

FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

GUSTAVO ROTH

PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE II RECOMBINANTE DE *Erwinia carotovora*
EM CULTIVOS DE *Escherichia coli* EM BATELADA ALIMENTADA

Porto Alegre
2011

GUSTAVO ROTH

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE II RECOMBINANTE DE *Erwinia carotovora*
EM CULTIVOS DE *Escherichia coli* EM BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2011

GUSTAVO ROTH

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE II RECOMBINANTE DE *Erwinia carotovora*
EM CULTIVOS DE *Escherichia coli* EM BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza - PUCRS

Profa. Dra. Giandra Volpato - IFRS

Prof. Dr. Cláudio Frankenberg - PUCRS

Porto Alegre

2011

RESUMO

Biofármacos são, na sua maioria, proteínas recombinantes produzidas por ferramentas biotecnológicas. Preparações de L-asparaginase que atualmente estão no mercado, derivadas de *Escherichia coli* ou *Erwinia chrysanthemi*, têm sido utilizadas como agentes terapêuticos no tratamento efetivo de leucemia linfoblástica aguda (ALL) por mais de 40 anos. O interesse em L-asparaginase tipo II de *Erwinia carotovora* decorre da sua atividade de glutaminase reduzida e sua atividade de asparaginase similar quando comparada a preparações terapêuticas atualmente em uso. Isso é particularmente importante uma vez que a atividade de glutaminase foi relacionada a sérios efeitos colaterais. O objetivo desse trabalho é aplicar uma combinação de tecnologias para desenvolver um processo simplificado e produtivo para a produção de L-asparaginase II recombinante homogênea e ativa de *Erwinia carotovora* (rErAII) em células hospedeiras de *E. coli*. Neste trabalho são descritas as condições para a expressão produtiva de rErAII em agitador orbital e em biorreator, assim como um protocolo de purificação em uma única etapa, por cromatografia líquida de troca iônica, seguida pela determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da enzima através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Usando uma técnica robusta de batelada alimentada, com vazão em perfil exponencial pré-determinado, o sistema de cultivo em biorreator rendeu 30,7 gramas de células secas e 0,9 gramas de proteína rErAII na fração solúvel por litro de meio de cultivo. Os resultados foram atingidos em cultivos mantidos a 30°C, em meio de cultura Terrific Broth sob indução de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e utilizando *E. coli* C43 (DE3) como célula hospedeira. O protocolo de purificação de uma única etapa rendeu aproximadamente 5 mg de rErAII homogênea por grama de célula seca, correspondendo a 168 mg de proteína rErAII por litro de meio de cultura. O trabalho demonstra que é possível produzir na fração celular solúvel a enzima rErAII ativa e homogênea, por meio de cultivos de *E. coli* em batelada alimentada sob a indução de IPTG. A rErAII mostrou ser uma terapia alternativa promissora para o tratamento de ALL devido a sua atividade de glutaminase reduzida. Quando comparada a ensaios espectrofotométricos bem estabelecidos, as técnicas calorimétricas diretas para determinação de cinética enzimática são exatas e precisas, tanto para enzimas purificadas quanto para extratos brutos. Esses dados poderão contribuir para indústrias farmacêuticas interessadas em desenvolver biosimilares, para políticas de saúde e para o melhoramento do controle de qualidade de enzimas terapêuticas.

Palavras-chave: Asparaginase. *Erwinia carotovora*. Glutaminase. Biorreator. Batelada Alimentada. *Escherichia coli*. Calorimetria de Titulação Isotérmica. Leucemia Linfoblástica Aguda.

ABSTRACT

Biopharmaceutical drugs are mainly recombinant proteins produced by biotechnological tools. Currently on the market L-asparaginase preparations, derived either from *Escherichia coli* or *Erwinia chrysanthemi*, have been used as a therapeutic agent on the effective treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) for more than 40 years. The interest in *Erwinia carotovora* L-asparaginase type II stems from its significantly lower glutaminase- and similar asparaginase-activity compared to current therapeutic preparations, this is particularly important since the glutaminase-activity has been implicated in causing serious side effects. The aim of this work is to apply a combination of technologies to develop a productive and simplified process for production of homogeneous and active recombinant L-asparaginase II from *Erwinia carotovora* (rErAII) in *E. coli* as host cells. The shake flasks and bioreactor conditions for productive rErAII expression are described, as well as a one-step ion-exchange liquid chromatography purification protocol followed by enzyme kinetics and thermodynamics through isothermal titration calorimetry (ITC). By using a robust fed-batch technique with pre-determined exponential feeding rates the bioreactor culture system yielded 30.7 gram of dry cell weight and 0.9 gram of recombinant rErAII protein in soluble form per liter of culture broth. This was achieved in cultures maintained at 30 °C, in Terrific Broth medium under isopropil β -D-thiogalactopiranosideo (IPTG) induction and using *E. coli* C43 (DE3) as a host cell. The established one-step purification protocol yielded more than 5 mg of homogeneous rErAII per gram of dry cell weight, corresponding to 168 mg of rErAII protein per culture liter. The work shows that it is possible to produce an active homogeneous rErAII enzyme in the soluble cell fraction through IPTG-induced *E. coli* fed-batch cultivation. The rErAII proved to be a promising alternative therapy in the treatment of ALL, due to its lower glutaminase activity. When compared to well-established spectrophotometric assays, the straightforward calorimetric techniques for enzyme kinetics determination are accurate and precise either for purified enzymes or crude extracts. These data will contribute to biopharmaceutical companies interested in developing biosimilars, to healthcare policies, and quality control improvement.

Keywords: Asparaginase. *Erwinia carotovora*. Glutaminase. Bioreactor. Fed-batch. *Escherichia coli*. Isothermal Titration Calorimetry. Acute Lymphoblastic Leukemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reação química de hidrólise catalisada pela asparaginase (EC 3.5.1.1).....	14
Quadro 1 - Metodologias de alimentação nos cultivos em batelada alimentada.....	17
Figure 1 - rErAII SDS-PAGE (12%) analysis.....	45
Figure 2 - IPTG-induced rErAII production in fed-batch cultivation of recombinant <i>E. coli</i>	46
Figure 3 - rErAII kinetic and thermodynamic parameters	46
Figure 4 - EcAII kinetic and thermodynamic parameters.....	47

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Kinetic parameters for the hydrolysis of L-Asn and L-Gln by rErAII and EcAII (Elspar [®]) at 25°C and pH 7.0.....	47
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ALL - Leucemia linfoblástica aguda

DCW - Peso de células secas (*Dry cell weight*)

DO - Oxigênio dissolvido

E. carotovora - *Erwinia carotovora*

E. chrysanthemi - *Erwinia chrysanthemi*

E. coli - *Escherichia coli*

EcAII - L-asparaginase II de *Escherichia coli* (Asparaginase Elspar[®])

IPTG - Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

ITC - Calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal titration calorimetry*)

kDa - quilo Dalton

L-Asn - L-asparagina

LB - Meio de cultura Luria - Bertani

L-Gln - L-glutamina

MCB - Banco de células principal (*Master cell bank*)

OD₆₀₀ - Densidade ótica a 600 nm

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pO₂ - Concentração de oxigênio dissolvido

rErAII - L-asparaginase II recombinante de *Erwinia carotovora*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TB - Meio de cultura Terrific Broth

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 BIOFÁRMACOS.....	10
1.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	11
1.3 A ENZIMA L-ASPARAGINASE	12
1.3.1 Estrutura da proteína	13
1.3.2 Mecanismo de ação	13
1.3.3 Toxicidade e hipersensibilidade	14
1.4 CULTIVOS CELULARES EM BIORREATOR.....	15
1.4.1 Fatores inibidores de crescimento em cultivos em biorreator	15
1.4.2 Estratégias de alimentação	16
1.5 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	18
1.6 CALORIMETRIA DE REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MANUSCRITO submetido ao periódico <i>Brazilian Journal of Chemical Engineering: RECOMBINANT <i>Erwinia carotovora</i> L-ASPARAGINASE II PRODUCTION IN <i>Escherichia coli</i> FED-BATCH CULTURES</i>	22
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A presente dissertação de mestrado envolve a aplicação de uma combinação de tecnologias para desenvolver um processo simplificado e produtivo para a produção de L-asparaginase II recombinante homogênea e ativa de *Erwinia carotovora* (rErAII) em células de *Escherichia coli*. A enzima asparaginase é um dos fármacos de primeira linha para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda, uma doença crônica que atinge adultos e crianças. Este trabalho foi desenvolvido na empresa Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento instalada no TecnoPUC por meio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Este trabalho visa à integração interdisciplinar dos conhecimentos da engenharia com a biologia molecular buscando, assim, ampliar as alternativas para produção de biofármacos com valor agregado para a saúde pública.

Na seção introdutória desta dissertação de mestrado são apresentados alguns aspectos teóricos fundamentais para o entendimento do conceito geral do tema. Além da definição de biofármacos, são descritas, também, as tecnologias utilizadas para alcançar o objetivo final, o qual é especificado na seção seguinte. Por fim está anexado o manuscrito submetido para publicação à revista *Microbial Cell Factories*, seguido por considerações finais relativas à conclusão deste trabalho.

1.1 BIOFÁRMACOS

As asparaginases utilizadas clinicamente pertencem à classe de biofármaco. O termo “biofármaco” é aceito como parte do vocabulário farmacêutico e pode ser definido como fármaco cujo princípio ativo são proteínas terapêuticas recombinantes obtidas por processo biológico, seja em cultura de células, em tecidos, em órgãos ou em organismos inteiros (SPADA; WALSH, 2005). Essas proteínas terapêuticas recombinantes são moléculas muito mais complexas do que as drogas tradicionais quimicamente produzidas. Elas exigem um processo de produção bastante elaborado e sofisticado e suas propriedades são altamente dependentes do processo utilizado (KUHLMANN; COVIC, 2006).

Os biofármacos têm revolucionado as opções de tratamento para muitas doenças, por isso seu valor comercial é relevante. Muitos biofármacos originais, ou seja, os primeiros produtos aprovados para a venda estão perdendo sua proteção de patente (COVIC; KUHLMANN, 2007). Assim, uma nova geração de moléculas, chamadas biossimilares, está

sendo desenvolvida. Essas moléculas poderão ser alternativas de menor custo para os biofármacos originais (KUHLMANN; COVIC, 2006). Entretanto, a segurança e a eficácia dos biossimilares devem ser comprovadas e devem equivaler ao produto original.

1.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), que tem como principal característica o acúmulo de células jovens (blastos) anormais na medula óssea, substituindo as células sanguíneas normais. Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo destas células na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos, dos glóbulos brancos e das plaquetas, causando anemia, infecções e hemorragias, respectivamente. Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia, porque ao não ser tratada é rapidamente fatal (BRASIL, 200-).

Segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil em 2006, publicadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), as leucemias afetaram cerca de 5.330 homens e 4.220 mulheres (BRASIL, 200-). O tipo de leucemia mais freqüente em crianças é a leucemia linfoblástica aguda (*Acute Lymphoblastic Leukemia - ALL*), enquanto que a leucemia mielóide aguda é mais comum em adultos (BRASIL, 200-). A ALL resulta da proliferação maligna de células linfóides e é diagnosticada em 3000 a 4000 pessoas nos Estados Unidos anualmente, sendo que dois terços destas são crianças (CORTES; KANTARJIAN, 1995; PARKER *et al.*, 1997).

Um progresso extraordinário tem ocorrido no tratamento desta doença. Há cinco décadas a taxa de cura era inferior a 10%. Segundo Pui e Evans (1998), a taxa de cura em 1998 estava próxima a 80% em crianças e a tendência é que se mantenha nesta faixa. Em contraste, apenas 30 a 40% dos adultos com ALL são curados (CORTES; KANTARJIAN, 1995).

Um avanço no tratamento da ALL ocorre pela otimização do uso de drogas já existentes com a introdução de uma combinação de quimioterapia. Entre as drogas utilizadas no tratamento da leucemia estão as enzimas bacterianas asparaginases, que vêm sendo empregadas desde os anos 70 (ORTEGA *et al.*, 1977).

