



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CAMPUS ARAPIRACA
COMPLEXO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E ENFERMAGEM - CCME
MEDICINA - BACHARELADO

LAISSA INACIO DA SILVA
ARTHUR FELIX SILVA DA ROCHA

**L-ASPARAGINASE, UM PROTÓTIPO DE FÁRMACO UTILIZADO NO
TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA, PRODUZIDA POR
BACTÉRIAS: PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

ARAPIRACA

2023

Laissa Inacio da Silva

Arthur Felix Silva da Rocha

L-asparaginase, um protótipo de fármaco utilizado no tratamento de leucemia
linfoblástica aguda, produzida por bactérias: prospecção tecnológica

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado à Universidade Federal de
Alagoas *Campus* Arapiraca, como requisito
curricular indispensável para a integralização
do Curso de Bacharelado em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Alysson Wagner F. Duarte

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Cavalcanti de
Queiroz

Arapiraca

2023



Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Campus Arapiraca
Biblioteca Setorial *Campus Arapiraca* - BSCA

S586l Silva, Laissa Inacio da
L-asparaginase, um protótipo de fármaco utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, produzida por bactérias [recurso eletrônico]: prospecção tecnológica / Laissa Inacio da Silva, Arthur Felix Silva da Rocha. – Arapiraca, 2023.
48 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Cavalcanti de Queiroz.
Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina) – Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, Arapiraca, 2023.
Disponível em: Universidade Digital (UD) – UFAL (*Campus Arapiraca*).
Referências: p. 42-48.

1. Enzimas. 2. Patentes. 3. L-asparaginase. 4. Quimioterápico. 5. Leucemia linfoblástica aguda. 6. Inovação tecnológica. I. Rocha, Arthur Felix Silva da. II. Duarte, Alysson Wagner Fernandes. III. Queiroz, Aline Cavalcanti de. IV. Título.

CDU 61

Laissa Inacio da Silva

Arthur Felix Silva da Rocha

L-asparaginase, um protótipo de fármaco utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, produzida por bactérias: prospecção tecnológica

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Universidade Federal de Alagoas *Campus Arapiraca*, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Bacharelado em Medicina.

Data de aprovação: 04/10/2023.

Banca Examinadora



Documento assinado digitalmente
ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE
Data: 10/10/2023 12:03:06-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte
Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Campus Arapiraca
(Orientador)



Documento assinado digitalmente
THAYSA KELLY BARBOSA VIEIRA TOME
Data: 20/10/2023 06:55:14-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Ma. Thaysa Kelly Barbosa Vieira Tomé
Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Campus Arapiraca
(Examinador)



Documento assinado digitalmente
AVERLANE VIEIRA DA SILVA
Data: 10/10/2023 15:17:35-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Me. Averlane Vieira da Silva
Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Campus Arapiraca
(Examinador)

RESUMO

INTRODUÇÃO: A utilização da enzima L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, L-Asnase) no tratamento da leucemia linfoblástica aguda tem exibido resultados excelentes e bem estabelecidos com enzimas de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, é comum a ocorrência de efeitos colaterais, como hipersensibilidade e imunogenicidade, devido às diferenças moleculares entre a forma enzimática bacteriana e a enzima endógena humana. Portanto, a busca por outros subtipos que facilitem a aplicação e com menores efeitos adversos é uma demanda eminente. **OBJETIVO:** realizar uma prospecção tecnológica sobre novas fontes de L-ASNases proveniente de bactérias no tratamento da leucemia linfoblástica aguda. **METODOLOGIA:** análise de documentos de patentes depositados no período entre 2017 e 2023 nas bases de dados do INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil), *The LENS*, WIPO (*World Intellectual Property Organization*) e EPO (*European Patent Office*) por meio de combinação “Bacteria AND L-asparaginase AND acute lymphoblastic leukemia” resultou em 8192 patentes, com 5080 após a exclusão dos documentos duplicados e apenas 28 foram elegíveis após a aplicação dos critérios de inclusão. **RESULTADOS:** diversas espécies bacterianas foram investigadas, incluindo espécies mesófilas e extremófilas. A pesquisa revelou que a criação de mutantes de L-ASNase expressa maior eficácia terapêutica, ao empregar técnicas como mutagênese dirigida, recombinação genômica e peguilação de proteínas. **CONCLUSÃO:** múltiplas espécies bacterianas foram exploradas para produção de L-Asnase, ocorrendo inovação notável em espécies particulares e pioneiras na produção, com ênfase para a pesquisa com isolados de bactérias termofílicas. A modificação genética aprimora a atividade e estabilidade das enzimas, enquanto a tendência se concentra em melhorar enzimas existentes em vez de descobrir novas, dada sua eficiência versátil em aplicações industriais, médicas e ambientais.

Palavras-chave: L-asparaginase; enzima; quimioterápico; leucemia linfoblástica aguda; patentes; inovação tecnológica.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The use of the enzyme L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, L-Asnase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia has excellent and well-established results with enzymes from *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. However, side effects such as hypersensitivity and immunogenicity are common due to molecular differences between the bacterial enzyme form and the human endogenous enzyme. Therefore, the search for other subtypes that facilitate application and with fewer adverse effects is an imminent demand. **OBJECTIVE:** to carry out technological exploration into new sources of L-ASNases from bacteria in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **METHODOLOGY:** analysis of patent documents deposited in the period between 2017 and 2023 in the databases of INPI (Brazilian National Institute of Industrial Property), The LENS, WIPO (World Intellectual Property Organization) and EPO (European Patent Office) through combination “Bacteria AND L-asparaginase AND acute lymphoblastic leukemia” proven in 8192 patents, with 5080 after exclusion of duplicate documents and only 28 were eligible after applying the inclusion criteria. **RESULTS:** several bacterial species were investigated, including mesophilic and extremophilic species. Research has revealed that the creation of L-ASNase mutants expresses greater therapeutic efficacy, when employing techniques such as directed mutagenesis, genomic recombination, and protein manipulation. **CONCLUSION:** multiple bacterial species were explored to produce L-Asnase, with notable innovations occurring in particular species and pioneers in production, with an emphasis on research with isolates of thermophilic bacteria. Genetic modification improves the activity and stability of enzymes, while the trend focuses on improving existing enzymes rather than discovering new ones, given their applied efficiency in industrial, medical and environmental applications.

Keywords: L-asparaginase; enzyme; chemotherapy; acute lymphocytic leukemia; technological innovation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma de pesquisa e seleção dos documentos de patentes.....	16
Figura 2 - Distribuição temporal dos documentos de patentes.....	19
Figura 3 - Distribuição geográfica dos documentos de patentes depositados.....	20
Figura 4 - Principais códigos da Classificação Internacional de Patentes (CIP)	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Combinação de descritores utilizados na busca nas diferentes bases patentárias.....	14
Tabela 2 - Número de patentes encontradas nas bases de dados.	15
Tabela 3 - Relação de patentes encontradas a respeito do tratamento de leucemia linfoblástica aguda com L-ASNases nativas de bactérias	17
Tabela 4 - Relação de depositantes e quantidades de patentes registradas	22
Tabela 5 - Principais microrganismos utilizados nos documentos de patentes e pH e temperaturas ótimas de cultivo das enzimas reportadas.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEP	Asparagina endopeptidase
CIP	Código Internacional de Patentes
CHC	Carcinoma hepatocelular
CTSB	Catepsina B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPO	<i>European Patent Office</i>
EUA	Estados Unidos da América
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil
L-ASNase	L-asparaginase
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Peguilado
Ph	Cromossomo Filadélfia
PhD	<i>Doctor of Philosophy</i>
RBCs	<i>Encapsulation in red blood cells</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SaLA	Salinispirillum asparaginase
TRAIL	Indução de apoptose relacionado ao tumor
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1	ANÁLISE DESCRITIVA DAS PATENTES.....	19
4.1.1	Distribuição Temporal dos Documentos de Patentes.....	19
4.1.2	Distribuição Geográfica dos Documentos de Patentes	19
4.1.3	Principais Códigos da Classificação Internacional de Patentes (CIP)	21
4.3	PRINCIPAIS DEPOSITANTES DE PATENTES.....	22
4.4	ESPÉCIES BACTERIANAS UTILIZADAS E RESULTADOS PROMISSORES COMO BIOFÁRMACOS	23
4.5	INOVAÇÕES ASSOCIADAS À APLICAÇÃO DA L-ASNASE DE ORIGEM BACTERIANA, DESTACADAS POR MEIO DE REGISTROS DE PROPRIEDADE INTELECTUAL.....	27
4.5.1	Engenharia Enzimática de L-Asnase em Diferentes Cepas Hospedeiras: Estudos e Aplicações	27
4.5.2	L-ASNases Livres de Endotoxinas: Métodos de Purificação e Estabilização Enzimática.....	33
4.5.3	L-ASNase protease-resistente e Técnica de Encapsulamento em Eritrócitos	35
4.5.4	Bactérias Recombinantes Invasivas como Vetores de Entrega de Agentes Terapêuticos.....	36
4.6	PESQUISAS COM MICRORGANISMOS EXTREMÓFILOS.....	37
5	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, L-ASNase) é uma enzima que catalisa a reação de desaminação da L-asparagina em aminoácido aspartato e amônia, sendo amplamente encontrada em diversos tipos de células eucarióticas e procarióticas (CHAND; MAHAJAN; PRASAD. 2020). Na conversão de L-asparagina em ácido aspártico, por meio da atividade da L-ASNase no plasma, a L-asparagina é depletada e resulta na inibição da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), levando a apoptose celular de células neoplásicas. Considerando as propriedades especiais desta enzima no tratamento do câncer, a L-ASNase foi introduzida no final da década de 1970, como uma droga anticâncer na quimioterapia da leucemia linfoblástica aguda (MORTAZAVI. *et al.* 2019). No Brasil, sua introdução só viria a ocorrer pelo Ministério da Saúde em 2011, mesmo que já tenha sido aplicado por hospitais antes desse período, utilizado também no tratamento de outras formas de câncer: doença de Hodgkin, linfossarcoma, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica crônica, reticulossarcoma e melanossarcoma (LOPES *et al.*, 2015).

As leucemias são alterações da série branca que se traduzem na proliferação de leucócitos malignos na medula óssea, que podem invadir o sangue periférico e infiltrar-se em outros órgãos (MATIAS; MATIAS. 2019). A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia maligna das células precursoras linfóides, caracterizada pela proliferação medular excessiva de destas células, atingindo mais frequentemente a linhagem de células B (MATIAS; MATIAS. 2019). A LLA, que é o foco do tratamento com a L-ASNase, é a neoplasia maligna infantil mais comum, representando 25% de todos os cânceres infantis, se apresentando com bom prognóstico nessa faixa etária, ao contrário de quando atinge adultos e idosos (NIGRO. 2013).

A L-ASNase tem um papel fisiológico vital nos seres humanos por atuar na síntese de metionina, treonina e lisina, além de atuar no catabolismo de aminoácidos, principalmente na produção do aspartato (NADEEM. *et al.*, 2020). A administração parenteral de asparaginase resulta em desaminação rápida e completa do aminoácido asparagina e, em menor extensão, da glutamina, levando à depleção de asparagina, especialmente no plasma e, em parte, no líquido cefalorraquidiano (LCR) (PIETERS; HUNGER; BOOS. 2011). Dessa forma, a L-ASNase explora a alta demanda das células de leucemia por asparagina, esgotando o *pool* circulante de asparagina do

soro sanguíneo. A depleção dos *pools* circulantes de asparagina do soro sanguíneo resulta na morte das células leucêmicas por apoptose (ALI; NAVEED; ULLAH. 2016).

Pela facilidade de manipulação, diversidade de opções, possibilidade de melhoramento genético e uso na indústria, a L- asparaginase bacteriana tem sido amplamente utilizada. Por isso, foram relatados dois tipos de L-ASNase de origem bacteriana: As enzimas do Tipo 1, expressas no citoplasma e hidrolisam tanto a asparagina quanto a glutamina. A L-ASNase do Tipo 2, expressas no periplasma e requerem um ambiente anaeróbico para sua expressão, têm alta afinidade pela L- asparagina o que potencializa a seu uso como fármaco (ALI; NAVEED; ULLAH. 2016). As L-ASNase do tipo 2 são as produzidas a partir da *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. Comercialmente, três tipos principais de L-ASNase têm sido utilizadas, a saber:

- i) Enzima nativa de *E. coli* (*E. coli* asparaginase);
- ii) Uma forma peguilada de *E. coli* asparaginase nativa (polietilenoglicol [PEG]-asparaginase)
- iii) E L-Asnase isolada de *E. chrysanthemi*, referida como *Erwinia* asparaginase.

