-oxidantes (tais como dissulfeto isomerases como Dsba, DsbC entre outras) e, portanto, permitem a formação de dissulfetos.

[042] Em vista desse fato, a expressão nestas linhagens foi adotada, uma vez que a enzima recombinante obtida de acordo com a presente invenção apresenta elevado número de resíduos de cisteínas, o que pode indicar a formação dos dissulfetos.

[043] De forma mais específica, na etapa (b), as linhagens de *E. coli* contendo os plasmídeos com os genes de interesse são pré-inoculadas em meio LB (Luria-Bertani) e cultivadas por 3 a 16h, preferencialmente 16h; a uma temperatura de 10 a 40°C, preferencialmente 37°C; sob agitação de 100 a 300 rpm, preferencialmente 200rpm; em agitador orbital.

[044] Posteriormente, ainda na etapa (b), a cultura é transferida para o meio LB/Ampicilina (LB/Amp), cultivadas até $OD_{600} = 0,6$ e, posteriormente, adicionado isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para concentração final de 0,1 a 2 mM, sendo a concentração preferencial de 0,3 mM. Após um período de 2 a 16 horas, preferencialmente 3 horas,

em 10 a 40°C, preferencialmente 37°C de indução, as células são decantadas por meio de centrifugação durante 10 a 40 min, preferencialmente 20 min; em uma temperatura de 4 a 37°C, preferencialmente 4°C; sob agitação de 2000 a 15000, 5000 rpm; e ressuspendidas em tampão Tris 50mM Hepes 50 mM PBS 50mM ou qualquer outro tampão que permita tamponamento na faixa de pH = 7,4- 8,5.

[045] O rompimento das células é realizado por sonicação de 10 a 40% de amplitude, preferencialmente 30% de amplitude, e os ácidos nucleicos são removidos por tratamento com sulfato de estreptomicina (concentração final = 1%) por 10 a 90 minutos, preferencialmente 20 minutos. Após este período, o extrato é centrifugado por 10 a 60 min, preferencialmente 45 min; em 4 a 37°C, preferencialmente 4 °C; de 10 a 50000g, preferencialmente 31,500g; e os extratos proteicos livres de ácidos nucleicos são coletados.

[046] Na etapa (c), uma vez que as proteínas foram expressas em vetores que adicionam cauda de histidina, elas são purificadas por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC) utilizando colunas comerciais contendo metais como cobalto ou níquel, os quais são capazes de interagir com a cauda de histidinas em fusão com a asparaginase, retendo-a na coluna enquanto que as demais proteínas celulares são eluídas. Preferencialmente, as proteínas são purificadas por IMAC utilizando colunas His-trap (comercial) em gradiente de imidazol. A qualidade da purificação é constatada por SDS-PAGE em condições redutoras. Em seguida, as proteínas são dessalinizadas através de cromatografia de filtração em gel e concentradas

por centrifugação (5.000-7000 g / 4-10 °C).

[047] As diferentes linhagens promoveram a formação de complexos proteicos de alta massa molar, entretanto, a expressão pro-oxidante e processamento (retirada da cauda de histidinas durante purificação) da proteína resultou em uma enzima monomérica de baixa massa molar (45 kDa - SEQ. ID. 2), constatada por meio de cromatografia de exclusão molecular, a qual foi denominada AspS (do inglês "*small*", pequena) - etapa (d).

[048] Cabe ressaltar que, após os procedimentos, a proteína recombinante AspS também apresenta sequência de aminoácidos (SEQ. ID. 2) distinta daquela encontrada naturalmente (SEQ. ID. 1), devido à inserção de aminoácidos GP na extremidade N-terminal.

[049] Uma vez que a condição oxidante é fundamental para a obtenção da proteína monomérica expressões em organismos procarióticos que possuam deficiências genéticas ou que apresentem o citosol com propriedades pro-oxidantes, manipulações *in vitro*, expressão periplasmáticas em células procarióticas ou no retículo endoplasmático, em células eucarióticas são reivindicadas nesta solicitação.

[050] A análise da estrutura secundária da enzima monomérica de baixa massa molar por meio de espectroscopia de dicroísmo circular demonstrou que a AspS apresenta 1,73% de α hélices e 40,84% de fitas β , revelando uma alteração na estrutura da enzima de forma muito expressiva (a enzima nativa apresenta 73,06% de α hélices e 26,94% de fitas β). Os gráficos podem ser observados nas Figs. 2A e 2B.

