

(22) Data de pedido: **2007.06.08**

(30) Prioridade(s): **2006.06.30 US 817817 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.04.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.08.12**
232/2015

(73) Titular(es):

SIGMA-TAU PHARMA LIMITED

21 HOLBORN VIADUCT LONDON EC1A 2DY GB

(72) Inventor(es):

DAVID R. FILPULA

US

MAOLIANG WANG

US

(74) Mandatário:

ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA

AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **HOSPEDEIRO RECOMBINANTE PARA PRODUZIR L-ASPARAGINASE II**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO FORNECE UMA CÉLULA HOSPEDEIRA DE ESCHERICHIA COLI RECOMBINANTE PARA PRODUZIR UMA ENZIMA L-ASPARAGINASE II DE ESCHERICHIA COLI. A CÉLULA HOSPEDEIRA INCLUI UM CROMOSSOMA DE ESCHERICHIA COLI E PELO MENOS UMA CÓPIA DE UM VETOR EXTRACROMOSSÓMICO RECOMBINANTE, EM QUE O VETOR EXTRACROMOSSÓMICO RECOMBINANTE CODIFICA A ENZIMA LASPARAGINASE II, EM QUE O CROMOSSOMA DE CÉLULA HOSPEDEIRA TAMBÉM CODIFICA A MESMA ENZIMA L-ASPARAGINASE II, E EM QUE O CROMOSSOMA HOSPEDEIRO NÃO CODIFICA QUALQUER OUTRA ISOFORMA DE L-ASPARAGINASE II.

DESCRIÇÃO

"HOSPEDEIRO RECOMBINANTE PARA PRODUZIR L-ASPARAGINASE II"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a vetores inovadores, células hospedeiras e métodos para produzir uma enzima L-asparaginase II de *E. coli* recombinante específica de pureza uniforme.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

A L-asparaginase é uma enzima que hidrolisa a L-asparagina de aminoácido em L-aspartato e amónia, isto é, é uma enzima de desaminação. A *E. coli* contém duas isoenzimas asparaginase: L-asparaginase I e L-asparaginase II. A L-asparaginase I é localizada no citosol e tem uma baixa afinidade para asparagina. A L-asparaginase II é localizada no periplasma e tem uma alta afinidade para L-asparagina.

A L-asparaginase II é útil no tratamento de tumores ou cancros que são dependentes da L-asparagina para a síntese de proteína ao remover a asparagina extracelular. A mesma é particularmente útil no tratamento de leucemias, tal como a leucemia linfoblástica aguda. A L-asparaginase é tipicamente usada em combinação com outras terapias antitumor ou anticancro, embora a mesma possa ser empregada sozinha em determinadas situações clínicas. A L-asparaginase foi originalmente purificada a partir de diversos organismos, incluindo *Escherichia coli* ("*E. coli*") e *Erwinia carotovora*. Dentre os mamíferos, a L-asparaginase II é encontrada em mais do que quantidades vestigiais

apenas em porquinhos-da-Índia (superfamília Caviioidea) e em determinados macacos do Novo Mundo.

A L-asparaginase II de *E. coli* é um tetrâmero de subunidades idênticas que exhibe excelentes k_{out} e K_{in} . A L-asparaginase II de *E. coli* (também conhecida na técnica como L-asparagina amidoidrolase, tipo EC-2, EC 3.5.1.1) está comercialmente disponível como Elspar® (Merck & Co., Inc.) e também está disponível junto à Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

A L-asparaginase II, por si só, apresenta desvantagens usuais da terapêutica de proteína, tal como a alta taxa de espaçamento de uma proteína estranha ao paciente, e o potencial para induzir uma resposta imunológica num paciente tratado com essa enzima. A fim de abordar essas desvantagens, um derivado conjugado com polietileno glicol da L-asparaginase II foi desenvolvido e é comercializado como pegaspargase ou Oncaspar® pela Enzon Pharmaceuticals, Inc. A pegaspargase é produzida com o uso da L-asparaginase II extraída da *E. coli*, conforme suprida pela Merck. A pegaspargase (também conhecida como monometóxi polietileno glicol succinimidil L-asparaginase) tem as vantagens de ser substancialmente não antigénica e de exhibir uma taxa reduzida de afastamento da circulação.

Entretanto, apesar desses sucessos, seria ainda mais eficaz e económico se a proteína de L-asparaginase II de *E. coli* pudesse ser produzida por uma célula hospedeira recombinante empregando um vetor de expressão extracromossómico adequado, por exemplo, tal como um plasmídeo. Tais vetores de expressão podem ser modificados para a produção mais eficaz da proteína que é disponível

com a produção de uma cepa de *E. coli* nativa. Apesar das vantagens potenciais de tal produção recombinante, acredita-se que, até o momento, não haja nenhuma sequência de polipeptídeos publicada precisa para a enzima L-asparaginase II comercial e nenhuma sequência de ácidos nucleicos publicada para os polinucleotídeos que codificam essa enzima. Por exemplo, uma sequência de peptídeos de L-asparaginase II foi anteriormente relatada por Maita et al. 1980, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361(2), 105 a 117 e Maita et al., 1974, J. Biochem. 76, 1.351 a 1.354 [Tóquio]. Entretanto, conforme discutido abaixo, esse trabalho inicial apresentou vários erros de sequenciação.

Outro obstáculo potencial para a expressão de plasmídeo da subunidade da enzima L-asparaginase II é a presença do gene que codifica uma subunidade de L-asparaginase II que é nativa ao cromossoma de cepas de *E. coli* potenciais que podem ser empregadas como células hospedeiras. Assim, há uma preocupação de que a L-asparaginase II colhida de uma célula hospedeira de *E. coli* que carrega um vetor de expressão extracromossômico poderia incluir subunidades representando mais do que uma isoforma de L-asparaginase. Dada a necessidade de ter um produto enzimático bem caracterizado, para propósitos tanto clínicos quanto reguladores, essa possibilidade representou, até ao momento, um sério desafio clínico à melhoria na eficácia da produção da proteína de L-asparaginase II de *E. coli*.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção satisfaz a necessidade mencionada acima de uma L-asparaginase II de *E. coli* que é produzida eficaz e economicamente na forma recombinante, enquanto fornece um

produto de enzima que tem a mesma estrutura de peptídeo que a proteína de L-asparaginase II de *E. Coli*, comercializada como Oncaspar®, que também é livre de quantidades detetáveis de isoformas de L-asparaginase II alternativas.

Assim, a invenção fornece uma célula hospedeira de *E. coli* que compreende um cromossoma de *E. coli* e pelo menos uma cópia de um vetor extracromossômico recombinante, em que o vetor extracromossômico codifica uma subunidade da proteína de L-asparaginase II, em que o cromossoma de célula hospedeira de *E. coli* codifica a mesma subunidade da proteína de L-asparaginase, e em que o cromossoma hospedeiro de *E. coli* não codifica qualquer outra isoforma de L-asparaginase II. O vetor extracromossômico é, de preferência, um plasmídeo adequado para a replicação e expressão em *E. coli*.

De preferência, a proteína de L-asparaginase expressa compreende quatro subunidades que têm uma sequência de polipeptídeos de acordo com a SEQ ID NO:1, que corresponde à sequência das subunidades da enzima L-asparaginase II usada na fabricação de Oncaspar® e o vetor de plasmídeo compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma subunidade da proteína de Lasparaginase, que é operacionalmente conectada a um promotor adequado. O promotor é qualquer promotor adequado, mas é opcionalmente selecionado a partir do grupo que consiste em promotores T7, araB, trp, tac, lac, λ P_L, λ P_R, aroH e phoA. O vetor de plasmídeo inclui opcionalmente elementos de vetor adicionais, conforme pode ser necessário para a expressão eficaz e/ou purificação de produto, que são operacionalmente ligados ao quadro de leitura aberto de L-asparaginase e/ou ao promotor. Esses elementos de vetor

incluem, por exemplo, uma sequência de operador compatível, sítio de ligação de ribossoma, terminador transcricional, sequência de sinal, marcador de resistência a fármaco e origem de replicação. Uma cópia gerada em plasmídeo do gene repressor relevante, por exemplo, *lacI*, pode também estar presente.

De preferência, a molécula de DNA de plasmídeo que codifica a subunidade da proteína de L-asparaginase II compreende a SEQ ID NO: 2, e a molécula de DNA cromossômico que codifica a proteína L-asparaginase II compreende a SEQ ID NO: 3.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 ilustra um mapa do vetor de plasmídeo pEN537.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conseqüentemente, a fim de fornecer as melhorias desejadas na produção da L-asparaginase II que corresponde à L-asparaginase Oncaspar® e Kyowa Hapko, é necessário obter um vetor que codifica a enzima e também fornecer uma célula hospedeira que expressará apenas uma única isoforma da L-asparaginase II. Assim, a enzima L-asparaginase II junto à Merck & Co., Inc., assim como a enzima L-asparaginase II obtida junto à Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. foram sequenciadas e as sequências resultantes foram comparadas a essa da enzima L-asparaginase II obtido a partir da *E. coli* K-12, conforme relatado por Jennings et al., 1990 J Bacteriol 172: 1.491 a 1.498. A enzima L-asparaginase II K12 é codificada pelo gene *ansB* (GeneBank nº M34277).

Conforme observado acima, o versado na técnica verificará que a enzima L-asparaginase II compreende quatro subunidades idênticas. Assim, a referência a um gene ou molécula de DNA que codifica a enzima e a sequência de proteína de enzima refere-se ao gene que codifica uma dessas subunidades idênticas.

A sequenciação de peptídeo foi conduzido por métodos padrão da técnica, conforme resumido pelo Exemplo 1, abaixo. As sequências de proteínas das subunidades tanto da Merck & Co., Inc. quanto da Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. revelaram-se surpreendentemente idênticas (consultar a SEQ ID NO: 1). Com esses dados, pode ser agora apreciado que relatos anteriores da sequência da L-asparaginase de Merck por Maita et al. 1980 Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361(2), 105 a 117 e Maita et al., 1974, J. Biochem. 76, 1.351 a 1.354 [Tóquio] continham, na verdade, vários erros.

As sequências obtidas foram também comparadas à estrutura de subunidade da enzima L-asparaginase II de K12. Foi revelado que a subunidade da enzima L-asparaginase II de K12 difere-se da subunidade da enzima L-asparaginase II da Merck & Co., Inc. nas quatro posições de resíduo específicas. Em relação à enzima L-asparaginase II da Merck, a subunidade de enzima de K12 tem Val₂₇ no lugar de Ala₂₇, Asn₆₄ no lugar de Asp₆₄, Ser₂₅₂ no lugar de Thr₂₅₂ e Thr₂₆₃ no lugar de Asn₂₆₃.

Conforme observado acima, é preferencial que o cromossoma da célula hospedeira de *E. coli* não expresse uma isoforma diferente da L-asparaginase II do que é expressa pelo vetor extracromossômico, isto é, por um plasmídeo. Esse resultado desejável pode ser alcançado por uma das diversas

estratégias alternativas. Por exemplo, qualquer gene de L-asparaginase II presente no cromossoma hospedeiro *E. coli* poderia ser deletado ou ter sofrido knock out completa ou parcialmente. Alternativamente, a expressão de qualquer gene de L-asparaginase II alternativo presente no cromossoma hospedeiro poderia ser suprimida por propriedades regulatórias intrínsecas do promotor natural com um que falha em permitir a expressão sob as mesmas condições de cultura que favorecem a expressão da isoforma da L-asparaginase II codificada pelo vetor extracromossômico. Entretanto, é preferencial ter os genes de L-asparaginase II cromossômico e extracromossômico expressando a mesma isoforma da enzima L-asparaginase II.

Para essa finalidade, as subunidades da enzima L-asparaginase II produzida por diversas cepas de *E. coli* disponíveis foram sequenciadas e comparadas aos produtos de enzima comerciais. Foi inesperadamente revelado que a cepa de *E. coli* BLR (DE3) [obtida junto à Novagen Corporation; nº de catálogo 69208-3] produz uma enzima L-asparaginase II cromossomicamente codificada idêntica na estrutura às enzimas comercialmente disponíveis, enquanto as cepas de *E. coli* GX1210 e *E. coli* GX6712 que foram também testadas revelaram produzir isoformas diferentes da enzima L-asparaginase II.

Com a identificação de um hospedeiro de *E. coli* preferencial, um vetor de expressão extracromossômico, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, cuja replicação é independente da replicação cromossômica, pode ser construído. Os vetores extracromossômicos adequados para o uso em *E. coli* incluem, por exemplo, plasmídeos derivados de pUC ou pBR322. Os mesmos incluem

plasmídeos tais como pET e pBAD, assim como uma variedade de plasmídeos que têm elementos de expressão de T7, araBAD, phoA, trc, O_L, O_R, P_L, P_R.

No vetor, a sequência de ácidos nucleicos que codifica a subunidade da enzima L-asparaginase II é operacionalmente conectada a uma sequência de promotor adequada. Os promotores adequados incluem, por exemplo, os promotores T7, araBAD, phoA, trc, O_L, O_R, P_L e P_R. De preferência, o promotor é um promotor viral T7.

Os elementos indutores adequados incluem, por exemplo, arabinose, lactose ou indução de calor, limitação de fosfato, limitação de triptofano, para citar apenas alguns. De preferência, o elemento indutor é um operon Lac, que é induzível por tiogalactosídeo de isopropila ("IPTG").

Uma sequência de sinal adequada (peptídeo de sinal) pode ser derivada de pelB, fd pIII ou ompA. De preferência, o peptídeo de sinal é derivado de ansB.

Os marcadores de seleção de antibiótico adequados são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, aqueles que conferem resistência à ampicilina, canamicina, cloranfenicol, rifampicina ou tetraciclina, dentre outros.

A origem adequada das sequências de replicação inclui aquelas encontradas nos plasmídeos a seguir: pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pIJ702, pBR322, pBR327 e pSC101.

As sequências de terminação adequadas incluem, por exemplo, terminador principal de fago, TF e rrnB.

Geralmente, os plasmídeos são preferenciais para o uso em *E. coli*. Os vetores de plasmídeo convencionais são moléculas de DNA circulares de fita dupla, de preferência, modificadas com sítio de reconhecimento de enzima adequados para inserir sequências de DNA exógenas, um gene selecionável antibiótico, uma origem de replicação para propagação autônoma na célula hospedeira e um gene para a discriminação ou seleção de clones que contêm DNA de inserção recombinante. Os vetores de plasmídeo disponíveis incluem, por exemplo, pET3, pET9, pET11 e a série pET estendida (catalogada pela Novagen Corporation), pBAD, trc, phoA, trp e plasmídeos $O_{L/R}/P_{L/R}$.

