



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANILO COSTA GERALDES

**Estudo de parâmetros farmacotécnicos e de processo para a
obtenção de asparaginases liofilizadas**

CAMPINAS
2017

DANILO COSTA GERALDES

**Estudo de parâmetros farmacotécnicos e de processo para a
obtenção de asparaginases liofilizadas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências na Área de
Fármacos, Medicamentos e Insumos
para a Saúde.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELO ALUNO DANILO COSTA GERALDES E
ORIENTADA PROFA. DRA. LAURA DE
OLIVEIRA NASCIMENTO.

Orientador: LAURA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 1596355
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7091-2895>

Ficha catalográfica
 Universidade Estadual de Campinas
 Biblioteca do Instituto de Biologia
 Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G311e Geraldles, Danilo Costa, 1992-
 Estudo de parâmetros farmacotécnicos e de processo para a obtenção de
 asparaginases liofilizadas / Danilo Costa Geraldles. – Campinas, SP : [s.n.],
 2017.

 Orientador: Laura de Oliveira Nascimento.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
 Biologia.

 1. Asparaginase. 2. Secagem por congelação. 3. *Escherichia coli*. I.
 Nascimento, Laura de Oliveira, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of pharmacotechnical and process parameters for the
 obtaining of lyophilized asparaginases

Palavras-chave em inglês:

Asparaginase

Freeze-drying

Escherichia coli

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Laura de Oliveira Nascimento [Orientador]

Marco Antonio Stephano

Priscila Gava Mazzola

Data de defesa: 14-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 14 de março de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Laura de Oliveira Nascimento

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Laura de Oliveira Nascimento pelo suporte e paciência;

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Stefano pelos conselhos e utilização do microscópio de liofilização;

Ao Prof. Dr. Carlos Ramos pelas análises de dicroísmo circular e discussão dos espectros;

Aos meu aluno de iniciação científica Boris Pichihua pelo apoio e dedicação;

Aos técnicos de laboratório Paulinho, Marcio, Karen, Nilton, Celso e Cláudia pelos serviços prestados sem os quais esse trabalho não seria possível;

A minha namorada Valéria Scorsato pela presença nos bons e mals momentos juntamente com o auxílio nas análises de CD;

As minhas colegas de laboratório Juliana e Viviane pelos momentos diários de seriedade e relaxamento;

A aluna Louise Tundisi e o Prof. Edgar Silveira pelo ensinamento com os protocolos de atividade enzimática;

Ao Prof. Dr. Marcos Oliveira e todos os seus alunos da Unesp de São Vicente pelos ensinamento e a recepção

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr. Pela viabilização do projeto via o Projeto Temático da FAPESP;

A minha querida família e meus queridos amigos pelo apoio, suporte e acolhimento

A Todos que participaram diretamente ou indiretamente deste projeto

*“If I have seen further it is by standing on the shoulders of **Giants**.”* – Sir Isaac Newton

RESUMO

A asparaginase (ASNase) é uma enzima de destaque no tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (LLA), sendo capaz de converter o aminoácido asparagina em aspartato e amônia. A depleção extracelular desse aminoácido leva a morte de células leucêmicas, que são deficientes em sua produção. Pela relevância do medicamento e pela suspensão de seu fornecimento no Brasil, este trabalho visou estudar parâmetros de formulações liofilizadas de ASNase oriunda de *Escherichia coli* (Eco ASNase, similar ao comercial). A formulação foi desenvolvida a partir de enzima purificada comercial, visando consistência dos estudos de pré-formulação e de processo de liofilização. Diversos excipientes foram testados e cinco foram selecionados por não interferirem nos métodos de caracterização. As combinações de excipientes resultaram em temperaturas de colapso (Tcs) muito baixas, sendo que quanto maior o número de excipientes, menor a Tc, informação não relatada em artigos científicos. O manitol mostrou interferir nas Tcs dos excipientes de todas as combinações que esteve presente, a alanina apresentou interferência na análise estrutural e a sacarose foi o único excipiente que apresentou mudança na estrutura secundária proteica. As melhores formulações, considerando seu perfil físico-químico, foram as de ASNase contendo os excipientes individuais na maior concentração testada: trealose 3%, manitol 3%, sacarose 3%, glicina 3% e alanina 3%.

