



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0404952-7 A**



(22) Data de Depósito: 10/11/2004
(43) Data de Publicação: 20/06/2006
(RPI 1850)

(51) Int. Cl⁷.:
C12P 21/02
C12N 9/80
A61P 35/02

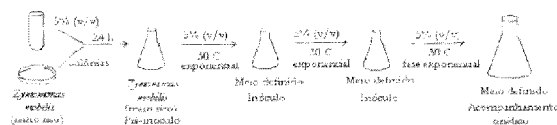
(54) Título: **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ASPARAGINASE PELA BACTÉRIA ZYMOMONAS MOBILIS E USO DO CALDO FERMENTATIVO E/OU DA ENZIMA PURIFICADA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS**

(71) Depositante(s): COPPE/UFRJ - Coordenação dos Programas de Pós Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

(72) Inventor(es): José Carlos Costa da Silva Pinto, Tito Livio Moitinho Alves, Ana Karla de Souza Abud

(74) Procurador: Joubert Gonçalves de Castro

(57) Resumo: "PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ASPARAGINASE PELA BACTÉRIA ZYMOMONAS MOBILIS E USO DO CALDO FERMENTATIVO E/OU DA ENZIMA PURIFICADA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS". A presente invenção refere-se ao processo de obtenção da enzima L-asparaginase II pela bactéria *Zymomonas mobilis*. O processo de produção consiste no crescimento da bactéria em um meio fermentativo, com diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. Utilizando-se o substrato L-asparagina como fonte de nitrogênio, observa-se a produção enzima asparaginase a partir da formação do aspartato e da liberação de amônia. Experimentos realizados em meio sintético sem asparagina e em meio contendo apenas glicose extrato de levedura também resultaram na formação da enzima, mostrando que a mesma é constitutiva e que pode ser produzida em diferentes meios e condições de fermentação. Além disso, devido aos efeitos colaterais relacionados às asparaginases comerciais, a formação de asparaginase a partir da bactéria *Zymomonas mobilis*, mesmo com uma produtividade menor, tem a vantagem de que o caldo fermentativo deste microrganismo já é utilizado no tratamento de doenças.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"Processo de Produção de Asparaginase pela Bactéria
Zymomonas mobilis e Uso do Caldo Fermentativo e /ou da
Enzima Purificada no Tratamento de Doenças".

5 **CAMPO TÉCNICO**

A presente invenção refere-se a processo de obtenção e uso da enzima L-Asparaginase de ação anti-linfoma pelo crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* em meio fermentativo.

10 **TÉCNICAS ANTERIORES**

Embora a glutaminase tenha sido utilizada para tratar neoplasias, o principal agente enzimático usado para este fim é a L-asparaginase (EC 3.5.1.1). Diversos microrganismos, tais como *Pseudomonas sp.* (Manna et al., 15 1995), *Escherichia coli* (Barnes et al., 1977 e 1978), *Erwinia sp.* (Maladkar ., 1993; Moola et al., 1994), *Citrobacter freundii* (Davidson et al., 1977), *Bacillus sp.* (El-Shora & Ashour, 1993; Mohapatra et al., 1995), *Staphylococcus sp.* (Rosaslka & Mikucki,1992) e *Proteus* 20 *vulgaris* (Tosa et al., 1972), têm servido ou serviram como fontes da enzima para ensaios clínicos (Souza, 2002). L-asparaginase é um importante agente na terapia de leucemia linfoblástica aguda (ALL), tendo sido usada no tratamento de leucemia por mais de 30 anos. Desde a década de 60 sabe-se 25 que algumas células leucêmicas são deficientes em L-asparagina sintetase, não podendo produzir quantidades suficientes do aminoácido essencial, L-asparagina, para a manutenção da viabilidade celular (Graham, 2003).

A enzima L-asparaginase é amplamente distribuída, 30 estando presente em bactérias, fungos, plantas e mamíferos. Tem sido amplamente estudada desde que Kidd, em 1953, demonstrou a inibição do crescimento de tumores induzidos em ratos depois do tratamento com soro de porquinhos da

Índia (GPS - guinea pig serum), o que não ocorria com o soro de coelhos, de cavalo e nem com o soro humano (Graham, 2003; Soares et al., 2002). Entre 1958 e 1962, Broome, comparando as observações de Kidd com as observações feitas
5 por Clementi em 1922 de que o soro de porquinhos da Índia, e não o de outros mamíferos, é uma fonte rica em L-asparaginase, acabou por confirmar que a L-asparaginase era a fonte de atividade anti-lymphoma no GPS (Graham, 2003). Nas bactérias Gram-negativas, estudos com L-asparaginase
10 têm sido bem documentados (Wriston e Yellin, 1973; Wriston, 1985). Mashburn e Wriston (1964) mostraram que a L-asparaginase de *E. coli* altamente purificada possui atividade anti-tumoral, ao contrário de um preparado de L-asparaginase de *Bacillus coagulans*, que não inibe o
15 crescimento do tumor. Isto se deve ao fato da bactéria *E. coli* produzir duas asparaginases distintas, tendo a asparaginase de ação anti-tumoral uma grande afinidade pelo seu substrato, a L-asparagina.

L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase)
20 catalisa a hidrólise de L-asparagina (L-Asn) em ácido L-aspartico e amônia. A maioria dos tecidos normais sintetiza L-asparagina em quantidades suficientes para as suas necessidades metabólicas. Certos tecidos neoplásicos, em especial as células de leucemia linfoblástica aguda,
25 necessitam de uma fonte exógena deste aminoácido. A L-asparaginase priva as células malignas da asparagina presente no fluido extracelular, resultando na morte celular (Graham, 2003; Bushman et al., 2000). Contudo, as células normais são capazes de sintetizar L-asparagina e,
30 assim, são menos afetadas pela rápida exaustão produzida pelo tratamento com a enzima L-asparaginase. Com isso, a terapia é baseada na idéia de que a síntese de proteína (crescimento) de células leucêmicas é inibida pela

introdução da L-asparaginase no sangue do paciente, de forma a decompor a asparagina no sangue. A L-asparaginase produzida por *Escherichia coli* tem efeito inibitório ao tumor e a enzima isolada de *Erwinia chrysanthemi* é também
5 farmacologicamente ativa. Uma vez que as L-asparaginases de *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi* possuem diferentes especificidades imunológicas, a disponibilidade de ambas gera uma importante alternativa para a terapia se o paciente desenvolver hipersensibilidade a uma das enzimas
10 (um fenômeno comum associado com a administração de L-asparaginase).

As principais indicações terapêuticas da L-asparaginase são o tratamento da doença de Hodgkin, tratamento de leucemia linfocítica aguda (ALL - acute
15 lymphatic leukemia), principalmente em crianças, leucemia mielomonocítica aguda e tratamento de linfossarcoma e melanossarcoma (Soares *et al.*, 2002). Administrações repetitivas de L-asparaginase podem causar sérios efeitos colaterais, como choque anafilático, urticária e edema, bem
20 como alergias brandas, náuseas, anorexia, anemia, entre outros. Tal fato se deve à necessidade de se administrar altas doses da enzima (3000 a 9000 UI/kg/dia) (Capizzi, 1993), uma vez que tanto a enzima bruta quanto a purificada possuem baixa atividade catalítica. Algumas dessas
25 complicações podem ser superadas com a substituição de L-asparaginase de microrganismos com sítios antigênicos diferentes. Contudo, de acordo com o método terapêutico, têm sido aplicadas algumas terapias combinadas com agentes quimioterápicos como prednisona, vincristina, metotrexato,
30 6-mercaptopurina, citarabina e ciclofosfamida, como também radioterapia.