[051] É oportuno ressaltar que quantidade de α hélices e fitas β apresentadas na estrutura secundária da enzima

AspS varia de acordo com as concentrações de proteína (10 a 100 μM) e de tampão/sal (10 a 500 mM) utilizadas na análise. Por exemplo, para os parâmetros aqui apresentados, foi utilizado uma concentração de proteína de 5 μM em tampão fluoreto de sódio 20 mM, pH 7,4. Alternativamente, pode ser utilizado o tampão Tris (tris-hidroximetilaminometano, 20mM, pH=7,4) ou outro tampão que possua propriedades colorimétricas acentuadas e interfiram nos resultados.

[052] O grau oligomérico da enzima foi avaliado por cromatografia de exclusão molecular (SEC) e está indicado nas Figs. 3A e 3B. Em 3A, observa-se que os picos principais da proteína apresentaram tempos de retenção aproximados de 6 minutos, o que corresponde a ~16 monômeros da enzima, dados que contrastam com os descritos para L-ASNases de bactérias, predominantemente tetraméricas. Em 3B, a L-ASNase de *E. coli* comercial foi usada como controle, apresentando-se como tetrâmero (~140 kDa). Quando a enzima AspS foi submetida a SEC, foi detectada uma proteína de massa molar ~45kDa, que representa a massa aproximada do monômero.

[053] Em suma, o método aqui proposto não somente alterou o grau oligomérico de Asp1, como também exerceu uma mudança na sua estrutura secundária e empacotamento, como demonstrado nas Figs, 2A, 2B, 3A e 3B.

[054] A enzima obtida é significativamente menor do que a enzima nativa, o que pode indicar menor imunogenicidade (por não formar agregados proteicos) e abre a possibilidade de utilização para o combate de tumores em tecidos e órgãos em que as demais L-ASNases não podem ser utilizadas em

razão de sua alta massa molar. Assim, a enzima recombinante apresenta elevado potencial para uso no preparo de medicamentos para tratar diferentes tipos de câncer, além de neoplasias malignas leucêmicas.

[055] Ainda, por ser uma molécula de tamanho inferior a 50 kDa, a AspS pode ser rapidamente excretada. No entanto, por apresentar 10 resíduos de cisteínas em sua sequência de aminoácidos (as quais indicam formar dissulfetos), estes podem ser utilizados para anexar moléculas de PEG com o objetivo de diminuir a imunogenicidade. Ainda, o PEG também pode ser adicionado em aminoácidos contendo grupos amino na cadeia lateral. Neste sentido, a conjugação com o PEG pode resultar em uma enzima com meia-vida biológica ideal.

[056] Cabe ressaltar que o aumento do tamanho da molécula deve ser o suficiente para não ocorrer a rápida excreção e, ao mesmo tempo, manter a possibilidade de penetrar em tecidos de difícil acesso por moléculas maiores.

Determinação da atividade específica:

[057] Para se avaliar a atividade de L-asparaginase de AspS, foi empregado o ensaio utilizando o reagente de Nessler e utilizando, como controle positivo, a enzima comercial Kidrolase (da empresa EUSA Pharma).

[058] Como pode ser observado na figura 4, a enzima comercial Kidrolase possui atividade específica de 280 UI / mg / enzima (Figura 4A).

[059] O ensaio realizado utilizando concentrações similares para a proteína AspS revela elevada atividade específica da enzima, a saber, ~120 UI / mg / enzima (Figura 4B).

[060] Os resultados demonstram que foi possível obter uma enzima recombinante com características únicas quanto a à estrutura e atividade.

[061] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de obtenção de L-asparaginase recombinante de baixa massa molar **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) Amplificação do gene Asp1 por PCR e inserção deste em plasmídeo;
- b) Expressão da enzima em *E. coli*;
- c) Purificação; e
- d) Seleção da enzima monomérica.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa (a), o gene Asp1 da linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* ser amplificado pela técnica de PCR e inserido em plasmídeos de expressão comercialmente disponíveis.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa (b), a enzima ser transformada por eletroporação e expressa de forma heteróloga em ambiente oxidante, preferencialmente em diferentes linhagens de *E. coli*, mais preferencialmente em linhagens e ou condições pro-oxidantes tais como Origami B21 (DE3) e K12 SHuffle T7, e purificada por cromatografia.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, **caracterizado** pelo fato de a cultura ser transferida para o meio LB/Amp, cultivada até $OD_{600} = 0,6$ e adicionada de IPTG para concentração final que varia de 0,1 a 2mM, preferencialmente 0,3 mM, sendo, após um período de tempo de 2 a 16 horas, preferencialmente 3 horas, em 10 a 40°C, preferencialmente 37°C de indução, decantada por meio de centrifugação durante 10 a 40 min, preferencialmente 20 min, em uma temperatura de 4 a 37°C, preferencialmente 4°C,