Palavras-Chave: L-asparaginase, liofilização, lioprotetores

ABSTRACT

ASNase is a key enzyme in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (LLA), being capable of convert the amino acid asparagine in aspartate and ammonium. The extracellular depletion of this amino acid leads to the death of leukemic cells, which are deficient in its production. Due to the relevance of this drug and the suspension of its supply in Brazil, this work aims to design freeze-dried formulations of ASNase from *Escherichia coli* (Eco ASNase, similar to the commercial drug). The formulation was designed from the purified commercial enzyme, due to the consistency of the pre-formulation and freeze-drying process. Several excipients were tested and five were selected and were selected because they did not interfere with the characterization methods. The combinations of excipients resulted in very low collapse temperatures (Tcs), the higher the number of excipients, the lower the Tc, information not reported in scientific papers. Mannitol showed interfering with the Tcs of the excipients in all formulations that it were present, alanine presented interference in the structural analysis and sucrose was the only excipient that presented a change in the protein's secondary structure. The best formulations, considering it's physic-chemical profile, were ASNases containing the individual excipients in the highest concentration tested: 3% trehalose, 3% mannitol, sucrose 3%, 3% glycine and alanine 3%.

Key Words: L-asparaginase, Freeze-drying, Lyoprotectors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do mecanismo catalítico da hidrólise de L-asparagina para L-aspartato pela L-asparaginase ¹³ . Nuc = nucleófilo	15
Figura 2 – Comparação da Homologia Sequencial de aminoácidos das ASNases provenientes de Sac ASNase, Eco ASNase e Erw ASNase.	17
Figura 3 - Ilustração do Processo de Liofilização. Imagem traduzida do inglês. ³⁴	19
Figura 4 - Sumário das propriedades gerais mais estudadas em pré-formulação farmacêutica, tanto para a análise das características físicas e químicas de fármacos e excipientes. ⁴²	20
Figura 5 – Gel de eletroforese de Sac ASNase A após purificação por coluna de níquel.	29
Figura 6 – Imagens do colapso das formulações de Eco ASNase por Microscopia de Liofilização.	37
Figura 7 – Temperatura Eutética/de Transição vítrea das Formulações de ASNase por DSC (1). A) Sacarose 3%; B) Manitol 3%; C) ASNase Pura. Os espectros foram obtidos com rampa de 5°C/min, na faixa de -70°C até 25°C.....	38
Figura 8 – Temperatura eutética/de transição vítrea das formulações de ASNase por DSC (2). D) Alanina 3%; E) Glicina 3%; F) Trealose 3%. Os espectros foram obtidos com rampa de 5°C/min, na faixa de -70°C até 25°C.....	39
Figura 9 - Gráfico de Contorno do Modelo de Misturas Trealose/Glicina/Sacarose ..	44
Figura 10 - Gráfico de Contorno de Modelo de Misturas Glicina/Alanina/Trealose....	45
Figura 11 - Espectro de dicroísmo circular (CD) da formulação de ASNase pura	46
Figura 12 – Espectro de dicroísmo circular (CD) das formulações de ASNase contendo todos os excipientes com exceção da alanina.	47
Figura 13 - Espectro de dicroísmo circular (CD) de Formulações de Alanina.....	47
Figura 14 - Espectro de dicroísmo circular das demais misturas de ASNase sem alanina.	48
Figura 15 - Aspecto visual das misturas de ASNase liofilizadas em microplaca de 96 poços.	50
Figura 16 – Caracterização por dicroísmo circular (CD) das misturas de ASNase pós-liofilização sem alanina.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características das ASNases terapêuticas comerciais ^{15–17,31}	18
Tabela 2 - Excipientes mais frequentes em medicamentos proteicos liofilizados	27
Tabela 3 – Comparação das Temperaturas de Colapso dos Excipientes (Microscopia de Liofilização)	30
Tabela 4 - Interferência dos Excipientes analisados em diferentes concentrações pelo Método de Nessler	31
Tabela 5 - Interferência dos excipientes em diferentes concentrações nos métodos de dosagem de proteínas totais por BCA e absorbância em 280 nm.	33
Tabela 6 - pH dos excipientes em solução aquosa	34
Tabela 7 - Seleção final dos excipientes conforme os resultados prévios	35
Tabela 8 - Comparação entre temperaturas de colapso (T_c), temperaturas eutéticas/de transição vítrea (T_e/T_g) experimentais com as temperaturas de referência na bibliografia (Ref)	40
Tabela 9 - Delineamento experimental de misturas de ASNases acrescidas de excipientes	41
Tabela 10 - Temperatura de colapso das misturas de ASNase	42
Tabela 11 - Tabela ANOVA para modelo de misturas quadráticos (misturas de ASNase)	43
Tabela 12 - Caracterização visual, tempo de ressuspensão, temperatura de colapso e atividade enzimática das misturas de ASNase liofilizadas	49
Tabela 13 - Comparação das atividades enzimáticas (pre e pós liofilização), proteínas totais e colapso das misturas de ASNase	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ASNase – L-asparaginase