1.3 A ENZIMA L-ASPARAGINASE

Em 1963, foi relatado por Broome que o soro de cobaias apresentava propriedades antileucêmicas, que foi atribuída à L-asparaginase (L-asparagina-amido-hidrolase). Duas formas de L-asparaginases já foram descritas; a primeira, L-asparaginase I, apresenta uma estrutura quaternária dimérica com baixa afinidade por L-asparagina; e a segunda, L-asparaginase II, tem estrutura quaternária tetramérica e alta afinidade por L-asparagina (CEDAR; SCHWARTS, 1967). As propriedades dessas enzimas foram estudadas intensivamente em microrganismos como *Escherichia coli* (BAGERT; RÖHM, 1989; HARMS *et al.*, 1991), *Erwinia carotovora* (KOTZIA; LABROU, 2005; WINK *et al.*, 2010) e *Erwinia chrysanthemi* (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001). Em particular, o tipo II da enzima apresenta atividade antitumoral e pode ser usada no tratamento de leucemia (ORTEGA *et al.*, 1977).

A asparaginase é um produto natural importante que possui um amplo espectro de atividade antitumoral. Além da ALL, a enzima tem sido aplicada no tratamento de muitas outras doenças, como a doença de Hodgkin's, linfomas de células-T, tumores NK e certos subtipos de leucemias mielóides também respondem ao tratamento com asparaginase (DUVAL *et al.*, 2002).

As preparações de asparaginase disponíveis no mercado hoje em dia são derivadas de *E. coli* (Asparaginase®; Medac, Kidrolase®; EUSA Pharma, Elspar®; Merck) na sua forma nativa ou como enzima peguilhada (fusionada a uma molécula de polietilenoglicol para aumento da sua biodisponibilidade - Oncaspar®; Sigma-Tau) e de *E. chrysanthemi* (Erwinase®; EUSA Pharma). As formulações de asparaginase nativas de *E. coli* disponíveis foram desenvolvidas entre 20 e 30 anos atrás, fazendo com que seu processo de produção seja ineficiente e desatualizado, restringindo o fornecimento do medicamento (PIETERS *et al.*, 2008).

Não há relato disponível a respeito da produção comercial desta importante droga antitumoral através de técnicas de DNA recombinante. No Brasil, a obtenção de asparaginase para a maioria das aplicações clínicas depende de importação. Sendo assim, a procura por sistemas que apresentem níveis elevados de expressão de asparaginase e a construção de genes apropriados para esta enzima através de técnicas de DNA recombinante é notavelmente atrativa.

1.3.1 Estrutura da proteína

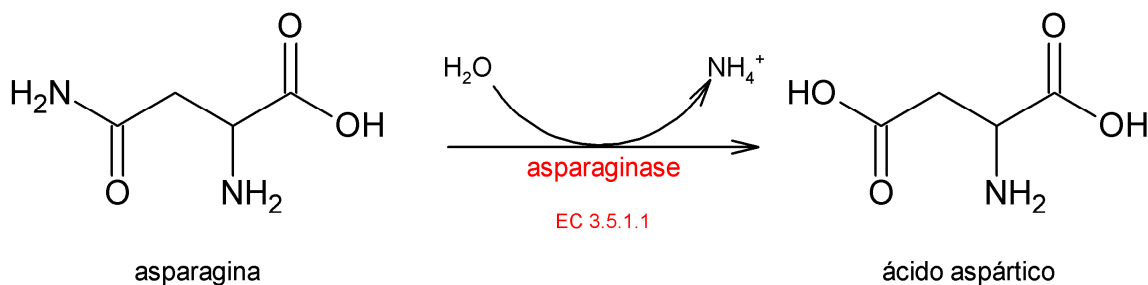
Todas asparaginases tipo II bacterianas (EC 3.5.1.1) são ativas como homo-tetrâmeros e apresentam massa molecular variável entre 140-160 kDa (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001). Cada monômero é composto por aproximadamente 330 resíduos de aminoácidos que formam 14 folhas- β e 8 α -hélices, que estão organizadas em dois domínios facilmente identificáveis, sendo o maior N-terminal e o menor C-terminal, os quais estão conectados por aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos. As L-asparaginases de *E. coli* e *E. carotovora* possuem peso molecular similar, porém diferem em seus valores de ponto isoelétrico (~4,5 para *E. coli* e ~8,5 para *E. carotovora*) e em suas propriedades farmacocinéticas (DUVAL *et al.*, 2002).

1.3.2 Mecanismo de ação

A maioria das células utiliza a enzima asparagina sintetase para obter asparagina. Assim as células saudáveis podem produzir seus próprios suprimentos deste aminoácido não essencial, não necessitando obtê-lo através da dieta. Diferente das células normais, as células malignas geralmente possuem baixos níveis de asparagina sintetase e não conseguem regular positivamente o gene desta enzima durante as condições de depleção de asparagina, sintetizando este aminoácido lentamente (KIRIYAMA *et al.*, 1989; MOOLA *et al.*, 1994).

O mecanismo anti-leucêmico da asparaginase conta com a depleção da asparagina circulante na corrente sanguínea, essencial para as células malignas (KIRIYAMA *et al.*, 1989; MOOLA *et al.*, 1994; OETTGEN *et al.*, 1967; RICHARDS; KILBERG, 2006). Esta enzima hidrolisa o aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia, através de um mecanismo cinético em que a asparagina primeiramente liga-se à enzima, posteriormente liberando amônia e formando o intermediário aspartil. Este, intermediário, pode reagir com a água para formar ácido aspártico (Figura 1) (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001). Desse modo, por as células tumorais serem praticamente incapazes de produzir sua própria asparagina, a depleção deste aminoácido da corrente sanguínea conduz à destruição das mesmas (OETTGEN *et al.*, 1967; SOBIN; KIDD, 1966).

Figura 1 - Reação química de hidrólise catalisada pela asparaginase (EC 3.5.1.1)



Fonte: O autor (2011).

1.3.3 Toxicidade e hipersensibilidade

Diferentes preparações e origem implicam em variações dos tempos de meia-vida, bem como, no perfil de toxicidade e imunogenicidade de enzimas utilizadas no tratamento de patologias humanas. A enzima derivada de *Erwinia* apresenta um tempo de meia-vida menor em relação àquela obtida de *E. coli*, e também está associada com um risco reduzido de ocorrência de reações de hipersensibilidade (ASSELIN *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2003). Este aspecto é de grande relevância clínica, uma vez que até 30% dos pacientes em tratamento com asparaginase nativa de *E. coli* apresentam reações alérgicas, sendo recomendado um teste intradérmico antes do início do tratamento (VROOMAN *et al.*, 2010). Os principais efeitos colaterais relacionados com a asparaginase podem se manifestar com uma ampla gama de sintomas clínicos, como disfunção hepática, pancreatite, diabetes, leucopenia, ataques neurológicos e anormalidades na coagulação que podem levar à trombose intracranial ou hemorragia.

Foi demonstrado que a enzima asparaginase derivada de *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica é uma alternativa para o tratamento da ALL por apresentar menores efeitos colaterais quando utilizada na terapia antineoplásica, comparada às asparaginases derivadas de *E. coli* ou de *Erwinia chrysanthemi* (KRASOTKINA *et al.*, 2004). Além disso, a enzima de *E. caratovora* possui uma atividade da glutaminase significativamente menor do que a apresentada pelas enzimas de *E. coli* e de *E. chrysanthemi* (WINK *et al.*, 2010; KOTZIA; LABROU, 2005). Isto é particularmente importante, uma vez que a atividade da glutaminase nas preparações terapêuticas das asparaginases tem sido a provável causa dos efeitos colaterais (HAWKINS *et al.*, 2004).

1.4 CULTIVOS CELULARES EM BIORREATOR

Os cultivos em agitador orbital (*shaker*) são importantes como estudos preliminares do comportamento da bactéria. As culturas em *shaker* são normalmente realizadas em batelada, sendo todos os componentes da cultura adicionados no início do cultivo, sem monitoramento nem controle de parâmetros como pH ou níveis de oxigênio dissolvido. A transição de cultivos em *shaker* para cultivos em biorreator não pode ser subestimada, uma vez que existem parâmetros nutricionais e metabólicos que são primordiais para a manutenção do rendimento específico de enzimas recombinantes, como, por exemplo, composição de meio de cultivo e taxa de transferência de oxigênio (GOYAL; SAHNI; SAHOO, 2009).

Crescer células de *E. coli* até altas densidades atualmente é o método escolhido para a produção de proteínas recombinantes, principalmente porque o sistema permite atingir uma alta produtividade volumétrica, reduzir o volume da cultura e investimento em equipamento. A exploração dos limites de crescimento de microrganismos em geral levou os microbiologistas a transformarem a *E. coli* em uma “máquina de produção” de proteínas recombinantes. Segundo Lee (1996), *E. coli* é o hospedeiro mais utilizado para produção de proteínas, principalmente porque é um sistema bastante estudado e muito bem caracterizado. A idéia de que o único obstáculo para crescimento ilimitado das bactérias em cultivos líquidos é a fluidez do meio de cultura (LEE, 1996), é baseada na suposição de que as bactérias irão continuar se dividindo, desde que suas exigências nutricionais sejam atingidas e que fatores tóxicos ou inibitórios não sejam excretados no meio. Uma das maneiras mais populares de se atingir cultivos celulares de alta densidade é o cultivo em batelada alimentada, controlada por alimentação de nutrientes (YAMANE; SHIMIZU, 1984). Fuchs *et al.* (2002) relatam ter atingido densidades celulares de *E. coli* de 190 g/L de peso de células secas.

1.4.1 Fatores inibidores de crescimento em cultivos em biorreator

A técnica de cultivo celular em batelada alimentada possui alguns problemas que devem ser superados para que as culturas possam atingir altas densidades celulares. A limitação da capacidade de transferência de oxigênio, a formação ou adição de produtos que inibem o crescimento celular, a inibição pelo substrato e a limitação da dissipação de calor, são alguns exemplos (LEE, 1996).

Um dos grandes problemas dos cultivos celulares de altas densidades é a formação de acetato. O acetato é produzido em condições anaeróbicas ou de oxigênio limitante, entretanto,

cultivos de *E. coli* conduzidos com excesso de glicose também podem levar à formação de acetato, mesmo em condições aeróbias (DOELLE; EWINGS; HOLLYWOOD, 1982). Esse fenômeno pode ocorrer quando o fluxo de carbono do metabolismo excede a demanda da biossíntese e a capacidade de geração de energia dentro da célula. A saturação do ciclo do ácido tricarbóxico e da cadeia de transporte de elétrons podem ser as principais causas deste fenômeno. Os dados disponíveis sobre o metabolismo de acetato indicam que este desempenha um papel determinante no desempenho dos processos produtivos. Concentrações de acetato em torno de 5 g/L em pH 7, por exemplo, inibem o crescimento de *E. coli* (KWEON *et al.*, 2001).

A indução com isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) também aparece como causadora de uma variedade de respostas ao estresse na célula e, desse modo, pode levar inclusive à perda do plasmídeo que contém o gene recombinante de interesse (KOSINSKI; RINAS; BAILEY, 1992; SORENSEN; MORTENSEN, 2005). A inibição temporária da proteína H35 (normalmente presente somente durante a fase exponencial de crescimento) foi observada após a adição de IPTG à cultura de *E. coli*, sugerindo que as células devem adaptar-se a baixos níveis de crescimento com a expressão induzida com IPTG. A degradação proteolítica de proteínas anormais pode ser influenciada pelos níveis de indução com IPTG; a degradação por algumas vias pode aumentar ou diminuir conforme os níveis de IPTG (KOSINSKI; BAILEY, 1991). Portanto, a razão de crescimento específico das células em batelada pode ser reduzida pela indução com IPTG durante a fase logarítmica de crescimento (BENTLEY; DAVIS; KOMPALA, 1991). Além disso, altos níveis de expressão da proteína recombinante pelo uso de IPTG também pode induzir a expressão de uma variedade de proteases presente no meio onde as concentrações de certos aminoácidos podem ser limitantes (HARCUM; BENTLEY, 1993). Possivelmente, a inibição do crescimento celular após a indução pode ocorrer porque a célula utiliza a maior parte da sua energia para a expressão protéica, ao invés de utilizá-la para o seu crescimento.