É importante notar que algumas dessas preparações estão mais disponíveis em um ou outro país, dependendo da disponibilidade e produção local (PIETERS; HUNGER; BOOS. 2011). Porém, o uso de L-ASNase bacteriana tem sido associado a efeitos colaterais bem caracterizados, como as reações de hipersensibilidade e imunogenicidade, pelas diferenças com a L-ASNase humana. Reações de hipersensibilidade, devido a produção de anticorpos anti-asparaginase foram observados em até 60% dos pacientes em algum momento durante a terapia com asparaginase de *E. coli*. O desenvolvimento desses anticorpos parece ser mais comumente observado com *E. coli* asparaginase comparada com a enzima peguilada, que por sua vez, possui meia-vida mais longa. Os sintomas de hipersensibilidade clínica incluem dor, edema, edema de Quincke, urticária, eritema, erupção cutânea, prurido e anafilaxia (PIETERS; HUNGER; BOOS. 2011).

A via de administração determina os sintomas clínicos, com maior incidência de reações cutâneas graves observadas com a administração intramuscular em relação a administração intravenosa (PIETERS; HUNGER; BOOS. 2011). A L-

ASNase nativa da *E. coli* é administrada via intramuscular. Já a forma peguilhada – que é uma enzima purificada pelo processo de conjugação a um polietilenoglicol – pode ser administrada via intravenosa, sendo mais conveniente e menos dolorosa do que a injeção intramuscular (PLACE; STEVENSON; VROOMAN. 2015). A forma peguilhada também inibe a depuração precoce no plasma, aumentando a meia-vida do fármaco e diminuindo a necessidade de múltiplas administrações (ALI; NAVEED; ULLAH. 2016).

Utilizados desde a década de 1960, os atuais regimes de tratamento da LLA juvenil empregando asparaginase, usado como agente quimioterápico em combinação com vincristina e um glicocorticóide, usualmente a dexametasona, apresentam uma taxa de sucesso de 92% de sobrevida em 5 anos (VIMAL, 2017). Acredita-se que os 8% de pacientes que não respondem positivamente à asparaginase deve-se à reações de hipersensibilidade e reações anafiláticas ao seu uso (PIERCE; CROW, 2018).

A L-ASNase nativa da *E. coli* foi inicialmente comercializada como *Elspar*® nos Estados Unidos ou como *Kidrolase*® e *L-asparaginase Medac*® na Europa ao longo da década de 1970. As L-ASNases isoladas da *E. chrysanthemi*, denominada *crisantaspase*, foram comercializadas como *Erwinase*® (PINE; GURSAHANI, 2019). Entretanto, seu uso é limitado devido aos altos custos monetários e potência inexplorada contra outras doenças. O custo total estimado do tratamento da LLA usando L-ASNases peguilhadas é US\$ 57.893 enquanto o tratamento usando *Dickeya* (*Erwinia*) asparaginase é ainda mais caro, ou seja, US\$ 113.558 (VIMAL; KUMAR, 2017). No Brasil o custo médio do tratamento via governo federal: com leuginase/Beiijing US\$ 798, com asparaginase/Medac US\$ 12.225,57, e com PEG-asparaginase/Oncaspar é de US\$ 34.001,1 (BRASIL, 2023).

Entretanto, é necessário levar em conta diversos elementos na produção industrial de L-ASNases, com o intuito de alcançar um processo mais eficiente em termos de rendimento e viabilidade econômica. O tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH, aeração, temperatura, tempo de fermentação e o agente microbiano utilizados influenciam no processo e resultados desejados (CACHUMBA; ANTUNES; PERES. 2016). Por todos os fatores explicitados, há uma necessidade de novas e robustas L-ASNases, de novos microrganismos, com novas disposições moleculares, que apresentem estabilidade melhorada, menor atividade de glutaminase, baixos *K_m* e alta afinidade de substrato para uso terapêutico. As

enzimas utilizadas hoje em dia apresentam desvantagens por apresentarem baixa especificidade de substrato e alta atividade de glutaminase, podendo causar problemas como disfunção hepática, pancreatite, leucopenia, disfunção neurológica e irregularidades na coagulação que levam à trombose ou hemorragia intracraniana (ALRUMMAN. *et al.* 2019). Além de que, a rápida progressão da LLA, em combinação com o grau de imaturidade das células tumorais, exige a necessidade de intervenção terapêutica imediata, especialmente em adultos e idosos diagnosticados com esta neoplasia, dado que são os que possuem pior prognóstico (MATIAS; MATIAS. 2019). Assim, a pergunta que norteia essa pesquisa é: existem documentos patentários que reportam novas fontes de L-ASNases para aplicação humana e com menor efeito adverso?

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma prospecção tecnológica sobre novas fontes de L-ASNases proveniente de bactérias, visando menores reações de hipersensibilidade e imunogenicidade e maior estabilidade do biofármaco para utilização farmacêutica no tratamento da leucemia linfoblástica aguda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a quantidade de patentes por banco de dados patentário;
- Definir a distribuição temporal e territorial de posse das patentes;
- Verificar os principais depositantes e inventores envolvidos no desenvolvimento patentário sobre a L-ASNase;
- Identificar as principais espécies produtoras e com maior semelhança com a variante humana;
- Descrever as novidades na produção e melhoramento da L-ASNase e informações sobre a descoberta de espécies de interesse clínico para o tratamento da LLA;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A prospecção tecnológica foi realizada em etapas: a escolha de palavras-chave e a abrangência da pesquisa, a busca em bases de dados e concessões, a leitura e seleção de patentes, a tabulação de informações e a sua organização e, enfim, a escrita dos resultados.

Para conduzir a presente pesquisa, utilizou-se o método de busca textual que consiste em empregar combinações de palavras-chave para examinar dados bibliográficos, resumos, descrições e, posteriormente, as patentes completas. A escolha das palavras-chave foi realizada visando restringir os resultados, aumentar a especificidade da pesquisa e reduzir os vieses de publicação, considerando o avultado número e heterogeneidade entre os títulos, o que dificultaria a triagem e seleção dos estudos (BRANDAU; MONTEIRO; BRAILE, 2005). Para a solução do problema, optou-se pela utilização do operador booleano "AND", devido à sua capacidade de abranger e especificar a pesquisa, sendo o método mais adequado para classificação dos termos e prevenção de perdas de patentes (Tabela 1). Também foi aplicado um filtro temporal durante a pesquisa, compreendido entre 01 de janeiro de 2017 até 20 de junho de 2023.

Tabela 1 - Combinação de descritores utilizados na busca nas diferentes bases patentárias

Combinações de palavras-chave
Bacteria AND Asparaginase AND Leukemia
Bacteria AND Asparaginase AND Leukemia Biphenotypic Acute
Bacteria AND L-Asparaginase AND Acute Lymphoblastic Leukemia
Bacteria AND L- Asparaginase AND Acute Lymphocytic Leukemia
Bacteria AND L-Asparaginase AND Acute AND Lymphoblastic AND Leukemia

Fonte: Os autores (2023).

A pesquisa realizada utilizou bases de dados e concessões divulgadas nas bases tecnológicas: Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil – INPI (<https://www.gov.br/inpi/pt-br>) e nas bases internacionais, *The LENS* (<https://www.lens.org/>), *World Intellectual Property Organization* – WIPO (<https://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf>) e *European Patent Office* – EPO (<https://worldwide.espacenet.com>) (Tabela 2). Com a pesquisa, verificou-se que as

palavras-chave que satisfaziam os objetivos da pesquisa foi a combinação “**Bacteria AND L-asparaginase AND acute lymphoblastic leukemia**”, pesquisadas em todas as bases acima citadas. Com a análise inicial das patentes, foi excluída a base Google patents pela inespecificidade da busca e desarranjo dos resultados.

Tabela 2 - Número de patentes encontradas nas bases de dados

Bases de dados	N.º de patentes encontradas
Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil – INPI	1
The LENS	5531
World Intellectual Property Organization – WIPO	1709
European Patent Office – EPO	951

Fonte: Os autores (2023).

Os resultados obtidos foram organizados em tabelas, posteriormente analisados e agrupados de acordo com os objetivos da pesquisa. A seleção dos documentos foi realizada manualmente, utilizando como filtro a identificação de patentes relacionadas às palavras-chave e aos objetivos do estudo.

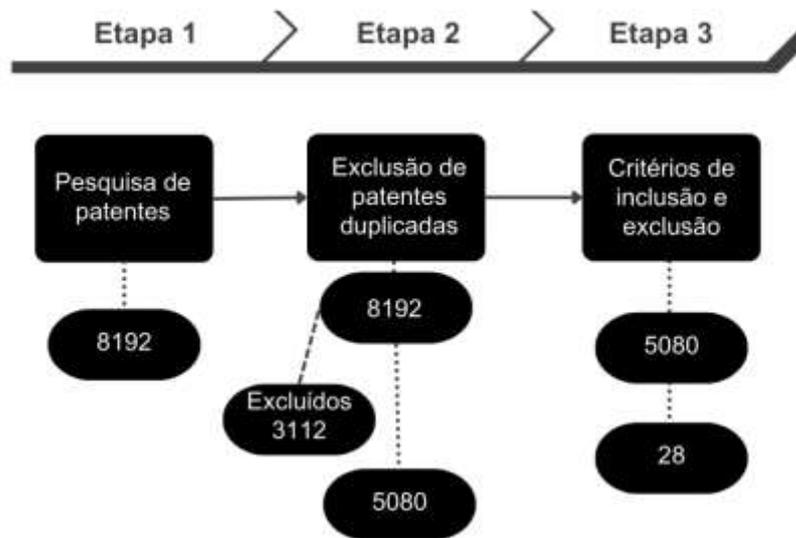
Nesta prospecção, realizamos um estudo por meio da coleta, processamento e análise das informações obtidas das patentes identificadas, sendo utilizados critérios de inclusão e de exclusão na análise dos documentos selecionados nas bases de dados utilizadas. Foram incluídas as patentes que desenvolviam métodos, composições e aplicações para a produção, atividade e estabilidade enzimática de L-ASNases produzidas por meio de bactérias, bem como aquelas que versavam das reduções de imunogenicidade, produção de endotoxinas e atividade de L-glutaminase. Também se utilizou como critério de inclusão o status da aplicação patentária, sendo consideradas aquelas apontadas como depositadas, aplicadas ou concedidas, considerando a patente mais recente da família de patentes. Foram excluídas as patentes duplicadas e aquelas que eram irrelevantes para a presente pesquisa, como também as que observavam métodos diversos para o tratamento da leucemia linfocítica aguda além da utilização de L-ASNases para a depleção de aspartato.

Além da análise da distribuição do número de patentes nas diferentes bases de dados, foram avaliados indicadores como o número de patentes registradas anualmente, sua distribuição geográfica por país, os principais requerentes e inventores envolvidos. Também foi realizada uma avaliação das Classificações

Internacionais de Patentes (CIPs) presentes em cada documento, sendo listadas as subclasses e grupos mais frequentes identificados.

Durante a etapa inicial do estudo, os descritores mencionados na tabela 1 foram empregados para conduzir uma investigação mais ampla sobre a L-ASNase bacteriana e as patentes com inovações disponíveis nos últimos 6 anos. Por meio da consideração dos descritores e combinações predeterminadas, 28 registros de patentes foram identificados (Figura 1, Tabela 3).

Figura 1- Fluxograma de pesquisa e seleção dos documentos de patentes.



Fonte: Os autores (2023).

Tabela 3 - Relação de patentes encontradas a respeito do tratamento de leucemia linfoblástica aguda com L-ASNases nativas de bactérias

Título	IPC	País	Códigos	Inventores	Publicação	Referência
Modified Tsa Gene Encoding the Thermostable L-asparaginase From Thermococcus Sibiricus Archaea, Recombinant Escherichia Coli Strain - Thermostable L-asparaginase Producer and Method for Purification of This Enzyme	A23L; C11B	RU	RU0002794225	Dumina Mariia Vladimirovna; Zhgun Aleksandr Aleksandrovich; Aleksandrova Svetlana Serebedzhanovna; Pokrovskaja Marina Vladimirovna; Sokolov Nikolai Nikolaevich; Zhdanov Dmitrii Dmitrievich.	2023	(VLADIMIROVNA <i>et al.</i> , 2023)
Obtaining L-asparaginase II (gkasn) Enzyme from Geobacillus Kaustophilus Dsm 7263t	C12N	TR	WO/2023/107054	Fatma Inci Ozdemir	2023	(OZDEMIR, 2023)
Formulations of Polyalkylene Oxide-Asparaginase and Methods of Making and Using the Same	A61K; A61P	UK	EP4019007A1	Fornasini, Gianfranco; Soukhareva, Nadejda; Phillips, Christopher	2022	(FORNASINI, SOUKHAREVA, PHILLIPS 2022)
Dosing Of Recombinant L-asparaginase	A61K; A61P	IE	WO2022211829	Choi, Mi Rim; Lin, Tong; Silverman, Jeffrey	2022	(CHOI; LIN; SILVERMAN, 2022)
Bacterial Vehicle for Engineering of Non-phagocytic Immune Cells	A61K; A61P	DK	WO2022008550	Scott Quainoo; Morten Otto Alexander Sommer; Sarah Aparecida Soares	2022	(QUAINOO; SOMMER; SOARES, 2022)
Modified L-asparaginase	A61K; C07K; C12N	IE	US2022056430A1	Friedrich, Lars; O'donnell Anne	2022	(FRIEDRICH, O'DONNELL. 2022)
L-asparaginase Mutant and Expression Thereof in Bacillus Subtilis	A23L; C12N; C12R	CN	CN112941059A	Rao, Zhiming; Zhang, Xian; Zhu, Manchi; Wang, Zhi; Yang, Taowei; Xu, Meijuan; Shao, Minglong	2022	(RAO <i>et al.</i> , 2022)
Asparaginase Mutant and Gene, Engineering Bacterium and Preparation Method Thereof	C12N; C12R	CN	CN113604457A	Liu, Yihan; Kang, Hongwei; Wang, Fenghua; Lu, Fuping	2021	(LIU Y. <i>et al.</i> , 2021)
L-asparaginase SaLA and coding gene and application thereof	C12N	CN	CN113549607A	Liu, Jianguo; Li, Jing; Wang, Miao; Li, Ziyi; Xin, Wen; Tan, Wenfei; Xu, Yingying; Jiang, Xuejiao	2021	(LIU, <i>et al.</i> 2021)
Recombinant L-asparaginase	A61K; A61P; C12R	IE	WO2021078988A1	Choi, Mi Rim; Lin, Tong; Silverman, Jeffrey	2021	(CHOI; LIN; SILVERMAN. 2021)
L-asparaginase Variants and Fusion Proteins with Reduced L-glutaminase Activity and Enhanced Stability	A61K; C07K; C12N; C12R	US	US10821160B2	Lavie, Arnon; Nguyen, Hien-anh	2020	(LAVIE; NGUYEN, 2020)
Pharmaceutical Composition of Pegylated L-asparaginase	A61K	IN	WO2020089743A1	Mendiratta Sanjeev Kumar; Bandyopadhyay Sanjay; Patel Chintan; Patel Tushar; Bhatt Chandresh	2020	(MENDIRATTA <i>et al.</i> , 2020)
Method For Production of Recombinant E. Coli Asparaginase	C12N; C12R	US	US11046964B2	Coleman, Russell J.; Bruck, Torben	2020	(COLEMAN; BRUCK, 2020)