BCA – Ácido Bicinconínico

CQA's – Parâmetros Críticos de Qualidade

DSC - *Differential Scanning Calorimetry*

E. coli - *Escherichia coli*

Eco ASNase – L-asparaginase proveniente de *Escherichia coli*

Ewr ASNase – L-asparaginase proveniente de *Erwinia chrysanthemi/Dickeya dadantii*

FDA – Food and Drug Administration

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPTG - isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

L.B. – Meio Luria-Bertani

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

PEG - Polietilenoglicol

Peg Eco ASNase - L-asparaginase proveniente de *Escherichia coli* peglada

QbD – *Quality by Design*

Sac ASNase – L-asparaginase proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*

SNC – Sistema Nervoso Central

Te – Temperatura Eutética

Tc – Temperatura de Colapso

TCA – Ácido Tricloroacético

Tg' – Temperatura de Transição Vítreia Pré-Liofilização

TGA – Análise Termogravimétrica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 A Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	14
2.2 ASNases para tratamento da LLA.....	15
2.3 Estabilidade e formulação de ASNases	17
2.4 Formas farmacêuticas liofilizadas	18
2.5 Estudos de Pré-Formulação	20
3. OBJETIVO GERAL	21
3.1 Objetivos Específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Enzimas	22
4.1.1 Produção e purificação de Sac ASNase (Asp I)	22
4.2 Estudo teórico das formulações de proteínas terapêuticas disponíveis no mercado.....	23
4.3 <i>Screening</i> de Formulações.....	23
4.4 Atividade Enzimática	24
4.5 Proteínas Totais	24
4.6 Temperaturas de Colapso	24
4.7 Temperaturas de Transição Vítreia/Cristalização	25
4.8 Liofilização	25
4.9 Umidade residual e dos pós liofilizados.....	25
4.10 Caracterização Estrutural das Proteínas.....	25
4.11 Métodos estatísticos e análise de dados	26
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Estudo teórico das formulações de proteínas terapêuticas comerciais.....	27
5.2 Produção Purificação de ASNases Recombinantes.....	28
5.2.1 Sac ASNase A.....	28
5.3 Caracterização Físico-Química dos Excipientes	29
5.3.1 Temperatura de colapso	29
5.3.2 Interferência dos excipientes no ensaio de atividade enzimática	31
5.3.3 Interferências dos excipientes nos ensaios de quantificação proteica	32
5.3.4 pH dos excipientes em solução	34

5.3.5 Resultados do screening inicial	35
5.4. Interação excipiente-ASNase	36
5.4.1 Temperaturas Críticas de ASNase combinada a excipientes	36
5.5 Delineamento Experimental – planejamento de misturas	40
5.5.1 Temperaturas de Colapso das Misturas	41
5.5.2 Análise Estrutural das Amostras	45
5.6 Liofilização das Misturas	48
5.5.1 Parâmetros de Liofilização em função do delineamento	48
5.5.2 Caracterização Visual e Tempo de Ressuspensão do Material Liofilizado	48
5.5.3 Atividade Enzimática do Material Liofilizado	51
5.5.4 Análise Estrutural das Misturas Pós-Liofilização	52
6. CONCLUSÃO	54
7. REFERÊNCIAS	55
ANEXO 1 – DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA.....	60
ANEXO 2 – DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS	61