Para contornar estes problemas, diversas estratégias de alimentação têm sido desenvolvidas a fim de controlar a velocidade específica de crescimento, limitando os nutrientes essenciais como fonte de carbono e nitrogênio, evitando problemas de inibição de crescimento.

1.4.2 Estratégias de alimentação

As estratégias de alimentação utilizadas nos cultivos celulares de altas densidades estão resumidas no Quadro 1 (LEE, 1996). As metodologias utilizadas sem controle *feedback*, conforme indicado, determinam a vazão de alimentação independente do andamento do

cultivo. Quando se utiliza vazão constante, devido ao aumento da concentração celular no biorreator, a velocidade específica de crescimento decai continuamente e o aumento da concentração celular decai ao longo do tempo. A elevação gradual, linear ou em degraus da vazão de alimentação acompanha o crescimento celular, mas apenas no caso de a vazão estar bem ajustada às condições do cultivo. Para permitir às células crescerem com uma velocidade específica de crescimento constante, o método de alimentação exponencial foi desenvolvido (RIESENBERG *et al.*, 1991). Desta forma, a produção de acetato pode ser minimizada pelo controle da taxa específica de crescimento abaixo da taxa crítica para formação do mesmo (geralmente é mantida entre 0,1 e 0,3 h⁻¹). A alimentação de nutriente com vazão exponencial pré-determinada é uma metodologia simples e eficiente de ser aplicada tanto que Korz *et al.* (1995) conseguiram atingir concentrações celulares de 128 g/L e 148 g/L, utilizando como fonte de carbono glicose e glicerol, respectivamente.

Quadro 1 - Metodologias de alimentação nos cultivos em batelada alimentada

<p>Sem controle <i>feedback</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vazão constante - Vazão linear - Vazão exponencial <p>Com controle <i>feedback</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Indireto <ul style="list-style-type: none"> • DO-stat • pH-stat • Medida de CO₂ • Concentração celular - Direto <ul style="list-style-type: none"> • Controle da concentração de substrato
--

Fonte: Modificado de Lee (1996).

As alimentações com controle *feedback* (Quadro 1) são mais sofisticadas. O controle indireto se baseia em medidas de parâmetros físicos do cultivo, como oxigênio dissolvido (DO), pH e velocidade de formação de CO₂, para alterar a vazão de alimentação. O método DO-stat, utilizado por Konstantinov *et al.* (1990), é baseado no fato de que o oxigênio dissolvido no meio rapidamente aumenta quando há crescimento celular baixo concomitante com escassez de nutrientes. A alimentação é adicionada quando o oxigênio dissolvido ultrapassa um valor pré-determinado. Já o método pH-stat é baseado na observação de que o pH se eleva devido ao aumento da concentração de íons amônio no meio de cultivo excretados pelas células, isso ocorre quando a fonte de carbono é escassa (KIM *et al.*, 2004).

O sistema adiciona alimentação quando o pH passa de um determinado valor. A elevação de pH no meio pode ser mais sutil do que a variação do oxigênio dissolvido.

Uma terceira maneira de controle indireto de adição de alimentação durante o cultivo celular é monitorar, com o auxílio de um espectrômetro de massa, a saída de gases do reator, onde CO₂ é produzido proporcionalmente ao consumo da fonte de carbono (GOYAL; SAHNI; SAHOO, 2009). Adicionalmente, a adição de solução de alimentação por controle *feedback* indireto também pode ser determinada através da medida da concentração de células presente no cultivo através de um turbidímetro a laser.

Outra opção de metodologia de alimentação nos cultivos em batelada alimentada é o controle *feedback* direto. Utilizando analisador de glicose *on-line*, é possível saber o quanto de glicose está presente no meio de cultivo num determinado instante. Selecionando o intervalo em que se deseja trabalhar, o equipamento é capaz de controlar o quanto de glicose será adicionado ao cultivo.

O uso combinado de mais de uma técnica também é possível. Este é o caso do trabalho realizado por Kim *et al.* (2004), que utilizaram alimentação exponencial combinada com pH-stat para controlar a velocidade de crescimento a 0,1 h⁻¹ e utilizando esta estratégia, obtiveram resultados de 101 g/L de concentração celular.

1.5 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O desenvolvimento de técnicas e métodos para a purificação de proteínas tem sido um pré-requisito essencial para os diversos avanços realizados na área da biotecnologia. Uma vez estabelecidas as condições de cultivo celular para a obtenção de quantidades elevadas da proteína recombinante de interesse, a próxima etapa do processo de desenvolvimento de biofármacos ou biossimilares compreende a purificação da proteína recombinante, para isolá-la na sua forma homogênea.

A purificação de proteínas pode variar de um simples procedimento de precipitação até várias etapas com diferentes eficiências em um processo de produção validado. Frequentemente mais de uma etapa de purificação são necessárias para obter a pureza desejada. A chave para uma purificação de proteínas bem sucedida e eficiente é selecionar as técnicas mais apropriadas, aperfeiçoar seu desempenho de maneira a atender as necessidades e combiná-las de modo lógico maximizando o rendimento e minimizando o número de etapas requeridas.

A maior parte dos protocolos de purificação envolve alguma forma de cromatografia.

Como resultado, a cromatografia se tornou uma ferramenta essencial em todo o laboratório onde a purificação de proteínas é necessária. A disponibilidade de diferentes técnicas de cromatografia com distintas seletividades possibilita uma poderosa combinação para a purificação de biomoléculas.

A necessidade de obter uma proteína de maneira eficiente, econômica e em pureza e quantidade suficientes, se aplica a qualquer purificação, desde a preparação de um extrato proteico enriquecido para caracterização bioquímica, até a produção em larga escala de uma proteína recombinante terapêutica. É importante definir objetivos de pureza e quantidade, manutenção da atividade biológica e economia em termos de dinheiro e tempo. Por exemplo, é importante diferenciar os contaminantes que devem ser removidos dos que podem ser tolerados. Todas as informações referentes às propriedades da proteína alvo e dos contaminantes auxiliarão durante o desenvolvimento da purificação, possibilitando uma seleção mais rápida e fácil da técnica cromatográfica a ser aplicada, evitando condições que podem inativar a proteína alvo.

As técnicas cromatográficas de purificação devem ser balanceadas entre resolução, velocidade, capacidade e recuperação. A importância de cada parâmetro varia se o passo de purificação é usado para captura, purificação intermediária ou refinamento da purificação. As técnicas variam de acordo com as propriedades da proteína: carga (troca iônica), tamanho (gel filtração), hidrofobicidade (interação hidrofóbica, fase reversa) e especificidade por algum ligante (afinidade).

As proteínas para uso terapêutico ou estudos *in vivo* devem ser extremamente homogêneas (>99%), uma vez que na grande parte dos métodos de caracterização físico-químicos a pureza necessária varia de 95-99% (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1999). Deve-se ter em mente que, os 5% de impurezas somente são aceitáveis caso forem inofensivas. Mesmo pequenas impurezas, que podem ser biologicamente ativas, são capazes de gerar problemas em aplicações terapêuticas ou de pesquisa.

1.6 CALORIMETRIA DE REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS

Cinética enzimática é o estudo de reações químicas que são catalisadas por enzimas. Na cinética enzimática a velocidade de reação é medida e os efeitos da variação de condições da reação são investigados. O estudo da cinética da enzima pode revelar o seu mecanismo catalítico, como sua atividade é controlada ou como um antagonista pode inibir sua ação. É necessário entender como as enzimas funcionam com seus substratos naturais antes de

desenvolver novos agentes terapêuticos, por isso esta etapa do processo de desenvolvimento de biofármacos ou biossimilares também merece destaque.

A caracterização adequada de uma enzima que segue o mecanismo de Michaelis-Menten requer a determinação da constante de Michaelis (K_m) e a constante catalítica ou número de renovações (k_{cat}). A razão k_{cat}/K_m é referida como a eficiência catalítica de uma enzima. Esses parâmetros cinéticos são usualmente determinados através de uma série de experimentos onde a cinética da reação catalisada por uma enzima é seguida por medições eletroquímicas ou óticas. Visto que a maioria dos substratos e/ou produtos não possuem propriedades apropriadas para a realização destes ensaios, as reações catalisadas por enzimas podem ser estudadas utilizando substratos modificados ou ensaios com enzimas acopladas. No entanto, essas estratégias podem introduzir erros experimentais na determinação de K_m e k_{cat} .

Virtualmente todas as reações químicas, inclusive as reações catalisadas por enzimas, ocorrem com alguma variação de calor (liberação ou absorção) tornando as técnicas calorimétricas bastante adequadas para acompanhar tais reações. A aplicação de técnicas calorimétricas no estudo de reações catalisadas por enzimas vêm aumentando nos últimos anos com o melhoramento dos equipamentos disponíveis. Julian Sturtevant foi o pioneiro na área e suas primeiras contribuições para o estudo de cinética enzimática datam do começo dos anos 50 (STURTEVANT, 1953). Com o tempo, o surgimento de equipamentos mais sensíveis teve consequências importantes na aplicação da calorimetria por titulação isotérmica (ITC) em ensaios enzimáticos. ITC é uma técnica universal que mede diretamente o calor liberado ou absorvido durante um evento biomolecular de ligação. A medição desse calor permite a determinação precisa, para qualquer sistema enzima-substrato, de constantes de dissociação (K_D), estequiometria de reação (n), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS), desse modo fornecendo informações termodinâmicas completas acerca da interação molecular, em um único experimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de um processo simples e eficiente de alto rendimento para a produção, em células de *E. coli*, de L-asparaginase II recombinante derivada de *Erwinia carotovora* com alto grau de pureza, solúvel e ativa. Tal pesquisa faz parte de um projeto maior realizado na empresa Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda. que propõe o escalonamento da produção de biofármacos em nível nacional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Analisar a expressão da proteína asparaginase recombinante em diferentes condições de cultivo em agitador orbital horizontal (*shaker*) para determinar a sua melhor condição de expressão. Para tal, utilizar diferentes cepas de *E. coli*, meios de cultura, e temperaturas de cultivo;
- b) A partir dos resultados obtidos nos cultivos realizados em *shaker*, escalonar o crescimento da proteína utilizando biorreator de 2 L; analisar a expressão e produtividade específica da proteína asparaginase recombinante;
- c) Purificar a proteína expressa através de Cromatografia Líquida de Rápida Performance (*FPLC*). Testar diferentes colunas cromatográficas e tampões com a finalidade de obter a proteína homogênea;
- d) Determinar a massa molecular e identidade da proteína por espectrometria de massa;
- e) Testar a atividade da asparaginase recombinante purificada e extrato bruto por calorimetria de titulação isotérmica.