Conforme exemplificado abaixo, um plasmídeo do sistema de expressão de pET, tal como pET 27b+, é preferencial. A fim de fornecer uma expressão eficaz e controlada da enzima, o vetor de expressão também inclui um promotor, um operador, sítio de ligação de ribossoma, sequência de sinal, terminador transcricional, origem de replicação, uma cópia regulada do gene repressor (por exemplo, lacI)

A cepa de *E. coli* hospedeira terá elementos regulatórios compatíveis em seu cromossoma. Por exemplo, o gene para a T7 RNA polimerase sob o controle do promotor lacUV5 está presente em células de BLR (DE3). Essa cepa é um lisogénio do bacteriófago DE3. A adição de IPTG à cultura de BLR (DE3) induz a T7 RNA polimerase, que, por sua vez, transcreve o gene alvo no plasmídeo pET. BLR(DE3) é também recA- que pode fornecer estabilidade adicional dos genes nos plasmídeos extracromossômicos .

A fim de obter uma molécula de ácido nucleico que codifica a enzima da Merck e Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., uma L-

asparaginase II disponível pode ser modificada por métodos adequados. A subunidade de L-asparaginase II de sequência de 326 aminoácidos madura do *ansB* de *E. coli* K-12 é codificada em um segmento de 978 pares de base conforme relatado por Jennings MP e Beacham IR (1990 J Bacteriol 172: 1.491 a 1.498; nº no GeneBank M34277). O gene *ansB*, que inclui um peptídeo de sinal de 22 aminoácidos que precede a proteína madura, foi clonado a partir de outra cepa de *E. coli* K-12 (GX1210; obtida junto à Genex Corporation) por métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencionais. O gene *ansB* que codifica a subunidade de L-asparaginase II de *ansB* de *E. coli* K-12 foi adaptado por mutagênese sítio-dirigida (por exemplo, com o método de Amersham Sculptor) para expressar L-asparaginase II com as substituições de resíduo discutidas acima, para fazer as substituições de base a seguir. T para C na base 530; A para G na base 640; T para A na base 1205 e C para A na base 1239. A numeração baseia-se nessa dada pelo GeneBank nº M34277. As alterações de codão resultantes [GTG para GCG; AAT para GAT; TCT para ACT e ACC para AAC nas posições correspondentes] converteram o gene *ansB* num gene modificado (doravante *ansB**; SEQ ID NO: 2) que expressa uma subunidade da enzima L-asparaginase II idêntica a essa obtidas junto à Merck & Co., Inc. e Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

O gene *ansB** pode ser inserido em qualquer vetor extracromossômico adequado para a expressão de proteína eficaz em *E. coli*, conforme discutido acima. Particularmente, o gene *ansB** foi inserido no plasmídeo pET-27b+ (Novagen Corporation) e introduzido na cepa de *E. coli* BLR (DE3) por eletroporação, conforme descrito em detalhes pelos exemplos fornecidos abaixo, para fornecer

uma *E. coli* que carrega o plasmídeo de *ansB** e que expressa a subunidade de L-asparaginase II como uma isoforma uniforme que corresponde à L-asparaginase II da Merck.

De preferência, o clone identificado pelos exemplos como a cepa EN538 (depositada como Número ATCC PTA 7490) é empregado e cultivado empregando qualquer método conhecido na técnica adequado para *E. coli*. Os sistemas de cultura adequados incluem métodos de cultura em lotes, alimentada em lotes e contínuos. Os meios de cultura são selecionados a partir do meio conhecido na técnica otimizado para *E. coli*. Uma vez que a cultura atinja uma densidade suficiente, na faixa de cerca de 20 OD₆₆₀ a cerca de 200 OD₆₆₀, um indutor apropriado, tal como IPTG, é adicionado ao meio de cultura. Após um período de tempo suficiente, na faixa de 0,5 hora a cerca de 20 horas, a L-asparaginase II produzida é purificada por métodos padrão do meio de cultura e/ou da massa celular colhida da cultura.

A massa celular é colhida por centrifugação e/ou filtração e lisada por qualquer método conhecido na técnica. A lise dos corpos celulares pode ser realizada por métodos incluindo lise de parede celular enzimática seguida pela lise osmótica, congelamento/descongelamento, sonicação, ruptura mecânica (por exemplo, microfluidização), uso de agentes lisantes e similares, seguido pela filtração e/ou centrifugação para separar a massa celular rompida dos conteúdos de proteína solúveis. Diversos ciclos de lise, lavagem e separação podem ser empregados para otimizar a recuperação.

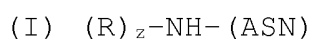
A enzima pode, então, ser recuperada e purificada do sobrenadante e/ou meio de cultura por métodos de

purificação bem conhecidos incluindo sulfato de amônio, extração de ácido, cromatofocagem, cromatografia de troca aniônica ou catiónica, cromatografia de fosfocelulose, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade, cromatografia de hidroxilapatita, FPLC® (cromatografia líquida de proteína rápida), cromatografia líquida de alto desempenho e similares.

Diversos parâmetros do processo de fermentação podem ser ajustados para otimizar a expressão de asparaginase ou para controlar a extensão do vazamento da proteína do periplasma para o meio de crescimento. Essas variáveis incluem os constituintes de meio (por exemplo, fonte de nitrogênio e carbono e aminoácidos adicionados ou outros nutrientes), temperatura, pH, concentração de indutor e duração de expressão. A linhagem genética de *E. coli* total (genótipo) pode também afetar a expressão e o vazamento de produto. Pode ser desejável coletar o produto de asparaginase das células (periplasma) apenas ou do meio apenas ou dos teores de fermentador totais dependendo do resultado da expressão de proteína e vazamento das células hospedeiras.

Conjugados de Polímero e L-Asparaginase

Uma utilidade preferencial para a enzima L-asparaginase II preparada de acordo com a invenção está na forma de uma enzima conjugada polimérica. Os conjugados de L-asparaginase e polímero da presente invenção correspondem geralmente à fórmula (I):



em que

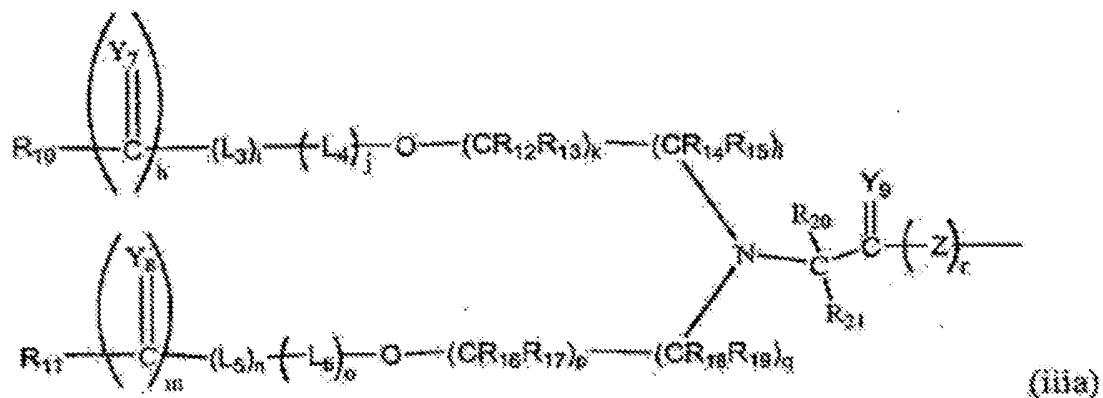
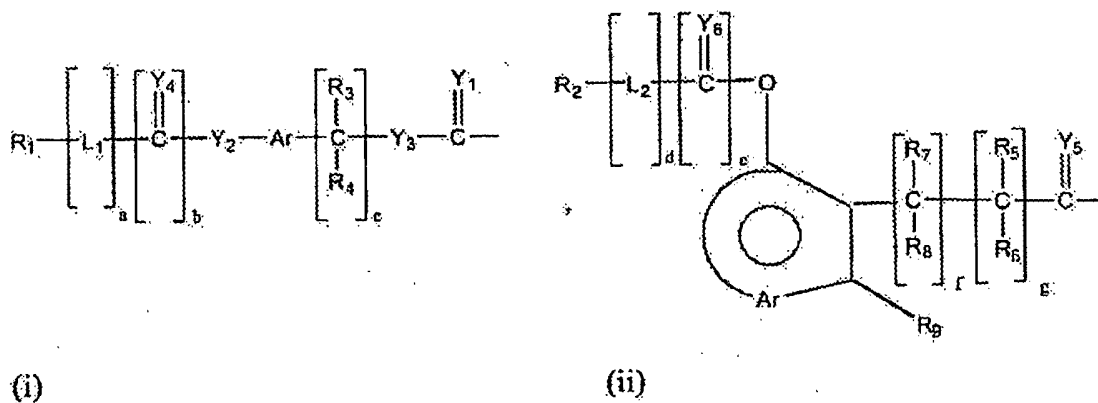
(ASN) representa a L-asparaginase ou um derivado ou fragmento da mesma;

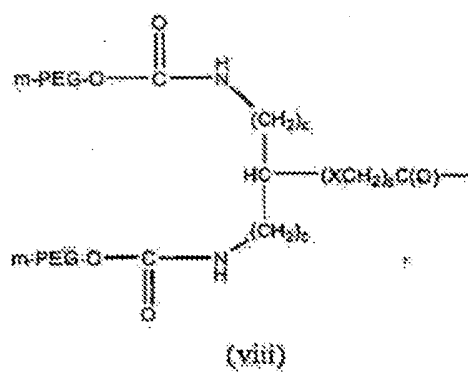
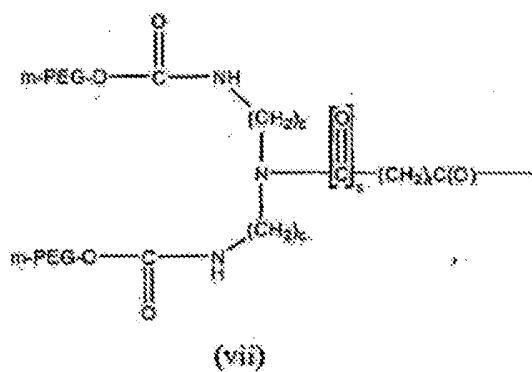
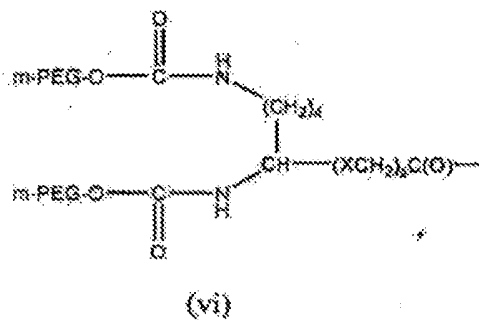
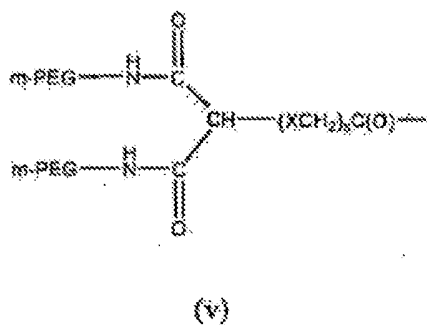
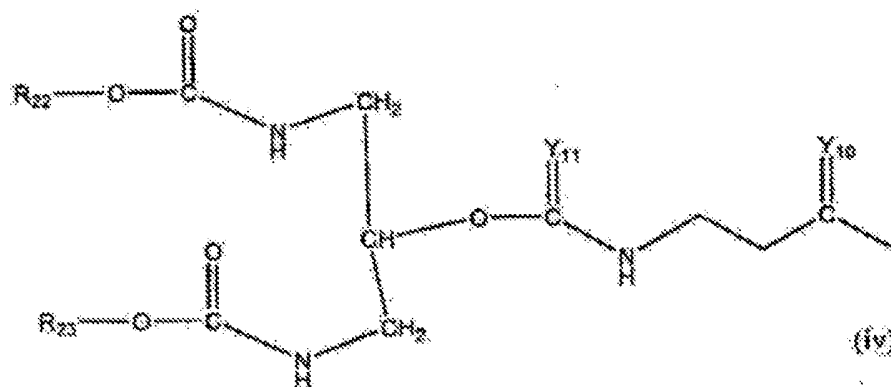
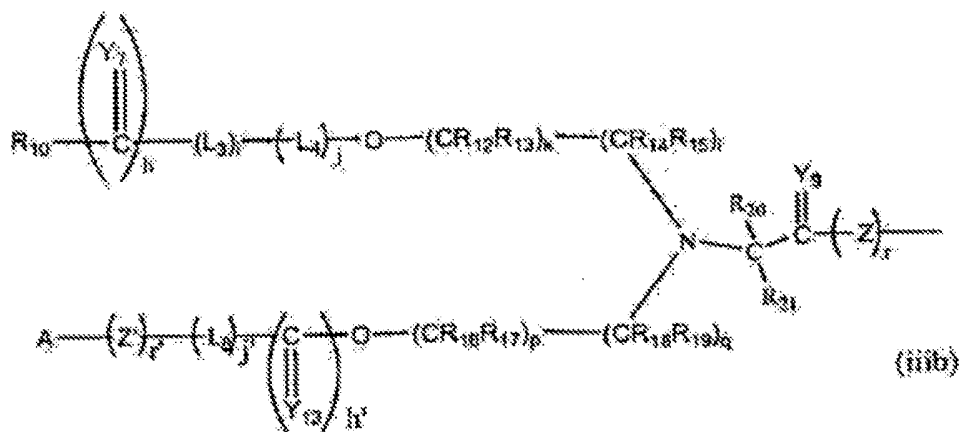
NH- é um grupo amino de um aminoácido encontrado na ASN, derivado ou fragmento da mesma para a fixação ao polímero;

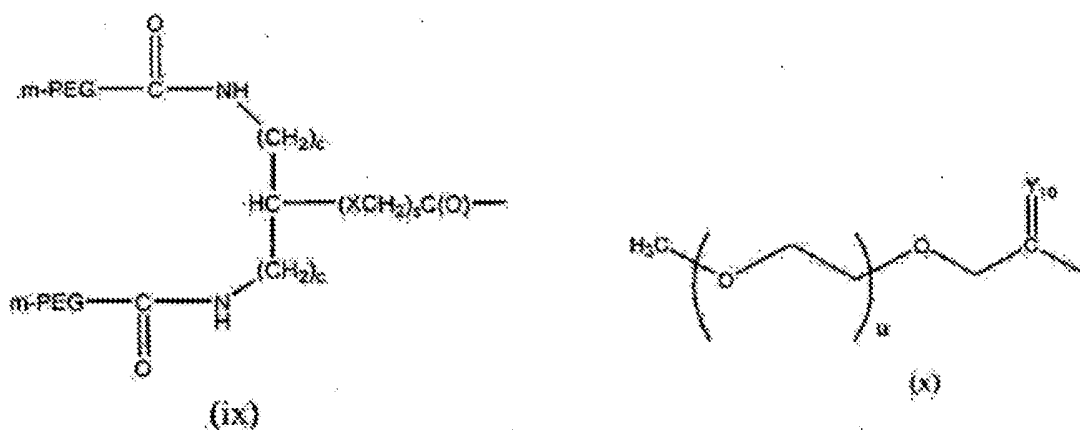
z é um número inteiro positivo, de preferência, de cerca de 1 a cerca de 80; e

R é um resíduo de polímero substancialmente não antigénico que é fixado à ASN de uma forma liberável ou não liberável.