1. INTRODUÇÃO

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), sendo a leucemia linfóide aguda (LLA) a que mais acomete crianças e jovens ¹. Os atuais protocolos de tratamento para a LLA apresentam chance de cura de 80% para crianças e 30% para adultos ². Um medicamento importante nesses protocolos é a enzima L-asparaginase (ASNase), utilizada na fase de remissão da doença ³. No entanto, o uso desse medicamento apresenta dois problemas relevantes atuais: disponibilidade comercial e efeitos colaterais. A produção nacional foi suspensa pelo Laboratório Bagó em 2013, e os medicamentos importados aumentam muito o custo do tratamento⁴.

Proteínas terapêuticas, como a ASNase, necessitam cuidados especiais em sua formulação. Quando formuladas em diluentes aquosos podem ser desnaturadas por aquecimento ou resfriamento repentino, mudanças de pH, agitação, exposições a agentes externos, hidrólise, deaminação, entre outros. Visando preservar propriedades físicas e químicas, as formulações proteicas são comumente desidratadas por liofilização.

Frente ao quadro atual, o projeto temático da FAPESP “Produção de L-asparaginase extracelular: da bioprospecção a engenharia de um fármaco antileucêmico” visa desenvolver uma formulação de ASNase comercial nacional, desde sua produção à sua formulação. Este trabalho de mestrado incluso no projeto temático propõe desenvolver formulações liofilizadas de ASNases biossimilares. O trabalho possui foco no desenvolvimento farmacotécnico e de processo, partindo da produção e purificação de ASNases recombinantes, estudos de pré-formulação para a caracterização físico-química e biológica da enzima e seus excipientes, parâmetros de processo da liofilização e caracterização e potência das formulações liofilizadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Leucemia Linfoide Aguda (LLA)

Segundo as estimativas do INCA, em 2016 surgiram 10.070 novos casos de leucemia no Brasil, resultando em aproximadamente 6316 óbitos ¹. As leucemias são caracterizadas por intensa multiplicação celular, acarretando em um grande número de células imaturas das linhagens linfoide e mieloide na corrente sanguínea ⁵. Os sintomas decorrentes deste acúmulo de células anormais na medula óssea são: anemia (deficiência na produção de glóbulos vermelhos), infecções (deficiência na produção de glóbulos brancos) e hemorragias (deficiência na produção de plaquetas) ⁷. Dentre os tipos da doença a leucemia linfoide aguda (LLA) é a que mais acomete crianças e jovens ⁸.

O tratamento da LLA é extenso, variando de dois a três anos. Os esquemas terapêuticos geralmente são constituídos de seis grandes fases: indução da remissão, intensificação, consolidação, reindução, prevenção da leucemia no sistema nervoso central (SNC) e continuação ou manutenção da remissão ³. Diferentemente dos primeiros relatos observados da doença, o avanço no suporte hematológico, no conhecimento de seu desenvolvimento no organismo e no número de alternativas terapêuticas permitiu que a LLA evoluísse de incurável e incompreendida para uma enfermidade passível de tratamento ⁹.

Existem diversos protocolos oncológicos para o tratamento de LLA, conforme a classificação no grupo de risco. Os protocolos são compostos por combinações de quimioterápicos, acompanhados ou não de radioterapia, visando interromper o metabolismo das células neoplásicas ¹. Dentre eles podemos citar: metotrexato (inibidor do metabolismo do ácido fólico), vincristina (antimitótico), doxoburricina (antibiótico que inibe a progressão da enzima topoisomerase II e consequentemente a transcrição do DNA celular), ciclosfosfamida (agente alquilante que forma ligações cruzadas com o DNA, impedindo a sua replicação) e L-Asparaginase ¹⁰.