**3 MANUSCRITO submetido ao periódico *Brazilian Journal of Chemical Engineering*:
RECOMBINANT *Erwinia carotovora* L-ASPARAGINASE II PRODUCTION IN
Escherichia coli FED-BATCH CULTURES**

**Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-
batch cultures**

Gustavo Roth^{1,3}, José ES Nunes^{1,3}, Leonardo A Rosado^{1,2}, Cristiano V Bizarro², Giandra Volpato^{3,4}, Cláudia P Nunes³, Gaby Renard³, Luiz A Basso^{1,2,3}, Diógenes S Santos^{1,2,3}, Jocelei M Chies^{3,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6690, Partenon, Porto Alegre, ZC 90610000, Brazil

²Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681, Tecnopuc, Prédio 92A, Partenon, Porto Alegre, ZC 90619900, Brazil

³Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. Av. Ipiranga, 6681, TecnoPUC, Prédio 92A, Partenon, Porto Alegre, ZC 90619900, Brazil

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2777, Santana, Porto Alegre, ZC 90035007, Brazil

* Corresponding author

Email addresses:

gustavo.roth@acad.pucrs.br

zehsacconi@yahoo.com.br

leo.rosado@gmail.com

cvbizarro@gmail.com

giandra.volpato@poa.ifrs.edu.br

cpaivanunes@gmail.com

gabyrenard11@quatrogpd.com.br

luiz.basso@pucrs.br

diogenes@pucrs.br

joceleichies@gmail.com

Abstract – Asparaginases are the cornerstone therapy of many successful combination regimens for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), the most common malignancy in children and adolescents. The aim of this work was to produce recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II in *Escherichia coli* fed-batch cultures. Using a robust fed-batch technique with pre-determined exponential feeding rates, our bioreactor culture system yielded 30.7 grams of dry cell weight and 0.9 grams of soluble rErAII protein per liter of culture broth. The homogeneous rErAII activity was determined by isothermal titration calorimetry (ITC). The enzyme K_m values for the main substrates L-Asn and L-Gln were 33×10^{-6} M and 10×10^{-3} M, respectively. Our work shows that it is possible to produce an active homogeneous rErAII enzyme in the soluble cell fraction through IPTG-induced *E. coli* fed-batch cultivation.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, asparaginase, *Erwinia carotovora*, bioreactor, isothermal titration calorimetry, *Escherichia coli*.

INTRODUCTION

L-asparaginase enzymes (L-asparagine amidohydrolase, E.C. 3.5.1.1) have been successfully used as therapeutic agents for treating acute lymphoblastic leukemia (ALL) for more than 40 years (Broome, 1963; Schwartz et al., 1966). Moreover, T-cell lymphomas, NK tumors and certain subtypes of myeloid leukemia also respond to asparaginase treatment (Covini et al., 2011).

The L-asparaginase anti-tumor activity is based on the depletion of circulating L-asparagine (L-Asn) that is essential for most malignant lymphoblastic cells but not for normal cells (Oettgen et al., 1967). Several asparaginases from different organisms have already been studied (Howard and Carpenter, 1972; Khushoo et al., 2005; Ferrara et al., 2006; Onishi et al., 2010), but the enzymes currently in clinical use are derived solely from *Escherichia coli* and

Erwinia chrysanthemi species, due to their enhanced L-Asn specificity (Schwartz et al., 1966; Wink et al., 2010). Type II L-asparaginase from *Erwinia carotovora* should be of interest for therapeutic purposes because it has similar asparaginase but lower glutaminase activity than its *E. coli* and *E. chrysanthemi* asparaginase counterparts (Krasotkina et al., 2004). Low affinity for L-Gln is preferable during anti-cancer therapy (Hawkins et al., 2004). Asparaginase has minimal bone marrow toxicity (Duval, 2002) and its major side effects are anaphylaxis, pancreatitis, diabetes, and coagulation abnormalities that may lead to intracranial thrombosis or hemorrhage (Pui et al., 1981; Evans et al., 1982; Priest et al., 1982; Sahu et al., 1998).

All bacterial type II L-asparaginases are active as homo-tetramers with 222 point-group symmetry and molecular masses in the range of 130-160 kDa with highly conserved overall folds (Aghaiypour et al., 2001). Each monomer consists of approximately 330 amino-acid residues that form 14 β -strands and 8 α -helices, which are arranged into two easily identifiable domains, with the larger being N-terminal domain and the smaller being C-terminal domain, which are connected by a linker consisting of ~20 residues.

Several asparaginase preparations currently on the market are derived from *E. chrysanthemi* (Erwinase) or from *E. coli*, available in its native form (Asparaginase Medac, Kidrolase, Paronal, Leunase, Elspar) and as a pegylated enzyme (Oncaspar). The available native *E. coli* asparaginase preparations were developed 20 to 30 years ago, making their production process outdated regarding advances in the understanding of protein folding and translocation (Lee, 1996). Inefficient production methods and the presence of aggregate contaminants have prevented many countries from approving current formulations, leading to the inclusion of asparaginase in the pediatric need-list of the European Medicines Agency (European Medicines Agency, 2006). Moreover, a number of commercially available

asparaginase preparations have several posttranslational modifications with unclear consequences (Bae et al., 2011).

The combination of recombinant DNA technology and large-scale culture processes has enabled enzymes to be produced in much larger quantities than what can be obtained from natural sources. Applying this technology to therapeutic asparaginase production would mitigate the aforementioned problems. In recombinant DNA technology, the most common host used for protein production is *E. coli*, mainly due to its well-known molecular genetics and physiology (Riesenberg and Guthke, 1999). Fed-batch techniques for culturing *E. coli* have improved productivity, thereby reducing the formation of toxic by-products, enhancing the downstream processing, lowering overall production costs and reducing the technical effort required (Johnston et al., 2002). Interestingly, to the best of our knowledge, there are no reports of recombinant production of soluble, high-yielding *E. carotovora* L-asparaginase II production.

Our research group has published results on recombinant *E. carotovora* L-asparaginase II with and without signal-peptide (Wink et al., 2010). In this paper, we extend the former work and propose an efficient and simplified production process, where gram-level of high-purity recombinant soluble *E. carotovora*-derived L-asparaginase II (rErAII) are obtained. For this purpose, we employed *E. coli* as the host in a fed-batch cultivation procedure. A one-step high yield purification scheme was established to ensure homogeneous enzyme production. Finally, the enzyme kinetics of the recombinant protein that we produced were measured using a calorimetric technique, and its activity was compared to the commercially available Asparaginase Elspar[®]. The new calorimetric continuous assay displayed advantages over the current published spectrophotometric and calorimetric discontinuous assays. The combination of different experimental strategies presented in this study provides an efficient protocol that may be useful in the industrial production of rErAII.

MATERIAL AND METHODS

Strain selection and shaker cultivation:

The experiments in this work were performed using the nucleotide sequence [GenBank: AY560097] that encodes for L-asparaginase II from *Erwinia carotovora* (rErAII). The gene was previously amplified and cloned by Wink and coworkers (Wink et al., 2010) without the signal peptide encoding region.

rErAII expression was assessed in the following *E. coli* strains: BL21 (DE3), BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) NH, C41 (DE3), Rosetta (DE3) and C43 (DE3). The strains were transformed by electroporation with a recombinant plasmid, pET-30a(+), containing a gene encoding for the mature asparaginase II protein region and a kanamycin resistance gene. An empty pET-30a(+)vector was used as a negative control. Transformed cells were selected on Luria-Bertani (LB) agar plates containing the appropriate antibiotics for each *E. coli* strain. The colonies were grown overnight in 10 mL LB medium (pre-inoculum) containing the appropriate antibiotics at 37°C. An aliquot of these cultures was used to inoculate flasks (final OD_{600 nm} = 0.1) containing 50 mL of either one of two complex media (TB or LB) or a semi-defined medium (0.5 g L⁻¹ NaCl, 1 g L⁻¹ NH₄Cl, 20 g L⁻¹ yeast extract, 6 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 3 g L⁻¹ KH₂PO₄, 30 µg mL⁻¹ kanamycin, 5 g L⁻¹ glucose, 1 mM MgSO₄, 1 µg mL⁻¹ thiamine, 1 mL L⁻¹ trace solution) in a shaker at either 30°C or 37°C and at 180 rpm. Recombinant protein expression was induced by adding 1 mM IPTG when the OD_{600 nm} reached 0.4–0.6. Control cultures were left uninduced. Samples were harvested at several different times after induction. The cells were disrupted, and the expression of rErAII was analyzed in the soluble and insoluble fractions by a 12% SDS-PAGE gel stained with Coomassie Brilliant Blue.

Bioreactor cultivation:

A MCB (Master Cell Bank) with the selected strain was made in 30% glycerol and stored at -20°C. The pre-inoculum was prepared with 250 mL of LB, 30 µg mL⁻¹ kanamycin and 150 µL of MCB. The culture was grown overnight in shaker at 180 rpm at 37°C. The bioreactor was inoculated at an OD_{600 nm} = 0.1. Batch and fed-batch culture experiments were

conducted in a BIOSTAT B Plus bioreactor (Sartorius Stedim, Germany) with two 2-L stirred tanks filled with 1 L of culture medium supplemented with antibiotics at defined temperatures, a pH 7.0 and a dissolved oxygen concentration (pO_2) of 30%. To maintain the pO_2 set point, the cultures were subjected to cascading impeller speed and/or supplementation with air enriched with pure oxygen. To control the pH, 12.5% (v/v) ammonium hydroxide and 10% (v/v) phosphoric acid were employed. Culture samples were used to determine the OD_{600 nm}, glucose content, rErAII and dry cell weight. The pO_2 , pH, stirrer speed, base and acid consumption and aeration rate were measured online and were recorded by an external data acquisition and control system (Sartorius Stedim, Germany).

After the acetic acid batch mode byproduct was consumed (indicating the final phase of exponential cell growth), we initiated the exponential addition of the concentrated feeding solution (2X TB, 300 g L⁻¹ glucose, 40 mM MgSO₄ and 30 μg mL⁻¹ kanamycin) (Korz et al., 1995). During the first part of the fed-batch cultivation, the exponential feed was calculated to provide a growth rate of 0.10 h⁻¹ (μ_{set}). Expression of rErAII was induced by adding 1 mM IPTG at OD_{600 nm} ~58 and concomitantly reducing the exponential feeding rate (μ_{set} =0.08 h⁻¹). These conditions were maintained for twelve additional hours, thereby completing the second part of the fed-batch procedure. Thereafter, the resulting biomass was collected by centrifugation at 7690 x g and 4°C for 30 min and was stored in aliquots at -20°C.

Purification of rErAII

The ionic-exchange liquid chromatography purification protocol was performed using the ÄKTA System (GE Healthcare, United Kingdom) at 4°C. The purification assay employed was performed as described by others (Krasotkina et al., 2004; Wink et al., 2010) with minor modifications. The aliquots stored from the bioreactor cultivation were suspended in 20 mM potassium phosphate buffer pH 5.5 (buffer A) (1 g cells 10 mL⁻¹ buffer) and were disrupted by modified French press (Constant Systems, England) at 30 kpsi. The cell lysate was centrifuged at 38900 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was incubated for 30 min

with 1% (w/v) streptomycin sulfate at 4°C under gentle agitation and was centrifuged at 38900 x g for 30 min. The resulting supernatant was dialyzed twice against 2 L of buffer A. Dialysis samples were clarified by centrifugation (38900 x g, 30 min, 4°C), and the supernatants were loaded onto a HiPrep 16/10 SP XL cation exchange chromatography column (GE Healthcare, United Kingdom) previously equilibrated with buffer A. The flow rate was 1 mL min⁻¹. Non-adsorbed proteins were washed out with 5 column volumes (CVs) of buffer A, while the adsorbed proteins were eluted with a 20 CV linear pH gradient (pH 5.5 to 8.5) (buffer B). The eluted fractions containing recombinant rErAII enzyme were pooled and were stored at -20°C. Fractions were analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue.

Mass spectrometry: protein identity and molecular mass

Protein desalting: Purified rErAII samples were desalted with a reverse chromatography phase (POROS R2-50 resin, Applied Biosystems) using lab-made columns built with glass fiber in 200- μ L pipette tips. The columns were activated with methanol and were equilibrated with 0.046% TFA before loading the samples. The samples were washed twice with 0.046% TFA and eluted with 80% acetonitrile/0.046% TFA. Eluted samples were dried using a SpeedVac concentrator (Thermo Scientific, USA).

Trypsin digestion: The in-solution trypsin digestion of rErAII was performed using an adapted protocol (Klammer and Maccoss, 2006). Desalted and dried samples of rErAII containing 35 μ g of protein (1 nmol) were resuspended in 50 μ L of 0.1% (w/v) RapiGest SF acid labile surfactant (Waters Corp.) diluted in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8. The samples were heated to 99°C for 2 min, and DTT was added for a final concentration of 5 mM. After incubation at 60°C for 30 min, iodoacetamide was added to a final concentration of 15 mM and the samples were incubated for 30 min at room temperature while protected from light. Trypsin was added at a ratio of 1:100 enzyme/protein along with CaCl₂ at a final concentration of 1 mM, and the solution was incubated for 1 h at 37°C. For surfactant

degradation, HCl was added at a final concentration of 100 mM. The samples were centrifuged at 20,800 $\times g$ at 4°C for 10 min, and the supernatants were transferred to clean tubes.