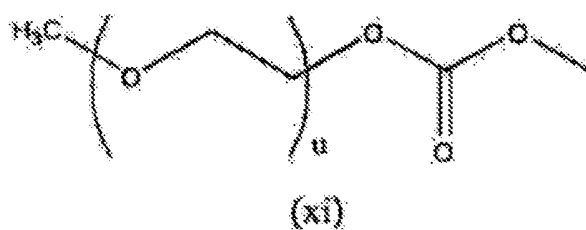
A porção de resíduo de polímero não antigénico do conjugado (R) pode ser selecionada dentre uma lista não limitante de sistemas à base de polímero tais como:







e



em que:

R_{1-2} , R_{10-11} e R_{22-23} podem ser iguais ou diferentes e são resíduos de polímero não antigénicos independentemente selecionados;

R_{3-9} , R_{12-21} e R_{24} (consultar abaixo) são iguais ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionado dentre hidrogénio, alquilos C_{1-6} , alquilos ramificados C_{3-12} , cicloalquilos C_{3-8} , alquilos substituídos C_{1-6} , cicloalquilos substituídos C_{3-8} , arilos, arilos substituídos, aralquilos, heteroalquilos C_{1-6} , heteroalquilos C_{1-6} substituídos, alcóxi C_{1-6} , fenóxi e heteroalcóxis C_{1-6} ;

Ar é uma porção química aromática que forma um hidrocarboneto aromático multissubstituído ou a um grupo heteroaromático multissubstituído;

Y_{1-11} e Y_{13} podem ser iguais ou diferentes e são independentemente selecionados dentre O, S e NR_{24} ;

A é selecionado dentre hidrogénio, grupos alquilo, porções químicas de alvejamento, grupos de saída, grupos funcionais, agente de diagnóstico e porções químicas biologicamente ativas;

X é O, NQ, S, SO ou SO_2 ; em que Q é H, alquilo C_{1-8} , alquilo ramificado C_{1-8} , alquilo substituído C_{1-8} , arilo ou aralquilo;

Z é selecionado dentre porções químicas ativamente transportadas numa célula alvo, porções químicas hidrofóbicas, porções químicas bifuncionais e combinações das mesmas;

L_{1-6} e L_8 podem ser iguais ou diferentes e são grupos ligantes bifuncionais independentemente selecionados;

a, c, d, f, g, i, j, j', k, l, n, o, p, q e t podem ser iguais ou diferentes e são, independentemente, 0 ou um número inteiro positivo, de preferência, na maioria dos aspetos;

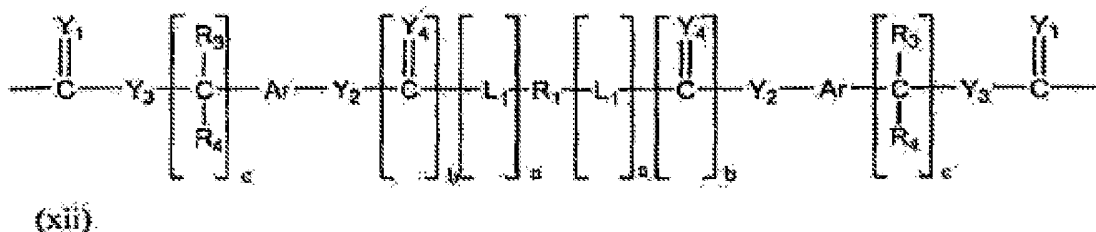
b, e, r, r', s, h, h' e m podem ser iguais ou diferentes e são, independentemente, 0 ou 1;

mPEG é $H_3CO(-CH_2CH_2O)_u-$ e

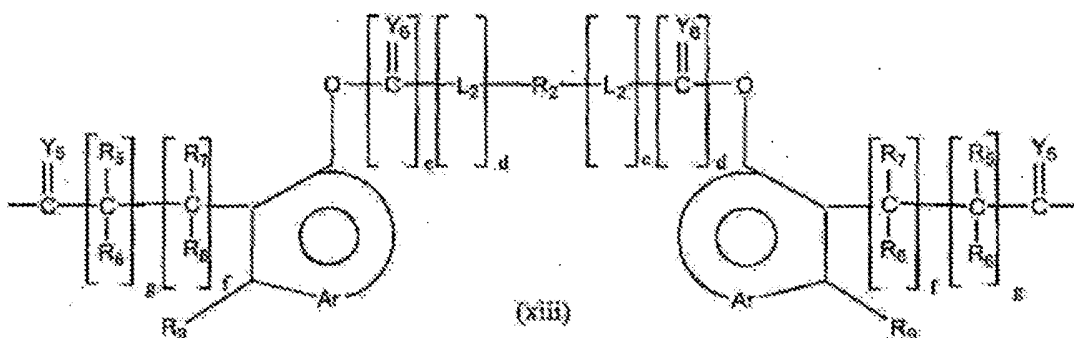
u é um número inteiro positivo, de preferência, de cerca de 10 a cerca de 2.300 e, de maior preferência, de cerca de 200 a cerca de 1.000.

Dentro do anterior, é preferencial que Y_{1-11} e Y_{13} sejam O; R_{3-8} , R_{12-21} e R_{24} são, cada um, independentemente, ou hidrogénio ou alquilos C_{1-6} , com metilo e etilo sendo os alquilos mais preferenciais e R_9 é, de preferência, CH_3 .

Num outro aspeto da invenção, a porção de polímero do conjugado pode ser uma que rende múltiplos pontos de fixação para a L-asparaginase. Uma lista não limitante de tais sistemas inclui:

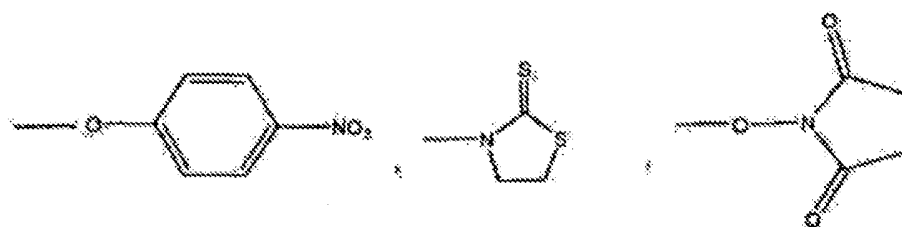


e



em que todas as variáveis são iguais a essa estabelecida acima.

Os polímeros ativados que podem ser empregados para fazer os conjugados de L-asparaginase corresponderão natural e diretamente às porções de polímero descritas acima. A principal diferença é a presença de um grupo de saída ou ativação, que facilita a fixação liberável do sistema de polímero a um grupo amina encontrado na L-asparaginase. Assim, os compostos (i) a (xiii) incluem um grupo de saída ou ativação tais como: p-nitrofenóxi, tiazolidinil tiona, N-hidroxisuccinimidila



ou outros grupos de saída ou ativação adequados tais como N-hidroxibenzotriazolila, halogênio, N-hidroxi-ftalimidila, imidazolila, O-acil ureias, pentafluorofenol ou 2,4,6-triclorofenol ou outros grupos de saída adequados aparentes para aqueles com habilidade comum, encontrados no local em que a L-asparaginase se fixa após a reação de conjugação.

Alguns PEGs ativados preferenciais incluem aqueles revelados nas Patentes cedidas à mesma cessionária nº U.S. 5,122,614, 5,324,844, 5,612,460 e 5,808,096. Conforme será apreciado por aqueles de habilidade comum, tais reações de conjugação são tipicamente executadas num tampão adequado com o uso de um excesso molar de diversas vezes do PEG ativado. Alguns conjugados preferenciais feitos com PEGs lineares como o SC-PEG mencionado acima podem conter, em média, de cerca de 20 a cerca de 80 fitas de PEG por enzima. Conseqüentemente, para esses, os excessos molares

de diversas centenas de vezes, por exemplo, 200 a 1.000x podem ser empregados. O excesso molar usado para polímeros ramificados e polímeros fixados à enzima será menor e pode ser determinado com o uso das técnicas descritas nas patentes e pedidos de patente que descrevem as mesmas que são mencionadas abaixo.

Para os propósitos da presente invenção, os grupos de saída devem ser entendidos como aqueles grupos que têm a capacidade de reagir com um grupo amina (nucleófilo) encontrado em uma L-asparaginase, por exemplo, em uma Lys.

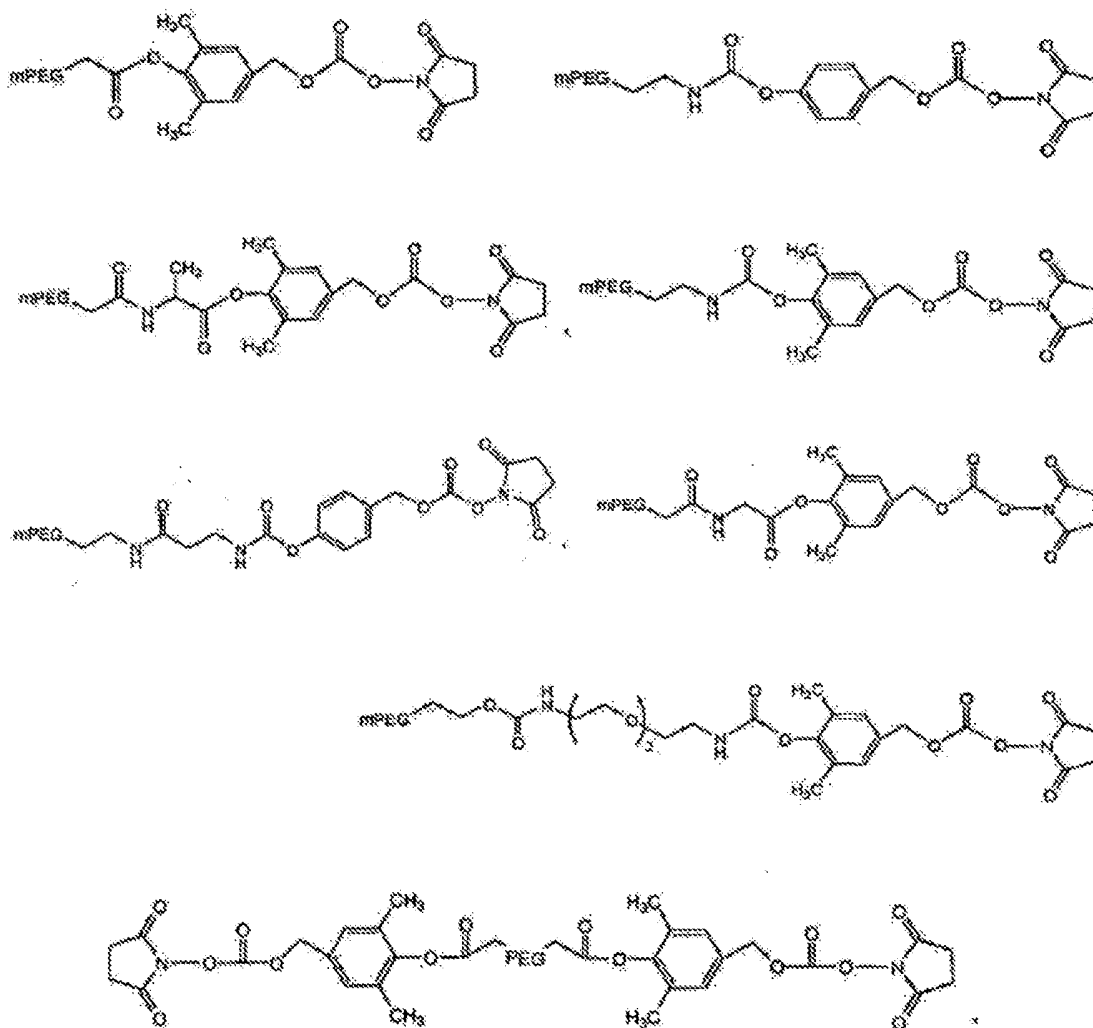
Para os propósitos da presente invenção, o anterior é também referido como ligantes de polímero ativados. Os resíduos de polímero são, de preferência, à base de óxido de polialquileno e, de maior preferência, à base de polietileno glicol (PEG) em que o PEG é linear ou ramificado.

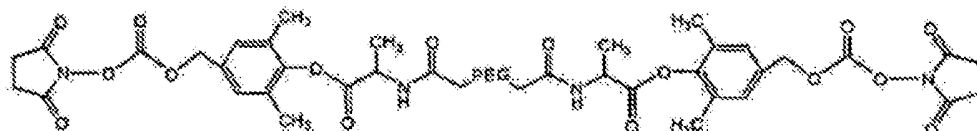
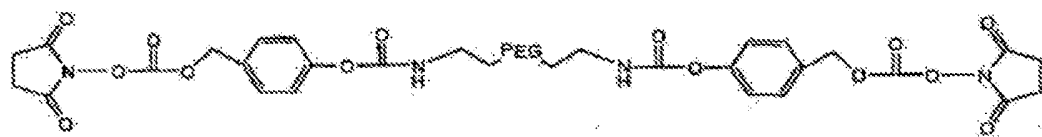
Referindo-se agora aos polímeros ativados descritos acima, pode ser visto que o Ar é uma porção química que forma um hidrocarboneto aromático multissubstituído ou um grupo heteroaromático multissubstituído. Um recurso chave é que a porção química de Ar é aromática em natureza. Geralmente, para ser aromático, os elétrons n (π) devem ser compartilhados dentro de uma "nuvem" tanto acima quanto abaixo do plano de uma molécula cíclica. Ademais, o número de elétrons n deve satisfazer a regra de Huckle ($4n+2$). Aqueles de habilidade comum na técnica perceberão que uma miríade de porções química irá satisfazer a exigência aromática da porção química e, assim, são adequadas para o uso no presente documento com halogênio(s) e/ou cadeias

laterais conforme esses termos são comumente entendidos na técnica.

Em alguns aspectos preferenciais da invenção, os ligantes de polímero ativados são preparados em conformidade com as Patentes cedidas à mesma cessionária nº U.S. 6,180,095, 6,720,306, 5,965,119, 6,624,142 e 6,303,569.