A L-asparaginase de *E. coli* usada atualmente no Brasil é comercializada sob a denominação Elspar[®],

fabricada nos Estados Unidos pela Merck Sharp & Dohme, que vem em forma de pó liofilizado estéril, para injeção intramuscular ou intravenosa após ressuspensão. A liofilização é uma técnica bastante usada em preparações 5 farmacêuticas para se obter uma droga enzimática na forma seca e estável antes de sua administração parenteral. A atividade específica do Elspar[®] é de, no mínimo, 225 UI/mg proteína e cada frasco contém 10000 UI e 80 mg de manitol, um ingrediente inativo. Contudo, em virtude do alto custo, 10 de problemas imunológicos e do baixo tempo de meia-vida no sangue ($t_{1/2} = 1,2$ dias), o que torna necessário fazer aplicações sucessivas e causa desconforto e dor aos pacientes, esforços vêm sendo realizados para a derivatização de enzimas. Esses trabalhos envolvem a 15 imobilização em suportes inertes, a conjugação química com moléculas poliméricas e o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular visando um aumento de produção da enzima. Além disso, tem-se buscado também a produção eficiente da enzima por microrganismos que permitam a 20 diminuição dos efeitos adversos associados à L-asparaginase de *E. coli* (Oliveira, 1998). Uma asparaginase sorologicamente distinta e de efeito terapêutico similar, cujo nome comercial é Erwinase[®], é produzida pela bactéria *Erwinia carotovora* (Lee et al., 1989). Em 1990, Tsirka e 25 Kyriakidis descobriram que a atividade da enzima L-asparaginase por *Tetrahymena pyriformes* é associada com a atividade quinásica, ocorrendo uma autofosforilação em resíduos de tirosina.

Os efeitos hepatotóxicos das asparaginases 30 microbianas podem ser resultado de sua capacidade de hidrolisar tanto a asparagina quanto a glutamina. A asparaginase de *E. coli*, por exemplo, possui um nível de atividade de glutaminase 130 vezes maior quando comparado à

atividade de asparaginase de *Wolinella succinogenes*. Como resultado, os pacientes tratados com asparaginases microbianas convencionais mostram uma apreciável redução nos níveis de glutamina e asparagina no soro (Schrek et al., 1972), que podem demonstrar uma possível correlação entre a carência de glutamina e a toxicidade clínica pela ação da asparaginase.

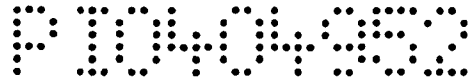
Um problema significativo associado com o uso de asparaginases microbianas é que os pacientes tratados com asparaginases de *E. coli* e *Erwinia carotovora* freqüentemente desenvolvem anticorpos neutralizantes de IgG e IgM, permitindo uma reação imediata dos níveis de soro de asparagina e glutamina. Uma abordagem para o problema de hipersensibilidade da enzima tem sido a mudança das propriedades da enzima com polietilenoglicol (PEG). Um medicamento denominado Oncaspar[®] foi proposto pela Enzon Pharmaceuticals e aprovado pelo FDA em 1994 (www.enzon.com), resultando em uma enzima menos imunogênica na indução de anticorpos anti-asparaginase, com tempo de meia-vida prolongado (5,7 dias ao invés de 1,2 dias observado para a enzima nativa) e retenção da atividade enzimática, com conseqüente atividade anti-tumoral preservada.

As reações de proteínas com PEG podem requerer certos requisitos relacionados à função da proteína em muitos meios de reação. O acoplamento estável entre a proteína e o PEG foi feito utilizando-se compostos intermediários heterocíclicos, como cloreto cianúrico, succinamida ou outros intermediários que permitam a reação entre PEG e a proteína em condições moderadas de pH e temperatura, usualmente num meio tamponado. O PEG ativado se liga às cadeias de aminoácidos livres das proteínas, em especial à lisina (Matsuyama et al., 1991), facilitando o

livre acesso da molécula de asparagina ao sítio ativo da enzima. Ao mesmo tempo, previne-se o consumo da enzima por um sistema retículo-endotelial, diminuindo enormemente a probabilidade de desenvolvimento de anticorpos contra a L-asparaginase e prolongando o tempo de meia vida da enzima
5 (Keating *et al*, 1993).

Além das técnicas de modificação da enzima, Garin *et al.* (1994) citam a possibilidade de encapsulá-la em eritrócitos humanos, nos quais os poros são alargados
10 transitoriamente através de um ambiente hipotônico. Neste caso, a enzima passa a apresentar uma longevidade semelhante à do eritrócito no ser humano, que é de 120 dias.

Como mencionado anteriormente, razão pela qual a
15 L-asparaginase de *Escherichia coli* possui atividade anti-linfoma, ao contrário de outras asparaginases de fungos e bactérias, deve-se ao fato da mesma produzir duas L-asparaginases distintas, que se diferenciam em função de um amplo número de propriedades, dentre as quais a mais
20 significativa é a diferença de afinidade pelo seu substrato, L-asparagina (Oliveira, 1998). A enzima com maior afinidade pela L-asparagina, a L-asparaginase II ou EC-2, de forma tetramérica e localizada no espaço periplásmico, situado
25 entre a membrana plasmática bacteriana e o envelope celular, possui um peso molecular de 36850 Da para o monômero e um ponto isoelétrico teórico de 5,66. O sítio ativo é composto pelos resíduos treonina (Thr34, Thr111), aspartato (Asp112) e lisina (Lys184). O valor de K_M para esta enzima é de $1,15 \times 10^{-5}$ M, evidenciando uma grande
30 afinidade pelo substrato. A enzima L-asparaginase I ou EC-1, localizada no citoplasma da célula, tem baixa afinidade por L-asparagina, apresentando um valor de K_M de $3,5 \times 10^{-3}$ M (banco de dados "SWISS-PROT", P18840). Sendo assim, essa



enzima é pouco efetiva contra o crescimento do tumor e não interfere com a síntese de proteínas em extratos microbianos.

A forma nativa da enzima de *E. coli* tem estrutura molecular que consiste de 10% de alfa-hélice e de 45% de estrutura beta, e 45% da estrutura na forma desordenada. Soluções de asparaginase têm a quantidade de estrutura beta elevada para 55%, reduzindo-se o conteúdo de alfa-hélice. A enzima é estável entre pH 5,5 e 10,8, mas é completamente desordenada a pH 11,2 (Wriston e Yellin, 1973).

Os estudos de raios-X de L-asparaginase de *E. coli* mostram que a proteína é composta de quatro subunidades idênticas, podendo considerar este tetrâmero como um dímero de dímeros pareados, como mostra o modelo da estrutura da enzima na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura do tetrâmero de L-asparagina (PDB IB codificação 3eca) desenhada com MOLSCRIPT. Os monômeros são codificados em cores. Os produtos da reação, os aspartatos, são ligados ao centro ativo da enzima pelos modelos em bolas (Stecher et al., 1999).

Cada um dos dímeros possui dois centros ativos, sendo que cada um desses centros ativos é formado por cadeias laterais de aminoácidos com subunidades intimamente relacionadas. Apesar dos dímeros conterem todos os elementos estruturais e grupos funcionais para criar um completo ambiente sítio-ativo, a enzima ativa é sempre um tetrâmero. Isto ocorre porque, aparentemente, enquanto as força iônicas e pontes de hidrogênio são os principais fatores responsáveis pelas estruturas secundária e terciária, as forças entre as subunidades no tetrâmero são predominantemente hidrofóbicas. E tais interações hidrofóbicas são importantes para a manutenção da estrutura quaternária da enzima (Stecher et al., 1999).