LC-MS/MS peptide mapping experiments: Chromatographic separations of digested peptide mixtures were performed using a nanoLC Ultra system (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent, USA) equipped with a nanoLC AS-2 autosampler (Eksigent, USA). The nanoflow system was connected to a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer (LTQ-XL and LTQ Orbitrap Discovery, Thermo Electron Corporation, USA) containing a Finnigan™ nanospray ionization (NSI) source (Thermo Electron Corporation, USA). The separation of digested samples was performed with 15 cm capillary columns (150 μm i.d.) packed in-house with Kinetex 2.6- μm C18 core-shell particles (Phenomenex, Inc.) using a slurry packing procedure (Moritz, 2010). The chromatographic method used a flow rate of 300 nL min^{-1} with a step gradient from mobile phase A containing 0.1% formic acid in water to mobile phase B containing 0.1% formic acid in acetonitrile (0-2% B over 5 min; 2-10% B over 3 min; 10-60% B over 60 min; 60-80% B over 2 min; 80% B isocratic for 10 min; 80-2% B over 2 min; and 2% B isocratic for 8 min). The nano-ESI infusion was performed using the NSI-1 dynamic nanospray probe (Thermo Scientific, USA) equipped with a silica-tip emitter with a 10- μm diameter tip (PicoTip, New Objective, Inc., USA). Spectra of the eluted peptides were acquired in positive ion mode in a data-dependent fashion. First, the instrument was set to acquire one MS survey scan for the m/z range of 400-2000 with a resolution of 30,000 (at m/z 400) followed by MS/MS spectra of the five most intense ions from each survey scan. MS/MS fragmentation was performed using collision-induced dissociation (CID) with an activation Q of 0.250, an activation time of 30.0 ms, 35% of normalized collision energy and an isolation width of 1.0 Da. To detect low-intensity ions, we employed a dynamic exclusion of ions lasting for 30 s during acquisition of MS/MS spectra. LC-MS/MS data was compared

with the theoretical MS/MS spectra obtained from in silico tryptic digests of the *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 proteome: National Center for Biotechnology Information [<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes>]. We allowed two missed cleavage sites for trypsin, a precursor tolerance of 10 ppm, a fragment tolerance of 0.8 Da, static carbamidomethylation on cysteines and oxidation on methionine residues. To reduce false identifications, we restricted our analysis to matches with a X_{corr} score > 2.0 for twice-charged ions and X_{corr} score > 2.5 for thrice-charged ions.

L-asparaginase activity measured by Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

ITC measurements were carried out in an iTC₂₀₀ microcalorimeter (Microcal, Inc., USA) at 25°C. The titrations for rErAII and EcAII were performed using a 39.7 µL syringe with the mixture stirring at 500 rpm. A heating reference of 11 µcal s⁻¹ was used in all experiments. The heat released during the enzyme-catalyzed reaction was directly proportional to the reaction rate and can be described by Equation 1:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V\Delta H_{\text{app}}} \frac{dQ}{dt} \quad (\text{Eq. 1})$$

where ΔH_{app} is the reaction enthalpy variation, V is the calorimetric cell volume and [P] is the product concentration (Bianconi, 2007). After a 60 s initial delay, the reactions were initiated by injecting a small volume (2-10 µl) of enzyme solution into the sample cell (total volume of 203 µl) loaded with substrate (L-asparagine, 5 to 1000 µM; or L-glutamine, 1 to 50 mM) diluted in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. A second enzyme injection was performed after a lag time between the first and second injections to obtain the correct baseline and also to determine the enzyme solution dilution heat, which was subtracted from the total reaction heat. The substrate and enzyme solutions were suspended in the same buffer to minimize the dilution and heat effects. The reference cell (200 µL) was loaded with MilliQ water for all experiments. The initial velocity rate for rErAII and EcAII was measured by taking the difference in heat flux measured between the base line and 60 s and the maximal

heat flux after enzyme solution injection into the calorimeter cell containing the substrate medium at variable concentrations. Steady-state is reached when the enzyme velocity remains constant (Origin 7, OriginLab Corp., USA). Different enzyme concentrations were used to prove that the relationship between protein concentration (4.9 nM - 68.4 nM) and enzyme velocity was linear, thereby indicating that quaternary structures did not form and cause a loss of biological activity (data not shown).

The same parameters were used with 1 mM L-asparagine in the sample cell to determine the rErAII specific activity in the crude extract after induction in the fed-batch cultivation step. Crude extract samples were harvested before IPTG induction to serve as a baseline for measuring rErAII specific activity after induction because *E. coli* express L-asparaginases constitutively.

The kinetic parameters V_{\max} and K_m were obtained by fitting the calorimetric data to the Michaelis-Menten equation (Equation 2) using nonlinear least square regression analysis (SigmaPlot 9.01, Systat Software Inc., USA).

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 2})$$

One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 μmol ammonia per minute at 25°C.

Analytical methods

Samples were withdrawn periodically for quantitative analysis during the cultivation. Experiments were carried out in duplicate. Cell growth during cultivation was determined by measuring the optical density at 600 nm (Ultrospec 3100 *pro*, GE Healthcare, United Kingdom) and calibrating it against the dry cell weight (DCW) at 80°C for a specific known optical density. One optical density unit was equivalent to 0.45 grams of dry cell weight per liter of culture medium. Glucose concentration in the medium was measured with a glucose analyzer (2700 select, Yellow Springs Instruments, USA). Acetate concentration was

determined by high performance liquid chromatography (Äkta Purifier, GE Healthcare, United Kingdom) with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad Laboratories, USA) at 25°C using 0.005 M H₂SO₄ as the mobile phase. Recombinant protein expression (soluble and insoluble fractions) was analyzed by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels in a separation zone and a concentration zone of 4% polyacrylamide. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and were subjected to densitometry analysis (Quantity One 4.6.6 software and model GS-700 Imaging densitometer, Bio-Rad Laboratories, USA). Purified rErAII was used as a standard for densitometric quantification. *Escherichia coli* L-asparaginase II (EcAII) was purchased from Medac (Asparaginase Elspar®, Germany) and was used to compare kinetic and thermodynamic data. The specific activity of Elspar® is at least 225 International Units per milligram of protein; the vial contained 10,000 International Units and 80 mg of mannitol. The protein concentration of the different fractions was analyzed by the Bradford method (Bradford, 1976) using a commercial assay kit with bovine serum albumin standards.

RESULTS AND DISCUSSION

The estimated molecular mass for L-asparaginase II without its signal peptide is 34.5 kDa, which differs from the approximately 39 kDa value observed by SDS-PAGE analysis. The protein may run differently (more slowly) on SDS-PAGE than expected, due to its notably alkaline character (estimated pI value of 8.5) (Walker, 2009).

Optimal conditions for soluble protein expression in shaker cultures

Several strains, temperatures and culture media were tested using a one-factor-at-a-time (OFAT) method (Montgomery, 1997). Various strains among the ones tested in shaken-flask cultures presented soluble rErAII protein expression. The C43 (DE3) strain presented the best inducer control (i.e., rErAII expression only with IPTG addition). The incubation temperature influenced the expression level. For example, the C43 (DE3) strain had much lower rErAII expression (12.9%) at 37°C in TB culture medium than when cultured at 30°C

(19.3%) (Figure 1). After taking into account rErAII expression, culture medium preparation convenience, good inducer control and temperature, the final selected conditions for rErAII in shake flask cultures were *E. coli* C43 (DE3) strain, 30°C, TB culture medium and 1 mM IPTG. As presented in Figure 1, rErAII expression represented 19.3% of the total protein content in the soluble cell fraction at 6 hours after induction.

Bioreactor cultivations

The optimized growth conditions from the shaker cultivations were applied to the bioreactor batch and fed-batch cultures. We employed the Terrific Broth culture medium (TB) in all experiments. The use of a commercially available culture medium requires less technical effort, reduces reproducibility errors and is easily implemented.

The transition from shaken flasks to bioreactors can reduce the recombinant protein yield (Goyal et al., 2009). Therefore, optimizing the nutritional and metabolic parameters for bioreactor cultivation is important for protein production. A successful cultivation procedure (Panda et al., 1999; Vallejo et al., 2002; Khalilzadeh et al., 2004) with a pre-determined exponential-feeding strategy was applied to maximize the production of rErAII (Korz et al., 1995).

A liquid culture of transformed *E. coli* C43 (DE3) was started from the MCB under batch cultivation in 1 L TB medium at 30°C, with a growth rate of 0.60 h⁻¹. We monitored acetate consumption and *pO*₂ increase to verify the transition from exponential to stationary cell growth and to define the right moment to initiate fed-batch culture. In the presence of abundant nutrients and/or low *pO*₂, bacterial cells produce and excrete acetate into their environment, however when the bacteria switch to a slower growth rate (when under nutrient deficits or high *pO*₂) they import and utilize the excreted acetate, which is a process known as the “acetate switch” (Wolfe, 2005).

The exponential addition of concentrated feeding solution started when the biomass of the culture reached 6.0 grams dry cell weight per liter of culture broth at a specific growth rate

of $\mu_{\text{set}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ($\mu_{\text{real}} = 0.13 \text{ h}^{-1}$), corresponding to phase 1 of fed-cultivation. Phase 2 started at 18 hours of cultivation when the biomass concentration reached 25.9 gram dry cell weight per liter of culture medium. At this time, the culture was induced with 1 mM IPTG and the μ_{set} was lowered from a value of 0.1 h^{-1} to 0.08 h^{-1} for 2 hours before decreasing further ($\mu_{\text{real}} = 0.02 \text{ h}^{-1}$). IPTG induction was accompanied by a decrease in the bacterial growth rate (Hortsch and Weuster-Botz, 2011). Lowering the μ_{set} is a proven method that maintains the substrate supply between the maintenance and threshold levels (Lee, 1996; Panda et al., 1999; Johnston et al., 2002; Khalilzadeh et al., 2004). The real specific growth rate in both cultivation phases differed from the set value despite controlling the acetate formation under inhibitory levels. This phenomenon has been reported by other researchers (Panda et al., 1999; Vallejo et al., 2002). At the end of the glucose-controlled fed-batch fermentation, rErAII represented about 10% of the total protein in the soluble protein fraction (Figure 1). Additionally, rErAII had the highest activity at 10 h post-induction, while longer culture times decreased its activity (Figure 2). The final biomass concentration was 30.7 grams of dry cell weight per liter of culture broth with a specific product concentration of 29.3 mg rErAII per gram of dry cell weight, corresponding to a volumetric yield of 0.9 grams of soluble rErAII per liter of culture medium. The values obtained for volumetric yield and specific rErAII concentration are comparable to previous studies with other recombinant proteins (Khushoo et al., 2005; Choi et al., 2006).

Purification and Mass spectrometry

The one-step ionic-exchange liquid chromatography purification protocol was applied as described by others (Krasotkina et al., 2004; Wink et al., 2010) with minor modifications. Our protocol varied from previously published protocols because it involved cellular disruption through a modified French press, which is an effective and economical technique for cell-free extract preparation providing high enzyme recovery. Purified biologically active rErAII protein was obtained by loading the soluble protein fraction of the cell-free extract

onto a HiPrep 16/10 SP XL cation exchange column at pH 5.5 and eluting the proteins using 20 mM potassium phosphate buffer on a linear pH gradient profile from 5.5 to 8.5. Owing to its notably alkaline character (estimated pI of 8.5), the rErAII loaded on the cation exchange column was tightly adsorbed to the resin, whereas most of the *E. coli* proteins, particularly the L-asparaginases with acidic pI values, were washed off of the column (Figure 1), thereby ensuring separation of the various proteins. The established one-step purification protocol yielded ~5 mg of rErAII per gram of dry cell weight, corresponding to a volumetric yield of 168 mg of rErAII per liter of culture medium.