Dentro desse contexto, os ligantes de polímeros ativados a seguir são preferenciais:

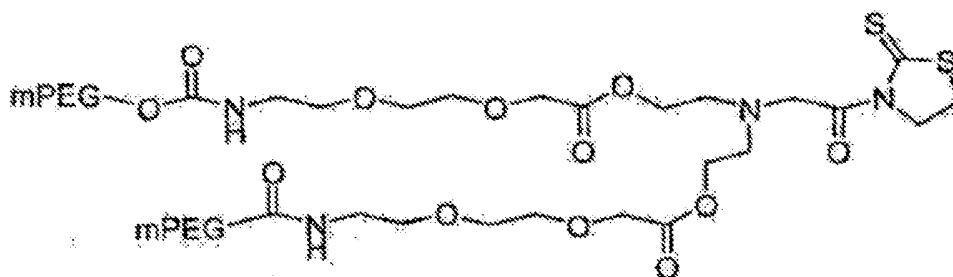




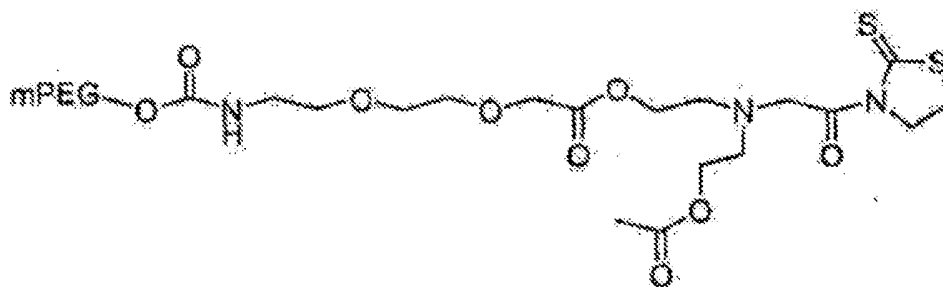
e



Num aspeto alternativo da invenção, os conjugados de polímero de L-asparaginase são feitos com o uso de determinados resíduos de polímero ramificado ou de bicina tais como aqueles descritos nos Pedidos de Patente cedidos à mesma cessionária nº U.S. 7.122.189 e 7.087.229 e Pedidos de Patente nº U.S. 10/557,522, 11/502,108 e 11/011,818. Alguns dos polímeros ativados preferenciais incluem:



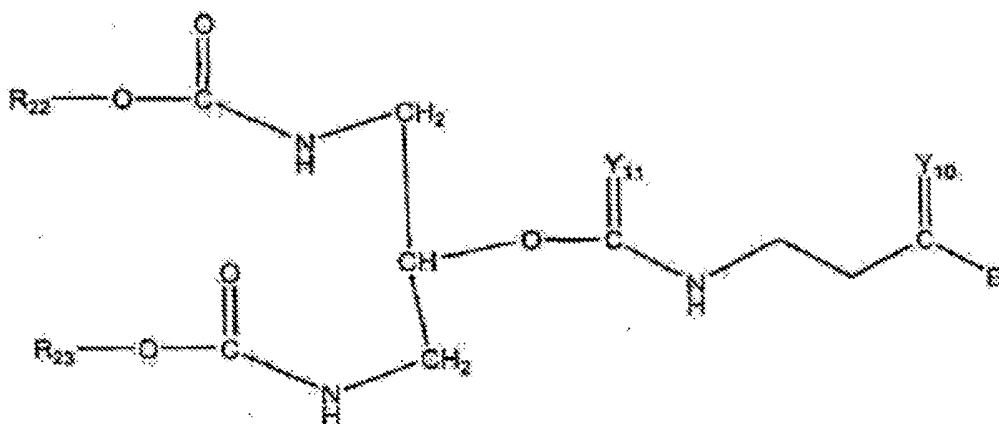
e



Deve ser também entendido que o grupo de saída mostrado acima é apenas um dos grupos adequados e os outros mencionados no presente documento podem também ser usados sem experimentação indevida.

Em aspectos alternativos, os ligantes de polímero ativados são preparados com o uso de resíduos de polímero ramificados tais como aqueles descritos nas Patentes cedidas à mesma cessionária nº U.S. 5,643,575; 5,919,455 e 6,113,906 e 6,566,506.

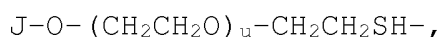
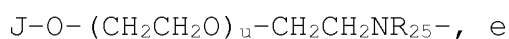
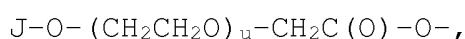
Tais polímeros ativados correspondem aos sistemas de polímero (v) a (ix) com o seguinte sendo representativo:



em que B é L-asparaginase II e todas as outras variáveis são conforme anteriormente definidas.

POLÍMEROS SUBSTANCIALMENTE NÃO ANTIGÉNICOS

Conforme relatado acima, R_{1-2} , R_{10-11} e R_{22-23} são, de preferência, cada um, resíduos de polímero solúveis em água que são, de preferência, substancialmente não antigénicos tais como óxidos de polialquileno (PAOs) e, de maior preferência, polietileno glicóis tais como mPEG. Para propósitos de ilustração e não limitação, a porção de resíduo de polietileno glicol (PEG) de R_{1-2} , R_{10-11} e R_{22-23} pode ser selecionada dentre:



em que:

u é o grau de polimerização, isto é, de cerca de 10 a cerca de 2.300;

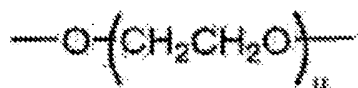
R_{25} é selecionado dentre hidrogénio, alquilos C_{1-6} , alquenilos C_{2-6} , alquinilos C_{2-6} , alquilos ramificados C_{3-12} , cicloalquilos C_{3-8} , alquilos substituídos C_{1-6} , alquenilos substituídos C_{2-6} , alquinilos substituídos C_{2-6} , cicloalquilos substituídos C_{3-8} , arilos, arilos substituídos, aralquilos, heteroalquilos C_{1-6} , heteroalquilos substituídos C_{1-6} , alcóxi C_{1-6} , fenóxi e heteroalcóxi C_{1-6} , e

J é um grupo de cobertura, isto é, um grupo que é encontrado no terminal do polímero e, em alguns aspectos, pode ser selecionado a partir de qualquer um dentre NH₂, OH, SH, CO₂H, alquilos C₁₋₆, de preferência, metilo ou outros grupos de ativação de terminal de PEG, conforme tais grupos são entendidos por aqueles de habilidade comum.

Numa modalidade particularmente preferencial, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁ e R₂₂₋₂₃ são selecionados dentre,

CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-, CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂C(O)-O-, e CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂CH₂ NH- e CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂CH₂ SH-, em que u é um número inteiro positivo, de preferência, selecionado de modo que o peso molecular ponderal médio seja de cerca de 200 a cerca de 80.000 Da. De maior preferência, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁ e R₂₂₋₂₃ têm, independentemente, um peso molecular médio de cerca de 2.000 Da a cerca de 42.000 Da, com um peso molecular médio de cerca de 5.000 Da a cerca de 40.000 Da sendo mais preferencial. Outros pesos moleculares são também contemplados de modo a acomodar as necessidades do versado na técnica.

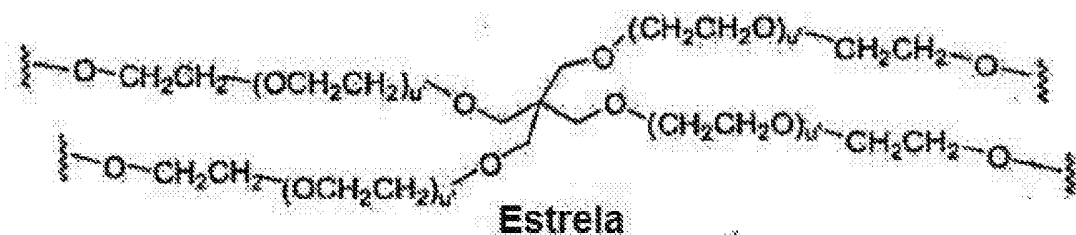
PEG é geralmente representado pela estrutura:



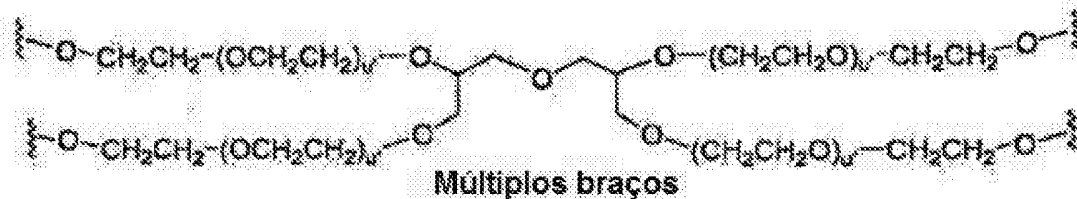
e R₁₋₂, R₁₀₋₁₁ e R₂₂₋₂₃ compreendem, de preferência, resíduos dessa fórmula. O grau de polimerização para o polímero representa o número de unidades de repetição na cadeia de polímero e é dependente do peso molecular do polímero.

São também úteis polipropileno glicóis, derivados de PEG ramificados tais como aqueles descritos nas Patentes cedidas à mesma cessionária nº U.S. 5,643,575 (a patente '575), "PEGs em estrela" e PEGs com múltiplos braços tais como aqueles descritos no catálogo da Shearwater Corporation 2001 "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Application". A revelação de cada um dos anteriores é incorporada no presente documento a título de referência. A ramificação fornecida pela patente '575 permite a ramificação secundária ou terciária como um modo de aumentar o carregamento de polímero numa molécula biologicamente ativa de um único ponto de fixação. Será entendido que o polímero solúvel em água pode ser funcionalizado para a fixação aos grupos de ligação bifuncional se exigido sem experimentação indevida.

Por exemplo, os conjugados da presente invenção podem ser feitos por métodos que incluem converter os produtos de PEG-OH com múltiplos braços ou "PEG em estrela" tais como aqueles descritos no catálogo de NOF Corp. Drug Delivery System, Versão 8, abril de 2006, cuja revelação é incorporada no presente documento a título de referência, num polímero adequadamente ativado, com o uso das técnicas de ativação descritas nas patentes '614 ou '096 mencionadas anteriormente. Especificamente, o PEG pode ter a fórmula:



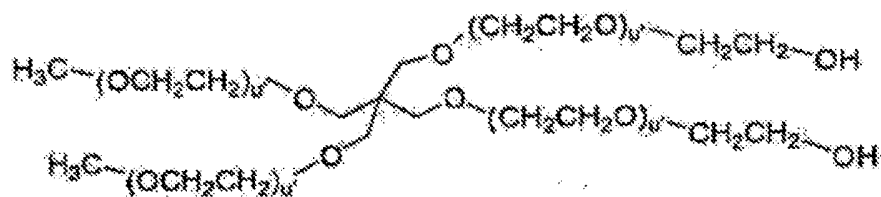
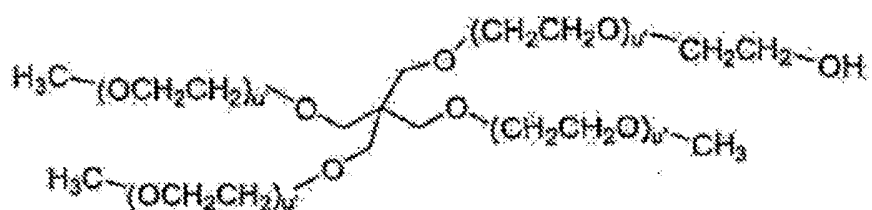
ou

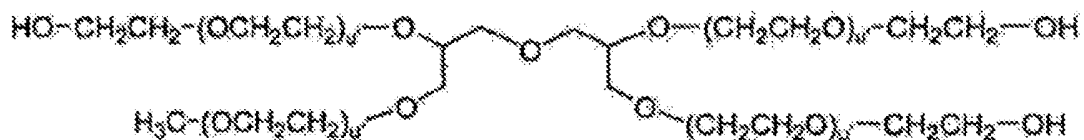
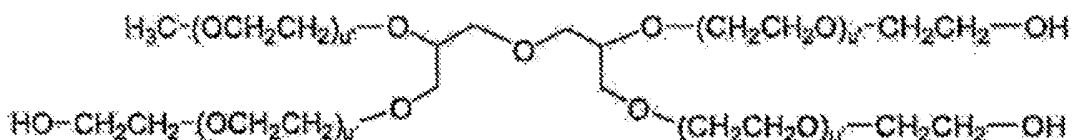
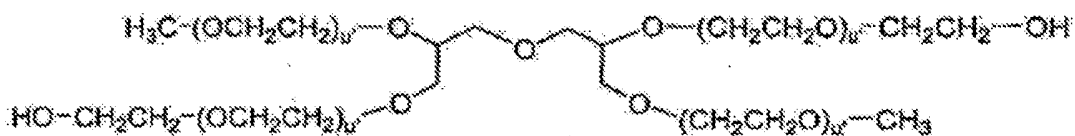


em que:

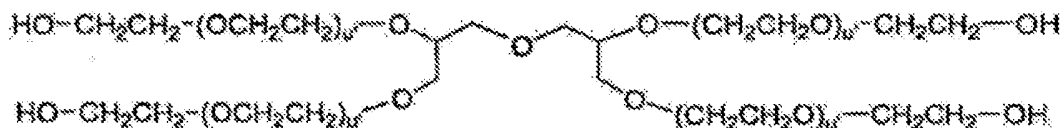
u' é um número inteiro de cerca de 4 a cerca de 455, para fornecer, de preferência, polímeros que têm um peso molecular total de cerca de 5.000 a cerca de 40.000; e até 3 porções terminais do resíduo são cobertas com um metilo ou outro alquilo inferior.

Em algumas modalidades preferenciais, todos os 4 braços de PEG são convertidos em grupos de saída adequados, isto é, carbonato de N-hidroxisuccinimidila (SC), etc., para facilitar a fixação à proteína recombinante. Tais compostos antes da conversão incluem:





e



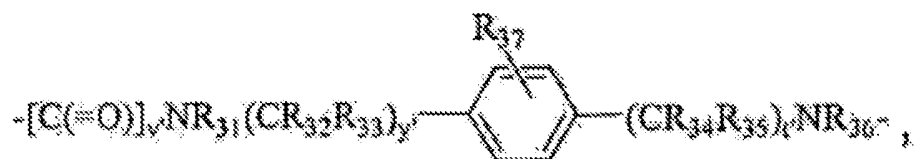
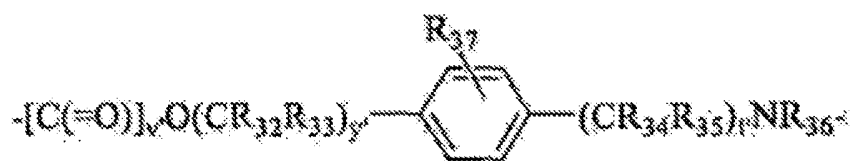
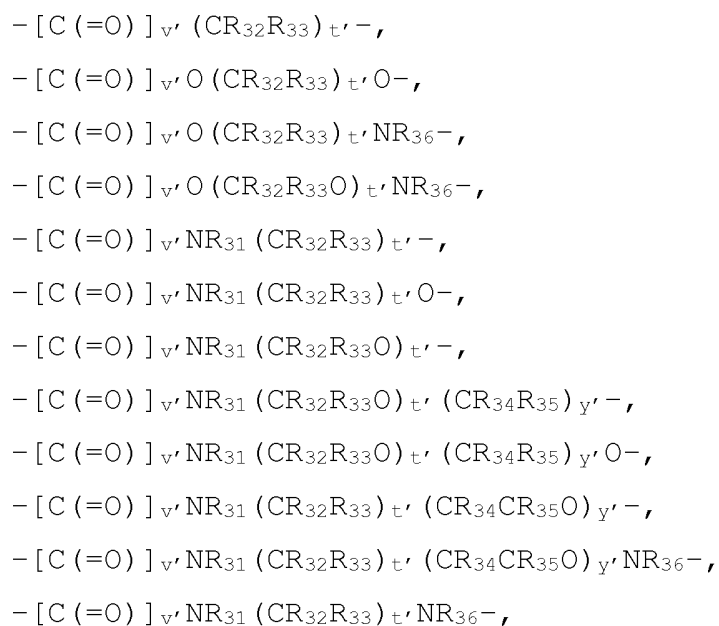
As substâncias poliméricas incluídas no presente documento são, de preferência, solúveis em água à temperatura ambiente. Uma lista não limitante de tais polímeros inclui homopolímeros de óxido de polialquileno tais como polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenados, copolímeros dos mesmos e copolímeros em bloco dos mesmos, desde que a solubilidade em água dos copolímeros em bloco seja mantida.