Os microrganismos que fermentam produtos do metabolismo da L-asparagina ou compostos relacionados, como é o caso das bactérias, geralmente mostram um modelo comum de regulação de L-asparaginase. Nestes organismos, a taxa de transferência de oxigênio para o meio, o pH e a concentração de ácidos orgânicos (como fumarato, lactato, piruvato, succinato, malato e oxaloacetato) podem ter uma importante função na regulação de L-asparaginase e a amônia pode estimular a produção da enzima (Paul e Cooksey, 1981).
5
10 Contudo, para as leveduras, a produção de uma L-asparaginase periplásmica é estimulada pela carência de nitrogênio na fase estacionária (Dunlope e Roon, 1975).

A presente invenção apresenta o processo de produção da enzima L-asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis* CP4, cujo caldo fermentativo tem apresentado ação terapêutica no tratamento de feridas e distúrbios intestinais e ginecológicos (Morais, 1982). Tal asparaginase e sua preparação são descritas detalhadamente a seguir.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

20 Esta invenção é baseada na descoberta da formação de asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis*. A constante de afinidade obtida pela bactéria para esta enzima é muito próxima à da asparaginase II de *E. coli*, indicando que a mesma pode ser usada como uma forma
25 alternativa no tratamento de doenças que respondam à carência de asparagina, particularmente aquelas que têm sofrido hipersensibilidade ao tratamento com as asparaginases comerciais existentes.

O que caracteriza de forma inequívoca esta
30 invenção é a capacidade da bactéria *Zymomonas mobilis* de produzir a enzima asparaginase, tanto a partir de seu substrato específico, L-asparagina, quanto a partir de

outras fontes de nitrogênio, como o aspartato, sulfato de amônio e extrato de levedura.

A inovação ora proposta consiste de um processo de fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* em meio de crescimento, onde as células formadas, após reação com tampão Tris-HCl 50 mM e pH 8,6 e com asparagina 10 mM, são capazes de liberar amônia como resultado da ação da enzima asparaginase. O processo é caracterizado pelo uso de fontes de nitrogênio (como, preferencialmente, aminoácidos e fontes inorgânicas como sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona), fontes de carbono (como, preferencialmente, glicose, frutose, sacarose ou um aminoácido) e de oligoelementos (preferencialmente, pantotenato de cálcio, fosfatos, cloretos e sulfatos). As concentrações podem variar de 0,1 a 30% do peso total do meio de fermentação. A temperatura pode variar na faixa de 30 a 37°C, preferencialmente. O pH do meio de cultivo não precisa ser controlado e a operação pode ser realizada sem aeração e sem agitação. Em um processo alternativo, em meio de crescimento complexo e em meio sintético, utilizando diferentes fontes de nitrogênio que não o substrato L-asparagina, é também observada a formação de amônia.

Uma Unidade Internacional de asparaginase (UI) é a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de amônia por minuto a 37°C e pH 8,6 (Mashburn & Wriston, 1963). A metodologia mais utilizada para determinação da atividade de L-asparaginase é baseada na determinação da amônia liberada pela L-asparagina, como resultado da ação da enzima, utilizando-se o reagente de Nessler (Mashburn e Wriston, 1963; Liu e Zajic, 1973; Paul e Cooksey, 1981; Soares et al., 2002). É um método com boa reprodutibilidade, mas que requer cuidados meticulosos, além de sofrer interferência de muitas substâncias.

Um dos aspectos da invenção proposta está relacionado à possibilidade da proteína produzida de acordo com o método descrito ser purificada ou utilizada na forma de caldo fermentativo, do concentrado celular ou da massa
5 seca do concentrado celular, para formular composições farmacêuticas. A purificação pode ser realizada de forma óbvia por um processo adequado, tais como processos de precipitação, de cromatografia por afinidade, eletroforese em géis de agarose e/ou técnicas de separação por tamanho,
10 associadas ou não. Depois da etapa de purificação, a enzima poderá ser testada em animais para comprovação da ação anti-lymfoma.

O caldo fermentativo pode ser obtido de forma óbvia, pela concentração do meio fermentado por operações,
15 por exemplo, de filtração através de membranas semi-permeáveis e/ou evaporação.

O concentrado celular pode ser obtido e modificado de forma óbvia, por exemplo, por centrifugação e liofilização das células obtidas do processo fermentativo.

20 A massa seca de células pode ser obtida e modificada de forma óbvia, por exemplo, por centrifugação e secagem (que pode ser a vácuo ou não), restringindo a água existente.

O uso do caldo fermentativo, do concentrado
25 celular e da massa seca pode ser feito de forma óbvia, purificando-se ou não a enzima, a partir da avaliação do crescimento e da atividade em presença de células malignas. Como já descrito, sabe-se que a asparaginase inibe o crescimento de células malignas e pode ser usada no
30 tratamento do câncer, em particular da leucemia aguda em crianças.

PROCESSOS EXISTENTES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ASPARAGINASE

Production of Asparaginase

Teller, J.D. (Worthington Biochemical Corporation), US Patent, number: 3.440.142, 22/04/1969.

Este trabalho registra o desenvolvimento de
5 processo para produção de asparaginase a partir de
Escherichia coli através de crescimento aeróbico. A
proteína obtida a partir do extrato de células
centrifugadas é precipitada e concentrada por precipitação
fracional e cromatografia.

10 O autor relata que a utilização de peptona como
fonte de nitrogênio, sob o nome de N-Z-amina tipo B, é
importante na formação de asparaginase com atividade anti-
tumoral. A suplementação com extrato de levedura e levedura
autolisada oferece rendimentos maiores em asparaginase.
15 Contudo, o uso destas fontes sem a peptona não resulta em
bons rendimentos da enzima. Fontes inorgânicas de
nitrogênio, como o sulfato de amônio, não são utilizadas e
não geram bons rendimentos em asparaginase. A adição de
aminoácidos como asparagina, alanina, glicina e aspartato
20 não apresentam melhoras na produção da enzima.

Na presente invenção, faz-se uso de um
microrganismo menos nocivo que a bactéria *Escherichia coli*,
que é a bactéria *Zymomonas mobilis*, onde o uso de um
aminoácido como fonte de nitrogênio, ao invés do sulfato de
25 amônio e do extrato de levedura, geraram bons rendimentos
na enzima.

Utilization of *Wolinella succinogenes* Asparaginase to Treat Diseases Associated with Asparagine Dependence

Durden, D.L. , US Patent, number: US 2002/0102251 A1
30 01/08/2002.

Production Processes for Recombinant *Wolinella succinogenes* Asparaginase

Durden, D.L. , Patent number: EP1219706 , 03/07/2003.

Estes trabalhos descrevem os métodos de produção de asparaginase a partir de *Wolinella succinogenes*. Também relatam os métodos para a utilização de enzimas microbianas recombinantes a partir de *Wolinella succinogenes* (ácidos 5 nucléicos e células hospedeiras adequadas ao uso) no tratamento de doenças que respondem à carência de asparagina, incluindo doenças hematológicas, doenças auto-imunes e doenças infecciosas.

O autor relata detalhadamente as vantagens de 10 utilização da enzima obtida de *Wolinella succinogenes* e descreve os testes de atividade e ação anti-lymfoma em ratos, comparados às asparaginases de *E. coli* e *Erwinia carotovora*.

A invenção ora proposta descreve os estudos de 15 obtenção e otimização da produção de asparaginase por uma bactéria em sua forma livre e cujo caldo fermentativo é utilizado no tratamento de doenças gastrointestinais, ao passo que o microrganismo *Wolinella* é associado com periodontites, apendicites e algumas infecções.

20 Process for Producing Immobilized L-Asparaginase Preparations for the Therapy of Leukemia

Nambu, M. (Nippon Oil Company), US Patent, number: 4.617.271, 14/10/1986.