Purified rErAII samples were desalted and digested with trypsin and were subjected to LC-MS/MS analysis. We obtained 1626 spectra that corresponded to 24 different peptides (approximately 88% of the rErAII sequence), which ensured the protein's identity. The mass spectrometry analysis showed that rErAII was separated from its *E. coli* counterpart, which is important for preparing therapeutic doses of *E. carotovora* L-asparaginases II because these two enzymes have distinct immunological specificities and provide alternative therapies for patients who develop hypersensitivity to one of the L-asparaginases (Duval, 2002).

L-asparaginase activity measured by isothermal titration calorimetry

L-asparaginases from *E. coli* and *E. chrysanthemi* and the alternative enzyme from *E. carotovora* have unique but comparable kinetic parameters, as determined by well-established colorimetric assays through discontinuous Nessler (Wink et al., 2010) and AHA methods (Derst et al., 2000), continuous direct (Krasotkina et al., 2004) assays and continuous coupled (Kotzia and Labrou, 2005) assays (Derst et al., 2000; Krasotkina et al., 2004; Kotzia and Labrou, 2005; Wink et al., 2010). This enzymatic comparison has generated discussions about the various enzymes' substrate affinity (L-asparagine and L-glutamine) (Derst et al., 2000; Krasotkina et al., 2004) and their toxicological consequences in leukemia treatment (Duval, 2002; Vrooman et al., 2010). The anti-tumor properties of the enzyme are related to its asparaginase activity (Oettgen et al., 1967), but the enzyme's glutaminase activity has been

implicated in causing side effects during ALL treatment (Pui et al., 1981; Priest et al., 1982; Sahu et al., 1998; Hawkins et al., 2004). Therefore, both L-asparaginase and L-glutaminase activities should be considered to improve this enzyme's therapeutic benefit.

Isothermal titration calorimetry (ITC) is a sensitive technique that directly determines the thermodynamic and kinetic parameters of enzymatic reactions by measuring the heat absorbed or released during a chemical reaction (binding, dilution, or transformation) (Bianconi, 2007). This nondestructive method is completely general, thereby enabling precise analysis of reactions in spectroscopically opaque solutions, such as cell crude extract, using physiological substrates. As described by Bianconi (Bianconi, 2003), the calorimetric enthalpy is the sum of the different heat effects that take place during the reaction. The downward baseline displacement after enzymatic injection indicates an exothermic reaction (Figure insets 3 and 4). ITC was employed to compare the thermodynamic and kinetic parameters of two different L-asparaginases: rErAII (purified as described in Materials and Methods) and *Escherichia coli* L-asparaginase II (EcAII) (purchased from Medac, Germany). The rErAII ΔH_{app} was 9.6 kcal mol⁻¹ for L-asparagine hydrolysis and 7.0 kcal mol⁻¹ for L-glutamine hydrolysis (Figure insets 3A and 3B, respectively). The EcAII ΔH_{app} was 6.1 kcal mol⁻¹ for L-asparagine hydrolysis and 5.7 kcal mol⁻¹ for L-glutamine hydrolysis (Figure insets 4A and 4B, respectively).

The kinetic parameters obtained by ITC for the purified rErAII were compared with those of EcAII (Table 1). Other researchers have reported that calorimetric and spectrophotometric data agree well (Todd and Gomez, 2001; Bianconi, 2003). Our enzyme is a pharmaceutically relevant alternative because L-Asparaginases with low K_m values for L-Asn and large values for L-Gln are preferable during the course of anti-cancer therapy (Hawkins et al., 2004). The k_{cat}/K_m ratio is an apparent second-order rate constant that determines the specificity of the enzyme for competing substrates (Fersht, 1999).

Accordingly, the ratio of the L-Asn k_{cat}/K_m value to the L-Gln k_{cat}/K_m value indicates that both enzymes convert the substrates equally well: rErAII exhibited a 2.8×10^3 -fold increase, compared to EcAII's 2.8×10^3 -fold increase. Moreover, the K_m value for L-Gln hydrolysis catalyzed by rErAII (10.3 mM) is larger than that found for L-asparaginases II from *E. carotovora* (Krasotkina et al., 2004), *E. coli* (Derst et al., 2000) and *E. chrysanthemi* (Moola et al., 1994) (3.4, 3.5 and 1.7 mM, respectively). The conversion rates for each substrate can be calculated based on the kinetic data for further comparison, taking into account the normal blood serum concentrations of L-Asn and L-Gln (50 and 600 μM , respectively (Derst et al., 2000)). Therefore, the physiological glutaminase activity of rErAII should be 40% lower than that of EcAII.

In addition to determining the thermodynamic and kinetics parameters, the calorimetric assays were implemented to define the crude extract activity during cultivation of rErAII (Figure 2). Due to the low ϵ_{215} ($102.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Howard and Carpenter, 1972)) of the γ -amide bond of L-asparagine or L-glutamine and the fact that crude extract are opaque solutions, rErAII activity cannot be measured by direct continuous assay. Figure 2 shows an increase in rErAII specific activity during fed-batch cultivation, reaching maximal values 10 h after IPTG induction. This proposed method for measuring L-asparaginase activity could help the biopharmaceutical industry because the equipment and method are simple and are easily implemented to monitor the activity during cultivation and to control the quality of the final product.

CONCLUSIONS

As already pointed out by other researchers (Lee, 1996; Choi et al., 2006), recombinant protein production methods have to increase continuously to meet commercial demands. In this work, we produced an active purified recombinant *E. carotovora* asparaginase II from the soluble cell fraction of fed-batch cultivated IPTG-induced *E. coli* with cell productivity that agreed with those reviewed by Choi et al. (2006). Additionally,

expressing the active recombinant protein in the soluble cell fraction is more economically viable because it eliminates the need for complicated and costly denaturation and refolding processes that can diminish final yields. The recombinant enzyme from *Erwinia carotovora* may be a promising alternative therapy for treating ALL because of its lower glutaminase activity compared to *Escherichia coli* L-asparaginase II. The straightforward calorimetric techniques for determining the enzyme kinetics are accurate and precise for both purified enzyme and crude extracts compared to well-established spectrophotometric assays. The ITC methodology described here could easily be used in industrial applications for process quality control where short times and small amounts of enzyme are needed. Overall, these data will contribute to the future prospects of the bright biopharmaceutical sector, providing alternatives to the ongoing research and innovation for secure product development.

NOMENCLATURE

Latin letters

DCW: dry cell weight [g.L⁻¹]

dQ/dt: heat flow [μcal.s⁻¹]

DTT: dithiothreitol

EcAII: *Escherichia coli* L-asparaginase II (Asparaginase Elspar[®])

IPTG: isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

ITC: isothermal titration calorimetry

k_{cat}/K_m : apparent second-order rate constant [M⁻¹.s⁻¹]

k_{cat} : apparent unimolecular rate constant [s⁻¹]

kDa: kilodalton

K_m : concentration at which the rate of the enzyme reaction is half of V_{max} [M]

L-Asn: L-asparagine [M]

L-Gln: L-glutamine [M]

MCB: master cell bank

pO_2 : dissolved oxygen concentration [%]

rErAII: recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TFA: trifluoroacetic acid

U: amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 μmol ammonia per minute at 25°C
[$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]

V: calorimetric cell volume [L]

V_{max} : maximum reaction rate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]

Greek letters

ΔH_{app} : total reaction enthalpy variation [$\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}$]

ϵ_{215} : molar extinction coefficient [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]

μ : specific growth rate [h^{-1}]

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this work was provided by FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) to Quatro G P&D Ltda.

REFERENCES

- Aghaiypour, K.; Wlodawer, A. and Lubkowski, J., Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase. *Biochemistry*, 40, 19, 5655–5664 (2001).
- Bae, N.; Pollak, A. and Lubec, G., Proteins from *Erwinia* asparaginase Erwinase (R) and *E. coli* asparaginase 2 MEDAC (R) for treatment of human leukemia, show a multitude of modifications for which the consequences are completely unclear. *Electrophoresis*, 32, 14, 1824-1828 (2011).
- Bianconi, M. L., Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 21, 18709-18713 (2003).

- Bianconi, M. L., Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. *Biophysical chemistry*, 126, 1-3, 59-64 (2007).
- Bradford, M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 (1976).
- Broome, J. D., Evidence that the L-asparaginase of Guinea Pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *The Journal of experimental medicine*, 118, 99-120 (1963).
- Choi, J.; Keum, K. and Lee, S., Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61, 3, 876-885 (2006).
- Covini, D.; Tardito, S.; Bussolati, O.; Chiarelli, L. R.; Paschetto, M. V.; Digilio, R.; Valentini, G. and Scotti, C., Expanding Targets for a Metabolic Therapy of Cancer: L-Asparaginase. Recent patents on anti-cancer drug discovery, in press, (2011).
- Derst, C.; Henseling, J. and Röhm, K. H., Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. *Protein Science*, 9, 10, 2009-2017 (2000).
- Duval, M., Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer---Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*, 99, 8, 2734-2739 (2002).
- European Medicines Agency, European Medicines Agency. Evaluation of medicines for human use: assessment of the paediatric needs chemotherapy products (Part I). London, 2006. Disponível em: <
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/10/WC500004053.pdf>.
- Evans, W. E.; Tsiatis, A.; Rivera, G.; Murphy, S. B.; Dahl, G. V.; Denison, M.; Crom, W. R.; Barker, L. F. and Mauer, A. M., Anaphylactoid reactions to *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukemia and lymphoma. *Cancer*, 49, 7, 1378-1383 (1982).

- Ferrara, M.; Severino, N.; Mansure, J.; Martins, A.; Oliveira, E.; Siani, A.; Pereira Jr., N.; Torres, F. and Bon, E., Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 7, 1457-1463 (2006).
- Fersht, A., Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. W.H. Freeman, (1999).
- Goyal, D.; Sahni, G. and Sahoo, D. K., Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresource technology*, 100, 19, 4468-4474 (2009).
- Hawkins, D. S.; Park, J. R.; Thomson, B. G.; Felgenhauer, J. L.; Holcenberg, J. S.; Panosyan, E. H. and Avramis, V. I., Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10, 16, 5335-5341 (2004).
- Hortsch, R. and Weuster-Botz, D., Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1, 69-76 (2011).
- Howard, J. B. and Carpenter, F. H., L-Asparaginase from *Erwinia carotovora*. *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 4, 1020-1030 (1972).
- Johnston, W.; Cord-Ruwisch, R. and Cooney, M. J., Industrial control of recombinant *E. coli* fed-batch culture: new perspectives on traditional controlled variables. *Bioprocess and biosystems engineering*, 25, 2, 111-120 (2002).
- Khalilzadeh, R.; Shojaosadati, S. A.; Maghsoudi, N.; Mohammadian-Mosaabadi, J.; Mohammadi, M. R.; Bahrami, A.; Maleksabet, N.; Nassiri-Khalilli, M. A.; Ebrahimi, M. and Naderimanesh, H., Process development for production of recombinant human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 31, 2, 63-69 (2004).
- Khushoo, A.; Pal, Y. and Mukherjee, K. J., Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. *Applied*

- microbiology and biotechnology, 68, 2, 189-197 (2005).
- Klammer, A. A. and Maccoss, M. J., Effects of modified digestion schemes on the identification of proteins from complex mixtures. *Journal of proteome research*, 5, 3, 695-700 (2006).
- Korz, D. J.; Rinas, U.; Hellmuth, K.; Sanders, E. A. and Deckwer, W.-D., Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 39, 59-65 (1995).
- Kotzia, G. A. and Labrou, N. E., Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Journal of biotechnology*, 119, 4, 309-323 (2005).
- Krasotkina, J.; Borisova, A. A.; Gervaziev, Y. V. and Sokolov, N. N., One-step purification and kinetic properties of the recombinant l-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39, 2, 215–221 (2004).
- Lee, S. Y., High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, 14, 3, 98-105 (1996).
- Montgomery, D. C., *Design and Analysis of Experiments*. Wiley, New York (1997).
- Moola, Z. B.; Scawen, M. D.; Atkinson, T. and Nicholls, D. J., *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochemical Journal*, 302, 921-927 (1994).
- Moritz, R. L., Configuration, Column Construction, and Column Packing for a Capillary Liquid Chromatography System. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007, 2, pdb.prot4578 (2010).
- Oettgen, H. F.; Old, L. J.; Boyse, E. A.; Campbell, H. A. and Philips, F. S., Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer research*, 27, 2619-2631 (1967).
- Onishi, Y.; Yano, S.; Thongsanit, J.; Takagi, K.; Yoshimune, K. and Wakayama, M., Expression in *Escherichia coli* of a gene encoding type II l-asparaginase from *Bacillus subtilis*, and characterization of its unique properties. *Annals of Microbiology*, (2010).
- Panda, A. K.; Khan, R. H.; Appa Rao, K. B. C. and Totey, S. M., Kinetics of inclusion body

production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone. *Journal of biotechnology*, 75, 161-172 (1999).