Numa outra modalidade e como uma alternativa aos polímeros à base de PAO, R_{1-2} , R_{10-11} e R_{22-23} são, cada um, opcionalmente selecionados dentre um ou mais materiais eficazmente não antigénicos tais como dextrano, álcoois polivinílicos, polímeros à base de carboidrato, hidroxipropilmet-acrilamida (HPMA), óxidos de polialquileno e/ou copolímeros dos mesmos. Consultar também a Patente cedida à mesma cessionária nº U.S. 6,153,655.

Será entendido por aqueles de habilidade comum na técnica que o mesmo tipo de ativação é empregado conforme descrito no presente documento que para PAOs tais como PEG. Aqueles de habilidade comum na técnica perceberão adicionalmente que a lista anterior é apenas ilustrativa e que todos os materiais poliméricos que têm as qualidades descritas no presente documento são contemplados e que outros derivados de óxido de polialquileno tais como os polipropileno glicóis, etc. são também contemplados.

GRUPOS LIGANTES BIFUNCIONAIS:

Em muitos aspetos da invenção, L_{1-6} e L_8 são grupo de ligação que facilitam a fixação de fitas de polímero, por exemplo, R_{1-2} , R_{10-11} e/ou R_{22-23} . A ligação fornecida pode ser ou direta ou através de grupos de acoplamento adicionais conhecidos por aqueles de habilidade comum na técnica. Nesse aspeto da invenção, L_{1-6} e L_8 podem ser iguais ou diferentes e podem ser selecionados a partir de uma ampla variedade de grupos bem conhecidos por aqueles de habilidade comum na técnica tais como grupos alifáticos e aromáticos-alifáticos bifuncionais e heterobifuncionais, aminoácidos, etc. Assim, L_{1-6} e L_8 podem ser iguais ou diferentes e incluir grupos tais como:



e



em que:

R₃₁-R₃₇ são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogénio, amino, amino substituído, azido, carbóxi, ciano, halo, hidroxilo, nitro, éter silílico, sulfonilo, mercapto, alquilmercapto C₁₋₆, arilmercapto, arilmercapto substituído, alquiltio C₁₋₆ substituído, alquilos C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, alquilo ramificado C₃₋₁₉, cicloalquilo C₃₋₈, alquilo substituído C₁₋₆, alquenilo substituído C₂₋₆, alquinilo substituído C₂₋₆, cicloalquilo substituído C₃₋₈, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, heteroalquilo C₁₋₆, heteroalquilo C₁₋₆ heteroalquil, alcóxi C₁₋₆, arilóxi, heteroalcóxi C₁₋₆, heteroarilóxi, alcanóilo C₂₋₆, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo C₂₋₆, ariloxicarbonilo, alcanoilóxi C₂₋₆, arilcarbonilóxi, alcanóilo substituído C₂₋₆, arilcarbonilo substituída,alconoilóxi substituído C₂₋₆, ariloxicarbonilo substituído,alconoilóxi substituído C₂₋₆ e arilcarbonilóxi substituído,

em que os substituintes são selecionados a partir do grupo que consiste em acilo, amino, amido, amidino, araalquilo, arilo, azido, alquilmercapto, arilmercapto, carbonilo, carboxilato, ciano, éster, éter, formilo, halogénio, heteroarilo, heterocicloalquilo, hidróxi, imino, nitro, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformato, alcóxi, fosforilo, fosfonato, fosfinato, sililo, sulfidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido e sulfonilo;

(t') e (y') são independentemente selecionados dentre números inteiros positivos ou zero, de preferência, 1 a 6; e

(v') é 0 ou 1.

De preferência, L1-6 e L8 são selecionados dentre:

-C(O)CH₂OCH₂C(O)-;
 -C(O)CH₂NHCH₂C(O)-;
 -C(O)CH₂SCH₂C(O)-;
 -C(O)CH₂CH₂CH₂C(O)-, e
 -C(O)CH₂CH₂C(O)-,

Alternativamente, os resíduos de aminoácidos adequados podem ser selecionados a partir de qualquer um dentre os L-aminoácidos de ocorrência natural conhecidos, por exemplo, alanina, valina, leucina, etc. e/ou uma combinação dos mesmos, para citar apenas alguns. L₁₋₆ e L₈ podem também incluir um peptídeo que varia em tamanho, por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 10 resíduos de aminoácidos.

Os derivados e aminoácidos de ocorrência natural, assim como vários aminoácidos de ocorrência não natural conhecidos na técnica (D ou L), hidrofóbicos ou não hidrofóbicos, são também contemplados.

PORÇÕES QUÍMICAS A

1. Grupos de saída ou ativação

Naqueles aspectos em que A é um grupo de ativação, as porções químicas adequadas incluem, porém, sem limitação, grupos tais como N-hidroxibenzotriazolilo, halogênio, N-hidroxiftalimidilo, p-nitrofenoxilo, imidazolilo, N-hidroxisuccinimidilo; tiazolidinil tiona, O-acil ureias, pentafluorofenoxilo, 2,4,6-triclorofenoxilo ou outros

grupos de saída adequados que serão aparentes para aqueles de habilidade comum na técnica.

Para os propósitos da presente invenção, os grupos de saída devem ser entendidos como aqueles grupos que têm a capacidade de reagir com um nucleófilo encontrado no alvo desejado, isto é, uma porção química biologicamente ativa, um agente de diagnóstico, uma porção química de alvejamento, um espaçador bifuncional, intermediário, etc. Os alvos contêm, assim, um grupo para deslocamento, tais como os grupos NH_2 encontrados em proteínas, peptídeos, enzimas, moléculas terapêuticas natural ou quimicamente sintetizadas tais como doxorrubicina, espaçadores tais como diaminas monoprotegidas. Deve ser entendido que aquelas porções químicas selecionadas para A podem também reagir com outras porções químicas além dos nucleófilos biologicamente ativos.

2. Grupos Funcionais

A pode também ser um grupo funcional. Os exemplos não limitantes de tais grupos funcionais incluem maleimidila, vinila, resíduos de sulfona, hidróxi, amino, carbóxi, mercapto, hidrazida, carbazato e similares que podem ser ligados à porção de bicina através de um espaçador que contém amina. Uma vez fixado à porção de bicina, o grupo funcional (por exemplo, maleimida) pode ser usado para ligar o polímero de bicina a um alvo tal como o resíduo de cisteína de um espaçador de polipeptídeo, aminoácido ou peptídeo, etc.

3. Grupos alquilo

Naqueles aspetos da fórmula (I) em que A é um grupo alquilo, uma lista não limitante de grupos adequados consiste em alquilos C₁₋₆, alquenilos C₂₋₆, alquinilos C₂₋₆, alquilos ramificados C₃₋₁₉, cicloalquilos C₃₋₈, alquilos substituídos C₁₋₆, alquenilos substituídos C₂₋₆, alquinilos substituídos C₂₋₆, cicloalquilos substituídos C₃₋₈, aralquilos, heteroalquilos C₁₋₆ e heteroalquilos C₁₋₆ substituídos.

PORÇÕES QUÍMICAS Z E SUA FUNÇÃO

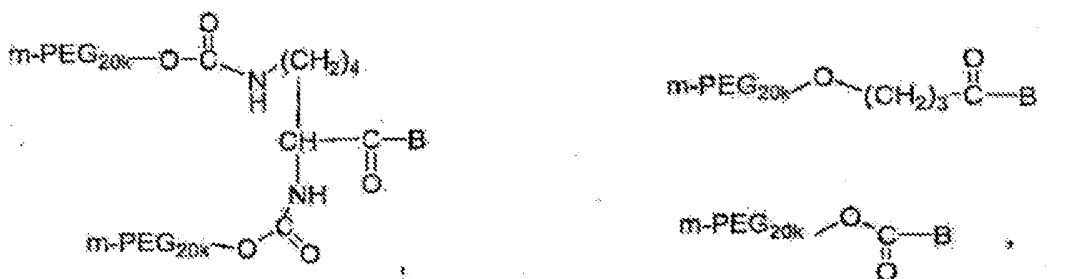
Num aspeto da invenção, Z é L₇-C(=Y₁₂) em que L₇ é um ligante bifuncional selecionado dentre o grupo que define L₁₋₆, e Y₁₂ é selecionado dentre os mesmos grupos que este que define Y₁. Nesse aspeto da invenção, o grupo Z serve como ligação entre a L-asparaginase e o restante do sistema de entrega de polímero. Noutros aspetos da invenção, Z é uma porção química que é ativamente transportada para uma célula alvo, uma porção química hidrofóbica e combinações das mesmas. O Z' quando presente pode servir como um ligante bifuncional, uma porção química que é ativamente transportada para uma célula alvo, uma porção química hidrofóbica e combinações das mesmas.

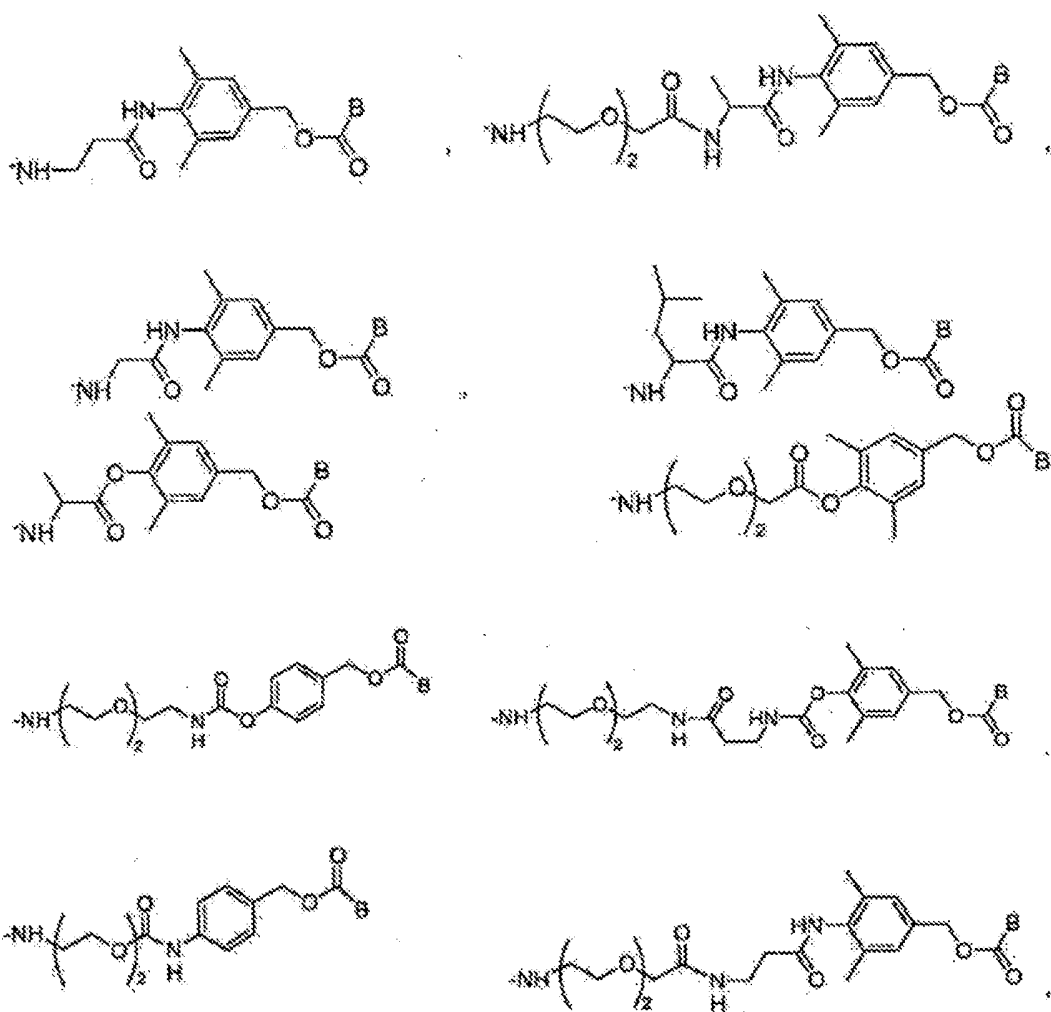
Nesse aspeto da invenção, os sistemas de polímero liberáveis são preparados de modo que a hidrólise *in vivo* clive o polímero da L-asparaginase e libere a enzima para o fluido extracelular, enquanto ainda ligada à porção química Z. Por exemplo, uma combinação Z-B potencial é leucina-L-asparaginase

Preparação de Conjugados de L-Asparaginase

Para propósitos de ilustração, as reações de conjugação adequadas incluem reagir L-asparaginase com um sistema de polímero adequadamente ativado descrito no presente documento. A reação é, de preferência, executada com o uso de condições bem conhecidas por aqueles de habilidade comum na técnica para modificação de proteína, incluindo o uso de um sistema tamponado com PBS, etc. com o pH na faixa de cerca de 6,5 a 8,5. Contempla-se que, na maioria das ocorrências, um excesso do polímero ativado será reagido com a L-asparaginase.