sob agitação de 2000 a 15000, 5000 rpm, e ressuspendidas em tampão Tris 50mM, Hepes 50 mM, PBS 50mM ou qualquer outro tampão que permita tamponamento na faixa de pH 7,4- 8,5.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, 3 ou 4, **caracterizado** pelo fato de o rompimento das células ser realizado por sonicação de 10 a 40%, preferencialmente a 30% amplitude e os ácidos nucleicos serem removidos por tratamento com sulfato de estreptomicina 1% por 10 a 90, preferencialmente 20 minutos, seguido de centrifugação por 10 a 60 min, preferencialmente 45 min; em 4 a 37°C, preferencialmente 4 °C; e de 10 a 50000g, preferencialmente 31,500g.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa (c), as proteínas serem purificadas por cromatografia de afinidade por metais em colunas comerciais contendo metais como cobalto ou níquel, preferencialmente His-trap em gradiente de imidazol, seguidas de dessalinização através de cromatografia de filtração em gel e concentradas por centrifugação (5.000 a 7000 g / 4 a 10 °C).

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa (d), a enzima monomérica de baixa massa molar ser constatada por meio de cromatografia de exclusão molecular e selecionada.

8. L-Asparaginase recombinante **caracterizada** pelo fato de ser conforme definida na SEQ. ID. 2, apresentar massa molar de 45 kDa e apresentar 1,73 % de α hélices e 40,84% de fitas β , em que a quantidade de α hélices e fitas β varia de acordo com as concentrações de proteína (10 a 100 μ M) e de tampão/sal (10 a 500 nM) utilizadas na análise de

sua estrutura por meio de espectroscopia de dicroísmo circular.

9. L-Asparaginase recombinante, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de ser, alternativamente, conjugada com o PEG nas cisteínas ou em aminoácidos contendo grupos amino na cadeia lateral.

10. Uso da L-asparaginase recombinante da reivindicação 8 ou 9, obtida conforme o método definido nas reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para tratar diferentes tipos de câncer e neoplasias malignas leucêmicas.