Polypeptide With Asparaginase Activity, Expression Cassette, Expression Vector, Host Cell, Pharmaceutical Composition, Methods for Producing a Polypeptide with Asparaginase Activity and For Preventing or Treating Cancer, And Use Of A Polypeptide	A61K; A61P; C12N	US	US20210121544	Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza; Nilson Ivo Tonin Zanchin; Stephanie Bath De Morais	2019	(SOUZA; ZANCHIN; DE MORAIS, 2019)
Method For Production of Recombinant Erwinia Asparaginase	C07K	US	WO2019/083793A1	Coleman, Russell J; Bruck, Torben	2019	(COLEMAN, BRUCK, 2019)
Methods Of Treatment with Asparaginase	A61K; C12N	IE	WO2019/109018A1	Pine, Polly; Gursahani, Hemamalini	2019	(PINE; GURSAHANI, 2019)
Preparation Method of High-purity Asparaginase	A61K; C12N	CN	CN110195050A	Liu Yanwei; Wang Hongwei; Zhang Qi; Zhao Liangliang; Yin Aoqiu	2019	(LIU <i>et al.</i> , 2019)
A Highly Stable, Protease-resistant E. Coli Asparaginase	A23L; A61K; C12N	IT	US2019270978A1	Maggi, Maristella; Scotti, Claudia	2019	(MAGGI; SCOTTI, 2019)
Variant Asparaginase Polypeptides for Medical Use	A61K; C12N	US	WO2019204636A1	Zhan Hangjun; Nguyen Lam; Chin Richard; Li Shyr Jiann	2019	(HANGJUN; <i>et al.</i> , 2019)
Pegylated L-asparaginase	A61K; C12N	US	US9920311B2	Abribat, Thierry	2018	(ABRIBAT, 2018)
L-asparaginase mutant, and construction method thereof	A23L; A61K; A61P; C12N	CN	CN107828768A	Zhang Xian; Rao Zhiming; Li Xu; Yang Taowei; Xu Meijuan; Zhang Hengwei; Zhao Haodong; Liu Peng	2018	(ZHANG <i>et al.</i> , 2018)
Host Bacteria with Endogenous L-asparaginasum II Gene Being Knocked Out, And Preparation Method and Application Thereof	C12N; C12R	CN	CN108795832A	Zeng, Jie; Tian Jing; Chen, Lei; Liu, Yanwei; Wang, Hongwei	2018	(JIE <i>et al.</i> , 2019)
Endotoxin Free Asparaginase	A61K; C07H; C12N	US	WO2018085493A1	Pierce, George; Crow, Sidney	2018	(PIERCE, CROW, 2018)
Secretory Production Of L-asparaginase In Recombinant Corynebacterium	C12N	KR	KR20170140868A	Kim Keun joong; Lee Jin young; You Sung hwan; Min jung Joon	2018	(JOONG, <i>et al</i> 2018)
Thermophilic L-asparaginase Mutant and Screening and Fermentation Method Thereof	C12N	CN	CN108103049A	Rao, Zhiming; Li Xu; Zhang Xian; Xu Shuqin; Hu Jingyi; Xu Meijuan; Yang Taowei	2018	(RAO <i>et al.</i> , 2018)
Asparaginase Mutant with Improved Enzyme Activity	C12N; C12R	CN	CN106282148A	Liu, Song; Feng, Yue; Jiao, Yun; Chen, Jian; Du Guocheng; Wang Yunlong	2017	(LIU S. <i>et al.</i> , 2017)
L-asparaginase Mutant with Improved Enzyme Activity and Construction Method Thereof	A23L; A61K; A61P; C12N	CN	WO2017031839A1	Rao, Zhiming; Shuiqing Longo; Zhang Xian; Yang Taowei; Xu Meijuan	2017	(RAO <i>et al.</i> , 2017)
Asparaginase	A23L; C12N	NL	WO2017050652A1	Van Der Laan, Jan-Metske; Ooi, Siew-loon; Teunissen, Aloysius Wilhelmus Rudolphus Hubertus; Wilbrink, Maarten Hotse	2017	(VAN DER LAN, <i>et al.</i> 2017)

Abreviaturas: CN – China; US – Estados Unidos da América; IE – Irlanda; KR – República da Coreia; IN – Inglaterra; IT – Itália; RU – Rússia; NL – Holanda; TR – Turquia; DK – Dinamarca; UK – Ucrânia.

Fonte: Os autores (2023).

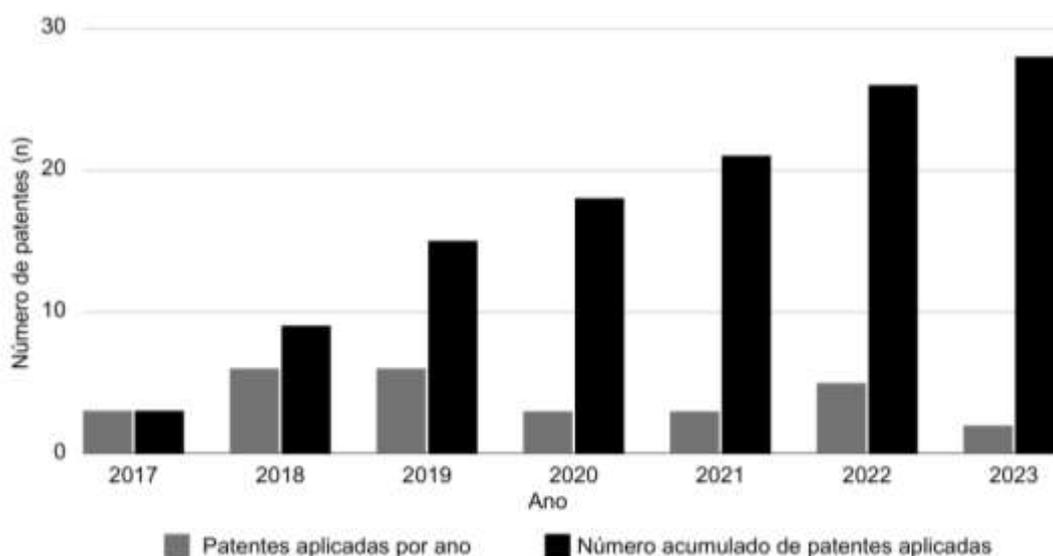
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DAS PATENTES

4.1.1 Distribuição Temporal dos Documentos de Patentes

Foi utilizado um recorte temporal entre os anos de 2017 e 2023 para a pesquisa de patentes em todas as bases de dados utilizadas. Observando os números de patentes ao longo dos anos, não houve uma clara linearidade ou tendência consistente no número de patentes encontradas. Com uma progressão não linear, mas variável, como (LIMA; BISPO; SILVA. 2021) também detecta em seu estudo, com picos de produção tecnológica. O ano com o maior número de patentes depositadas foi o de 2018, seguido por 2019 e 2017, que juntos representam um total de cerca de 42% das patentes encontradas. Contudo, importa destacar que 2020 e 2021 foram os anos em que menos patentes foram depositadas, excetuando o ano de 2023, pois a presente pesquisa foi realizada ainda no decorrer deste ano, não sendo possível precisar o número total de patentes que ainda iriam ser depositadas (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição temporal dos documentos de patentes



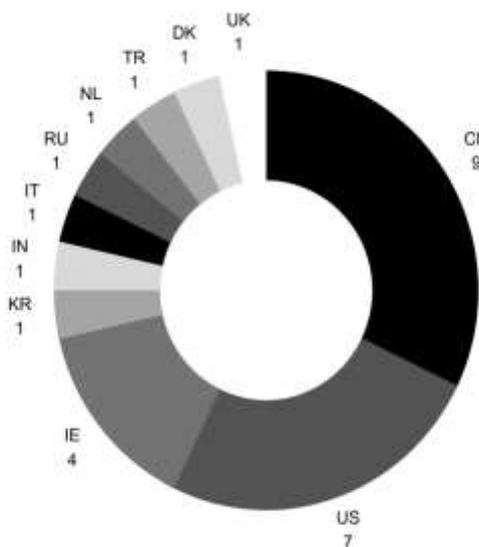
Fonte: Os autores (2023).

4.1.2 Distribuição Geográfica dos Documentos de Patentes

Quanto a distribuição geográfica das patentes selecionadas, nota-se que a China lidera a lista com 9 patentes depositadas, seguida de perto pelos Estados

Unidos da América (EUA) com 7 patentes depositadas; juntos representam mais de 57% de todos os países que depositaram patentes entre 2017 e 2023. Em relação à distribuição continental das patentes, a Ásia (representada principalmente pela China) é o continente com mais patentes depositadas, seguida pela América do Norte, tendo os EUA como seu único representante, enquanto nenhuma patente foi depositada na América do Sul, África ou Austrália (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição geográfica dos documentos de patentes depositados



Abreviaturas: CN – China; US – Estados Unidos da América; IE – Irlanda; KR – República da Coreia; IN – Inglaterra; IT – Itália; RU – Rússia; NL – Holanda; TR – Turquia; DK – Dinamarca; UK – Ucrânia.

Fonte: Os autores (2023).

Ao observar os países com mais patentes depositadas (China e EUA), podemos considerar alguns fatores que podem influenciar essa distribuição. Ambos os países têm economias altamente desenvolvidas e investimentos significativos em pesquisa e desenvolvimento, possuindo também ecossistemas empresariais robustos e uma tradição de inovação tecnológica (CORRÊA; PINTO; CASTILHO. 2020). A concorrência entre esses dois países em várias áreas tecnológicas também pode explicar a alta atividade patentária entre os anos de 2017 e 2023.

Embora a Irlanda tenha uma presença menor em comparação com a China e os EUA, ainda é notável que 14% de todos os documentos foram depositados neste país (Figura 3). Os depósitos de patentes foram realizados pela *Jazz Pharmaceuticals Ireland*, empresa biofarmacêutica sediada em Dublin, Irlanda, que concentra seus estudos nas áreas de neurociência e oncologia.

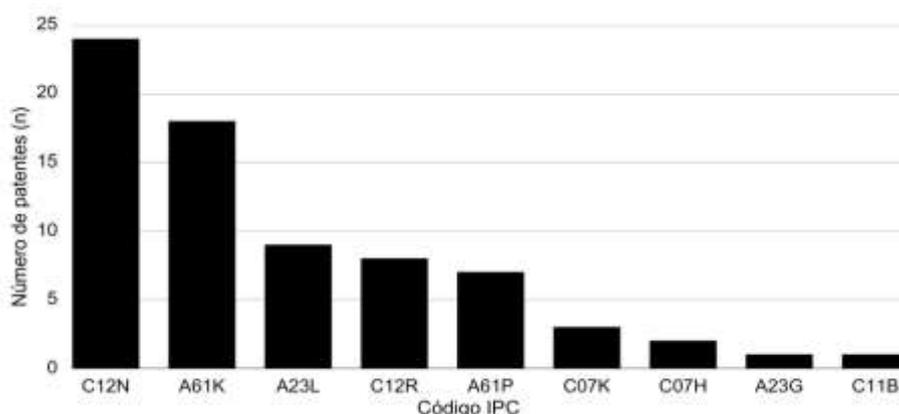
4.1.3 Principais Códigos da Classificação Internacional de Patentes (CIP)

Desde que entrou em vigor em 1968, a Classificação Internacional de Patentes (CIP) é o principal meio para a uniformização dos documentos de patentes no mundo inteiro, sendo uma ferramenta de busca eficaz e simples. Também é um instrumento que permite a elaboração estatística de dados acerca da propriedade intelectual e do desenvolvimento tecnológico de uma gama imensa de áreas (INPI, 2020).