Este trabalho relata o processo de produção de L- 25 asparaginase imobilizada, gerando uma enzima embutida numa matriz hidrogel com excelentes características quanto a anti-trombogenicidade e força mecânica através de procedimentos simples.

O autor relata que a utilização da enzima 30 imobilizada, administrada de várias formas, mostrou alta remissão da leucemia linfocítica, leucemia mielocítica e especialmente a leucemia linfática aguda.

Na presente invenção busca-se a otimização da produção da enzima asparaginase por *Zymomonas mobilis* em sua forma livre e o estudo sobre possível ação antitumoral, uma vez que se tem afinidade pelo substrato L-asparagina e
5 o K_M obtido pela bactéria é muito próximo à enzima L-asparaginase II de *E. coli*.

Production of L-Asparaginase

BURNETT & CO WM T, Patent number: IE862092L,
06/02/1987.

10 Este trabalho relata o processo de produção de L-asparaginase em cultura de *Erwinia chrysantemi* contendo material genético produzido por tecnologia de DNA recombinante.

A invenção ora apresentada relata o processo de
15 produção de asparaginase por uma cultura de *Zymomonas mobilis*, sem a utilização de técnicas de engenharia genética.

Production of L-Asparaginase

SECRETARY FOR SOCIAL SERVICES IN BRITAIN, Patent
20 number: IE862092L, 13/05/1972.

Production of L-Asparaginase

SECRETARY OF STATE FOR SOCIAL SERVICES IN LONDON,
Patent number: IE834343L, 27/12/1970.

Production of L-Asparaginase

25 SECRETARY FOR SOCIAL SERVICES IN BRITAIN, Patent
number: GB1379728, 08/01/1975.

L-Asparaginase Production

SECRETARY FOR SOCIAL SERVICES IN BRITAIN, Patent
number: IE33302L, 23/02/1970.

30 Estes trabalhos relatam o desenvolvimento e as melhorias no processo de produção de L-asparaginase em culturas de *Erwinia*.

O processo de invenção neste instante descrito
relata o processo de produção de asparaginase por uma
cultura de *Zymomonas mobilis*. A principal diferença está no
fato desta bactéria ter um histórico de tratamento em
5 infecções em mamíferos, fazendo com que a enzima produzida
por esta bactéria, ao contrário de *E. coli* e *Erwinia*, possa
ter um menor efeito tóxico ao homem.

Asparaginase Production

Herbert, D.; Christie A. (SECRETARY FOR SOCIAL SERVICES
10 IN BRITAIN), US Patent, number: US3843445, 22/10/1974.

Este trabalho relata o melhoramento do processo
de produção de L-asparaginase a partir do gênero *Erwinia*,
tendo o seu meio fermentativo suplementado com um
aminoácido ou um grupo de aminoácidos.

15 A invenção descrita relata o processo de produção
de asparaginase e a influência do aminoácido na síntese
desta enzima. A principal diferença é a utilização de um
novo microrganismo, a bactéria *Zymomonas mobilis*.

Method for Production of L-Asparaginase

20 Hill, J.M.; Roberts, J.. (J K Wadley and Susie L
Research), US Patent, number: US3616230, 26/10/1971.

Este trabalho relata o processo de produção de L-
asparaginase a partir de diferentes microrganismos e
nutrientes para o meio de cultivo, visando o aumento de
25 produção da enzima. Os microrganismos testados foram
diferentes linhagens de *E. coli*, *Serratia marcescens*,
Bacillus subtilis e *Pseudomonas aeruginosa*.

O microrganismo estudado na invenção ora descrita
para a produção de L-asparaginase é o principal
30 diferencial.

Production of L-Asparaginase

Peterson, R.E.; Ciegler, A. (US Agriculture), US
Patent, number: US3589982, 29/06/1971.

Este trabalho relata o processo de produção de altas quantidades da enzima L-asparaginase por culturas de *Erwinia aroideae* e *Hydrogenomonas eutropha*.

O principal diferencial desta invenção é a utilização de um novo microrganismo, a bactéria *Zymomonas mobilis*, em cultivos simples sem aeração e sem necessidade de controle de pH, para a produção da enzima asparaginase.

Production of Human Asparaginase

Murakami, H.; Shirahata, S. (Japan Synthetic Rubber CO
10 LTDA), Patent number: JP4320684, 11/11/1992.

Este trabalho relata estudos com células humanas, originadas do pulmão, estômago ou mama para a produção de asparaginase humana. O objetivo principal é o de se obter uma asparaginase com menos sintomas alérgicos que os da
15 asparaginase produzida comercialmente, a partir de *E. coli* e *Erwinia caratovora*.

A invenção descrita para a produção de asparaginase utiliza uma bactéria. Contudo, a *Zymomonas mobilis* já tem estudos documentados no tratamento de
20 infecções, o que faz com que a enzima asparaginase produzida possa ter menos efeitos alérgicos em comparação com as enzimas comerciais existentes no mercado.

Process for Manufacture of L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi*

25 Lee, S.; Ross, J.T.; Wroble, M.H. (Department of Health and Human Services), US Patent, number: 4.729.957, 08/03/1988.

Este trabalho registra o processo de recuperação e purificação de L-asparaginase a partir de *Erwinia
30 chrysanthemi*. O autor descreve detalhadamente todo o processo em que a proteína, obtida a partir do extrato de células centrifugadas, é permeabilizada com acetona e purificada a partir de etapas de cromatografia de afinidade

e de troca iônica ou por uma simples separação por cromatografia de afinidade.

A presente invenção realiza estudos de permeabilização das células centrifugadas com lizozima, com
5 CTAB (brometo de cetiltrimetil amônio) e por choque osmótico, avaliando, a partir de testes eletroforéticos e de concentração de proteína pela metodologia de Bradford, o melhor procedimento de permeabilização.

Produção de L-Asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae*:

10 Regulação de Nitrogênio

Oliveira, E.M.M. (Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro), Tese de Mestrado, 1998.

Este trabalho discute a produção de L-
15 asparaginase pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde muitos estudos têm sido realizados por ser um organismo eucarioto e manipulável por quaisquer dos métodos da engenharia genética clássica e molecular. À semelhança do que ocorre em *E. coli*, possuíam dois tipos de L-
20 asparaginase. A Asparaginase I, codificada pelo gene ASP1, é intracelular e de expressão constitutiva. A asparaginase II, codificada pelo gene ASP3, é periplasmática e regulada pelo metabolismo do nitrogênio, sendo expressa em condições de estarvação por nitrogênio.

25 Estudando a influência da regulação do nitrogênio na produção de L-asparaginase por *Saccharomyces cerevisiae* em células mutantes com o plasmídeo contendo o gene URE2 (cepa P40-3C+), a autora observou que, após a incubação em 3% de glicose e ausência de fonte de nitrogênio, a
30 atividade enzimática em células na fase exponencial de crescimento aumenta cerca de 6 vezes ao se utilizar um meio contendo prolina. Os valores de atividade obtidos variaram de 36 UI/g células em peso seco, em células recém colhidas,

a 219 UI/ g células em peso seco, em células mutantes
estavadas para o nitrogênio. A cepa selvagem de
Saccharomyces cerevisiae (D273-10B) em meio contendo
prolina não apresentou atividade asparaginásica. Também foi
5 observado que os níveis de atividade são dependentes da
fonte de nitrogênio presente no meio, uma vez que meios
contendo sulfato de amônio e nitrato de sódio não possuíram
um aumento tão grande na atividade.

A invenção ora proposta mostra que, sem nenhuma
10 técnica de melhoramento genético do microrganismo, o
rendimento de células em enzima é superior à levedura
Saccharomyces cerevisiae.