Priest, J. R.; Ramsay, N. K.; Steinherz, P. G.; Tubergen, D. G.; Cairo, M. S.; Sitarz, A. L.; Bishop, A. J.; White, L.; Trigg, M. E.; Levitt, C. J.; Cich, J. A. and Coccia, P. F., A syndrome of thrombosis and hemorrhage complicating L-asparaginase therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatrics*, 100, 6, 984-989 (1982).

Pui, C. H.; Burghen, G. A.; Bowman, W. P. and Aur, R. J., Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone. *The Journal of Pediatrics*, 99, 1, 46-50 (1981).

Riesenberg, D. and Guthke, R., High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 51, 422-430 (1999).

Sahu, S.; Saika, S.; Pai, S. K. and Advani, S. H., L-asparaginase (Leunase) induced pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 15, 6, 533-538 (1998).

Schwartz, J. H.; Reevesi, J. Y. and Broome, J. D., Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *Biochemistry*, 56, 1516-1519 (1966).

Todd, M. J. and Gomez, J., Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity. *Analytical Biochemistry*, 296, 2, 179-187 (2001).

Vallejo, L. F.; Brokelmann, M.; Marten, S.; Trappe, S.; Cabrera-Crespo, J.; Hoffmann, A.; Gross, G.; Weich, H. A. and Rinas, U., Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 94, 185-194 (2002).

Vrooman, L. M.; Supko, J. G.; Neuberger, D. S.; Asselin, B. L.; Athale, U. H.; Clavell, L.; Kelly, K. M.; Laverdiere, C.; Michon, B.; Schorin, M.; Cohen, H. J.; Sallan, S. E. and Silverman, L. B., *Erwinia* asparaginase after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric blood & cancer*, 54, 2, 199-205 (2010).

Walker, J. M., *The protein protocols handbook*. Springer, (2009).

Wink, P. L.; Bogdawa, H. M.; Renard, G.; Chies, J. M.; Basso, L. A. and Santos, D. S., Comparison between Two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II Constructions: cloning, Heterologous Expression, Purification, and Kinetic Characterization. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2, 1, 13-19 (2010).

Wolfe, A. J., The Acetate Switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 1, 12-50 (2005).

FIGURES

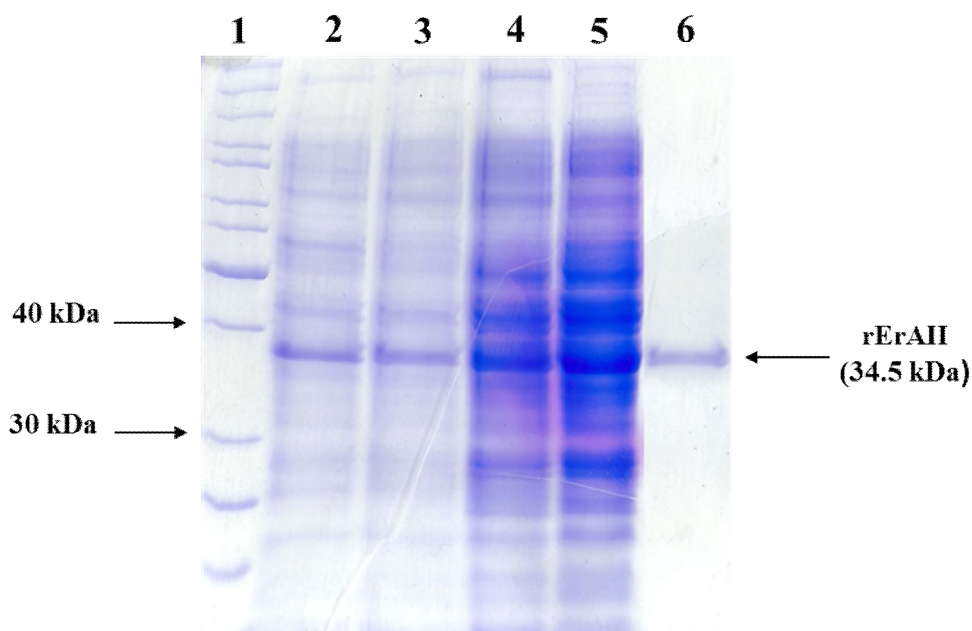


Figure 1 - rErAII SDS-PAGE (12%) analysis. Lanes: 1, PageRuler unstained protein ladder (Fermentas Life Sciences); 2, 3 and 4, total cell protein content from *E. coli* cultures grown under different conditions: shaken flask cultivation in TB medium at 30°C, shaken flask cultivation in TB medium at 37°C and fed-batch cultivation, respectively; 5, dialyzed crude extract loaded onto a HiPrep 16/10 SP XL (GE Healthcare, United Kingdom) cation exchange column; 6, homogeneous rErAII pool eluted from the ionic-exchange column.

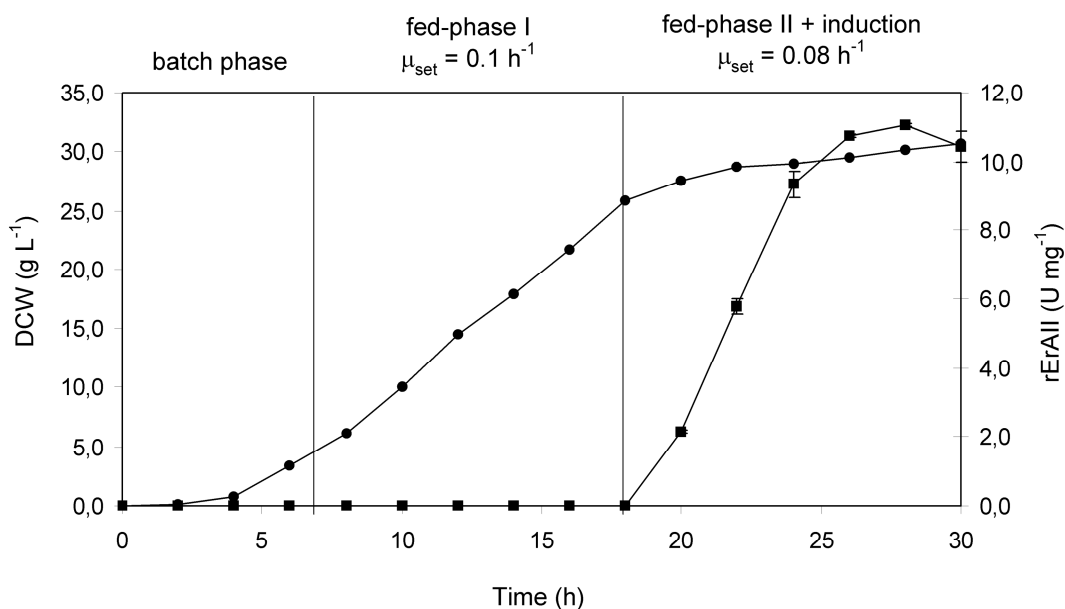


Figure 2 - IPTG-induced rErAII production in fed-batch cultivation of recombinant *E. coli*. After unlimited growth during batch mode, the concentrated solution was fed at rates intended to achieve the indicated specific growth rates. Product formation was induced at 25.9 dry cell weight per culture liter by injection of 1 mM IPTG.

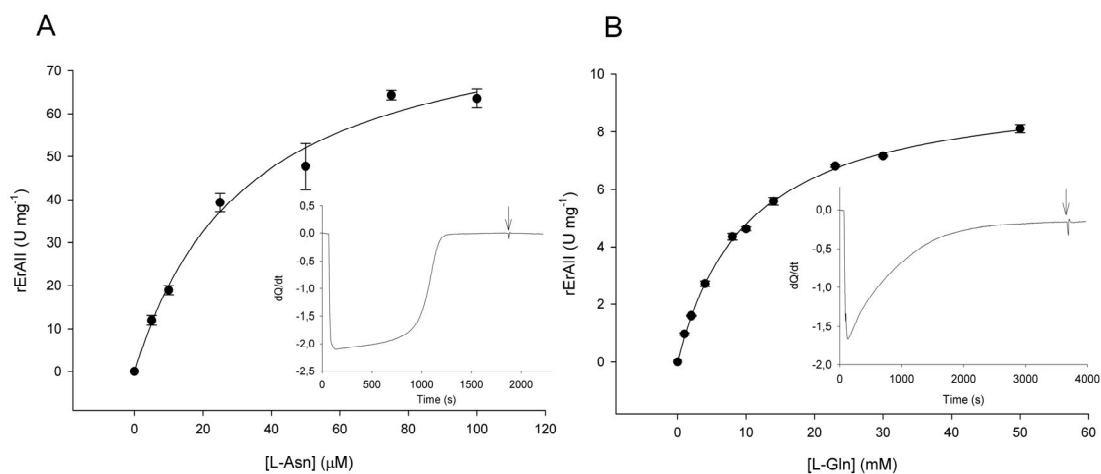


Figure 3 - rErAII kinetic and thermodynamic parameters. Initial velocity experiments at different L-Asn (A) and L-Gln (B) concentrations, as measured by ITC. Heat flow as a function of time ($\mu\text{cal s}^{-1}$) for the consumption of L-Asn (Inset A) and L-Gln (Inset B), at 25°C in potassium phosphate buffer (pH 7.0). The arrow indicates the time of the second injection.

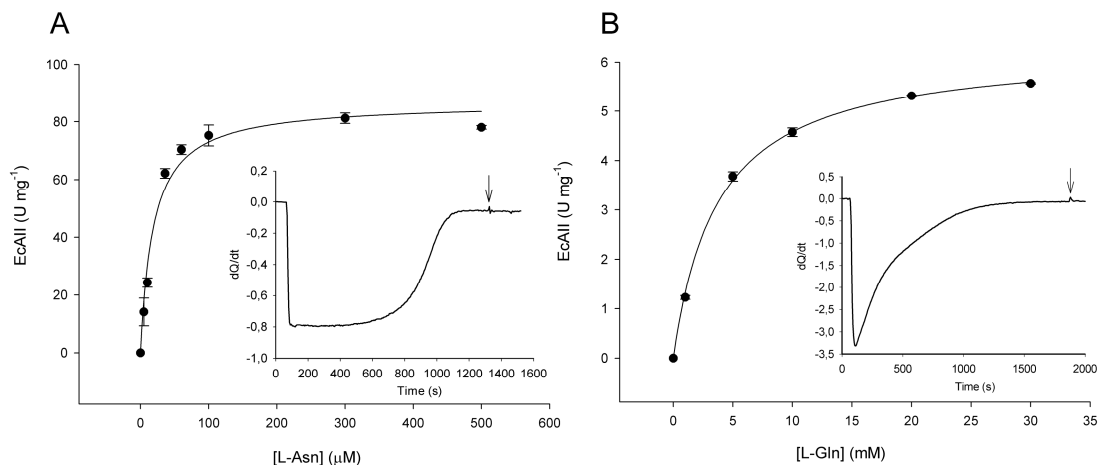


Figure 4 - EcAII kinetic and thermodynamic parameters. Initial velocity experiments at different L-Asn (A) and L-Gln (B) concentrations, as measured by ITC. Heat flow as a function of time ($\mu\text{cal s}^{-1}$) for the consumption of L-Asn (Inset A) and L-Gln (Inset B), at 25°C in potassium phosphate buffer (pH 7.0). The arrow indicates the time of the second injection.