Dentre os principais códigos de classificação das patentes selecionadas, destaca-se o C12N, que versa acerca de microrganismos ou enzimas, suas composições, propagação, conservação, manutenção, meios de cultura e engenharia genética. Dentro da subseção "C12", a categoria "C12N" é específica para microrganismos ou enzimas, propagação, conservação ou manutenção de microrganismos e/ou células animais, vegetais ou células-tronco. O CIP C12N esteve presente em cerca de 72% de todos os documentos de patentes (Figura 4).

Em seguida, a atividade terapêutica de proteínas ou enzimas de célula única, representada pelo CIP A61K, foi a segunda classificação encontrada com maior frequência, estando presente em 54% dos documentos. A seção principal deste CIP se refere às necessidades humanas, especificamente à categoria "Medicina e Higiene". Importa ressaltar que, dentro da categoria "A61K", os produtos patentários são classificados de acordo com sua composição química, seu modo de administração e suas aplicações médicas.

Figura 4 - Principais códigos da Classificação Internacional de Patentes (CIP)



Fonte: Os autores (2023).

Destaca-se também o CIP A23L, usado para categorizar patentes que abrangem inovações em alimentos, produtos alimentícios e bebidas não alcoólicas. Tal classificação pode se referir a uma ampla gama de tópicos relacionados à produção, processamento, formulação, embalagem e melhoria dos alimentos e bebidas consumidos pelas pessoas. Não à toa, esta classificação foi usada pois a enzima L-ASNase tem aplicação importante no ramo da indústria de alimentos, por sua capacidade de diminuir os níveis de acrilamida, que é uma substância potencialmente carcinogênica para humanos, ainda assim preservando tanto seus benefícios nutricionais quanto suas qualidades sensoriais (CACHUMBA; ANTUNES; PERES. 2016). O CIP A23L esteve presente em cerca de 27% dos documentos selecionados, sendo o terceiro mais frequente.

4.3 PRINCIPAIS DEPOSITANTES DE PATENTES

Após a seleção dos documentos de patentes, foi verificado que os principais depositantes de patentes sobre a L-ASNase utilizada no tratamento da LLA foram a *Jazz Pharmaceuticals INC*, empresa biofarmacêutica global com sedes de produção nos EUA, Reino Unido, Irlanda e toda a Europa, e a *Jiangnan University*, uma universidade nacional da China localizada em Wuxi, ambas com 5 patentes registradas das escolhidas. Seguidos de perto por: *University of Georgia*, localizada na Georgia - EUA; *Jiangsu Hengrui Medicine CO, LTD.*, uma companhia farmacêutica chinesa; e a *Pfenex Inc*, uma companhia de biotecnologia de estágio clínico, que foi adquirida comercialmente pela *Ligand Pharmaceuticals Inc*, dos EUA. Possuindo 2 patentes cada uma. Os demais depositantes (Tabela 4) possuem apenas uma patente registrada.

Tabela 4 - Relação de depositantes e quantidades de patentes registradas

Depositante	Quantidade de Registro de Patente
<i>Jazz Pharmaceuticals</i>	5
<i>Jiangnan University</i>	5
<i>Georgia State University Research Foundation, Inc</i>	2
<i>Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd</i>	2
<i>Pfenex Inc.</i>	2
<i>University of Illinois</i>	1

<i>Chonnam National University Industry- University Cooperation Foundation</i>	1
<i>Tianjin University of Science & Technology</i>	1
<i>China Agricultural University</i>	1
<i>Cadila Healthcare Limited</i>	1
<i>Kindred Biosciences, Inc.</i>	1
<i>Universita' Degli Studi Di Pavia</i>	1
<i>Russian Federation</i>	1
<i>Dsm Ip Assets Bv</i>	1
<i>C-Lecta Gmbh</i>	1
<i>Gebze Teknik Universitesi</i>	1
<i>Fundação Oswaldo Cruz</i>	1
<i>Danmarks Tekniske Universitet</i>	1

Fonte: Os autores (2023).

Os inventores principais associados às patentes selecionadas foram: Zhiming Rao, engenheiro profissional, gerente de projetos de tecnologia com atuação em Singapura e EUA (LINKEDIN, 2023), com a autoria de 4 patentes registradas das selecionadas. Seguido por George Pierce, *PhD* e professor da Universidade da Geórgia (LINKEDIN, 2023); e Russell Coleman, diretor de engenharia de cepas na *Ligand Pharmaceuticals* (LINKEDIN, 2023). Estes últimos com duas patentes cada.

4.4 ESPÉCIES BACTERIANAS UTILIZADAS E RESULTADOS PROMISSORES COMO BIOFÁRMACOS

A asparaginase é uma enzima amplamente disseminada na natureza, encontrada em mamíferos e aves e está localizada no fígado desses animais. Mas a produção comercial e as pesquisas que utilizam essa enzima focam na L-ASNase bacteriana tipo II, comum em bactérias Gram negativas e, com menor frequência, em bactérias Gram positivas, fungos e leveduras (D' ANDREIA; BIANCONI. 2012). Após as descobertas de propriedade anti-linfoma da L-ASNase, as pesquisas cresceram e pesquisadores isolaram enzimas nativas das bactérias *E. coli* e *E.chrysanthemii* em 1964. A L-ASNase foi inicialmente isolada de bactérias Gram negativas como *E. coli* (WHELAN; WRISTON. 1969). Porém, após diversos estudos, verificou-se também a capacidade de produção por *Dickeya chrysanthemii* (*Erwinia chrysanthemii*) (Minton *et al.*, 1986), que possui menor capacidade de toxicidade, uma vez que os pacientes

tratados com L-ASNase nativa de *E. coli* apresentaram uma incidência significativamente maior de neurotoxicidade, pancreatite e sepse com risco de vida quando comparados com o grupo *Erwinia* (EDEN *et al.*, 1996). Com o escalonamento das pesquisas e estudos randomizados, verificou-se que a asparaginase da *E. coli* induziu mais anormalidades da coagulação e toxicidade, mas foi superior à asparaginase provinda da *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) para o tratamento de neoplasias linfóides na infância (DUVAL; SUCIU; FERSTER. 2002).

A *E. coli* é um bastonete Gram-negativo, da ordem *Enterobacteriales*, amplamente distribuída na natureza, mas que pode afetar trato gastrointestinal e urinário dos animais; é anaeróbia facultativa, podendo ter flagelos para sua locomoção ou ser imóveis. Algumas cepas de *E. coli* são comensais no trato intestinal, não sendo patogênicas nesses casos. Porém, alguns subtipos mais virulentos podem ser patogênicos como a *E. coli* enteropatogênica. Já a *E. chrysanthemi*, nome atual *Dickeya chrysanthemi*, são bastonetes anaeróbios facultativos, causadores do enfraquecimento vascular em várias espécies de plantas. Conjuntamente, a espécie conhecida por *Erwinia carotovora*, foi realocada, denominada agora de *Pectobacterium carotovorum* (OMS, 2023).

Diante desses fatos, Jie *et al.* (2018) fornecem um método para eliminar um gene endógeno de L-ASNase tipo II e obter uma cepa hospedeira de *E. coli* enquanto o substitui por um gene recombinado de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*), a fim de diminuir a imunogenicidade advinda da *E. coli*, mantendo suas características de produção enzimática. De acordo com a invenção, a L-ASNase tipo II nativa de *Dickeya* pode tratar pacientes com LLA que apresentam hipersensibilidade à L-ASNase tipo II nativa de *E. coli*. O produto enzimático obtido por expressão recombinante usando a bactéria hospedeira não contém quantidades detectáveis de outras variantes da L-ASNase tipo II.

Algumas invenções trazem a *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) conjugada, em especial (ABRIBAT, 2018), pois possui atividade substancial de L-asparagina aminohidrolase e polietilenoglicol, particularmente com baixo peso molecular. Essa associação traz uma asparaginase com ligação PEG-proteína estável, meia-vida *in vivo* prolongada e boa bioatividade (PINE; GURSAHANI. 2019). A peguilação proteica é a ligação covalente de polímeros de polietilenoglicol (PEG), poliéter sintético, hidrofílico e biocompatível, a resíduos de aminoácidos da proteína, e é uma das técnicas utilizada para melhorar o efeito terapêutico dos biofármacos e a

estabilidade a longo prazo. Aumenta a meia-vida, promove maior estabilidade e reduz a imunogenicidade (MENDIRATTA *et al.*, 2020).

Além da peguilação da enzima nativa da *D. chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*), há ainda a composição farmacêutica estável nativa de *E. coli* peguilada, com formulação liofilizada de L-ASNase, e sem adição de sal inorgânico, com açúcar, tampão e aminoácido. Os açúcares citados são preferencialmente os compatíveis com a L-ASNase como a sacarose e o manitol (MENDIRATTA *et al.*, 2020). Essa combinação de fatores promove uma maior estabilidade para a enzima, deixando-a isenta de partículas ou agregados e evita a formação destes durante o armazenamento e transporte por até um mês. A técnica de liofilização utilizada é uma forma farmacêutica de preparo envolvendo etapas como congelamento rápido a -15°C, secagem primária, secagem secundária e, opcionalmente, reaquecimento da solução aquosa de L-ASNase peguilada (MENDIRATTA *et al.*, 2020).

Com a exploração de novos ambientes e a necessidade de desenvolvimento de novas L-ASNases, algumas bactérias foram incluídas no *hall* de espécies utilizadas para sua produção. A *Pseudomonas fluorescens*, bastonete Gram-negativo, mesófila foi utilizada como hospedeira para a L-ASNase recombinante nativa da *E. coli* (CHOI; LIN; SILVERMAN. 2021). Assim como o *Thermococcus sibiricus* que é um archaeon anaeróbio, isolado de águas de formação de alta temperatura, portanto com propriedades termofílicas (VLADIMIROVNA *et al.*, 2023), e o *Bacillus* sp., bastonete Gram-positivo, anaeróbio e mesófilo, que é costumeiramente um patógeno humano e é utilizado comercialmente para produzir alguns compostos antibióticos (RAO; *et al.*, 2017), como visto nas patentes CN113604457A e WO2017031839A1, com as espécies *Bacillus Subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (LIU; *et al.*, 2021).

Na invenção US11046964B2 foi utilizado o gene recombinante da bactéria *D. chrysanthemi*. Utilizou-se a bactéria *Pseudomonadales* sp. como célula hospedeira, sendo esta da ordem de Proteobacteria, que inclui alguns membros de infecções oportunistas, mesófilos. Foram utilizadas para produção de L-Asnase tipo II, a partir do gene selecionado e melhorado da já conhecida *D. chrysanthemi* (COLEMAN, BRUCK. 2019). Em contrapartida, a busca e seleção de gene de L-ASNase de outras espécies trouxe a *Fervidobacterium pennivorans*, microrganismo encontrado em lama quente, anaeróbio, Gram positivo e termófilo, como produtora de L-ASNase. A partir da sua descoberta, o gene foi, então, sintetizado, clonado e expresso em *E. coli*.

Ozdemir (2023) traz um método para produzir a enzima L-ASNase tipo II a partir do organismo *Geobacillus kaustophilus* (Tabela 5), bactéria Gram-positiva termófila isolada de sedimentos de águas profundas coletados na Fossa das Marianas (MORI; FUKUI; AMATSU, 2022), compreendendo a sua própria sequência de aminoácidos. Assim como Xian *et al.* (2018) que têm o objetivo central de criar um mutante da enzima L-ASNase nativa da bactéria *Pyrococcus yayanosii* CH1, otimizando suas propriedades em termos de temperatura, pH e afinidade pelo substrato, sendo um microrganismo archaeon hipertermofílico, isolado do campo hidrotérmico Ashadze localizado na Dorsal Meso-Atlântica.

Liu *et al.* (2021), por meio da patente CN113549607A, descrevem a preparação de uma nova L-ASNase, denominada L-asparaginase SaLA. Nativa da bactéria *Salinispirillum* sp. *JH*, cuja amostra foi retirada de um lago alcalino na região de Ordos, na Mongólia, a proteína SaLA exibe propriedades específicas que a tornam promissora na terapêutica contra a LLA, como sua alta atividade enzimática, amplo substrato, temperatura de reação, amplo pH de reação e alta tolerância a íons metálicos. A aplicação da L-asparaginase SaLA abrange seu uso em uma vasta gama de temperaturas (cerca de 20-90°C) e pHs (3-11), destacando-se a temperatura ótima de 50°C e pH 8. Na patente WO2018085493, Pierce e Crow (2018) trazem a NHase-Asparaginase, uma enzima produzida pela bactéria Gram-positiva *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, com características de ser mesófila, anaeróbia, isenta de endotoxinas, e que possui atividade de nitrila hidratase, além da atividade de asparaginase, por isso o nome.