Pegaspargase: A Review of Clinical Studies

Graham, M.L., *Advanced drug Delivery Reviews*, 1998,
15 vol. 55, pp. 1293-1302.

Este trabalho discute a ação anti-tumoral da L-
asparaginase em diferentes microrganismos. O autor relata
que, tem-se conhecimento desde a década de 60 que algumas
células leucêmicas são deficientes em L-asparagina
20 sintetase, não podendo produzir quantidades suficientes do
aminoácido essencial, L-asparagina, para a manutenção da
viabilidade celular.

Neste trabalho o autor cita que são reconhecidos
2 mecanismos de resistência à L-asparaginase. Em primeiro
25 lugar, um aumento na atividade de asparagina sintetase tem
sido notado no sangue de pacientes com ALL (leucemia
linfocítica aguda) clinicamente resistente à droga. Tal
aumento tem sido observado em células linfomas de ratos,
onde o aumento do RNA mensageiro (bem como os níveis de
30 enzima) para a asparagina sintetase tem sido descrito em
várias linhas celulares. Um segundo possível mecanismo de
resistência à L-asparaginase parece ser o desenvolvimento

asparagina induz a L-asparaginase somente em condições anaeróbias.

Entre as 464 bactérias estudadas, as atividades dessas enzimas ocorreram em muitas bactérias Gram-negativas e em poucas Gram-positivas, observando-se que no gênero *Pseudomonas* as atividades de asparaginase e glutaminase ocorrem simultaneamente e em grande proporção. Nas 261 espécies do gênero *Streptomyces* e *Nocardia* observaram-se atividade de asparaginase e glutaminase apenas quando os organismos foram lisados. Nas 4158 espécies de fungos estudadas, foi observada atividade de asparaginase em todas elas; no entanto, apenas em algumas espécies foi observada a formação de glutaminase. O mesmo ocorre nas 1326 espécies de leveduras analisadas. Contudo, a atividade anti-linfoma foi encontrada apenas nas enzimas da família *Enterobacteriaceae*, fazendo com que as mesmas sejam utilizadas em experimentos clínicos. Os gêneros mais importantes da família *Enterobacteriaceae* são *Escherichia*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Serratia* e *Shigella*, caracterizando-se por serem bastonetes Gram negativos, não esporulados, aeróbios facultativos, capazes de crescerem em meio sintético (nutrientes simples) e fermentarem açúcares produzindo uma variedade de produtos finais.

Production of L-Asparaginase II by *Escherichia coli*

Cedar, H.; Schwartz, J.H., *Journal of Bacteriology*, 1998, vol. 96 (6), pp. 2043-2048.

Este trabalho discute a produção e localização da asparaginase de ação anti-tumoral pela bactéria *E. coli*. Os autores mostram que a asparaginase bacteriana está localizada na célula ou próximo da sua superfície celular, sendo que a enzima só é liberada para o sobrenadante quando as células são submetidas a choque osmótico ou formação de esferoplasto.

Os autores relatam que a glicose pode ser um repressor da síntese da asparaginase, uma vez que grandes quantidades da enzima foram produzidas pela bactéria na ausência de açúcares e presença de grandes quantidades de aminoácidos.

A presente invenção mostra que a asparaginase pode ser produzida pela bactéria *Zymomonas mobilis*.

Studies on Nutritional and Oxygen Requirements for Production of L-Asparaginase by *Enterobacter aerogenes*

Mukherjee, J.; Majumdar, S.; Scheper, T., Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, vol. 53 (2), pp. 180-184.

Este trabalho discute a repressão da síntese de asparaginase pela glicose na bactéria *Enterobacter aerogenes*.

Os autores também relatam que o nitrogênio é o fator limitante para a asparaginase. Afirmam, também, que a glicose é um repressor da síntese de L-asparaginase, identificando as fontes de C e N que mais estimulam a produção da enzima. No cultivo em reator observaram que o O₂ foi o fator limitante para a produção de L-asparaginase.

VANTAGENS DA PRESENTE INVENÇÃO

Como discutido anteriormente, apesar da utilidade terapêutica, o tratamento com as asparaginases existentes no mercado, utilizando *E. coli*, *E. coli* modificada com PEG ou *Erwinia caratovora*, possuem grandes limitações clínicas, que vão de reações alérgicas brandas a choques anafiláticos. Em contraste, tais limitações em *Zymomonas mobilis* têm a possibilidade de não ocorrer, uma vez que o caldo fermentado desta bactéria é utilizado no tratamento de feridas e distúrbios intestinais e ginecológicos no homem (Morais, 1982).

O processo fermentativo com a bactéria *Zymomonas mobilis* tem mostrado que a aeração e agitação não influenciam o crescimento e, conseqüentemente, a produção da enzima. Isto facilita sobremaneira a produção e o
5 controle da operação. Aliado a isto, há a formação de outros subprodutos de interesse comercial, como etanol, sorbitol e ácido glicônico.

A presente invenção é apresentada com o microrganismo em sua forma livre. Técnicas de biologia
10 molecular e de imobilização podem ser aplicadas a este processo, podendo gerar uma produção de enzima muito superior ao obtido no processo ora descrito.

EXEMPLOS

A metodologia empregada nos exemplos será
15 apresentada em três conjuntos principais: microrganismo utilizado, manutenção e fermentação propriamente dita. Desta forma, serão descritos os procedimentos para realização dos experimentos e serão apresentadas receitas típicas das fermentações. Em todos os exemplos a
20 temperatura foi sempre mantida constante e igual a 30°C, sem controle de pH e agitação. A agitação não limita o escopo da invenção, dado que a velocidade de agitação pode ser usada para controlar e influenciar o crescimento, podendo variar na faixa de 100 a 300 rpm, mas rende menores
25 quantidades de enzima. A temperatura não limita o escopo da invenção, podendo variar na faixa de 30 a 37°C. O controle de pH não limita o escopo da invenção, podendo estar na faixa de 5,0 a 6,5.

A) Microrganismo

30 O microrganismo utilizado é a bactéria *Zymomonas mobilis* linhagem CP4 (ATCC 31821), fornecida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de

Pernambuco (UFPE). A linhagem do microrganismo não limita o escopo da invenção.

B) Manutenção da cultura

A manutenção é feita em meio contendo 10 g/L de glicose e 5 g/L de extrato de levedura. As concentrações não limitam o escopo da invenção, podendo variar na faixa de 0,5 a 50% do peso total do meio de cultura. Outros meios de manutenção podem ser utilizados, como a utilização de outra fonte inorgânica como a peptona e associação ou não de aminoácidos. Após a inoculação, as células são incubadas por 12 a 24 horas entre 28 e 35°C e, então, estocadas em geladeira. Para melhor conservação da cultura, repiques são feitos, em média, a cada três meses e, também, mantém-se o microrganismo em placas contendo 10 g/L de glicose, 5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de agar, preferencialmente.