Asp2_E.coli/I-348	1	-----MEFFK-----KTLAALVMGFSGAALA-----	48
AspB_E.Chrys/I-348	1	-----MERWF-----KSLFVLVLF-FVFTASAADK-----	51
AspB_E.Carot/I-349	1	-----MKRMF-----KALFVVVFVCFSSLANAAEN-----	52
AspI_YDR321W/I-381	1	MKSDSVEITTCPOVENSQFVVQNSCPETIPEILKSQNAAVNGSGIACQQRSIPRKILCTGGTISKKIDSSQTACVH	79
Asp2_E.coli/I-348	49	VGKVGVENLVNAVYQEKDIANVKGEDVNTGSDMNDNVWLTAKKIN--TDCDKTDGFVTHGDTTMEETAYFFDLTV	125
AspB_E.Chrys/I-348	52	AGALGVDLTINAYPEVKKLNAVKGEDFSNMAENMTGDVVLKLSQRVNEELLARDDVDGVVTHGDTTVEESAYFFHLTV	130
AspB_E.Carot/I-349	53	AGALGVETLIQAVPELKTLANIKGEQVASIGSENMTSDVLTLSKRVNELLARSDDVDGVVTHGDTTLDSPYFFLNLTV	131
AspI_YDR321W/I-381	80	VDLT-QDILLDAIIDIISKVCDIYEQLCNVDSKDINEDI LYKLYKGVSESLQA--FDGIVVTHGDTTLDSETAFFIESTI	155
Asp2_E.coli/I-348	126	KC-DKPVVMVGAMRPSTSMSSADGPFNLVNAVYTAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVTNTTDDVATFKSVNYPLGY	203
AspB_E.Chrys/I-348	131	KS-DKPVVFVAAMRPATAISADGPMNLEAVRVAGDKQSRGRGVMMVLNDRAGSARYITNTASTLDTFKANEQYLG	208
AspB_E.Carot/I-349	132	KS-DKPVVFVAAMRPATAISADGPMNLYGAVKVAADKNRCRGVLVVLNDRAGSARFISNTASTLDTFKAPEEYLG	209
AspI_YDR321W/I-381	156	DAGDVPILVFYGSMRPSTSVSADGPMNLYQAICIASNPKRCRGVLVSLNDQISSQYITNTANSLSHNVR-QYLG	233
Asp2_E.coli/I-348	204	IHNCKDYQRTPAKKHSDTPFDVSKLN---ELPKVGLVYNYANA-SDLPAKALVDAGYDGI VSGVGNCLYKSV-FD	277
AspB_E.Chrys/I-348	209	IIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVDVRLT---SLPKVDILYGYQDD-PELYDAAIQHGKGI VYAGMGAGSVSVRG-IA	282
AspB_E.Carot/I-349	210	IIGDKIYYQTRLDKVHTTRSVDVTNVD---KLPAVDILYGYQDD-PEYMYDASIKHGKGI VYAGMGAGSVSVKRG-DA	283
AspI_YDR321W/I-381	234	IYVNEHYHYPPFVAPQL-CHKIKLRVDGKHFKLEVCILYAHQAF-PPAIVNLVADK-YDGI VLATMGAGSLPEE---V	306
Asp2_E.coli/I-348	278	TLATAAKTGTAVVRSSVPTGATTQDAEVDDA--KYGFVASGTINPQKARVLLQLALTQTQDPQQQQIINQY---	348
AspB_E.Chrys/I-348	283	CMRKAMEKGVVIRSTRTGNCIVPDEELP-----GLVSD-SLNPAAHARILLMLALTRTSDPKVQIYFHTY---	348
AspB_E.Carot/I-349	284	GIRKAESKGI VVVRSSITGSGIVRPDAGQP-----GLVAD-SLSPAKSRILLMLALTKTTPAVQDYFHTY---	349
AspI_YDR321W/I-381	307	NETCMKLS-LPIVYSKSMGDMVRIANVPKKGSKEDNLASGYLSPKSRILLQLCLACHYTLLEEIKHVITGVYGG	381