Tabela 5 - Principais microrganismos utilizados nos documentos de patentes e pH e temperaturas ótimas de cultivo das enzimas reportadas.

Microrganismo	pH Ótimo*	Temperatura Ótima*	Origem da pesquisa	Referências
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> DAP 9625	7,0	30° C	EUA	(PIERCE, CROW, 2017); (PIERCE, CROW, 2018)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	7,0	32° C	Coreia do Sul	(JOONG, <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,7-8,8	22-33° C	Irlanda; EUA	(CHOI; LIN; SILVERMAN, 2022); (COLEMAN; BRUCK, 2019)
<i>Pseudomonadales</i>	5,0-8,0	22 - 33° C	EUA	(COLEMAN, BRUCK. 2019)
<i>Escherichia coli</i> (subtipos: <i>E.coli</i> BL21; <i>E. coli</i> DH5 α ;	7,4-8,0	30- 37° C	China; EUA; Irlanda; Dinamarca; Ucrânia	(JIE <i>et al.</i> , 2018); (CHOI; LIN; SILVERMAN, 2021); (SOUZA; ZANCHIN; DE MORAIS, 2019); (SCOTT; SOARES; APARECIDA, 2022); (LIU <i>et al.</i> , 2021)
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	7,0-8,5	37°C	EUA; China	(LAVIE; HIEN-ANH, 2020); (PINE; GURSAHANI. 2019); (ABRIBAT, 2018); (ZHAN

et al., 2019);

<i>Paenibacillus barengoltzii</i> CAU904	8,5	45° C	China	(ZHENGQIAN <i>et al.</i> , 2017)
<i>Salinispirillum</i> sp. JH	8,0	50°C	China	(LIU <i>et al.</i> 2021)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	9,0	50° C	China	(YIHAN <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillus licheniformis</i>	9,0	50° C	China	(YIHAN <i>et al.</i> , 2021)
<i>Geobacillus kaustophilus</i> DSM 7263T	8,5	55° C	Turquia	(OZDEMIR, 2023)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) AansA/ansB	7,4-8,0	45 - 59° C	Itália	(MAGGI, SCOTTI 2019)
<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	7,0	60 - 120° C	Holanda	(VAN DER LAN, <i>et al.</i> 2017)
<i>Thermococcus sibiricus</i> <i>archaea</i>	9,0	90° C	Rússia	(VLADIMIROVNA <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bacillus subtilis</i>	7,0-9,0	95° C	China; Irlanda	(RAO <i>et al.</i> , 2017); (RAO <i>et al.</i> , 2018); (RAO <i>et al.</i> , 2022); (YIHAN <i>et al.</i> , 2021); (LIU S. <i>et al.</i> , 2017); (ZHANG <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1	7,0	96° C	China	(RAO <i>et al.</i> , 2018)

*Valores de temperatura e pH ótimos referentes ao cultivo dos microrganismos. Alguns documentos de patentes não informaram temperatura e pH ótimos num valor específico, tais valores são demonstrados na tabela a partir do recorte de intervalos citados nos depósitos de patente.

Fonte: Os autores (2023).

4.5 INOVAÇÕES ASSOCIADAS À APLICAÇÃO DA L-ASNASE DE ORIGEM BACTERIANA, DESTACADAS POR MEIO DE REGISTROS DE PROPRIEDADE INTELECTUAL

4.5.1 Engenharia Enzimática de L-Asnase em Diferentes Cepas Hospedeiras: Estudos e Aplicações

Na natureza, mutações e outros diversos tipos de alterações genéticas ocorrem de maneira espontânea a todo momento. Essas ocorrências se dão em proporções substancialmente reduzidas, acontecendo, aproximadamente, uma vez a cada 1 a 10 milhões de células a cada geração (Nussbaum; McInnes; Willard, 2008). Tais mutações se disseminam sem uma ordem aparente ao longo dos cromossomos, podendo, em ocasiões, provocar modificações incidentais nas vias metabólicas. Todavia, há muito tempo a ciência se ocupa em ampliar consideravelmente a taxa de mutação por intermédio da exposição dos microrganismos a diversos elementos mutagênicos, como a luz ultravioleta e variadas substâncias químicas, que ocasionam modificações no material genético das células hospedeiras, resultando em um incremento na frequência de mutações (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2008).

A Engenharia Genética engloba um conjunto de metodologias de análises moleculares que facultam a investigação das características, expressão e alterações do material genético (DNA e RNA) de organismos vivos (CORDEIRO, 2003). Grande parte da engenharia genética microbiana se concentrou na bactéria Gram-negativa *E. coli*, desde quando a tecnologia de DNA recombinante surgiu no início dos anos 70, tornando-se um importante método para o isolamento e transferência de genes únicos de maneira precisa, controlável e conveniente (HESSELTINE, 1992).

Contudo, em contraste ao grande uso do melhoramento genético por meio de mutações controladas, a recombinação genômica foi erroneamente concebida, não como um complemento aos programas de mutagênese, mas como uma alternativa para a substituição destes. Porém, uma abordagem mais abrangente e otimizada para o desenvolvimento de linhagens microbianas não deve favorecer um método em detrimento do outro, ao contrário, deve incluir elementos de triagem tanto para a mutagênese quanto para a recombinação (ADRIO; DEMAIN, 2006).

Liu Song *et al.* (2017), por meio da patente CN106282148A, defendem que a engenharia genética é o principal método para aumentar o rendimento da enzima L-ASNase. E, para tanto, objetivaram desenvolver uma enzima mutante por meio de mutagênese dirigida, que apresente modificações no aminoácido ácido glutâmico na posição 29 de uma determinada sequência específica, tendo diferentes aminoácidos como glutamina, arginina, treonina, lisina e asparagina, introduzidos na mesma posição. As bactérias geneticamente modificadas para produzir os mutantes de L-ASNase são especificadas como sendo do gênero *Bacillus subtilis*, e uma cepa particular de *B. subtilis* WB600 foi mencionada. Os resultados mostram que a mutação dirigida ao local E29 resultou em mutantes de L-ASNase com atividades enzimáticas significativamente aumentadas, até 2,37 vezes, em comparação com a enzima selvagem. Isso indica que estas modificações podem aumentar a eficácia da enzima no contexto de terapias ou aplicações industriais. O estudo, contudo, não apresentou nenhum dado quanto as características imunogênicas das enzimas mutantes.

A patente CN108795832A (ZENG *et al.*, 2019) fornece um método de eliminação do gene codificador de L-ASNase de uma *E. coli*, enquanto o substitui por um gene recombinado de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*), a fim de diminuir a imunogenicidade advinda da *E. coli*, porém mantendo suas características de produção enzimática. A técnica é baseada em um “plasmídeo suicida” que se comporta como um vetor de DNA que contém uma sequência que pode ser inserida

no gene-alvo desejado, interrompendo assim a sua função normal – tecnologia denominada *knockout*. A L-ASNase nativa de *D.chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) pode tratar pacientes com LLA que apresentam hipersensibilidade à L-ASNase nativa de *E. coli*. Como resultado, o produto enzimático obtido por expressão recombinante usando a bactéria hospedeira não conteve quantidades detectáveis de outras variantes da L-ASNase.

Semelhantemente, a patente WO2021078988A1 (CHOI; LIN; SILVERMAN, 2021) demonstra técnicas de introdução de genes recombinantes de *E. coli* e de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) em uma célula hospedeira de *P. fluorescens*, ao passo que também são utilizadas técnicas de otimização dos polinucleotídeos responsáveis pela expressão da L-ASNase, por meio de modificação de regiões de iniciação de tradução, alteração de elementos estruturais de mRNA e uso de diferentes polarizações de códons que expressam alguns aminoácidos. O estudo foi realizado com 82 pacientes, porém foram divulgados apenas os dados preliminares de 47 destes, ficando relatado que apenas 1 paciente apresentou uma reação de hipersensibilidade de alto grau, havendo necessidade de descontinuação da utilização do fármaco. Nenhum outro paciente sofreu eventos adversos graves, como pancreatite ou trombose.

Também neste sentido, a patente US10821160B2 (LAVIE; HIEN-ANH, 2020) dispõe-se a desenvolver uma enzima L-ASNase com atividade reduzida ou eliminada de L-glutaminase, descrevendo mutações específicas que ocorrem nas posições 31, 63 e 254 da sequência de aminoácidos de uma L-ASNase nativa de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*). Os seguintes resultados foram obtidos: redução na atividade da L-glutaminase, entre 0% e uma porcentagem específica (variando de 10% a 65%) da atividade da enzima original; e redução na velocidade de reação da L-glutaminase nas variantes de 40 a 60% da taxa de reação da enzima selvagem.

Lavie e Hien-anh (2020) também discutem a fusão de certas proteínas, onde é mencionada a criação de proteínas de fusão que combinam o fator de indução de apoptose relacionado ao tumor (TRAIL) com a enzima L-ASNase de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*). Essas proteínas de fusão têm o potencial de exibir propriedades citotóxicas aprimoradas, visando especificamente as células malignas da leucemia linfoblástica aguda. Ao unir o TRAIL com uma enzima L-ASNase mutante de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) que possui atividade de L-glutaminase reduzida, os autores defendem que esta terapêutica deve ser explorada como uma estratégia

inovadora no tratamento contra o câncer, uma vez que se resolvem as duas principais problemáticas envolvidas no processo: a eficácia do tratamento e a redução da imunogenicidade.

Outras enzimas L-ASNases mutantes são igualmente mencionadas na patente US2022056430A1 (FRIEDRICH; O'DONNELL, 2022), que versa da adição de resíduos de aminoácidos de prolina e alanina à L-ASNase, buscando com tal modificação alguns objetivos comuns a diversos outros estudos aqui relatados: elevada bioatividade *in vitro*, meia-vida *in vivo* prolongada, imunogenicidade significativamente reduzida, por meio da redução ou eliminação de uma resposta de anticorpos contra a preparação de L-ASNase. As L-ASNases mutantes também podem ser usadas como alternativa terapêutica para os pacientes que desenvolveram sensibilidade a terapias de primeira linha. Cada peptídeo foi conectado à L-ASNase por meio de uma ligação amida formada pelo grupo carboxilo do resíduo de aminoácido C-terminal do peptídeo e um grupo amino livre na L-ASNase. Diferentes variantes da sequência de aminoácidos foram mencionadas no documento, com diferentes números de resíduos de prolina e alanina. No final, a L-ASNase modificada tem uma atividade de depleção de L-asparagina cerca de 20% superior à da L-ASNase não modificada.

A inovação da patente WO2019083793A1 (COLEMAN; BRUCK, 2019) está em produzir uma enzima L-ASNase nativa de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) em altos níveis de expressão, de maneira solúvel e funcional, utilizando uma célula hospedeira a bactéria *P. fluorescens*. O estudo descreve um método para produzi-la no citoplasma da célula hospedeira, o que pode resultar em melhores rendimentos de purificação e maior facilidade na obtenção da enzima. A patente menciona a utilização de construções de DNA que contêm o gene de L-ASNase nativa de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*), operacionalmente ligado a sequências de DNA que codificam sinais para direcionar a proteína para o periplasma ou citoplasma da célula hospedeira. Também foi demonstrada a possibilidade de utilizar diferentes sequências de nucleotídeos para codificar a mesma sequência de aminoácidos, devido à redundância no código genético. Isso significa que diferentes combinações de bases nitrogenadas no DNA podem resultar na mesma sequência de aminoácidos na proteína.

Semelhantemente, a patente coreana KR20170140868A (KIM; YOO, 2018) utilizou cepas de *Corynebacterium glutamicum* para expressar e secretar L-ASNase.

Para isto, foram utilizadas técnicas para a introdução de genes com uma sequência sinal que direciona a L-ASNase para ser secretada para fora da célula hospedeira, permitindo que a enzima seja produzida e secretada em quantidades significativas. A parte crítica do processo foi a escolha da sequência sinal apropriada. Várias sequências de sinal nativas de *C. glutamicum* foram testadas para otimizar a expressão e secreção de L-ASNase, incluindo sequências de sinal de proteínas como CspA, NCgl0336, NCgl0932, NCgl1930 e NCgl2101. Como resultado, foi confirmado que a L-ASNase pode ser superproduzida, além de que a proporção de alta pureza foi significativamente maior do que a das preparações de L-ASNase disponíveis comercialmente.

Explorando o campo da engenharia genética, Rao *et al.* (2017), por meio do documento de patente WO2017031839A1, fornece uma L-ASNase modificada criada a partir da substituição do códon que glicina, na posição 107, para um códon que codifica ácido aspártico. Tal método produziu um gene recombinante que foi ligado a um vetor de expressão para obter um plasmídeo recombinante (G107D), que foi então introduzido na cepa hospedeira *B. subtilis*. O estudo, por meio da mutagênese dirigida descrita, promoveu a melhora da estrutura molecular da L-ASNase em relação a enzima nativa, obtendo uma atividade enzimática aumentada em 83% em comparação com a enzima selvagem obtida de uma cepa controle. A afinidade do substrato K_m também foi reduzida em 50% na enzima mutante, enquanto a eficiência catalítica foi aumentada em 84%, demonstrando que a posição 107 dos resíduos de aminoácidos no genoma bacteriano tem grande influência na catálise da enzima.