2.2 ASNases para tratamento da LLA

A L-Asparaginase (ASNase) é uma enzima que catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (Figura 1). Sua síntese é realizada por diversos micro-organismos e animais, incluindo o ser humano. Quando administrada como medicamento, a enzima depleta a L-asparagina do meio extracelular, afetando as células neoplásicas que não sintetizam este aminoácido essencial ¹¹. Algumas asparaginases, incluindo as atuais terapêuticas, também catalisam a hidrólise de glutamina, que leva a apoptose células cancerígenas capazes de sintetizar asparagina ¹².

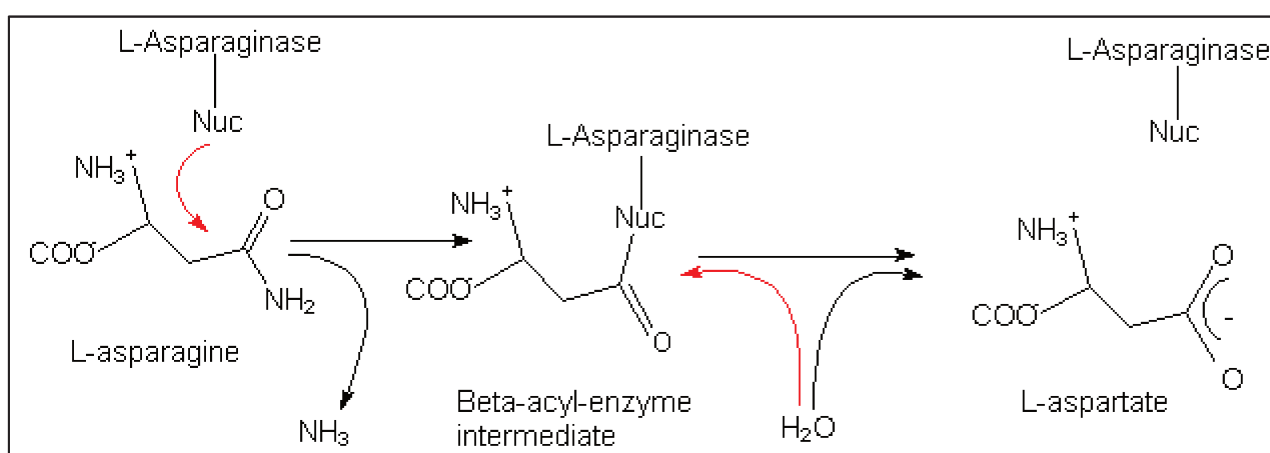


Figura 1 - Esquema do mecanismo catalítico da hidrólise de L-asparagina para L-aspartato pela L-asparaginase¹³. Nuc = nucleófilo

Existem duas ASNases distintas utilizadas para tratamento atualmente, ambas homotetraméricas: *Erwinia chrysanthemi*/*Dickeya dadantii* (Erw ASNase, nome comercial *Erwinase*) e *Escherichia coli* (Eco ASNase, nome comercial *Elspar*, *Kidrolase* e *Spectrila*). A enzima de *E. coli* ainda apresenta uma versão peglada (PEG Eco ASNase, Pegaspase), o que aumenta sua meia vida plasmática e diminui sua imunogenicidade. Os três medicamentos possuem o mesmo mecanismo de ação, porém diferem em suas propriedades farmacocinéticas, como a meia vida plasmática: a Eco ASNase possui uma meia vida de 30h, enquanto a Erw ASNase de 16h e a PEG Eco ASNase de aproximadamente 6 dias (3 dias em pacientes que desenvolveram hipersensibilidade) ¹⁴⁻¹⁷.

Apesar de eficaz, as ASNases podem apresentar efeitos adversos. Entre eles, podemos citar: reações de hipersensibilidade (devido à exposição do sistema imune a proteínas exógenas), pancreatite (menos de 10% dos casos, relacionada ao efeito

da ASNase na síntese proteica), insuficiência hepática (33% dos casos em adultos e 10% em crianças, causada por esteatose severa em função da catálise de asparagina e glutamina), trombose (diminuição da asparagina sérica acarreta em efeito pró-coagulante) e imunossupressão (depleção de precursores de células B, produtoras de anticorpos). Tais efeitos adversos podem ser prevenidos ou controlados com o devido ajuste de dose e acompanhamento de marcadores renais/hepáticos¹⁸⁻²¹.