FIG. 1

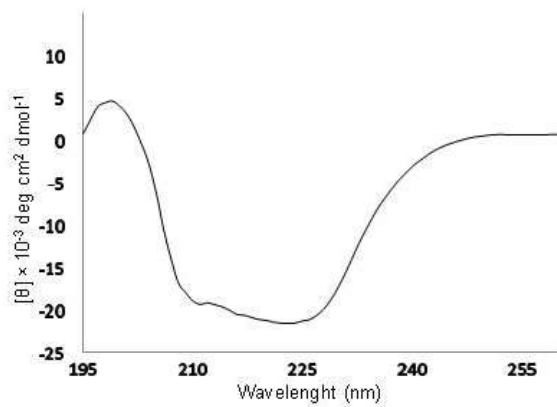


FIG. 2A

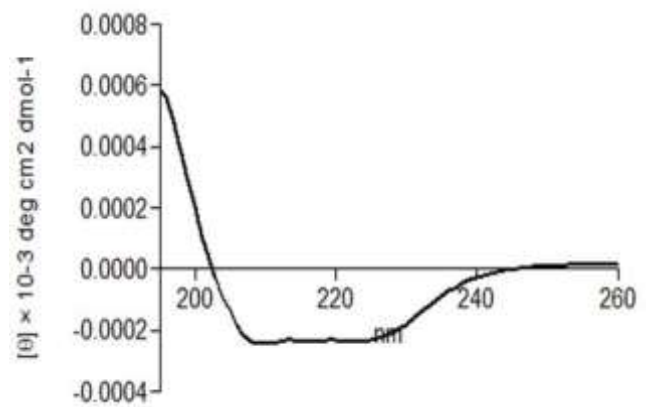


FIG. 2B

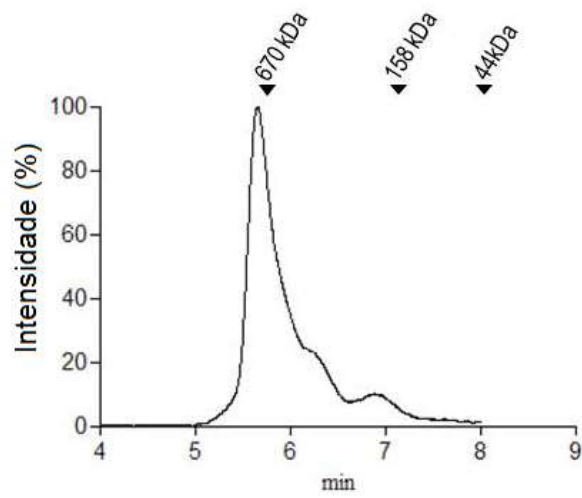


FIG. 3A

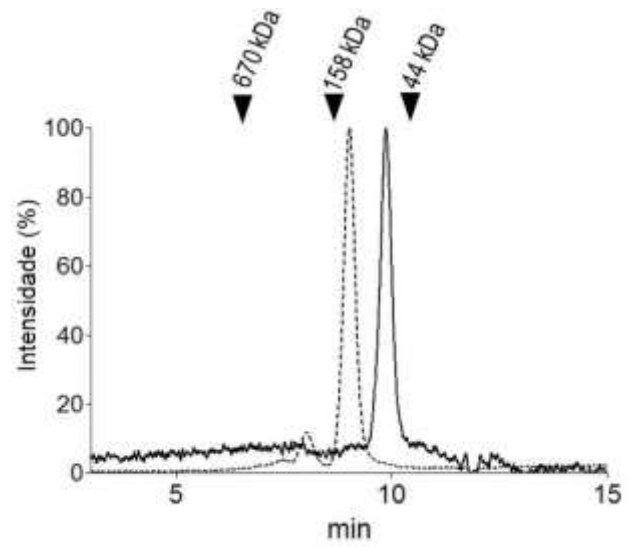


FIG. 3B

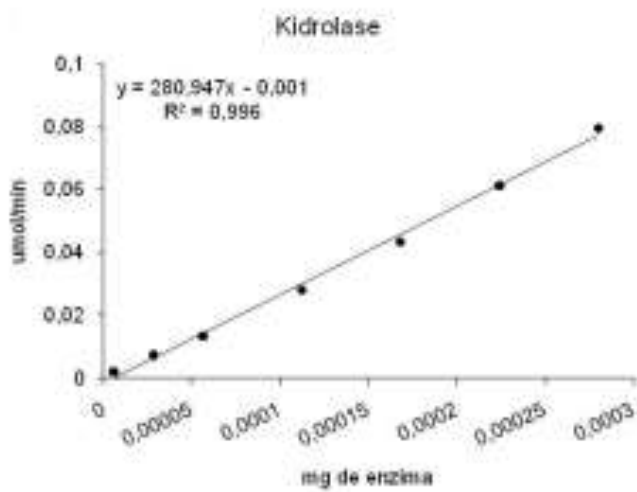


FIG. 4A

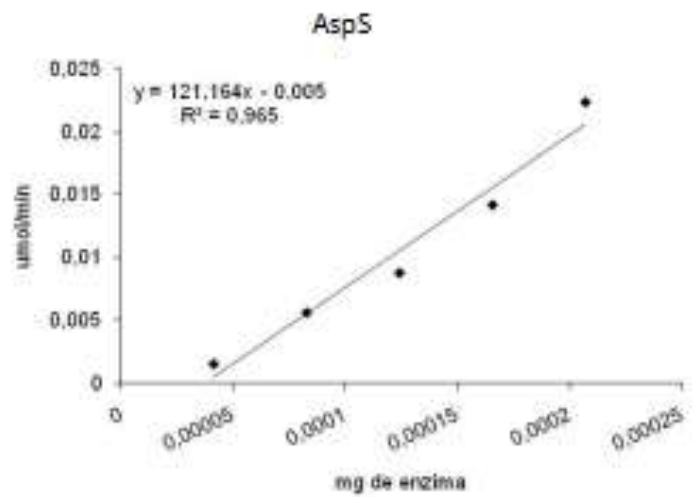


FIG. 4B

Resumo**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE DE BAIXA MASSA MOLAR, L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE E USO DA MESMA**

Esta invenção descreve um método de obtenção de uma L-asparaginase recombinante, bem como a referida enzima e seu uso potencial no preparo de medicamentos para tratar diferentes tipos de câncer, além de neoplasias malignas leucêmicas.

O método da presente invenção foi obtido de acordo com metodologias de biologia molecular e a enzima recombinante obtida é uma L-ASNase de levedura de baixa massa molar e, portanto, apresenta baixa atividade imunogênica e elevada atividade específica sobre a asparagina, podendo ser conjugada com o PEG nas cisteínas ou em aminoácidos contendo grupos amino na cadeia lateral.