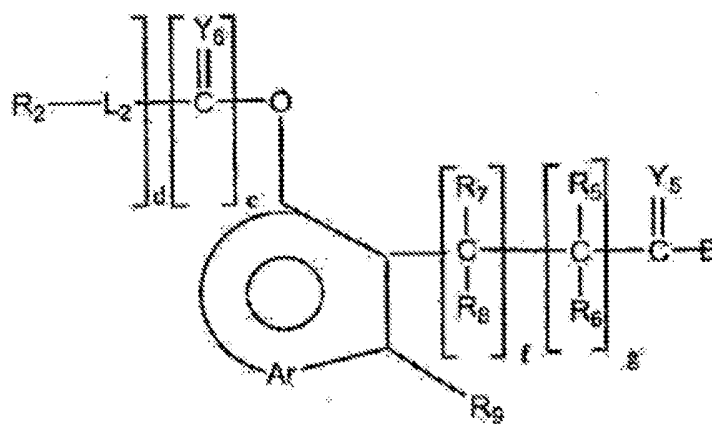
As reações desse tipo resultarão frequentemente na formação de conjugados que contêm um ou mais polímeros ligados à L-asparaginase. Conforme será apreciado, será frequentemente desejável isolar as várias frações e fornecer um produto mais homogêneo. Na maioria dos aspectos da invenção, a mistura de reação é colhida, carregada numa resina de coluna adequada e as frações desejadas são sequencialmente eluídas com níveis crescentes de tampão. As frações são analisadas por ferramentas analíticas adequadas para determinar a pureza da proteína conjugada antes de ser adicionalmente processada. Independentemente da rota da síntese e polímero ativado selecionado, os conjugados estão em conformidade com a Fórmula (I) conforme definido no presente documento. Alguns dos compostos preferenciais que resultam das técnicas sintéticas descritas no presente documento incluem:



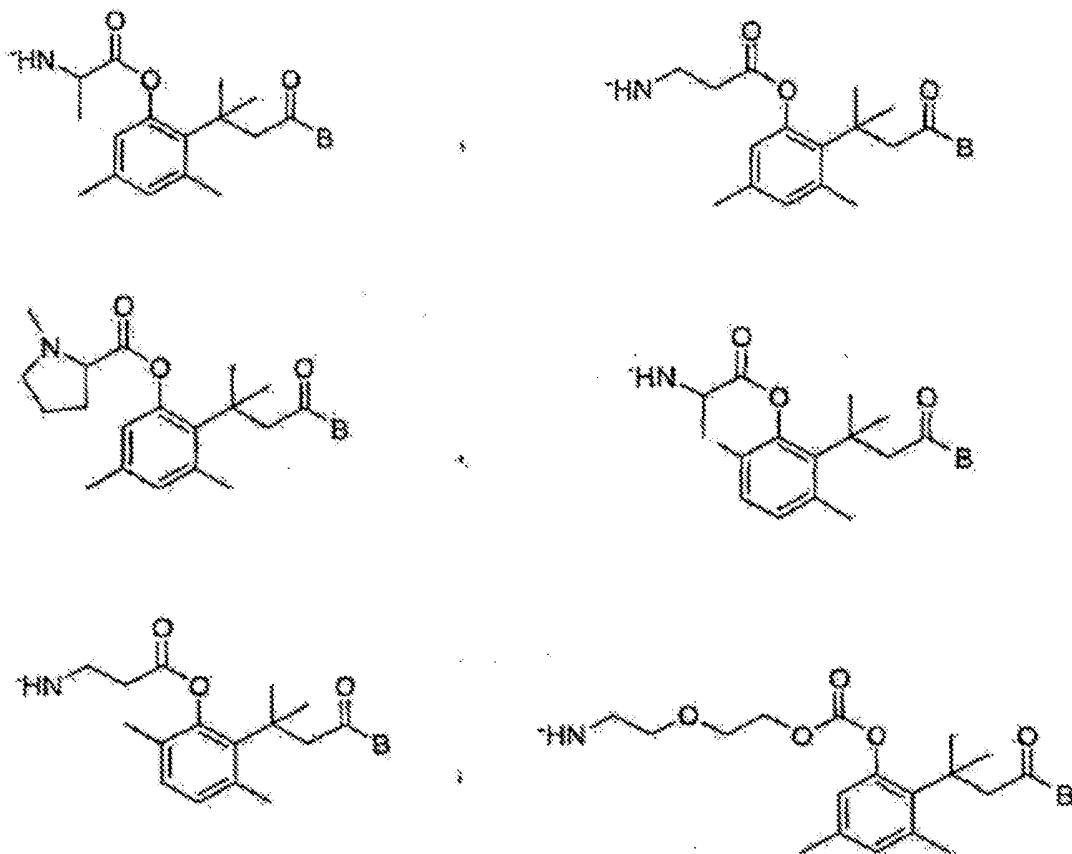


em que B é L-asparaginase.

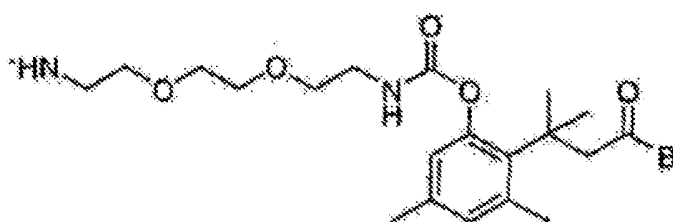
Outros conjugados incluem:



em que B é L-asparaginase. Uma lista não limitante empregada nos conjugados estão dentre

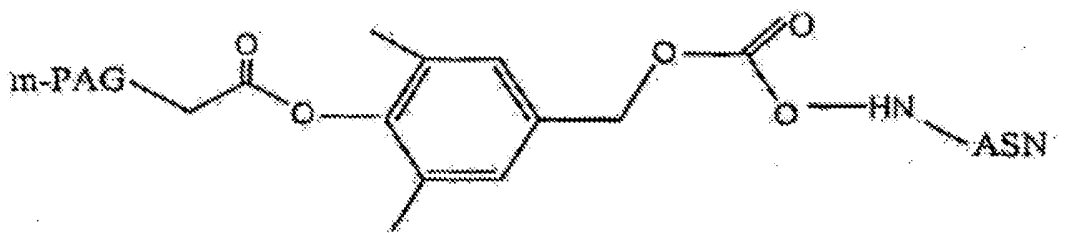


e



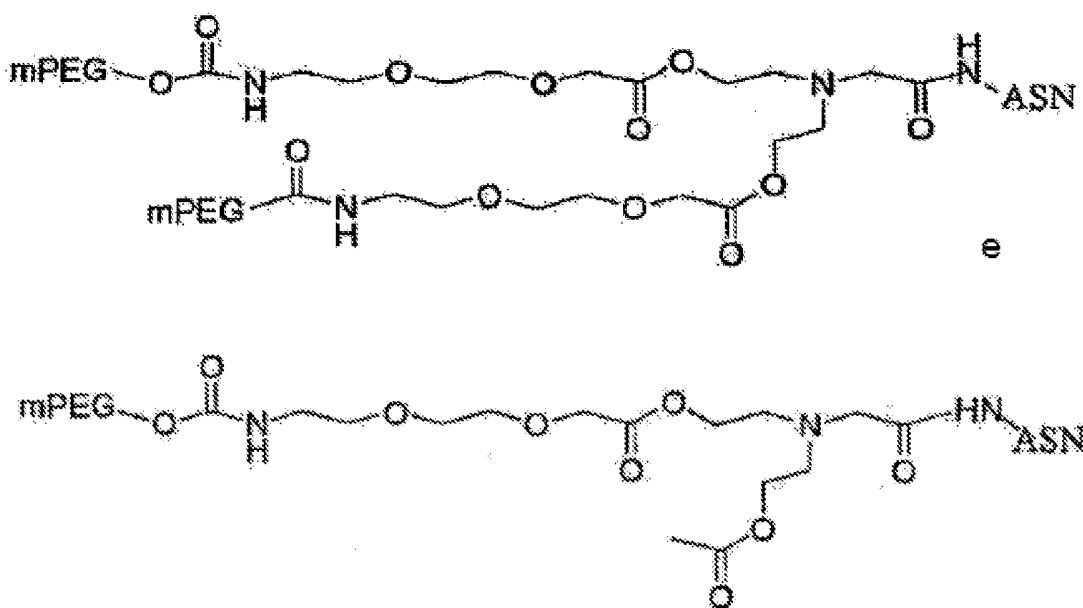
em que B é L-asparaginase.

Um conjugado particularmente preferencial é:



em que o peso molecular do mPEG é de cerca de 10.000 a cerca de 40.000.

Quando os sistemas de polímero à base de bicina são usados, dois conjugados preferenciais são:



em que os pesos moleculares do mPEG são iguais ao acima.

Verifica-se que a peguilação da L-asparaginase será empiricamente otimizada para as fixações de PEG totais por proteína, tamanho de polímero de PEG e projeto de ligante de PEG. As características chave da L-asparaginase peguilado para a avaliação da peguilação e otimização incluem tanto ensaios in vitro (por exemplo, estabilidade e

atividade de enzima) e ensaios in vivo (por exemplo, farmacocinética e farmacodinâmica).

MÉTODOS DE TRATAMENTO

A L-asparaginase produzida pelo DNA, vetores e células hospedeiras descritos no presente documento é útil para todos os métodos e indicações já conhecidos na técnica para Elspar® (Merck & Co., Inc.) e Oncaspar® (Enzon Pharmaceuticals, Inc.). Assim, a enzima L-asparaginase II inventiva ou conjugada com óxido de polialquileno ou como uma proteína não conjugada é administrada a um paciente em necessidade da mesma em uma quantidade que é eficaz para tratar uma doença ou distúrbio ou outra afeção que é responsiva a tal tratamento. O versado na técnica verificará as quantidades adequadas, rotas de administração e programações de dosagem extrapoladas das propriedades conhecidas de Elspar® e Oncaspar®.

EXEMPLOS

Os exemplos não limitantes a seguir estabelecidos abaixo ilustram determinados aspetos da invenção.

EXEMPLO 1

SEQUENCIAÇÃO DE L-ASPARAGINA AMIDOIDROLASE, TIPO EC-2, EC 3.5.1.1: PROTEÍNA DE L-ASPARAGINASE II DE *E. COLI*

A fim de obter as sequências de aminoácidos das enzimas L-asparaginase II comercialmente disponíveis junto à Merck & Co. e Kyowa Hakko Kogyo Co., respetivamente, essas proteínas foram submetidas à análise de sequência de

proteína e comparadas à sequência do gene *ansB* de *E. coli* K-12 publicado (Número de Acesso no GenBank M34277).

A L-asparaginase II foi sequenciada conforme segue. Uma alíquota de 2 mL de L-asparaginase II (80 mg/mL; Merck) foi diluída em água de grau de reagente para render uma solução diluída com uma concentração de proteína de 5,0 mg/mL. A solução diluída foi filtrada através de um filtro de 0,22 µm em frascos a fim de reduzir a biocarga antes de conduzir a análise de sequência de proteína. Similarmente, 100 mg de L-asparaginase II (Kyowa Hakko Kogyo) foram dissolvidos em 20 mL de água de grau de reagente para render uma solução diluída de 5,6 mg/mL e esterilizada por filtração. As análises de aminoácido quantitativas, determinações de sequência de N-terminal, mapeamento de peptídeo e espectrometria de massa foram usadas para determinar as sequências completas das duas proteínas. Fragmentos de brometo de cianogênio, digestão de Lys-C, digestão quimotríptica e digestão tríptica foram preparados e separados por cromatografia líquida de alta pressão ("HPLC"), e espectrometria de massa e sequência de aminoácidos foram realizados nos peptídeos isolados. As análises concluídas demonstraram uma identidade de sequência aparente entre as duas enzimas L-asparaginase II comerciais. Entretanto, quatro posições de aminoácido diferiram-se da asparaginase derivada da sequência de genes da *E. coli* K-12. Essas quatro posições diferentes são mostradas pela Tabela 1, abaixo.

TABELA 1

Posição de Resíduo	27	64	252	263
Merck e KH	Ala	Asp	Thr	Asn
K12 AnsB	Val	Asn	Ser	Thr

EXEMPLO 2**CONSTRUÇÃO DA CEPA DE *E. COLI* EN538 QUE EXPRESSA A L-ASPARAGINASE II RECOMBINANTE**

O gene que codifica ansB L-asparaginase II de *E. coli* K-12 foi adaptado para expressar a L-asparaginase II com as substituições de resíduo ilustradas pela Tabela 1 do Exemplo 1, conforme segue. A L-asparaginase II de sequência de 326 aminoácidos maduros do ansB de *E. coli* K-12 é codificada num segmento de 978 pares de base conforme relatado por Jennings MP e Beacham IR (1990 J Bacteriol 172: 1.401 a 1.498; nº no GeneBank M34277). O gene ansB, que inclui um peptídeo de sinal de 22 aminoácidos que precede, então, a proteína madura, foi clonado a partir de outra cepa de *E. coli* K-12 (GX1210; obtida junto à Genex Corporation) por métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencionais. Especificamente, os oligonucleótidos 5'-TACTGAATTCATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCA-3' (SEQ ID NO: 4) e 5'-ACAGTAAGCTTAGTACTGATTGAAGATCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 5) foram empregues como iniciadores com o uso de um termociclador Perkin Elmer Gene Amp 9600, Taq polimerase e reagentes padrão com esses parâmetros de ciclagem: 30 segundos 94 °C, 30 segundos 40 °C, 1 min 72 °C, por 25 ciclos.

A banda de ~1 kb amplificada foi purificada em eletroforese em gel de agarose TBE, digerida com Eco RI e Hind III e clonada no vetor de bacteriófago M13mp8. A sequência de DNA do gene ansB [Genebank nº M34277] foi confirmada por métodos de sequenciação de dideoxi de DNA manuais. O gene ansB clonado foi usado a seguir na mutagênese sítio-dirigida para alterar quatro códons do

gene *ansB* [GTG para GCG na base 530; AAT para GAT na base 640; TCT para ACT na base 1205 e ACC para AAC na base 1239] para codificar os aminoácidos alternados (Val27Ala; Asn64Asp; Ser252Thr; e Thr263Asn) com o uso do kit de mutagênese Amersham RPN 1523 versão 2 conforme descrito por Whitlow e Filpula [Single Chain Fvs, In Tumour Immunology. A Practical Approach, Ed. G. Gallagher, R.C. Rees, e C.W. Reynolds, 1993, Oxford University Press, páginas 279 a 291].

Especificamente, os oligonucleótidos mutagênicos empregados foram 5'-CAACTTTACCCGCTGTGTAGTTAG-3' (SEQ ID NO: 6) para alteração de Val27Ala; 5'-CAGCCAGACATCATCGTTCATGTC-3' (SEQ ID NO: 7) para alteração de Asn64Asp; 5'-GTCGAACACAGTTTTATACAGGTTGC-3' (SEQ ID NO: 8) para alteração de Ser252Thr; 5'-CTGCAGTACCGTTTTTCGCGGCGG-3' (SEQ ID NO: 9) para alteração de Thr263Asn. Todas as quatro alterações foram feitas num único lote e a sequenciação de DNA confirmou a sequência de gene *ansB* modificada [designada no presente documento como o gene *ansB** (SEQ ID NO: 2)].

A clonagem do gene *ansB** no plasmídeo pET-27b+ (Novagen Corporation) foi realizada introduzindo-se sítios de restrição de flanqueamento, *NdeI* e *BamHI*, nos terminais 5' e 3' do gene, respectivamente, por amplificação por PCR. Seguindo a digestão do DNA sintético com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, o gene de 1 quilobase foi ligado por meio de T4. A DNA ligase no plasmídeo de vetor pET-27b(+) foi também digerida com essas duas enzimas. O plasmídeo recombinante foi introduzido na cepa de *E. coli* BLR (DE3) por eletroporação com o uso de um Manipulador de Célula BTX Electro 600 de acordo com as instruções do fabricante.

A construção de vetor pET coloca o gene ansB* atrás de um promotor T7 que é induzível como uma consequência da adição de IPTG. A IPTG induz a expressão do gene de T7 RNA polimerase cromossômico sob o controle de um promotor lacUV5 e a T7 RNA polimerase transcreve, então, o gene ansB* que rende a expressão de alto nível do produto de proteína.