Os protocolos de tratamento utilizando-se ASNase variam de acordo com o país, a idade e remissão da doença. Tratamentos de primeira escolha costumam ser realizados utilizando-se Eco e PEG Eco ASNase, sendo a Erw ASNase utilizada como tratamento secundário. Em caso de desenvolvimento de hipersensibilidade ao tratamento, sempre deve-se alterar a formulação utilizada visando maiores benefícios clínicos ao paciente²². Porém, substituições entre as formulações comercializadas atualmente podem não ser efetivas em casos de hipersensibilidade e ou imunossupressão, tornando-se imprescindível a exploração de outras ASNases que possam ter uma maior potência e ou diminuição nos efeitos adversos¹¹. De acordo, a ASNase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sac ASNase) Aspl, enzima constitutiva intracelular, apresenta alto grau de homologia à Eco ASNase e Erw ASNase (figura 2), e pode ser uma alternativa no tratamento da Leucemia Linfóide Aguda^{23,24}. A diferença mais significativa entre as enzimas consideradas é o conteúdo de cisteínas: ausente na Erw ASNase, 2 unidades na Eco ASNase e 10 unidades na Sac ASNase. As pontes dissulfeto formadas por cisteínas são intramoleculares, tendo participação na formação e estabilização de sua estrutura quaternária²⁵.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

Saccharomycescerevisiae  MKSDSVEITTICPDVENSQFVVQSNCPETIPEILKSQNAAVNGSGI-ACQQRSLPRIKIL
Escherichiacoli         -----MEFFKKTALAALVMGF-SGAALALPNITIL
Erwiniachrysanthemi     -----MERNFKSLFVLVLFVFTASAADKLPNIVIL
                        * : * * * : : * * *

Saccharomycescerevisiae  GTGGTIASKAIDSSQTAGYHVD-LTIQDLLDAIPDISKVCIDIEYQLCNVDSKDINEDIL
Escherichiacoli         ATGGTIAGGGDSA-TKSNTYVGKVGVENLVNAVPLQKDIAVVKGEQVNVIGSQDMNDVNV
Erwiniachrysanthemi     ATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVV
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Saccharomycescerevisiae  YKIYKGVSES--LQAFDGVITHGDTLSETAFFIESTIDAGDVPVIVGSMRPSTSVSA
Escherichiacoli         LTLAKKINTD--CDKTDGFVITHGDTMEETAYFLDLTVK-CDKPVVMVGAIRPSTSMISA
Erwiniachrysanthemi     LKLSQRVNEILLRDDVDGVVITHGDTVEESAYFLHLTVK-SDKPVVFVAAMRPATAISA
                        * : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Saccharomycescerevisiae  DGPNNLYQAICIASNPKSRGRGLVLSLNDQISSGYYITKTNANSLDSFNV-RQGYLGNFV
Escherichiacoli         DGPNNLYNAVVTAAADKASANRGLVVMNDTVLDGRDVTKTNTTQVATFKSVNYGPLGYIH
Erwiniachrysanthemi     DGPNNLLEAVRVAGDKQSRGRGMVVLNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEGLGVII
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Saccharomycescerevisiae  NNEIHYYPPVKPQGCH-KFKLRVDGKHFKLPEVCILYAHQAFPPAIV-NLVADIKYDGIV
Escherichiacoli         NGKIDYQRTPAKHTSDTPFDV--SKLNELPKVGIVVYNYANASDLPAKALVDAGYDGIV
Erwiniachrysanthemi     GNRYYQNRIDKLHTTRSVFDV--RGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGV
                        * * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Saccharomycescerevisiae  LATMGAGSLPEEVNET---CMKLSLPVYVSKRMDGMVPIANVPKKGSKEDNLIASGYLS
Escherichiacoli         SAGVGNLGYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSSRVPTGATTQDAE--VDDAKYGFVASGTIN
Erwiniachrysanthemi     YAGMGAGSVSVRGIAGRKAMEKGVVIVIRSTRTGNVIVPPDEE--L-----PGLVSDSLN
                        * * * * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Saccharomycescerevisiae  PEKSRIILLQLCLAGNYTLEEIKHVFTGVVGG
Escherichiacoli         PQKARVLLQLALTQTKDPQIQIIFNQY---
Erwiniachrysanthemi     PAHARILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY---
                        * : * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 2 – Comparação da Homologia Sequencial de aminoácidos das ASNases provenientes de Sac ASNase, Eco ASNase e Erw ASNase.