De modo semelhante, o documento de patente US20210121544 (SOUZA; ZANCHIN; MORAIS., 2019) descreve a modificação de uma L-ASNase humana por meio de mutações específicas que melhoram seu mecanismo de autoprocessamento, isto é, otimizam o processo pelo qual a enzima cliva a si mesma e gera formas funcionais, sendo um evento crucial para a atividade enzimática. Esse processo começa quando um grupo hidroxila presente em um aminoácido chamado T168 perde um próton e se torna altamente reativo. O T168 interage com o grupo carbonila de um segundo aminoácido chamado G167, formando uma ligação covalente entre eles. Essa ligação covalente é posteriormente hidrolisada, resultando na clivagem da ligação peptídica entre G167 e T168. Tal processo permite que o grupo amino do aminoácido T168 fique livre para catalisar a hidrólise da asparagina, agindo como um *primer* extrínseco de autoprocessamento. Os autores defendem que este método

otimiza o processo de autoclivagem, melhorando assim a atividade da enzima L-Asnase e, conseqüentemente, sua eficácia no tratamento da LLA. Contudo, o documento de patente não fornece informações suficientes acerca das células hospedeiras que sintetizam a L-ASNase modificada, destacando que podem ser de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal.

Similarmente, a invenção CN113604457A (LIU Y. *et al.*, 2021) expõe uma inovação alcançada pela obtenção de um mutante de L-Asnase do tipo selvagem a partir da bactéria *Bacillus cereus* TCCC111005 por meio de mutações aleatórias utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) propensa a erros, formando os plasmídeos recombinantes pBSA43-asnm1 e pBSA43-asnm2. Estes plasmídeos foram inoculados em células hospedeiras de *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis*. As propriedades enzimáticas dos mutantes foram analisadas em termos de atividade enzimática específica, temperatura ideal de reação, estabilidade de temperatura, pH ideal e estabilidade de pH. Os resultados descritos na patente demonstram uma faixa de pH ótimo em torno de 9,0 e uma temperatura ótima de reação a 50°C. A invenção oferece resultados significativos, em especial a maior atividade enzimática de L-ASNase.

O documento de patente US11046964B2 (COLEMAN; BRUCK, 2020) também detalha uma série de métodos relacionados à expressão da enzima L-ASNase da bactéria *E. coli* em bactérias do gênero *P. fluorescens*. Os plasmídeos contendo as construções da L-ASNase de *E. coli* foram introduzidos nas cepas hospedeiras de *P. fluorescens*, especificamente nas cepas DC454 e DC441. A invenção incluiu também uma mutação em um ou mais genes que codificam protease nas células hospedeiras, resultando na inativação destas proteases nativas. Altos títulos de produção de L-ASNase foram obtidos utilizando os métodos da invenção.

A eficácia enzimática da L-ASNase também foi objeto de estudo de Rao *et al.* (2022), patente CN112941059A, cuja pesquisa divulga mutações na sequência de aminoácidos de uma L-ASNase nativa de *Rhizomucor miehei*. Mais especificamente, o aminoácido na posição 344 foi mutado de ácido aspártico para ácido glutâmico. A mutação desse aminoácido resultou em uma enzima chamada A344E, que posteriormente foi expressa em uma célula hospedeira de *B. subtilis*. Os resultados foram promissores, havendo uma expressão de L-ASNase 7,1 vezes maior que na célula selvagem, sob condições em que a temperatura ótima foi de 45°C e o valor de pH é de 7,0, sendo 1,5 vez maior que o de uma célula selvagem. Contudo, deve-se

destacar que, apesar da célula hospedeira ser uma bactéria, as enzimas nativas de fungos, como os da espécie *Rhizomucor miehei*, costumam incorrer em uma maior quantidade de eventos relacionados à hipersensibilidade. Tal aspecto, entretanto, não foi exposto de maneira clara no documento de patente.

A patente WO2019204636A1 (ZHANG; *et al.*, 2019) reproduz uma série de polipeptídeos variantes de L-ASNase com estabilidade e farmacodinâmica melhoradas, bem como a imunogenicidade reduzida. Para tanto, aminoácidos específicos nativos de *Erwinia chrysanthemi*, como a lisina e cisteína, foram substituídos. A princípio, a expressão da L-ASNase de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) em *E. coli* resultou em baixa eficiência de produção, com a maior parte da enzima não processada sendo retida dentro das células. Contudo, a introdução de cisteínas em regiões próximas a locais antigênicos gerou um processo de PEGuilação seletiva, resultando em menor imunogenicidade em comparação com um polipeptídeo de L-ASNase de *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) de tipo selvagem correspondente e um rendimento maior de enzima solúvel.

Por fim, a patente WO2022211829 (CHOI; LIN; SILVERMAN, 2022) apresenta uma abordagem inovadora ao expor regimes de administração aprimorados para L-ASNase recombinante destinados ao tratamento da leucemia linfoblástica aguda, como uma alternativa às tradicionais L-ASNases nativas de *E. coli*. O principal objetivo do estudo é mitigar reações imunogênicas adversas em pacientes, além de otimizar a eficácia do tratamento. Quanto à recombinação relatada no estudo, esta consiste no preparo de L-ASNase ativa em forma de multímero, mais especificamente um tetrâmero, composto por quatro monômeros de 1-20 peptídeos conjugados. Apesar de não dispor de muitos detalhes, a conclusão do estudo é que esta estrutura multímera da enzima é essencial para sua eficácia e especificidade.

4.5.2 L-ASNases Livres de Endotoxinas: Métodos de Purificação e Estabilização Enzimática.

A L-ASNase obtidas de microrganismos já conhecidos costuma não ser usada em tratamentos de longo tempo porque, normalmente, resultam em sensibilidade e reações adversas advindas, em grande parte, de vestígios de endotoxinas bacterianas. Considerando isto, o documento de patente WO2018085493A1 (PIERCE; CROW, 2018) divulga enzimas L-ASNases que são produzidas a partir da

bactéria Gram-positiva *Rhodococcus rhodochrous* DAP 96253, sendo estas isentas de endotoxinas, o que as torna seguras para o tratamento a curto e longo prazo da LLA, e seguras para aqueles pacientes que apresentaram reações alérgicas a outros tipos de L-ASNase. O documento de patente também indica que a bactéria *R. rhodochrous* DAP 96253 possui grande eficácia na produção enzimática, sendo capaz de produzir L-ASNase em quantidades consideravelmente superiores ao observado em *E. coli* ou *Dickeya (Erwinia)*. Isso pode ser relevante para a produção em grande escala de uma enzima pura.

Métodos de preparação de L-ASNase de alta pureza foram fornecidos pela patente CN110195050A (LIU; *et al.*, 2019). O método abrange a purificação de uma solução contendo L-ASNase por meio da utilização de uma coluna de cromatografia de ânions e uma outra coluna de cromatografia de cátions para separar e purificar a L-ASNase da mistura complexa de componentes presentes na solução. Em certas modalidades do experimento as enzimas foram modificadas por meio de processos de peguilação e liofilização, a fim de melhorar suas propriedades farmacocinéticas e prolongar sua meia-vida no organismo humano. O resultado alcançado é uma L-ASNase com uma pureza superior a 99%, com um teor de endotoxinas em cada unidade de L-ASNase inferior a 0,015 UI de endotoxina.

Adicionalmente, Coleman e Bruck (2019) mencionam o uso de mutações para inativar proteases da bactéria *P. fluorescens*, a fim de evitar a degradação indesejada das L-ASNase. As mutações ocorreram pela realização de mutações em um ou mais genes que codificam proteases. Tais mutações visaram inativar as proteases da célula hospedeira, com a intenção torná-las não funcionais, garantindo assim que a L-ASNase seja expressa e acumulada em níveis mais elevados e preservada em sua forma funcional.

Outras formas de melhoramento enzimático também foram divulgadas com a patente EP4019007A1 (FORNASINI; SOUKHAREVA; PHILLIPS, 2022). A inovação do estudo reside na ligação covalente do óxido de polialquileno à L-ASNase nativa de *E. coli*, utilizando ligantes reativos como o N-hidroxisuccinimidil, o que confere propriedades específicas à composição, como uma meia-vida prolongada em circulação sanguínea e uma redução da imunogenicidade, tornando-a mais adequada para aplicações terapêuticas no tratamento da LLA. Além disso, a composição também passou por um processo de liofilização, que lhe conferiu estabilidade para armazenamento e adequada para uso clínico.

4.5.3 L-ASNase protease-resistente e Técnica de Encapsulamento em Eritrócitos

Maggi e Scotti (2019) apontam algumas fragilidades nas L-ASNases que são amplamente utilizadas hoje, principalmente as nativas de *E. coli* e *D. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*), sendo ambas reconhecidas, segundo as autoras, por sua alta instabilidade *in vivo*, meia-vida curta e sua consequente necessidade de administração de altas doses para que se obtenha uma concentração farmacológica ideal no organismo. Tais fragilidades se dão, em grande parte, à suscetibilidade da molécula à degradação mediada por proteases. Patel *et al.* (2009) descreveram a presença de duas proteases lisossômicas com a capacidade de degradação de L-ASNase, conhecidas como catepsina B (CTSB) e asparagina endopeptidase (AEP). Verificou-se também que essas proteases têm capacidade de serem superexpressas por linfoblastos de LLA, em especial aquelas que possuem genótipos específicos, como o cromossomo Filadélfia (Ph) e iAMP21, que são variantes altamente agressivas e pouco responsivas ao tratamento.

Por meio do documento US2019270978A1, Maggi e Scotti (2019) utilizaram uma cepa de *E. coli* para realizar uma mutação específica no gene *ansB* de *E. coli*, que resultou na substituição de um aminoácido na posição 24 por serina (N24S). Esse procedimento foi conduzido com alta precisão, assegurando que não houvesse outras mutações aleatórias no gene.

Maggi e Scotti (2019) também demonstraram a incorporação da proteína N24S em eritrócitos, utilizando uma técnica conhecida como *Encapsulation in red blood cells* (RBCs). O processo de encapsulamento consistiu em submeter as hemácias de um determinado paciente a um choque osmótico transitório, resultando em permeação osmótica das células sanguíneas. O processo promoveu uma permeabilidade temporária na membrana celular, devido à expansão e abertura de seus poros, tornando-as permeáveis à introdução L-asparaginase N24S. Em seguida, as células retornaram ao estado isotônico, retraindo a L-ASNase em seu interior como uma molécula ativa. Os eritrócitos encapsulados foram posteriormente transfundidos para o paciente e, após hemólise, a L-ASNase foi liberada no soro do paciente. O uso de eritrócitos como "biorreatores" para administrar a L-ASNase melhora a estabilidade do medicamento e reduz a imunogenicidade, ao promover um escape à degradação proteolítica por meio de CTSB e AEP.

4.5.4 Bactérias Recombinantes Invasivas como Vetores de Entrega de Agentes Terapêuticos

A invenção WO2022008550 (SCOTT; SOARES; APARECIDA, 2022) fornece uma promissora opção terapêutica para o tratamento de diversas patologias do sistema imunológico, incluindo a LLA. Explorando ao máximo toda a biotecnologia envolvida na engenharia de microrganismos, o documento descreve a construção de uma bactéria recombinante que tem capacidade de sintetizar ou armazenar determinados agentes terapêuticos e invadir células do sistema imune não fagocíticas, como as células T. Tais bactérias recombinantes foram projetadas para expressar proteínas que permitem que elas invadam as células imunes e sofram lise, liberando sua carga terapêutica no citosol das células do sistema imunitário.

Scott, Soares e Aparecida (2022) descrevem o processo para a construção destas bactérias a partir da escolha de proteínas de invasão específicas, que são frequentemente nativas de patógenos que naturalmente possuem essa capacidade de invadir células hospedeiras, a exemplo das proteínas IpaB, IpaC e Invasina. Os genes que codificam essas proteínas foram isolados e inoculados em uma cepa de *E. coli* (EcNAdapA), usando técnicas que garantem a expressão nas bactérias hospedeiras. Uma vez dentro do organismo de mamíferos, as proteínas de invasão interagem com receptores específicos presentes nas células imunes não fagocíticas e, após serem internalizadas para o ambiente intracelular, as bactérias necessitam escapar da ação dos fagossomos, e isso é realizado por proteínas específicas, como as mencionadas IpaB e IpaC, que desencadeiam a formação de poros nas membranas do fagossomo, permitindo que as bactérias escapem para o citosol da célula hospedeira. Uma vez no citosol, as bactérias são programadas geneticamente para sofrer lise, o que significa que elas se rompem e liberam sua carga terapêutica diretamente nas células imunes.

Não obstante aos métodos promissores que o estudo acima citado fornece, vale ressaltar que é necessária uma visão crítica acerca da segurança do procedimento em seres humanos, uma vez que a capacidade de bactérias se tornarem invasivas pode ter implicações não apenas nas células-alvo do sistema imune, mas também em outras células do organismo, gerando efeitos colaterais indesejados.