A mistura de transformação foi plaqueada em placas de ágar LB contendo canamicina (15 mg/mL) para permitir a seleção de colônias que contêm o plasmídeo pET-27b(+)/ansB*. Isso é designado como plasmídeo pEN537, conforme ilustrado pela Figura 1. As colônias isoladas foram adicionalmente purificadas por plaqueamento e analisadas quanto à expressão de gene induzível por IPTG por métodos padrão tais como aqueles descritos no Manual de Sistema pET Novagen Nona Edição. As sequências de genes foram verificadas com o uso de um Analisador Genético Applied Biosystems Prism310.

EXEMPLO 3

EXPRESSÃO DA L-ASPARAGINASE II RECOMBINANTE e
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA.

A cepa EN538 foi cultivada em meio LB a 37 °C com canamicina (15 µg/mL). Em OD₆₀₀ de cerca de 0,8, IPTG (1 mM) foi adicionada à cultura e permitiu-se que a indução da expressão de gene progredisse por 2, 3 ou 4 horas. A análise SDS-PAGE da cultura confirmou a expressão de nível alto do polipeptídeo de ansB* de 34,6 kDa. Western blotting com o uso do anticorpo policlonal de coelho de asparaginase

II anti-*E. coli* confirmou que a principal banda de proteína induzida em SDS-PAGE foi a L-asparaginase II.

Já que a L-asparaginase II é normalmente secretada no espaço periplásmico seguindo a remoção de peptídeo de sinal, experimentos adicionais foram conduzidos para examinar a localização da asparaginase nas células ou meio. A cultura foi centrifugada e as células peletizadas foram ressuspensas numa solução de liozima para romper as paredes celulares antes de examinar as proteínas associadas à célula solúveis e insolúveis, mais as proteínas liberadas para o meio de crescimento durante a cultura, por SDS-PAGE.

Essas análises demonstraram que uma indução de 3 ou 4 horas a 37 °C fornece uma expressão de *ansB** quase máxima de cerca de 30% de proteínas celulares totais. Pelo menos 70% da asparaginase pode ser solubilizada a partir do pélete de célula pelo tratamento com liozima. A quantidade de asparaginase libertada no meio de crescimento durante a cultura é cerca de 25% da asparaginase total expressa.

A asparaginase solubilizada libertada a partir do periplasma pelo tratamento com liozima foi adicionalmente examinada quanto à atividade de enzima com o uso de um ensaio RP-HPLC que mede o ácido aspártico, o produto da reação de asparaginase do substrato, asparagina. A atividade de enzima em extratos crus das amostras induzidas por IPTG foi cerca de 60 IU/mg, enquanto apenas cerca de 2 IU/mg nas amostras preparadas a partir de culturas não induzidas. Já que a proteína é apenas cerca de 20% pura nesse estágio, a mesma se compara bem à atividade específica relatada da asparaginase II pura (~250 a 300 IU/mg). A análise de sequência de N-terminal dessa

preparação de asparaginase foi também alcançada com o uso de um sequenciador de proteínas Applied BioSystems PROCISE. A sequência de N-terminal LPNITILATGGTIAGGGDSA (SEQ ID NO: 10) corresponde exatamente à sequência de proteínas de N-terminal prevista da asparaginase madura corretamente processada. A análise LC-MS (coluna de fase invertida Jupiter C-18) foi também realizada nessa amostra. A espécie de proteína principal demonstrou uma massa de 34.592 que corresponde exatamente à massa prevista como a asparaginase de ansB* madura. Nenhuma evidência de uma espécie de proteína que possui substituições de norleucina foi observada.

EXEMPLO 4

SEQUÊNCIAS DE CODIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE L-ASPARAGINASE II (GENES ANSB & ANSB*) DO PLASMÍDEO pEN537 e CROMOSSOMA DE *E. COLI* BLR.

O DNA cromossômico foi preparado a partir da *E. coli* BLR (DE3) [obtida junto à Novagen Corporation; nº de catálogo 69208-3]. Uma cultura de 2 mL de crescimento de BLR em meio LB com canamicina (15 µg/mL) a 37 °C foi centrifugada por 2 min numa microcentrífuga e o pélete de célula foi ressuspenso em 0,5 mL do tampão STET. Fenol/clorofórmio (0,5 mL) foi adicionado e a mistura foi submetida a vórtice e centrifugada por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi colhido e misturado com 50 µL de acetato de sódio a 3 M e 1 mL de etanol. Após a incubação em gelo por 10 min, o DNA foi peletizado por centrifugação e ressuspenso em 100 µL de água. PCR foi conduzida na amostra para isolar o gene ansB cromossômico. A mistura de reação PCR continha 5 µL de tampão de PCR High Fidelity 10x, 5 µL

de mistura de dNTP a 10 mM, 1 mL de MgSO₄ a 50 mM, 0,5 µL (50 pmol) do oligonucleótido 5'-GATCCATATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCAC-3' (SEQ ID NO: 11), 0,5 µL (50 pmol) do oligonucleótido 5'-GTACGGATCCTCATTAGTACTGATTGAAGATC-3' (SEQ ID NO: 12), 1 mL de DNA de BLR, 36 mL de água destilada e 1 mL da polimerase Platinum Taq High Fidelity. O produto de PCR foi clonado com o uso do sistema de clonagem TOPO comercial obtido junto à Invitrogen Corporation e conduzido conforme descrito pelo fabricante.

A reação de clonagem com o uso do produto de PCR e do vetor TOPO TA foi conduzida em 6 mL à temperatura ambiente durante por 30 min. O produto de ligação da reação foi transformado em células de *E. coli* TOP 10 competentes e plaqueado em placas de ágar LB com seleção de canamicina. A análise de sequência de DNA do gene cromossômico de BLR ansB clonado e o gene ansB* de pEN537 foi conduzida nos plasmídeos com o uso de um Analisador Genético Applied Biosystems Prism 310. Ambas as fitas foram sequenciadas. As sequências de codificação do gene ansB de BLR e gene ansB* de pEN537 diferem-se por 29 designações de base incompatíveis nas sequências de codificação de proteínas maduras. Entretanto, nenhuma dessas substituições de base resultou numa alteração na sequência de aminoácidos devido à degeneração do codão. A proteína de ansB codificada de BLR e a proteína de ansB* codificada de pEN537 foram confirmadas como sendo idênticas em sequência de aminoácidos. Todas as 326 posições foram mostradas como sendo idênticas nessas duas proteínas de asparaginase.

EXEMPLO 5

PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS E MEIO DE CULTURA

O processo a seguir foi adaptado de Harms et al., 1991 *Protein Expression and Purification* 2: 144 a 150.

Culturas da cepa de *E. coli* EN538, conforme descritas acima, são cultivadas em caldo Luria na presença de canamicina (15 µg/mL) a 37 °C, num incubador agitador. Num OD₆₆₀ de 0,8, IPTG é adicionada a uma concentração final de 1 mM, o crescimento continuou por 4 horas adicionais. As células são colhidas por centrifugação. Por propósitos analíticos, culturas de 2 mL são usadas.

Para produzir extratos de célula, os péletes são suspensos num tampão de ruptura de 1 mL (KPO a 50 mM, pH 7,5, EDTA a 1 mM, ditiotreitol a 0,5 mM] e as células rompidas por microfluidização. Os detritos celulares são removidos por centrifugação e o fluido sobrenadante é avaliado quanto à atividade de L-asparaginase II e também usado para avaliar a produção de enzima por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE). O fracionamento de choque osmótico é executado conforme descrito por Boyd et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 84:8.525 a 8.529, incorporado a título de referência no presente documento. Em resumo, o pélete é suspenso em 2 mL de tampão de esferoplasto (Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,0, sacarose a 0,5 M, EDTA a 0,5 mM), incubado em gelo por 5 min e centrifugado. O pélete é aquecido à temperatura ambiente, ressuspenso em 0,3 mL de água fria, incubado em gelo por 5 min e novamente centrifugado. A fração periplásmica sobrenadante é usada sem tratamento adicional para a determinação de atividade e eletroforese.

Purificação de Enzima

Para preparações de L-asparaginase II em grande escala, células são cultivadas em culturas em lotes (10 litros) e submetidas a choque osmótico conforme acima. Por litro de volume de cultura, 50 a 100 mL de tampão de esferoplasto e 30 a 40 mL de água são empregados. O protocolo a seguir inicia com o extrato periplásmico obtido a partir de uma cultura de 2 litros. Todas as etapas são realizadas a 5 a 10 °C.

Fracionamento de Sulfato de Amônio

A 100 mL de fluido sobrenadante, 29,5 g de sulfato de amônio sólido são adicionados para gerar 50% de saturação. Após 2 horas, o precipitado é removido por centrifugação e o pélete descartado. O sobrenadante foi colocado a 90% de saturação com sulfato de amônio (27,2 g para 100 mL). Após o pélete ter ficado em repouso de um dia para o outro, o mesmo é colhido por centrifugação, dissolvido em alguns mililitros de tampão de piperazina-HCl a 25 mM, pH 5,5 e dialisado contra o mesmo tampão. Esse mesmo processo é também aplicado ao meio de cultura restante para recuperar a L-asparaginase II secretada.

Cromatofocalização

Uma coluna de 1 x 30 cm de Poly-buffer exchanger PBE 94 foi equilibrada com 200 mL do tampão de piperazina-HCl acima (tampão de partida). Após a solução de amostra (10 mL) ser aplicada, a coluna é eluída com 200 mL de tampão de eluição (Polybuffer 74, diluído 10 vezes com H₂O e ajustado a um pH 4,0 com HCl) a uma taxa de fluxo de 30 mL/h. As frações de 2 mL são colhidas e avaliadas quanto à atividade de L-

asparaginase II após a diluição apropriada das amostras de 20- μ L. As frações que contêm asparaginase são agrupadas e dialisadas contra solução de sulfato de amónio saturada. O pélete de enzima é lavado com 90% de sulfato de amónio e armazenado como uma suspensão nesse meio.

EXEMPLO 6

PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS E MEIO DE CULTURA

As culturas da cepa de *E. coli* EN538, conforme descrito acima, são cultivadas no meio de cultura [por exemplo, conforme descrito em Filpula, D., McGuire, J. e Whitlow, M. (1996) Production of single-chain Fv monomers and multimers, In Antibody Engineering: A Practical Approach (J. McCafferty, H. Hoogenboom, e D.J. Chiswell, eds.; Oxford University Press, Oxford, RU) páginas 253 a 268] na presença de canamicina (15 mg/mL) a 25 °C a 37 °C, num fermentador. Num OD₆₆₀ de 20 a 200, IPTG é adicionada a uma concentração final de 0,1 mM, e o crescimento continuou por 1 a 12 horas adicionais. As células são colhidas por centrifugação e passadas através de um homogeneizador de célula Manton-Gaulin. O lisato celular é centrifugado a 24.300 g por 30 min a 6 °C e o sobrenadante é colhido e submetido à ultrafiltração/diafiltração e a condutividade é ajustado a 3 mS. O pH do lisato é ajustado a 4,1 com 25% de ácido acético e diafiltrado com tampão de acetato de sódio a 5 mM, NaCl a 25 mM, pH 4,1.

A asparaginase é capturada na cromatografia de coluna de troca catiónica S-Sepharose. A asparaginase ligada é eluída com fosfato de potássio a 12,5 mM, NaCl a 25 mM, pH 6,4 (tampão NK64).

As frações de pico de asparaginase colhidas a partir da cromatografia S-Sepharose são agrupadas e Tween 80 0,1% é adicionado e incubado por 20 min à temperatura ambiente. Um volume do tampão NK64 é adicionado e a amostra é carregada numa coluna Q-Sepharose. A coluna Q é lavada com tampão Q-25 (NaCl a 25 mM, fosfato de potássio a 10 mM pH 6,4) e a asparaginase é, então, eluída com tampão Q-135 (NaCl a 135 mM em fosfato de potássio a 10 mM pH 6,4).

Às frações de enzima agrupadas, é adicionado sulfato de magnésio em pó a uma concentração final de 0,25 M e é carregado numa coluna de interação hidrofóbica de fenilo pré-equilibrado com MgSO₄ a 0,25 M em fosfato de potássio a 10 mM, pH 7,8. A asparaginase é colhida no fluxo através da fração e diafiltrada numa unidade Filtron com o uso de uma membrana de polissulfona de corte de peso molecular de 30 kDa com o tampão, NaCl a 75 mM, fosfato de potássio a 1 mM, pH 7,2.

A fração de asparaginase é diluída com um volume igual de água e carregada numa coluna de hidroxiapatita. As impurezas são removidas com eluição com tampão H15 (NaCl a 50 mM, fosfato de potássio a 15 mM, pH 7,8). A asparaginase purificada é eluída com tampão H150 (NaCl a 50 mM, fosfato de potássio a 150 mM, pH 7,8).

EXEMPLO 7

PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS E MEIO DE CULTURA

As culturas da cepa de *E. coli* EN538, cultivadas, induzidas e homogeneizadas conforme descrito no Exemplo 6, são

diafiltradas contra acetato de sódio a 20 mM, NaCl a 40 mM, pH 4,6 com 8 volumes de produto com uma fibra oca Microgon de 50 kDa a uma taxa de fluxo de 2,9 L/min, 110,32 kPa (16 psi) até o A_{280} ser menor do que 0,1 e a condutividade é 5 mS. O produto é filtrado com o uso de uma membrana de 0,22 mm.

A cromatografia de troca catiónica é conduzida com uma coluna Poros-HS. A coluna é equilibrada em acetato de sódio a 20 mM, pH 4,6, NaCl a 40 mM. O meio clarificado diafiltrado é carregado a um volume de coluna de 0,5 (CV)/min e a coluna é lavada com 5 CV de acetato de sódio a 20 mM, pH 4,6, NaCl a 40 mM. A asparaginase é eluída com acetato de sódio a 20 mM, pH 4,6, NaCl a 135 mM.

Ao produto acima, é adicionado fosfato de sódio dibásico a 0,2 M, pH 9,2 para ajustar o pH a 6,3. A amostra é, então, diafiltrada contra fosfato de sódio a 10 mM, pH 6,3 com um filtro de fibra oca Microgon de 50 kDa a uma taxa de fluxo de 0,74 l/min, 113,76 kPa (16,5 psi).

A cromatografia de troca aniônica é conduzida em TMAE Fractogel. A coluna é equilibrada em acetato de sódio a 10 mM, pH 6,4. O eluato de coluna de catião diafiltrado é carregado a 0,5 CV/min e a coluna é lavada com 5 CV de acetato de sódio a 10 mM, pH 6,4. A coluna é lavada adicionalmente com 5 CV de acetato de sódio a 10 mM, pH 6,4, NaCl a 25 mM. A asparaginase é eluída com acetato de sódio a 10 mM, pH 6,4, NaCl a 100 mM.

O produto é diafiltrado contra fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,5 com uma membrana de 50 kDa a uma concentração de 40 mg/mL e filtrado através de uma membrana de 0,22 mm.