A ASNase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sac ASNase, peso molecular 41,4 KDa) Aspl, enzima constitutiva intracelular, apresenta alto grau de homologia à Eco ASNase (peso molecular 36,8 KDa) e Erw ASNase (peso molecular 37,5 KDa).

Dados obtidos pelo programa Clustal Omega 26,27. Os asteriscos (*) indicam conservação do aminoácido da mesma coluna entre as três sequências. Um ponto (.) indica alta conservação entre as sequências de aminoácidos com propriedades similares. Dois pontos (:) indicam fraca conservação de aminoácidos com propriedades similares. Traços (-) indicam ausência de aminoácido.

2.3 Estabilidade e formulação de ASNases

Proteínas terapêuticas são formuladas em sua maioria em diluentes aquosos, e podem ser desnaturadas por aquecimento ou resfriamento repentino, mudanças de pH, agitação, exposições a agentes externos, hidrólise, deaminação, entre outros ²⁸. Foi demonstrado que a Eco ASNase em meio aquoso (37°C/pH 6,8) perde até 50% de sua atividade após 3 dias, porém sem perda da estrutura quaternária. Outro estudo mostrou que a deaminação é capaz de alterar a meia vida plasmática e ponto isoelétrico da Eco ASNase e Erw ASNase, mas sem alterar atividade enzimática. Para evitar os problemas mediados pelo ambiente aquoso, as estratégias mais comuns são adição de excipientes ou a retirada do solvente ^{6,29}.

Os excipientes das formulações farmacêuticas podem ser classificados conforme sua finalidade. No caso das formulações parenterais os mais comuns são: diluentes (agentes de preenchimento que fornecem volume adequado), agentes tamponantes (controle de pH), agentes de tonicidade (manutenção do valor da osmolaridade dos fluídos biológicos), lioprotetores (previnem colapso ou denaturação das formas liofilizadas) e crioprotetores (protegem o fármaco no processo de congelamento) ³⁰. No caso das ASNases, existem 5 formulações no mercado, do nosso conhecimento: *Elspar*, *Erwinase*, *Kidrolase*, *Pegaspase* e *Spectrila* (Tabela 1); dessas, apenas a proteína peglada é comercializada em solução. Cada formulação liofilizada tem um lioprotetor diferente (poliálcool-manitol, açúcar-glicose/sacarose e aminoácido-glicina), o que mostra a heterogeneidade das formulações e instiga estudos mais detalhados sobre a melhor formulação para as asparaginases.

Tabela 1 – Características das ASNases terapêuticas comerciais ^{15–17,31}.

Nota-se a prevalência da forma farmacêutica liofilizada entre as formulações, sendo a Pegaspase a única exceção.

Nome Comercial	UI/mL	Microrganismo	Forma farmacêutica	Excipientes
Elspar	5000	E. coli	Liofilizado	Manitol (D/L)
Erwinase	10000	Erwinia chrysantemi	Liofilizado	Glicose (D/L) NaCl (To)
Kidrolase	4000	E. coli	Liofilizado	Glicina (D/L/Ta)
Pegaspase	750	E.coli*	Solução	Tampão fosfato (Ta) NaCl (To)
Spectrila	2500	E. coli	Liofilizada	Sacarose (D/L)

* enzima ligada covalentemente a PEG. D/L = agente Diluente/Lioprotetor; To = agente de Tonicidade; Ta = agente Tamponante ³².