4.6 PESQUISAS COM MICRORGANISMOS EXTREMÓFILOS

Segundo Ozdemir (2023), enzimas com alta termoestabilidade obtidas de organismos adaptados a ambientes termicamente extremos, possuem a propriedade intrínseca de uma meia-vida prolongada em comparação com aquelas nativas de organismos adaptados a temperaturas moderadas. Esta característica lhes confere a capacidade de manter sua funcionalidade biocatalítica por um período substancialmente maior quando expostas a condições de temperatura ambiente. Adicionalmente, segundo o autor, tais enzimas também exibem uma considerável resistência à deterioração ocasionada por agentes desnaturantes de natureza química. Apesar do uso de L-ASNase ter revolucionado o tratamento de LLA e aumentado significativamente a sobrevida de pacientes após o tratamento com preparações enzimáticas, como resultado do uso prolongado da enzima, alguns pacientes podem desenvolver distúrbios como choque anafilático, pancreatite e leucopenia (PIETERS, 2010). Tendo em vista a relevância inequívoca das L-ASNases no contexto da indústria farmacêutica e alimentícia, bem como as limitações intrínsecas associadas às L-ASNases já existentes, a perspectiva de empregar L-ASNases originárias de microrganismos extremófilos se reveste de uma empolgante promessa.

Microrganismos termofílicos que habitam ambientes com características físico-químicas extremas são fontes preciosas de enzimas termoestáveis. Essas enzimas possuem vantagens práticas sobre as obtidas por meio de modificações enzimáticas (OZDEMIR, 2023). Ao contrário das enzimas de microrganismos mesofílicos, as enzimas termoestáveis podem ser conservadas em temperatura ambiente durante períodos prolongados, sem sofrer perda substancial de atividade funcional (OZDEMIR, 2023).

Vladimirovna *et al.* (2023) isolaram arqueias hipertermófilas da espécie *Thermococcus sibiricus* em águas profundas de um campo de petróleo de alta temperatura na Sibéria Ocidental, a uma temperatura de 84°C, e, por meio do documento de patente RU0002794225, tiveram como objetivo desenvolver preparações purificadas de uma nova L-ASNase termoestável, criando um sistema eficiente de expressão heteróloga em células de bactérias mesofílicas, especialmente de *E. coli*, por meio introdução do gene modificado “tsA_mod” no vetor pME2020 na cepa receptora.

Ainda segundo Vladimirovna *et al.* (2023), bactérias da espécie *Thermococcus sibiricus*, quando mantidas em temperaturas acima de 85°C, apresentam propriedades únicas, como alta atividade asparaginase específica, baixa atividade indesejável de glutaminase, alta termoestabilidade e resistência à desnaturação química e à presença de íons metálicos. As enzimas nativas de *Thermococcus sibiricus* podem ainda manter a atividade em temperaturas entre 70°C e 90°C por até 32 horas. Por fim, em comparação com as enzimas L-ASNase nativa de *Pyrococcus sp.*, as enzimas L-ASNases de *Thermococcus sp.* também apresentam uma atividade enzimática mais alta.

A patente WO2017050652A1 (VAN DER LAN, *et al.* 2017) fundamenta-se na descoberta de uma enzima L-ASNase cuja origem pertence ao gênero *Fervidobacterium*, mais especificamente da espécie *F. pennivorans*. As implicações desta inovação abrangem múltiplos aspectos, incluindo a análise da sequência de aminoácidos inerente à enzima, bem como a sequência genética específica responsável pela codificação desta enzima. Além disso, a invenção engloba o desenvolvimento de vetores de expressão destinados à produção eficaz de L-ASNase em células hospedeiras, sendo que esses vetores exibem uma notável capacidade de replicação autônoma, permitindo assim sua reprodução independente dos processos nativos de replicação do DNA celular. A seleção da célula hospedeira, onde o vetor é inserido, pode variar entre procariotos, como bactérias, e eucariotos, abrangendo células vegetais, animais e fúngicas. A inserção do vetor pode ser viabilizada por diferentes técnicas, como eletroporação e transformação de protoplastos. O estudo ainda demonstra que é possível otimizar a produção do polipeptídeo ao modificar a célula hospedeira para eliminar genes que possam interferir no processo ou aprimorar a expressão da enzima em questão.

O documento de patente WO2023107054 (OZDEMIR, 2023) descreve um método detalhado para a produção e caracterização da enzima L-ASNase a partir do organismo *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263T (GkASNase). A temperatura ótima da GkASNase foi de 55°C, enquanto o pH ótimo foi de 8,5. A presença de íons como Cu²⁺ e Fe²⁺, inibiram sua atividade enzimática, enquanto íons como Mn²⁺, Mg²⁺ e outros agentes a aumentaram. A resistência térmica da enzima foi avaliada submetendo-a a temperaturas de 37°C e 55°C durante 6 horas. Os resultados demonstram que os preparos com essa enzima podem ser conservados em temperatura ambiente por períodos prolongados sem que haja perdas em sua função.

Ozdemir (2023) também menciona que a enzima L-ASNase obtida a partir de *Geobacillus kaustophilus* possui alta atividade L-ASNase e atividade insignificante de glutaminase, o que é benéfico para reduzir os efeitos colaterais no tratamento do câncer. Além disso, o efeito antiproliferativo da enzima também foi testado em células malignas do carcinoma hepatocelular (CHC). Os resultados indicam que a GkASNase também pode ser uma candidata promissora no tratamento de CHC.

Igualmente, outras patentes mencionam a bactéria *Pyrococcus yayanosii* CH1 como uma fonte viável para a obtenção de L-ASNases. Rao *et al.* (2018), por meio da patente CN108103049A, utilizam a técnica já descrita de PCR propensa a erros para construir e categorizar diversas cepas mutantes de *P. yayanosii* CH1. O processo de mutagênese local dirigida resultou em um mutante com atividade enzimática aumentada, que posteriormente foi utilizado numa cepa de *B. subtilis* 168. (RAO. *et al.* 2018), no entanto, por meio da patente CN107828768A, demonstraram a construção de uma L-ASNase mutante de *P. yayanosii* CH1 com temperatura ótima reduzida de 95°C para 85°C, pH ótimo de 8,0 para 7,0 e um valor Km de afinidade do substrato reduzido de 6,5 para 4,9. Tais mudanças visam a melhor adequação da enzima no ramo farmacêutico quando, por exemplo, a diminuição do pH torna o mutante mais eficiente em um intervalo mais próximo da neutralidade e do pH do plasma humano.

5 CONCLUSÃO

A presente revisão patentária sobre L-ASNase bacteriana e seus avanços nos últimos anos revela um grande progresso na compreensão do uso dessa enzima como um agente terapêutico potencial no tratamento da LLA e diversos outros tipos de cânceres. Os estudos patentários analisados mostram uma série de novas formulações, métodos de produção e aplicações clínicas, que têm demonstrado resultados promissores na redução de efeitos colaterais e melhorias na eficácia do tratamento. Esses avanços representam um marco importante no desenvolvimento da L-asparaginase bacteriana como uma opção terapêutica cada vez mais viável para pacientes oncológicos.

A concentração de depositantes de patentes e produção em determinados grupos de pesquisa voltados para a L-asparaginase é observada principalmente em duas entidades: a *Jazz Pharmaceuticals INC*, originalmente irlandesa, e a *Jiangnan University*, uma universidade nacional da China. Essa concentração pode ser atribuída à expertise e investimentos significativos nessas áreas, e à atuação contínua nessa linha de pesquisa, resultando em avanços significativos no desenvolvimento e produção desse importante medicamento.

Na produção de L-asparaginase, são comumente utilizadas bactérias de espécies correlacionadas, como a *E. coli* e a *Dickeya Chrysanthemi*, já reconhecidamente boas produtoras de L-asparaginase tipo II, que é a melhor opção bioterapêutica, ou a utilização delas como hospedeira ou doadora de um gene recombinante em outra espécie. Além dessas espécies, há ainda grupos de pesquisa que exploram bactérias fitopatogênicas, como a própria *Dickeya chrysanthemi*, ou termofílicas, que teriam biocaracterísticas interessantes para maior estabilidade e capacidade de armazenamento na produção dessa enzima, expandindo assim o conhecimento e as oportunidades de fabricação da L-ASNase.

Essa diversidade de bactérias utilizadas demonstra a importância de estudos e pesquisas contínuas, buscando alternativas eficientes e de baixo custo para a produção dessa enzima e ampliar a sua capacidade de enfrentar a demanda crescente do mercado. Além disso, os avanços tecnológicos têm possibilitado a modificação genética dessas bactérias, visando melhorar sua atividade enzimática e estabilidade, bem como reduzir possíveis efeitos colaterais indesejados. A

identificação e caracterização de novas linhagens bacterianas promissoras também têm se mostrado essenciais na busca de melhores tratamentos anticancerígenos.

A análise da direção dos estudos envolvendo enzimas tem sido voltada, em grande parte, para a melhoria das enzimas já reconhecidamente eficazes, em substituição à busca pela identificação de novas enzimas em espécies previamente não investigadas para esse propósito. Essa abordagem se deve ao fato de que as enzimas já conhecidas possuem uma vasta gama de aplicações e são altamente eficientes em suas funções biocatalíticas. Assim, aprimorar essas enzimas já estabelecidas, seja por meio de engenharia genética ou modificações químicas, permite a otimização de suas características, como a atividade, estabilidade e especificidade, tornando-as mais eficazes e versáteis para diversas aplicações na indústria, medicina e meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABRIBAT, T. **PEGylated L-asparaginase**. Depositante: Alize Pharma li Sas. EUA.US 9920311 B2. Depósito: 6 jule 2009. Concessão: 20 mar. 2018.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Genetic improvement of processes yielding microbial products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 187-214, 2006. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2005.00009. x.
- ALI, U.; NAVEED, M.; ULLAH, A. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): a novel approach to target ALL. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 199–210, 2016. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.12.023.
- ALRUMMAN, S. *et al.* Production and anticancer activity of an L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. **Scientific Reports**, v. 9, n.1, p. 3756, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-40512-x
- BATOOL, T.; MAKKY, E. A.; JALAL, M. A comprehensive review on L-Asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900–923, 2016. DOI: 10.1007/s12010-015-1917-3.
- BRANDAU, R.; MONTEIRO, R.; BRAILE, D. Importância do uso correto dos descritores nos artigos científicos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 20, n.1, 2005.
- CACHUMBA, J. J. M.; ANTUNES, F. A. F.; PERES, G. F. D. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 77–85, 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.004.
- CAMILO, F. M.; CANÊDO, G. dos S.; CARDOSO, A. M. L-Asparaginase e perspectivas no tratamento da leucemia linfoblástica aguda: revisão de literatura. **Rev Cient Esc Estadual Saúde Pública Goiás**, v. 8, p. 1-21, 2022.
- CAMILO, F. M.; CANÊDO, G. S.; CARDOSO, A. M. L-Asparaginase and perspectives in the treatment of acute. **RESAP**, v. 8, p. 1–18, 2016.
- CECCONELLO, D. K.; MAGALHÃES, M. R. de; WERLANG, I. C. R. Asparaginase: an old drug with new questions. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 42, n. 3, p. 275–282, 2020. DOI: 10.1016/j.htct.2019.07.010.
- CHAND, S.; MAHAJAN, R. V.; PRASAD, J. P. A comprehensive review on microbial l-asparaginase: bioprocessing, characterization, and industrial applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 619–647, 2020. DOI: 10.1002/bab.1888.

CHOI, M. R.; LIN, T.; SILVERMAN, J. **Dosing of recombinant L-Asparaginase**. Depositante: Jazz Pharmaceuticals Ireland LTD. IRE. WO2022211829. Depósito: 14 may 2021. Concessão: 10 June 2022.

CHOI, M. R.; LIN, T.; SILVERMAN, J. **Recombinant L-Asparaginase**. Depositante: Jazz Pharmaceuticals Ireland LTD. IRE. WO2021078988A1. Depósito: 25 oct. 2019. Concessão: 29 oct. 2021.

COLEMAN, R. J.; BRUCK, T. **Method for production of recombinant Erwinia Asparaginase**. Depositante: Pfenex Inc. EUA. WO 2019/083793 A1. Depósito: 27 oct. 2017. Concessão: 2 may 2019.

COLEMAN, R. J.; BRUCK, T. **Method for production of recombinant E. Coli Asparaginase**. Depositante: Pfenex Inc. EUA. US11046964B2. Depósito: 27 oct. 2017. Concessão: 29 June 2021.

CORDEIRO, M. C. R. **Engenharia genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações**. Planaltina, MG: Embrapa Cerrados, 2003. (Documentos, 86).

CORNELIS, Pierre (edit.). **Pseudomonas: genomics and molecular biology**. Belgium: Vrije Universiteit Brussel, 2008. Disponível em: <http://www.caister.com/pseudo>. Acesso em: 31 ago. 2023.