C) Fermentação

A receita do meio de crescimento sintético utilizado nas fermentações é definida na Tabela 1. Em alguns casos, para se avaliar o efeito da fonte de nitrogênio, substitui-se a L-asparagina por sulfato de amônio, peptona e extrato de levedura e/ou por outro aminoácido. Os seus componentes são dissolvidos em água milli-Q e esterilizados separadamente em grupos (sulfatos, fosfatos, cloretos, glicose, L-asparagina, pantotenato e sulfato ferroso) a 121°C por 20 minutos e misturadas a frio, assepticamente. A amostra de sulfato ferroso tem o seu pH ajustado para 3,0 a fim de se evitar a precipitação do mesmo.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,25 mg/L
KCl	8,0 mg/L
NaCl	8,0 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,2 mg/L
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,7 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g/L

FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 mg/L
K ₂ HPO ₄	1,75 g/L
KH ₂ PO ₄	3,5 g/L
Glicose	1 - 50 g/L
L-asparagina	0,5 g/L
Pantotenato de cálcio	10 mg/L

Tabela 1 - Composição do meio sintético de crescimento

A receita da Tabela 1 não limita o escopo da invenção. As concentrações podem variar de 0,2 mg/L a 50 g/L. Outros componentes podem ser utilizados, substituindo as fontes de carbono e nitrogênio, como frutose, sacarose, ácido glucônico, peptona, extrato de levedura e aminoácidos, de 1 a 10% do peso total do meio fermentativo.

A qualidade da água não limita o escopo da invenção, podendo-se utilizar água destilada, deionizada ou até mesmo água potável.

A técnica de esterilização não limita o escopo da invenção, podendo ser efetuada por filtração em membrana, calor úmido ou calor seco.

Os ensaios realizados com *Zymomonas mobilis* foram conduzidos conforme o esquema ilustrado na Figura 2 que representa o esquema de preparo de inóculo e cultivo. A forma de realização dos ensaios não limita o escopo da presente invenção.

Além das análises de atividade de asparaginase, acompanha-se ao longo de todo o crescimento, o pH, a concentração celular, a concentração de glicose, a concentração de asparagina, a concentração de aspartato e a concentração de etanol.

A concentração de células é determinada através da medida de absorvância a 600 nm e convertida para concentração através da curva de calibração obtida por gravimetria (peso seco). A concentração de glicose é determinada no sobrenadante recolhido da centrifugação através do método enzimático-colorimétrico glicose-oxidase-

peroxidase (GOD-POD). As concentrações de asparagina e aspartato são determinadas a partir do método colorimétrico descrito por Sheng *et al.* (1993), modificado para se dosar, simultaneamente, asparagina e aspartato. Um total de 4,5 mL de uma solução 0,05% (peso/volume) de ninhidrina em álcool etílico é misturado a 0,5 mL do sobrenadante recolhido da centrifugação e incubado por 3 horas a 37°C. A amostra é lida por varredura no range de 300 a 600nm, onde o branco é a mistura de água com a solução de ninhidrina em álcool etílico, sob as mesmas condições das amostras. A partir de amostras de concentração conhecida de asparagina e aspartato, é possível estabelecer um sistema com 2 equações e 2 incógnitas, uma vez que a asparagina exibe uma absorvância máxima em 350 nm e o aspartato apresenta espectros máximos de absorvância em a 410 e 570nm. A concentração de etanol é determinada por cromatografia gasosa em um cromatógrafo CG, contendo um detetor de ionização de chama e uma coluna de separação tipo Carbowax-20-M sobre Chromosorb, tendo nitrogênio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detetor são mantidas a 225 °C e a temperatura da coluna em 150°C. O volume da amostra é de 1µL e o tempo de retenção aproximado do etanol nestas condições de operação é de 1 minuto.

A atividade de asparaginase é determinada a partir de células removidas do meio por centrifugação e ressuspensas em igual volume de NaCl 0,85%. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, as células centrifugadas são suspensas em 1,0 mL de tampão tris-HCl 50mM, pH 8,6, e 1,0 mL de L-asparagina 10mM e incubadas a 37°C por 30 minutos. A reação é interrompida adicionando-se 0,1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5M. A amostra é centrifugada e a amônia liberada é determinada por Nesslerização direta, colocando 0,5 mL do clarificado

centrifugado da reação em 7,0 mL de água bidestilada e 1,0 mL do reagente de Nessler, à temperatura ambiente por 10min. A leitura é conduzida em espectrofotômetro a 480nm e a concentração de amônia produzida na reação é determinada com base numa curva padrão previamente obtida, com sulfato de amônia como padrão. Como mencionado anteriormente, uma unidade internacional de L-asparaginase (UI) é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de amônia por minuto a 37°C e pH 8,6 (Mashburn & Wriston, 1963).

10 A execução ou não de monitoramento e as técnicas de monitoramento das variáveis de processo não limitam o escopo da presente invenção.

EXEMPLOS

A Tabela 2 mostra que, resultados típicos de crescimento e rendimento celular para diferentes fontes de nitrogênio que não a asparagina, como o sulfato de amônio e o aspartato. O processo fermentativo é fundamentalmente o mesmo, variando-se apenas a taxa de crescimento específica (μ). Os resultados indicam que a enzima é constitutiva, confirmando que a síntese de asparaginase pela *Z. mobilis* ocorre independentemente da presença do substrato asparagina. Entretanto, apesar de haver produção de asparaginase em meio rico e em meio mínimo com fonte inorgânica de nitrogênio, é o aminoácido o melhor nutriente para a síntese da enzima.

	Exemplo 1 Asparagina	Exemplo 2 Aspartato	Exemplo 3 Sulfato	Exemplo 4 Extrato lêvedo
μ (h^{-1})	0,25	0,26	0,34	0,29
Y_{XS} (g/g)	0,038	0,033	0,041	0,044
Y_{UX} (UI/g)	9,16	11,11	8,63	4,57

Tabela 2 - Principais variáveis do crescimento de *Z. mobilis* em meio mínimo utilizando diferentes fontes de nitrogênio em comparação com o cultivo da bactéria em meio rico.

A Tabela 3 apresenta resultados com diferentes formas de operação e diferentes receitas do meio de fermentação. A Figura 3 apresenta o comportamento cinético do crescimento celular na bactéria *Z. mobilis* em diferentes fontes de nitrogênio.

Os elevados valores de Y_{XS} obtidos nos Exemplos 5 e 8 com 1 g/L de glicose indicam a utilização de uma outra fonte de carbono, possivelmente o aspartato que está sendo gerado durante o crescimento. Com 50 g/L de glicose (Exemplo 7), por haver um exaustão da fonte de nitrogênio, observa-se que não há acúmulo de aspartato e o fator de conversão substrato em células é menor do que o geralmente encontrado na literatura para a bactéria *Zymomonas mobilis*, que está na faixa de 0,03 a 0,04. Ao mesmo tempo, a utilização de uma outra fonte de carbono após o término da glicose, no caso, o aspartato, favorece a síntese de asparaginase da mesma forma que no cultivo de *E. coli* (Cedar e Schwartz, 1968). Experimentos com 0,5 g/L de aspartato como fonte de carbono e 0,5 g/L de asparagina como fonte de nitrogênio (Exemplo 11) apresentaram resultados muito superiores aos máximos obtidos com glicose e asparagina (18,1 UI/g) ou com glicose e aspartato (23,3 UI/g).

	Exemplo 5	Exemplo 6	Exemplo 7	Exemplo 8	Exemplo 9	Exemplo 10	Exemplo 11
	1 g/L Glic + 0,5 g/L Aspn	10 g/L Glic + 0,5 g/L Aspn	50 g/L Glic + 0,5 g/L Aspn	1 g/L Glic + 0,5 g/L Aspt	10 g/L Glic + 0,5 g/L Aspt	10 g/L Glic + 0,5 g/L Sulfato	0,5 g/L Aspt + 0,5 g/L Aspn
Tempo cultivo (h)	30	18	18	33	18	18	33
Fim da fonte C (h)	6	12	não acaba	9	15	9	não acaba
Fim da fonte N (h)	27	12	15	não acaba	15	-	não acaba
μ (h^{-1})	0,20	0,25	0,29	0,23	0,26	0,34	0,05
X final (g/L)	0,115	0,401	0,685	0,145	0,344	0,438	0,134
Y_{XS} (g/g)	0,093	0,038	0,015	0,117	0,033	0,041	0,418
Y_{UX} máx (UI/g)	18,16	9,16	10,83	23,37	11,11	8,63	37,79
Y_{US} fim fonte C	2,99	1,21	0,37	1,57	1,04	0,75	-

(UI/mol C)							
Y_{us} outra fonte C (UI/mol C)	6,74	-	-	13,89	-	-	não acaba
Residual N fim C (g/L)	0,32	0,00	0,00	0,48	0,00	-	não acaba

Tabela 3 - Principais variáveis dos cultivos cinéticos da bactéria *Z. mobilis* em meio sintético, variando-se a concentração e o tipo da fonte de carbono e o tipo da fonte de nitrogênio.