LISTA DE SEQUÊNCIA

<110> Filpula, David R.
Maoliang, Wang R.

<120> HOSPEDEIRO RECOMBINANTE PARA PRODUZIR L-ASPARAGINASE
II

<130> 213.1239-U-PCT

<140> PCTUS0770706

<141> 08-06-2007

<150> Não conhecido ainda

<151> Na mesma data

<150> 60/817.817

<151> 30-06-2006

<160> 12

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 326

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Leu Pro Asn Ile Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Asp Ser Ala Thr Lys Ser Asn Tyr Thr Ala Gly Lys Val Gly Val
20 25 30

Glu Asn Leu Val Asn Ala Val Pro Gln Leu Lys Asp Ile Ala Asn Val
35 40 45

Lys Gly Glu Gln Val Val Asn Ile Gly Ser Gln Asp Met Asn Asp Asp
50 55 60

Val Trp Leu Thr Leu Ala Lys Lys Ile Asn Thr Asp Cys Asp Lys Thr
65 70 75 80

Asp Gly Phe Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Met Glu Glu Thr Ala
85 90 95

Tyr Phe Leu Asp Leu Thr Val Lys Cys Asp Lys Pro Val Val Met Val
100 105 110

Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ser Met Ser Ala Asp Gly Pro Phe Asn
115 120 125

Leu Tyr Asn Ala Val Val Thr Ala Ala Asp Lys Ala Ser Ala Asn Arg
130 135 140

Gly Val Leu Val Val Met Asn Asp Thr Val Leu Asp Gly Arg Asp Val
145 150 155 160

Thr Lys Thr Asn Thr Thr Asp Val Ala Thr Phe Lys Ser Val Asn Tyr
165 170 175

Gly Pro Leu Gly Tyr Ile His Asn Gly Lys Ile Asp Tyr Gln Arg Thr
180 185 190

Pro Ala Arg Lys His Thr Ser Asp Thr Pro Phe Asp Val Ser Lys Leu
195 200 205

Asn Glu Leu Pro Lys Val Gly Ile Val Tyr Asn Tyr Ala Asn Ala Ser
210 215 220

Asp Leu Pro Ala Lys Ala Leu Val Asp Ala Gly Tyr Asp Gly Ile Val
225 230 235 240

Ser Ala Gly Val Gly Asn Gly Asn Leu Tyr Lys Thr Val Phe Asp Thr
245 250 255

Leu Ala Thr Ala Ala Lys Asn Gly Thr Ala Val Val Arg Ser Ser Arg
260 265 270

Val Pro Thr Gly Ala Thr Thr Gln Asp Ala Glu Val Asp Asp Ala Lys
275 280 285

Tyr Gly Phe Val Ala Ser Gly Thr Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg Val
290 295 300

Leu Leu Gln Leu Ala Leu Thr Gln Thr Lys Asp Pro Gln Gln Ile Gln
305 310 315 320

Gln Ile Phe Asn Gln Tyr
325

<210> 2

<211> 1530

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

```

aastgggggc gaaagcggtg ctgaaaagcg ggggtaaacc attacagcat gtctctggaa 60
gcttgggaag cctggggggg ctgcaatcct caatccaaac cgaagtggaa aagcagggaa 120
aagattcca gcaatttggc aaagatcttt ctgacccggt tctgactctg gaagatagcc 180
gaaaagccct ggtcgggaat ttaaaataat cctctatitt aagcgggcat aatacttttt 240
tatgcggttt aattcttctt ttgttaacct gcctctaaact ttgtagatct ccaaaatata 300
ttcaogttgt aattgttta agtcccaatt tcccatcacg agctaaggga taatgogtag 360
cgttcacgta actggaggaa tgaatatgag tttttcaaaa agcgggcaat tgcgcgactg 420
gttatgggtt ttagtggtgc agcattggca ttaccacaata tcaccatttt agcaacgggc 480
gggaccattg cggtggtgag tgactccgca accaaatcta actacacagc ggttaaagtt 540
ggcgtagaaa atctgttta tgoggtgocg caactaaaag acattggcaa cgttaaaggc 600
gagcaggtag tgaatatggc ctcccaggac atgaacgatg atgtctgggt gacactggcg 660
aaaaaatta acaccgactg agtaagacc gacggcttag taattacaa cgttacggac 720
acgatggaa agactgctta ctctctggac ctgacggtga aatgggaca accggtggtg 780
atgtcggcgc caatgcgtcc gtcccagctc atgagcgcag acggtccatt caactgtat 840
aacgcggtag tgaccgagc tgataaagcc tccgcacaac gtagggtgct ggtagtgatg 900

```

```

aatgacaccg tgcctgatgg ccgtgaagtc accaaaaaca acacacacga cgtagcgacc 960
ttcaagtctg ttaactacgg tccctcgggt tacattcaca accgtaagat tgcctaccag 1020
cgtaccccg cactaagca taccagcgc acccacttcg atgtctctaa gctgaatgaa 1080
ctgcgcaag toggcattgt ttataactac gctaacgcat ccgatcttc cgttaagca 1140
ctggtagatg cgggctatga tggcctcgtt agcgtcgtg tgggtaacgg caacctgtat 1200
aaaactgtgt togacacgct ggagacggcc gggaaaaacg gtactgcagt cgtgcgttct 1260
tcccgctac cagcgggggc taccactcag gatgcgcaag tggatgatgc gaatacggc 1320
ttcgtcgcct ctggcactgt gaacccgcaa aaagcgcgcg ttctgtgca actggtctctg 1380
accgaaaaa aagatccgca gcagatccag cagatcttca atcagtacta atcgcctcgc 1440

cccggtatcg tgcggggct ttttcaactc agactcacgt ccattgocaa ttttaattac 1500
cctaattgata atcacccgaa taaattattt 1530

```

<210> 3

<211> 1044

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

```

atggagtttt tcaaaaagac ggcacttggc gcaactggtt tgggttttag tggtagcaga 60
ttggcattac ccaatatcac cattttagca accggcggga ccattgcagg tggtagtgac 120
tccgcaacca aatctaacta cacagcgggt aaagttagcg tagaaaatct ggttaatgag 180
gtgcgcgcaac tgaaggacat tgcgaacgtt aaaggcagac aggtagtcaa tattgacctc 240
caggacatga acgatgatgt ctggtgaca ctggcgaaaa aaattaacac cgaactcgat 300
aaaactgacg gcttcgtcat taaccacggt accgacacga tggagcaaac cgttacttcc 360
ctcgacctga cggtagaatg cgcacacccg gtggtgatgg taggtgcaat ggtccgctcc 420
acgtctatga ggcagacggy tccattcaac ctgtataacg ccgtagtgcac tgcagctgat 480
aaagcctcag ctaatcgtgg cgtactcgtc gtgatgaacg acacogtgcct tcatggcctt 540
gatgtcaaca aaacccacac cacogatgta ggcacottca agtctgttaa ctacggtcct 600
ctgggttaca ttcaaacggy taagattgac taaccaagta ccccgccacg taagcacacc 660
agcgacacgc cgttcgatgt ctctaacgtg aatgaactgc cgaagtcagg cattgtttat 720
aactacgcta accatccgca tcttcggct aaagcactgg tagatgaggg ctatgatggc 780
atcgttagcg ctggcgtggy taacggcaac ctgtataaaa ccgtatttga cacccttga 840

```

```

accgctggga aaaaggcac tgaagtatg cgttctccc ggtacagac gggcgtacc 900
actcaggatg cagaagtgga tgaigogaaa taaggcttag tagcctctgg cacttgaac 960
ccgcaaaag cggcgttct gctgcaactg gctctgacga aaactaaga tggcagcag 1020
atcagcaga tcttcactca gtac 1044

```

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> iniciador de oligonucleótido

<400> 4

tactgaattc atggagtttt tcaaaaagac ggca 34

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> iniciador de oligonucleótido

<400> 5

acagtaagct tagtactgat tgaagatctg ctg 33

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> iniciador de oligonucleótido

<400> 6

caactttacc cgctgtgtag ttag 24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> iniciador de oligonucleótido

<212> DNA

<213> iniciador de oligonucleótido

<400> 11

gatccatatg gagtttttca aaaagacggc ac 32

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> iniciador de oligonucleótido

<400> 12

gtacggatcc tcattagtagc tgattgaaga tc 32

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Célula hospedeira de *Escherichia coli* recombinante para produzir uma enzima L-asparaginase II de *Escherichia coli* **caracterizada** por compreender um cromossoma de *Escherichia coli* e pelo menos uma cópia de um vetor extracromossómico recombinante, em que o vetor extracromossómico recombinante codifica uma subunidade da enzima L-asparaginase II, em que o cromossoma da célula hospedeira também codifica a mesma subunidade da enzima L-asparaginase II, em que o cromossoma hospedeiro não codifica qualquer outra isoforma de L-asparaginase II, em que a subunidade de L-asparaginase II codificada compreende a SEQ ID NO: 1; e o vetor extracromossómico recombinante compreende uma molécula de DNA que compreende a SEQ ID NO:2.

2. Célula hospedeira de *Escherichia coli* recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo vetor extracromossómico ser um plasmídeo.

3. Célula hospedeira de *Escherichia coli* recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo vetor extracromossómico recombinante compreender uma molécula de DNA que codifica a subunidade da enzima L-Asparaginase II que é operacionalmente ligada a um promotor adequado.

4. Célula hospedeira de *Escherichia coli* recombinante, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo promotor ser selecionado a partir do grupo que consiste em promotores T7, araB, $\lambda P_R/\lambda P_L$, phoA, trc e trp.

5. Célula hospedeira de *Escherichia coli* recombinante, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo vetor extracromossômico recombinante compreender adicionalmente um operador, sítio de ligação de ribossoma, sequência de sinal, terminador transcricional, marcador de seleção de antibiótico, origem de replicação e uma cópia regulada do repressor.

6. Célula hospedeira de *Escherichia coli* recombinante, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo cromossoma compreender uma molécula de DNA em conformidade com a SEQ ID NO:3.

7. Molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma subunidade da enzima L-asparaginase II de SEQ ID NO: 1 **caracterizada** pela molécula de ácido nucleico isolada consistir em um ácido nucleico selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3.

8. Vetor extracromossômico recombinante **caracterizado** pelo vetor extracromossômico recombinante compreender a SEQ. ID NO:2 e codificar uma subunidade da enzima L-asparaginase II.

9. Vetor extracromossômico, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo vetor ser um plasmídeo.

10. Vetor extracromossômico, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo vetor ser o plasmídeo pEN537.

11. Célula hospedeira de *Escherichia coli* **caracterizada** por compreender o plasmídeo, conforme definido na reivindicação

2, em que o plasmídeo é pEN537, designado como EN538 e depositado como Número ATCC PTA 7490.

12. Método para produzir uma enzima L-asparaginase II recombinante substancialmente livre de outros isómeros de L-asparaginase II **caracterizado** por compreender cultivar a célula hospedeira, conforme definido na reivindicação 11, e isolar a enzima L-asparaginase II produzida.

13. Molécula de DNA isolada **caracterizada** por codificar uma subunidade da enzima L-asparaginase II que compreende a SEQ ID NO: 2.

14. Vetor extracromossómico recombinante, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pela SEQ ID NO: 2 ser operacionalmente conectada a um promotor adequado.

15. Vetor extracromossómico recombinante, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo promotor ser selecionado a partir do grupo que consiste em promotores T7, araB, $\lambda_{PR}/\lambda_{PL}$, phoA, trc e trp.

RESUMO

"HOSPEDEIRO RECOMBINANTE PARA PRODUZIR L-ASPARAGINASE II"

A invenção fornece uma célula hospedeira de *Escherichia coli* recombinante para produzir uma enzima L-asparaginase II de *Escherichia coli*. A célula hospedeira inclui um cromossoma de *Escherichia coli* e pelo menos uma cópia de um vetor extracromossômico recombinante, em que o vetor extracromossômico recombinante codifica a enzima L-asparaginase II, em que o cromossoma de célula hospedeira também codifica a mesma enzima L-asparaginase II, e em que o cromossoma hospedeiro não codifica qualquer outra isoforma de L-asparaginase II.

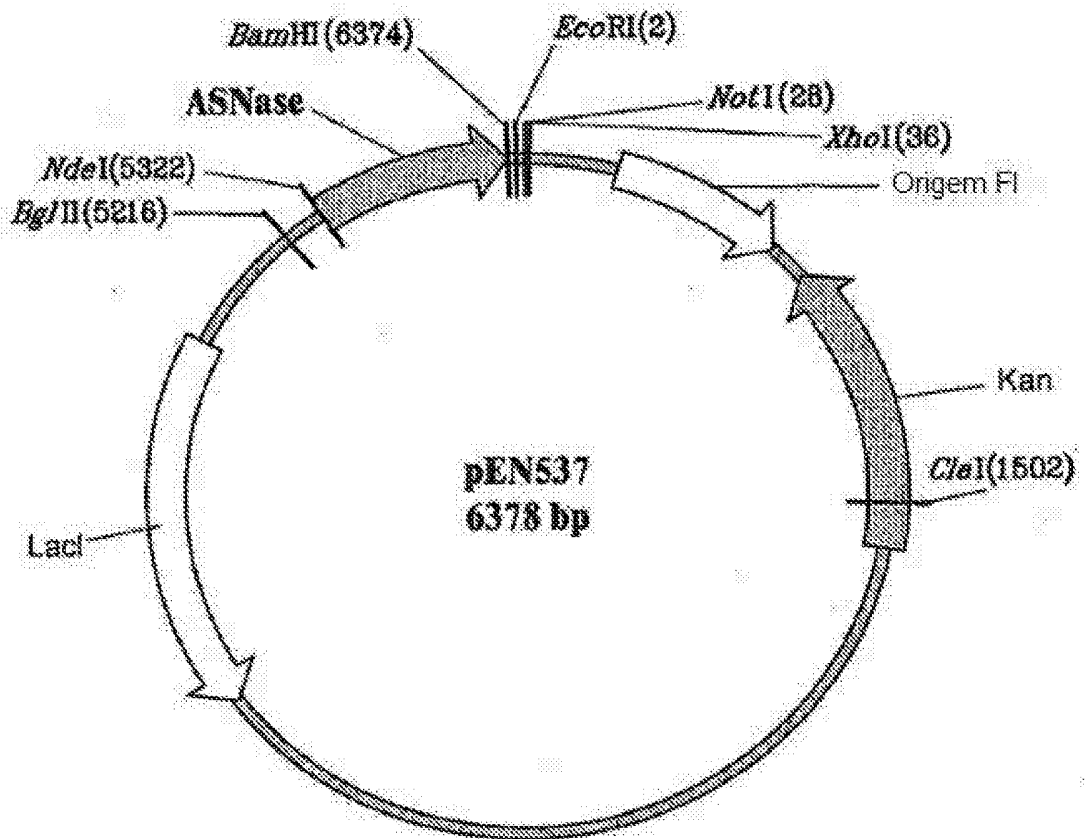


FIG. 1