CORRÊA, L. M.; PINTO, E. C.; CASTILHO, M. dos R. Mapeamento dos países nas cadeias globais de valor: uma análise dos fluxos de comércio e de renda de propriedade intelectual. **Nova Economia**, v. 30, n.2, p. 355–382, 2020. DOI: 10.1590/0103-6351/4995

D' ANDREIA, M, G.; BIANCONI, M, L. **Caracterização físico-química da Asparaginase de E. coli**. 2012. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Estrutural, Universidade Federal do Rio de Janeiro , Rio de Janeiro, 2012.

DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A. 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. 2734-9, 2002. DOI: 10.1182/blood.v99.8.2734.

EDEN, O. B. *et al.* Non-randomised study comparing toxicity of Escherichia coli and Erwinia asparaginase in children with leukaemia. **Med Pediatr Oncol**, v. 18, n.6, p. 497-502, 1990. DOI: 10.1002/mpo.2950180612.

FANG, G.; ZHANG, Q.; CHEN, X. The draft genome of the Asian corn borer yields insights into ecological adaptation of a devastating maize pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, nov. 2021. DOI: 10.1016/j.ibmb.2021.103638.

FORNASINI, G.; SOUKHAREVA, N.; PHILLIPS, C. **Formulations of Polyalkylene Oxide-Asparaginase and methods of making and using the same**. Depositante: Servier Ip Uk Ltd. UK. EP 4019007 A1. Depósito: 1 june 2017. Concessão: 29 june 2022.

FRIEDRICH, L.; O'DONNELL, A. **Modified L-Asparaginase**. Depositante: Jazz Pharmaceuticals Ireland LTD. IRE. US2022056430A1. Depósito: 21 june 2017. Concessão: 24 feb. 2022.

HESELTIME, C. W. Mixed-culture fermentations. *In*: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Applications of biotechnology to traditional fermented foods: report of an ad hoc panel of the board on science and technology for international development**. Washington, EUA: National Academies Press, 1992. p.52-58.

INPI. **Classificação Internacional de Patentes (IPC)**: versão 2020. Rio de Janeiro: INPI, 2020.

JAZZ PHARMACEUTICALS. **Global Footprint**. Roscommon, IRE: Jazz Pharmaceuticals, 2024. Disponível em: <https://www.jazzpharma.com/about/global-footprint/>. Acesso em: 26 ago. 2023.

JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO. About us. **Jiangsu Hengrui Pharmaceuticals Co**, China, 2021. Disponível em: <https://www.hengrui.com/en/about.html>. Acesso em: 26 ago. 2023.

JIANGNAN UNIVERSITY. **Overview**. Wuxi, CN: Jiangnan University, 2023. Disponível em: https://english.jiangnan.edu.cn/ABOUT_JU/Overview.htm. Acesso em: 26 ago. 2023.

KINOSHITA, S.; UDAKA, S.; SHIMONO, M. Studies on amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 3, n.3, p. 193–205, 1957. DOI: 10.2323/jgam.3.193.

KUMAR, R.; TRIPATHI, R. C.; SINGH, V. Keyword based search and its limitations in the patent document to secure the idea from its Infringement". **Physics Procedia**, v. 78, p. 439–446, 2016. DOI: 10.1016/j.procs.2016.02.086.

LAVIE, A.; NGUYEN, H. **L-asparaginase variants and fusion proteins with reduced L-glutaminase activity and enhanced stability**. Depositante: Univ Illinois. EUA. US 10821160 B2. Depósito: 1 mar. 2016. Concessão: 3 nov. 2020.

LAVIE, A.; NGUYEN, H. **L-asparaginase variants and fusion proteins with reduced L-Glutaminase activity and enhanced stability**. Depositante: Univ Illinois. EUA. WO2017151707A1. Depósito: 1 mar, 2016. Concessão: 8 sept. 2017.

LIMA, de O. I. G.; BISPO, J. R. S.; SILVA, M. B. Technological prospecting: mapping patents on l-asparaginases from extremophilic microorganisms. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 250–265, 2021. DOI: 10.2174/1872208315666210805162459.

LINKEDIN. **George Pierce**: teacher at Georgia State University. Sunnyvale, CA, EUA: LinkedIn, 2023. Disponível em: <https://www.linkedin.com/in/george-pierce-45aa3740>. Acesso em: 26 ago. 2023.

LINKEDIN. **Zhiming (Ben) Rao, Ph.D, PMP, CEng**. Sunnyvale, CA, EUA: LinkedIn, 2023. Disponível em: https://www.linkedin.com/in/zhiming-ben-rao-ph-d-pmp-ceng-03b84822?challengeId=AQE896qrpBiCsgAAAYozoShXUnZcgaNqG1syA6pRmBBK0XGreBUZkg6lpeCzuqP4fccsRQz0xCMgR-TRIJ2iCtLsh4Ob4k9HNA&submissionId=f14b46bc-4d0a-7f17-1818-e3106ef09420&challengeSource=AgErzW5scYD6LQAAAYozocez5rVOEQ1jBFvGaSrTe06g6YMNTU2rx_6xJxHj3YY&challegeType=AgEx_Ls1_W4cvAAAAYozoce2V4Ewu_6ybUWMsCSXmdzQico1d36P97c&memberId=AgFSemCE78s4ugAAAAYozoce4O6mY4NTwQd6WYACOyi-efgQ&recognizeDevice=AgE5fBTVe3kRLgAAAAYozoce7B8N384UOSiYWYf0n32ikvxQBupk. Acesso em: 26 ago. 2023.

LIU, J. *et al.* **L-Asparaginase sala and coding gene and application thereof**. Depositante: Univ China Petroleum East China. CN. CN113549607A. Depósito: 11 june 2021. Concessão: 26 oct. 2021.

LIU, S. *et al.* **Asparaginase mutant with improved enzyme activity**. Depositante: Univ Jiangnan - China. CN. CN106282148A. Depósito: 21 oct. 2016. Publicação: 4 jan. 2017.

LIU, Y. *et al.* **Preparation method of high purity asparaginase**. Depositante: Jiangsu Hengrui Medicine Co. CN. CN110195050A. Depósito: 27 feb. 2018. Concessão: 3 sept. 2019.

LIU, Y. *et al.* **Asparaginase mutant and gene, engineering bacterium and preparation method thereof**. Depositante: Univ Tianjin Ciência E Tecnologia. CN. CN113604457A. Depósito: 10 aug. 2021. Publicação: 5 nov. 2021.

LOPES, A. M. *et al.* Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, ed.1, p. 82–99, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1120705>

MAGGI, M.; SCOTTI, C. **A highly stable, protease-resistant E. Coli Asparaginase**. Depositante: Univ Degli Studi Di Pavia. USA. US2019270978A1. Depósito: 8 nov. 2016. Concessão: 5 sept. 2019.

MATIAS, N. M. A. **Leucemia linfoblástica aguda: fisiopatologia, diagnóstico e abordagens terapêuticas**. 2019. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, PO, 2019.

MENDIRATTA, K. S. *et al.* **Pharmaceutical Composition of Pegylated L-Asparaginase**. Depositante: Cadila Healthcare Limited. IN. WO2020089743A1. Depósito: 2 nov. 2018. Concessão: 7 sept. 2020.

MINTON, N. P. *et al.* Nucleotide sequence of the *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 L-asparaginase gene. **Gene**, v.46, n.1, p. 25-35, 1986. DOI: 10.1016/0378-1119(86)90163-0.

MORI, K.; FUKUI, K.; AMATSU, R. A novel method for transforming *Geobacillus kaustophilus* with a chromosomal segment of *Bacillus subtilis* transferred via pLS20-dependent conjugation. **Microb Cell Fact**, v.21, n.34, 2022. DOI: 10.1186/s12934-022-01759-8.

MORTAZAVI, M. *et al.* In silico analysis of codon usage and rare codon clusters in the halophilic bacteria L-asparaginase. **Biologia**, v. 75, n. 1, p. 151–160. 2019. DOI: 10.2478/s11756-019-00324-w.

NADEEM, M. S. *et al.* Studies on the recombinant production and anticancer activity of thermostable L- asparaginase I from *Pyrococcus abyssi*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, e244735, 2022. DOI: 10.1590/1519-6984.244735.

NIGRO, L. L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 35, n. 4, p. 245–252, 2013. DOI: 10.1097/MPH.0b013e31828f8746.

NZIOKA, A. M.; KIM, M. G.; HWANG, H. U. Experimental investigation on the drying of loosely-packed and heterogeneous municipal solid waste. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, v. 50, n. 4, p. 414–421, 2016. DOI: 10.1134/S0040579516040448.

OMS. OPAS. BIREME. **Descritores em ciências da saúde: DeCS/MeSH**. São Paulo: OMS: OPAS: BIREME, 2023. Disponível em: https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=30116&filter=ths_exact_term&q=Dickeya%20chrysanthemi. Acesso em: 4 set. 2023.

OZDEMIR, F. I. **Obtaining L-Asparaginase II (Gkasn) Enzyme from Geobacillus Kaustophilus Dsm 7263t**. Depositante: Gebze Teknik Universitesi. TR. WO2023107054. Depósito: 29 de nov. 2022. Concessão: 15 june 2023.

PATEL N. *et al.* A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 119, n.7, p.1964–1973, 2009. DOI: 10.1172/JCI37977.

PELICAN. **Home**. San Diego, CA, EUA: Ligand Pharmaceuticals, 2023. Disponível em: <https://pelicanexpression.com/>. Acesso em: 26 ago. 2023.

PIERCE, G.; CROW, S. **Endotoxin free Asparaginase**. Depositante: Univ Georgia State Res Found. EUA. WO 2018/085493 A1. Depósito: 4 nov. 2016. Publicado: 11 may 2018.

PIETERS, R.; HUNGER, S. P.; BOOS, J. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2011. DOI: 10.1002/cncr.25489.

PINE, P.; GURSAHANI, H. **Methods of treatment with Asparaginase**. Depositante: Jazz Pharmaceuticals Ireland Ltd. IE. WO 2019/109018 A1. Depósito: 30 nov. 2017. Concessão: 6 june 2019.

PLACE, A. E.; STEVENSON, K. E.; VROOMAN, L. M. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native Escherichia coli L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): A randomised, open-label phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 16, p. 1677–1690, 2015. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00363-0

QUAINOO, S.; SOMMER, M. O. A.; SOARES, S. A. **Bacterial vehicle for engineering of non-phagocytic immune cells**. Depositante: Danmarks Tekniske Universitet. DK. WO2022008550. Depósito: 7 jule 2021. Concessão: 13 jan. 2022.

RAO, Z. *et al.* **L-Asparaginase Mutant with Improved enzyme activity and construction method thereof**. Depositante: Univ Jiangnan – China . CN. WO2017031839A1. Depósito: 25 aug. 2015. Concessão: 2 mar. 2017.

RAO, Z. *et al.* **L-Asparaginase mutant and expression thereof in Bacillus subtilis**. Depositante: Univ Jiangnan - China. CN. CN112941059A. Depósito: 23 feb. 2021. Concessão: 11 june 2021.

RAO, Z. *et al.* **Thermophilic L-asparaginase mutant and screening and fermentation method thereof**. Depositante: Univ Jiangnan - China. CN. CN108103049A. Depósito: 15 dez. 2017. Concessão: 1 june 2018.

SANTOS, J. H. P. M. **Potencial da PEGuilação para o desenvolvimento de proteínas para fins terapêuticos e analíticos**. 2019. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. DOI: 10.11606/T.9.2019.tde-23092019-124950.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n.1, p.1–17, 2015. DOI: 10.1139/w03-076.

SOUZA, T. de A. C. B.; ZANCHIN, N. I.T. MORAIS, S. B. **Polypeptide with asparaginase activity, expression cassette, expression vector, host cell, pharmaceutical composition, methods for producing a polypeptide with asparaginase activity and for preventing or treating cancer, and use of a polypeptide**. Depositante: Fundação Oswaldo Cruz. BR. US20210121544. Depósito: 18 jan. 2019. Concessão: 29 apr. 2021.

UNIVERSITY OF GEORGIA. **Home**. Athens, GA, EUA: University of Georgia, 2023. Disponível em: <https://www.uga.edu/>. Acesso em: 26 ago. 2023.

VAN DER LAN, M. *et al.* **Asparaginase**. Depositante: DSM IP ASSETS BV. EUA. WO2017050652A1. Depósito: 25 sept. 2015. Concessão: mar. 2017.

VLADIMIROVNA, D. M. *et al.* **Modified Tsa gene encoding the Thermostable L-Asparaginase from thermococcus sibiricus archaea, recombinant escherichia coli strain - thermostable L-Asparaginase producer and method for purification of this enzyme**. Depositante: Russian Federation. RU. RU0002794225. Depósito: 11 mar. 2022. Concessão: 13 apr. 2023.

WHELAN, H. A.; WRISTON, J. C. Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli* B. **Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 2386 – 2393, 1969. DOI:10.1021/bi00834a020.

ZHANG, X. *et al.* **L-Asparaginase mutant, and construction method thereof**. Depositante: Univ Jiangnan - China. CN. CN107828768A. Depósito: 13 dec. 2017. Concessão: 23 mar. 2018.