5 Além disso, uma maior quantidade de enzima é formada pelo aminoácido como uma fonte secundária de carbono (Exemplos 5 e 8) do que quando se utiliza apenas a glicose (Exemplos 6, 7, 9 e 11). Considerando que no ensaio com asparagina e aspartato (Exemplo 11) ocorre o término da
10 fonte de carbono, isto é, do aspartato, a conversão de substrato em enzima fica em torno de 18,35 UI/mol de carbono, valor superior aos experimentos utilizando glicose e um dos aminoácidos.

A Tabela 4 apresenta resultados em diferentes
15 fontes de carbono, com realização do cultivo diferente do esquema apresentado na Figura 2, com meio rico enriquecido com peptona, etapa de pré-inóculo em glicose, centrifugação e lavagem de células para a inoculação dos experimentos citados nos Exemplos 12 a 15.

	Exemplo 12 Glicose	Exemplo 13 Frutose	Exemplo 14 Ác. Glucônico	Exemplo 15 Sacarose
Tempo cultivo (h)	20	20	20	20
Fase estacionária (h)	16	19	12	9
μ (h^{-1})	0,30	0,25	0,28	0,28
X final (g/L)	0,39	0,35	0,16	0,11
Y_{XS} (g / g)	0,039	0,034	0,015	0,009
Y_{UX} final expon (UI/g)	5,21	4,61	2,57	0,00
Y_{us} fonte C (UI/mol C)	0,10	0,09	0,11	0,00

20 Tabela 4 - Principais variáveis dos cultivos cinéticos da bactéria *Z. mobilis* em diferentes fontes de carbono.

Estudos de eletroforese em gel SDS-PAGE, tendo como comparativo a asparaginase comercial de *E. coli*

(Elspar[®]), e a utilização de diferentes técnicas de rompimento celular mostraram, juntamente com a determinação da atividade de asparaginase a partir em células de *Z. mobilis*, que a enzima está localizada no periplasma da
5 célula.

A Figura 4 mostra uma eletroforese em gel SDS-PAGE, utilizando-se diferentes técnicas de permeabilização das células obtidas do processo fermentativo. O quadro marca a banda onde aparece a enzima asparaginase comercial
10 de *E. coli*, obtida do medicamento Elspar[®].

A taxa específica de consumo de asparagina, considerada como sendo responsável pela remoção de nitrogênio em forma de amônia na molécula de asparagina, gerou um valor de K_M para esta enzima a partir dos
15 experimentos realizados é em torno de $1,89 \times 10^{-4}$ M, valor este próximo ao K_M da L-asparaginase II de *Escherichia coli*, indicando que além de estar no periplasma da célula e ter afinidade pelo substrato L-asparagina, possui uma alta afinidade pelo substrato e pode ser ativa contra o
20 crescimento do tumor.

REIVINDICAÇÕES

1- "Processo de Produção de Asparaginase pela Bactéria *Zymomonas mobilis*" caracterizado pela formação da enzima em meio fermentativo.

5 2- "Processo" de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo uso de um ou mais tipos de meio de cultivo, visando a otimização da produção da enzima.

3- "Processo" de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pela formação da enzima a partir da liberação de amônia no meio de cultivo e formação de aspartato a partir da asparagina.

4- "Processo" de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelas etapas de (1) pré-inoculação para ativação das células; (2) inoculação para estabilização das células; (3) processo fermentativo.

5 - "Processo" de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pela detecção de asparaginase em células livres e imobilizadas.

6- "Processo" de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado pela detecção de asparaginase nas células a partir da análise de atividade e determinação da quantidade de amônia liberada na reação.

7- "Processo" de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo uso de diversas fontes de carbono, preferencialmente a glicose, nas concentrações de 1 a 50 g/L.

8- "Processo" de acordo com as reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo uso de diversas fontes de nitrogênio, orgânicas e inorgânicas, preferencialmente aminoácidos e peptona, associados ou não, nas concentrações de 0,1 a 35% do peso total do meio fermentativo.

9- "Processo" de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo uso de diversos oligoelementos,

preferencialmente pantotenato de cálcio, cloretos, fosfatos e sulfatos, nas concentrações de 0,2 mg/L a 4 g/L.

10- "**Processo**" de acordo com as reivindicações 1 a 9, caracterizado pela realização da fermentação em diferentes temperaturas, preferencialmente na faixa de 30 a 37°C.

11- "**Processo**" de acordo com as reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo uso de diferentes formas de operação, como batelada, batelada alimentada e contínua com e sem reciclo celular, visando o aumento de produtividade da enzima asparaginase.

12- "**Processo**" de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizado pela fermentação em diferentes pH's, preferencialmente sem a necessidade de controle do pH do meio ao longo do cultivo e/ou crescimento, na faixa de 5,0 a 6,5.

13- "**Processo**" de acordo com as reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo controle ou não da velocidade de agitação, onde o processo sem agitação consegue fornecer uma maior produção da enzima.

14- "**Processo**" de acordo com as reivindicações 1 a 13, caracterizado pela modificação do meio de cultivo, preferencialmente a fonte de nitrogênio, fazendo-se uma associação de aminoácidos com fontes inorgânicas, principalmente peptona e extrato de levedura.

15- "**Processo**" de acordo com as reivindicações 1 a 14, caracterizado por ensaios de concentração e purificação do caldo fermentativo, modificado ou não, utilizando, por exemplo, técnicas de centrifugação, liofilização, precipitação e cromatografia.

16- "**Processo**" de acordo com as reivindicações 1 a 15, caracterizado pela obtenção da enzima purificada,

utilizando-se, por exemplo, técnicas de precipitação, extração e cromatografia.

17- "Processo" de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado por ensaios de permeabilização das células e eletroforese de proteínas, tendo como comparativo a enzima comercial, o medicamento Elspar®.

18- "Enzima" produzida de acordo com as reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo ensaio de eletroforese, que pode ser comparada à enzima comercial de ação antitumoral, L-asparaginase II, pela grande afinidade por L-asparagina e baixo valor da constante cinética de Michaelis-Menten.

19- "Uso" do produto resultante do processo, de acordo com as reivindicações 1 a 18, para o tratamento de doenças no homem, caracterizado pelo uso de uma enzima com menores efeitos colaterais.

20- "Uso", de acordo com a reivindicação 19, do caldo fermentativo resultante do processo para o tratamento de doenças no homem, caracterizado pelo uso de uma enzima com menores efeitos colaterais.

21- "Uso", de acordo com as reivindicações 19 a 20, do concentrado celular resultante do processo para o tratamento de doenças no homem, caracterizado pelo uso de uma enzima com menores efeitos colaterais.

22- "Uso" de acordo com as reivindicações 19 a 21, da massa seca resultante do processo para o tratamento de doenças no homem, caracterizado pelo uso de uma enzima com menores efeitos colaterais.

23- "Uso" de acordo com as reivindicações 19 a 22, da enzima purificada resultante do processo para o tratamento de doenças no homem, caracterizado pelo uso de uma enzima com menores efeitos colaterais.