TABLES

Table 1 - Kinetic parameters for the hydrolysis of L-Asn and L-Gln by rErAII and EcAII (Elspar[®]) at 25°C and pH 7.0

	L-asparagine			L-glutamine		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
rErAII	33±6	49.8±3.8	1.50x10 ⁶ ±0.29	10.3±0.4	5.6±0.1	0.53x10 ³ ±0.02
EcAII (Elspar [®])	18±3	53.2±2.0	2.95x10 ⁶ ±0.47	3.7±0.2	3.9±0.1	1.04x10 ³ ±0.05

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de produção de proteínas recombinantes com potencial uso na indústria farmacêutica devem evoluir continuamente para alcançar a crescente demanda comercial, o caso das asparaginases bacterianas não é diferente. Esta demanda pode ser ilustrada pela revolução causada pelas asparaginases na terapia molecular para a leucemia linfoblástica, e recentemente também no tratamento da doença de Hodgkin's, linfomas de células-T, tumores NK e certos subtipos de leucemias mielóides (DUVAL *et al.*, 2002). As enzimas comercialmente disponíveis no Brasil são obtidas a partir de culturas de *E. coli* ou *E. chrysanthemi*, sistema em que a produção de grandes quantidades de asparaginase é restrita pela baixa eficiência das técnicas de fermentação.

No entanto, estas formulações da asparaginase recombinante não são produzidas no Brasil, o que resulta em um alto custo na importação deste medicamento. Em 2003, o país importou 10 medicamentos utilizados no manejo das neoplasias, gastando US\$ 9,8 milhões, sendo que cerca de US\$ 1,450 milhões foram gastos com a asparaginase (INSTITUTO VIRTUAL DE FÁRMACOS DO RIO DE JANEIRO, 2005). A fabricação da asparaginase no mercado nacional provocaria uma diminuição nas importações desse medicamento, evitando que seu preço variasse conforme a oscilação do mercado internacional. Isso reduziria o seu preço, facilitando o acesso da população e do Sistema Único de Saúde (SUS) ao fármaco.

Esta é a primeira vez na literatura, até onde sabemos, que a enzima recombinante homogênea e ativa é produzida na fração celular solúvel através de cultivos de *E. coli* em batelada alimentada com indução de IPTG com produtividades comparáveis à outros estudos, revisados por Choi, Keum e Lee (2006). Outras pesquisas relatam a clonagem e expressão em agitador orbital da seqüência de DNA que codifica a proteína asparaginase de *E. carotovora* contendo ou não a seqüência peptídeo-sinal (WINK *et al.*, 2010; KOTZIA; LABROU, 2005; KRASOTKINA *et al.*, 2004), ou expressa extracelularmente produzida em biorreator (KHUSHOO *et al.*, 2005). Mais um aspecto inovador deste trabalho é a estratégia de expressar a proteína recombinante na fração celular solúvel. Ela pode ser considerada vantajosa economicamente em relação à expressão extracelular uma vez que processos complicados e custosos de desnaturação e enovelamento, os quais diminuem os rendimentos finais, são eliminados.

Ao final do cultivo em biorreator em batelada alimentada com vazão exponencial pré-determinada, definido neste trabalho, foi possível obter uma concentração de biomassa de

30,7 gramas de células secas por litro de meio de cultivo e uma concentração específica de produto de 29,3 mg de rErAII por grama de célula seca, correspondendo a um rendimento volumétrico de 0,9 gramas de rErAII solúvel por litro de meio de cultura.

Outro resultado positivo deste trabalho foi a determinação e comparação dos parâmetros cinéticos da L-asparaginase II recombinante de *E. carotovora* com o medicamento Elspar® (L-asparaginase II nativa de *E. coli*) através de um protocolo inovador utilizando calorimetria por titulação isotérmica. Diferentemente dos métodos espectrofotométricos, a técnica por ITC pode ser usada para determinação da atividade de asparaginase tanto para a enzima homogênea quanto para o extrato bruto da fração celular solúvel. Os resultados de atividade encontrados são promissores uma vez que foi demonstrado que a enzima de *E. carotovora* possui uma menor atividade de glutaminase, do que a apresentada pelas enzimas de *E. coli* e de *E. chrysanthemi*, reduzindo potencialmente os possíveis efeitos colaterais decorrentes da sua utilização no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, uma vez que a atividade da glutaminase nas preparações terapêuticas das asparaginases tem sido implicada na causa dos efeitos colaterais (DUVAL *et al.*, 2002), e que as asparaginases com alta afinidade por asparagina e baixa afinidade por glutamina, como a produzida neste trabalho, têm sido relatadas por serem preferíveis durante a série de terapia anticâncer (HAWKINS *et al.*, 2004).

Este trabalho representa um método eficiente e com alta produtividade para a obtenção de L-asparaginase II recombinante de *E. carotovora*, com baixa atividade de glutaminase. Vale ressaltar que ele é a continuação de um trabalho anterior do mesmo grupo de pesquisa realizado por Wink e colaboradores (2010) que se intitula *Comparison between two Erwinia carotovora L-Asparaginase II constructions: cloning, heterologous expression, purification, and kinetic characterization* publicado na revista *Journal of Microbial and Biochemical Technology*.

O avanço científico tem permitido o emprego industrial de microrganismos ou células modificadas geneticamente objetivando a produção de proteínas de interesse em diversas áreas e, em especial, na saúde humana. A realização de experimentos de superexpressão, purificação e caracterização da proteína asparaginase recombinante visam aperfeiçoar a produção desta em larga escala para futuramente suprir a demanda do mercado nacional. Sendo assim, a realização deste projeto visa, futuramente, a produção nacional com tecnologia de ponta da enzima asparaginase recombinante. Este trabalho pretende contribuir para a sensível redução de custos com importação e o fornecimento do fármaco a um número maior de pacientes que dele necessita para tratamentos de saúde.

REFERÊNCIAS

- AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, p. 5655-5664, 2001.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Technical Handbook**, Stockholm, 18-1132-29, 1999.
- ASSELIN, B. L. *et al.* Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **Journal Clinical Oncology**, v. 11, p. 1780-1786, 1993.
- BAGERT, U.; RÖHM, K. H. On the role of histidine and tyrosine residues in *E. coli* asparaginase; chemical modification and nuclear magnetic resonance studies. **Biochemistry Biophysica Acta**, v. 999, p. 36-41, 1989.
- BENTLEY, W. E.; DAVIS, R. H.; KOMPALA, D. S. Dynamics of CAT expression in *E. coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 749-760, 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Leucemia aguda**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344>. Acesso em: 25 jun. 2009.
- BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 118, n. 1, p. 99-120, 1963.
- CEDAR, H.; SCHWARTS, J. H. Localization of two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. **Journal Biology Chemistry**, v. 242, p. 3753-3755, 1967.
- CHOI, J.; KEUM, K.; LEE, S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chem Eng Sci**, v. 61, p. 876-885, 2006.
- CORTES, J. E.; KANTARJIAN, H. M. Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. **Cancer**, v. 76, n. 12, p. 2393-2417, 1995.
- COVIC, A.; KUHLMANN, M. K. Biosimilars: recent developments. **International Urology and Nephrology**, v. 39, p. 261-266, 2007.
- DOELLE, H. W.; EWINGS, K. N.; HOLLYWOOD, N. W. Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. **Adv. Biochemistry Engineering**, v. 23, p. 1-35, 1982.
- DUVAL, M. *et al.* Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, n. 8, p.2734-2739, 2002.
- FUCHS, C. *et al.* Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *E. coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 243-251, 2002.

GOYAL, D.; SAHNI, G.; SAHOO, D. K. Enhanced production of recombinant streptokinase in *E. coli* using fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4468-4474, 2009.

HARCUM, S. W.; BENTLEY, W. E. Response dynamics of 26-, 34-, 39-, 54-, and 80-kDA proteases in induced cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 675-685, 1993.

HARMS, E. *et al.* Construction of expression systems for *Escherichia coli* asparaginase II and two-step purification of the recombinant enzyme from periplasmic extracts. **Protein Expression and Purification**, v. 2, p. 144-150, 1991.

HAWKINS, D. S. *et al.* Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 5335-5341, 2004.

INSTITUTO VIRTUAL DE FÁRMACOS DO RIO DE JANEIRO. **Sistema de Informação Sobre a Indústria Química**. 2005. Disponível em: <http://www.ivfrj.ccsdecania.ufrj.br/download/conf4_2005.ppt>. Acesso em: 25 set. 2009.

KHUSHOO, A.; PAL, Y.; MUKHERJEE, K. J. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 189-197, 2005.

KIM, B. S. *et al.* High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 26, p. 147-150, 2004.

KIRIYAMA, M. *et al.* Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. **Leukemia**, v. 3, n. 4, p. 294-297, 1989.

KONSTANTINOV, K. *et al.* A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *E. coli*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 38, p. 750-758, 1990.

KORZ, D. J. *et al.* Simple fed-batch techniques for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 59-65, 1995.

KOSINSKI, M. J.; BAILEY, J. E. Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal/3-galactosidase in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 55-68, 1991.

KOSINSKI, M. J.; RINAS, U.; BAILEY, J. E. Isopropyl-13-D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 36, p. 782-784, 1992

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. Cloning, expression and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 309-323, 2005.

KRASOTKINA, J. *et al.* One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, n.

2, p. 215-221, 2004.

KUHLMANN, M.; COVIC, A. The protein science of biosimilars. **Nephrol Dial Transplant**, v. 5, p. 4-8, 2006.

KWEON, D. H. *et al.* Over production of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 537-542, 2001.

LEE, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v. 14, p. 98-104, 1996.

MOOLA, Z. B. *et al.* *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. **Biochemical Journal**, v. 302, n. 3, p. 921-927, 1994.

OETTGEN, H. F. *et al.* Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. **Cancer Research**, v. 27, n. 12, p. 2619-2631, 1967.

ORTEGA, J. A. *et al.* L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. **Cancer Research**, v. 37, n. 2, p. 535-540, 1977.

PARKER, S. L. *et al.* Cancer statistics, 1997. **A Cancer Journal of Clinicians**, v. 47, n. 1, p. 5-27, 1997.

PIETERS, R. *et al.* Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. **Blood**, v. 112, p. 4832-4838, 2008.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 9, p. 605-615, 1998.

RICHARDS, N. G.; KILBERG, M. S. Asparagine synthetase chemotherapy. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 629-654, 2006.

RIESENBERG, D. *et al.* High cell density fermentation of recombinant *E. coli* expressing human interferon alpha 1. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 77-82, 1991.

SOBIN, L. H.; KIDD, J. G. Alterations in protein and nucleic acid metabolism of lymphoma 6C3HED-og cells in mice given guinea pig serum. **The Journal of Experimental Medicine**, n. 123, p. 55-74, 1966.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

SPADA, S.; WALSH, G. **Directory of approved biopharmaceutical products**. Boca Raton; London; New York; Washington, DC: CRC, 2005.

STURTEVANT, J. M. Heats of hydrolysis of amide and peptide bonds. **Journal American Chemical Society**, v. 75, p. 2016-2017, 1953.

VROOMAN, L. M. *et al.* *Erwinia* Asparaginase Allergy After Allergy to *E. coli* Asparaginase in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Blood Cancer**, v. 54, p. 199-205,

2010.

WANG, B. *et al.* Evaluation of immunologic crossreaction of antiasparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. **Leukemia**, v. 17, p. 1583-1588, 2003.

WINK, P. L. *et al.* Comparison between two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II constructions: cloning, heterologous expression, purification, and kinetic characterization. **Journal Microbial Biochemical Technology**, v. 2, n. 1, p. 13-19, 2010.

YAMANE T.; SHIMIZU S. Fed-batch techniques in microbial processes. **Advanced Biochemistry Engineering Biotechnology**, v. 30, p 147-194, 1984.