24- "Uso" de acordo com as reivindicações 19 a 23, do caldo fermentado, do concentrado de células, da massa seca ou da enzima purificada resultante do processo no tratamento de doenças, caracterizado pelo uso de uma 5 enzima que reduz crescimento e a atividade de células malignas.

25- "Uso" de acordo com as reivindicações 19 a 24, do caldo fermentado, do concentrado de células, da massa seca ou da enzima purificada resultante do processo 10 no tratamento de doenças, caracterizado pelo uso de uma enzima eficaz para o tratamento de leucemia, principalmente a leucemia linfocítica aguda em crianças.

FIGURAS

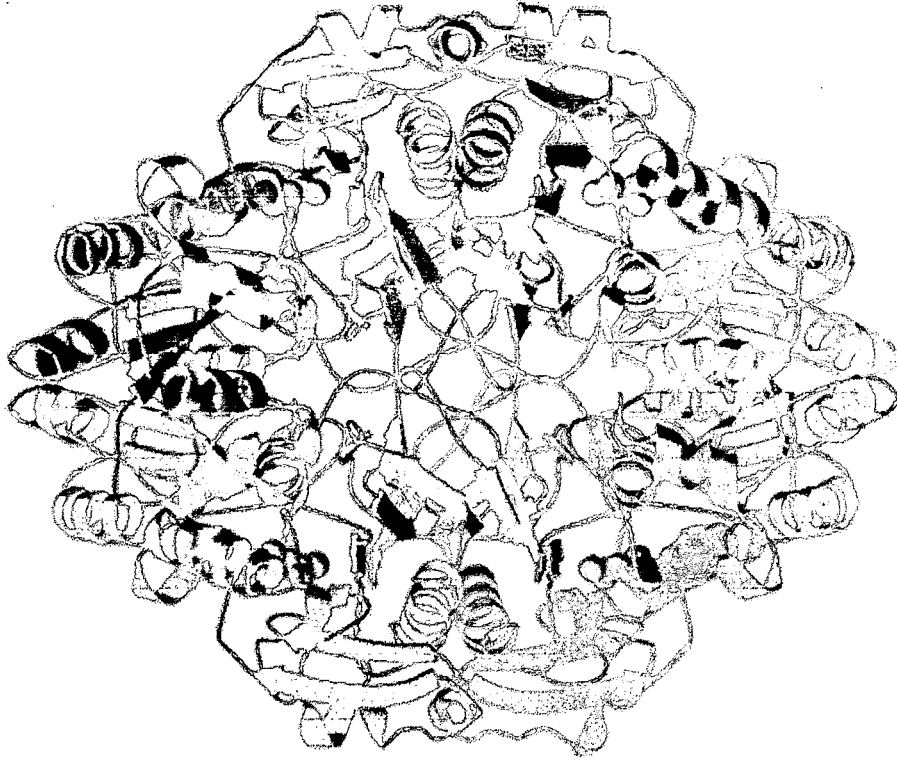


Figura 1

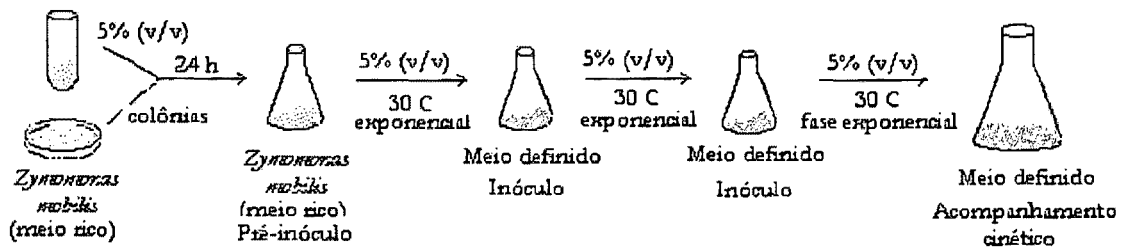


Figura 2

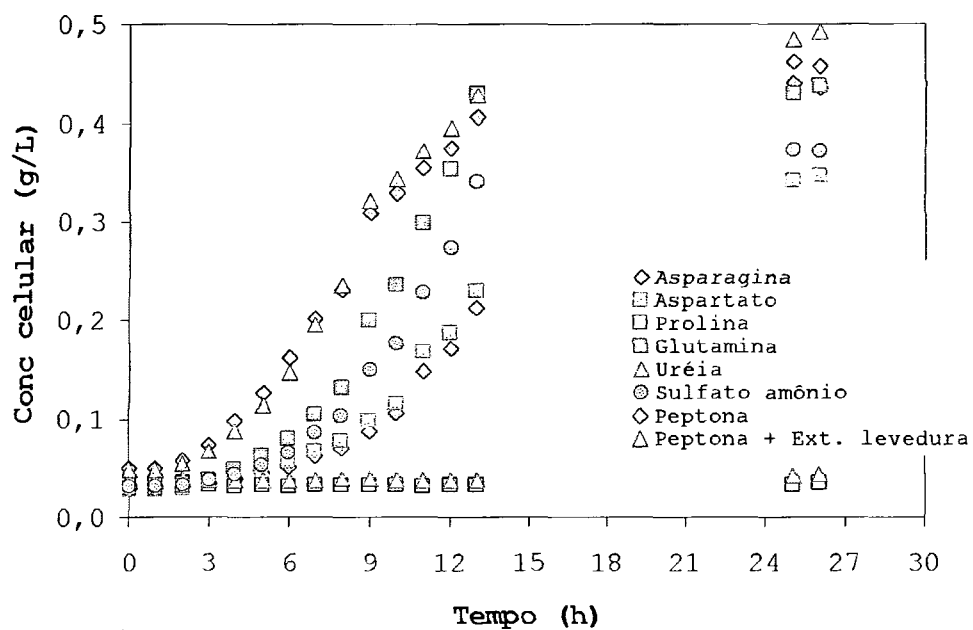


Figura 3

1	2	3	4	5	6	7	8	
								1- sobrenadante de <i>Zymomonas</i> após permeabilização com CTAB
								2 - Elspar
								3- células de <i>Zymomonas</i> permeabilizadas com CTAB
								4 - células de <i>Zymomonas</i> permeabilizadas com lisozima
								5 - sobrenadante de <i>Zymomonas</i> após permeabilização com lisozima
								6 - Elspar
								7- células de <i>Zymomonas</i> permeabilizadas com CTAB
								8 - células de <i>Zymomonas</i> permeabilizadas com lisozima

Figura 4

RESUMO

Patente de Invenção para "Processo de Produção de Asparaginase pela Bactéria *Zymomonas mobilis* e Uso do Caldo Fermentativo e/ou da Enzima Purificada no Tratamento de Doenças".

A presente invenção refere-se ao processo de obtenção da enzima L-asparaginase II pela bactéria *Zymomonas mobilis*. O processo de produção consiste no crescimento da bactéria em um meio fermentativo, com diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. Utilizando-se o substrato L-asparagina como fonte de nitrogênio, observa-se a produção enzima asparaginase a partir da formação do aspartato e da liberação de amônia. Experimentos realizados em meio sintético sem asparagina e em meio contendo apenas glicose e extrato de levedura também resultaram na formação da enzima, mostrando que a mesma é constitutiva e que pode ser produzida em diferentes meios e condições de fermentação. Além disso, devido aos efeitos colaterais relacionados às asparaginases comerciais, a formação de asparaginase a partir da bactéria *Zymomonas mobilis*, mesmo com uma produtividade menor, tem a vantagem de que o caldo fermentativo deste microrganismo já é utilizado no tratamento de doenças.