2.4 Formas farmacêuticas liofilizadas

Visando preservar propriedades físicas e químicas, as formulações proteicas são comumente desidratadas por liofilização ²⁸. A liofilização é um processo de secagem constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. O processo inicial de congelamento tem como finalidade imobilizar o produto a ser liofilizado, interrompendo ou diminuindo reações químicas/bioquímicas e interações físicas que possam ocorrer na formulação. O material previamente congelado é desidratado por sublimação de solvente em baixas temperaturas e vácuo (Figura 3). A secagem primária retira a água livre enquanto a secagem

secundária sublima a água ligada as moléculas do produto ou entremeadas na matriz ³³.

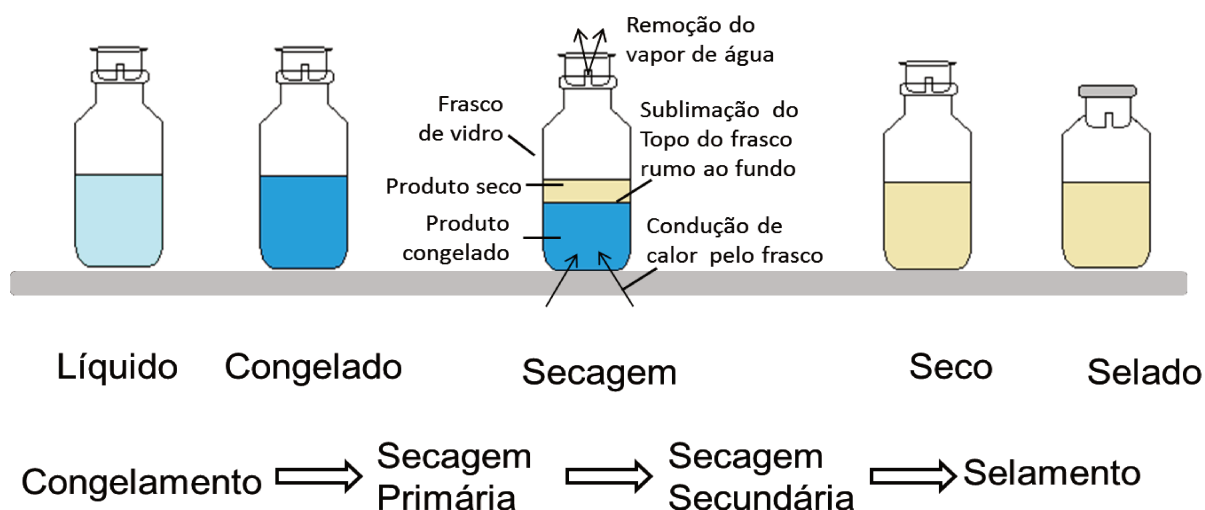


Figura 3 - Ilustração do Processo de Liofilização. Imagem traduzida do inglês.³⁴

O processo inicial de congelamento tem como finalidade imobilizar o produto a ser liofilizado, interrompendo ou diminuindo reações químicas/bioquímicas e interações físicas que possam ocorrer na formulação. O material previamente congelado é desidratado por sublimação de solvente em baixas temperaturas e vácuo.

A criodessecação, apesar de ser um método de secagem brando, pode desnaturar proteínas pelo congelamento e ou pressão osmótica gerada pela desidratação ³⁵. A Erw ASNase, por exemplo, perde mais que 60% de sua atividade após congelamento a -40°C .³⁶ Assim, é necessário ampliar o conhecimento do processo de liofilização e utilização de excipientes adequados para a preservação das ASNases.

A adição de excipientes pré-liofilização influencia o comportamento de uma solução durante os processos de congelamento e secagem. Alguns aditivos podem cristalizar ou vitrificar durante a etapa de congelamento, acarretando na formação de massa liofilizada heterogênea, mudanças de pH e colapso da amostra. Por outro lado, outros aditivos podem ter função protetora e prevenir esses eventos ³⁷.

Três teorias foram propostas para explicar o mecanismo de ação dos lioprotetores, conforme suas funções atribuídas no processo de liofilização: a teoria de substituição aquosa, em que os lioprotetores substituem a água de solvatação da amostra ³⁸; a teoria cosmotrópica, que diz respeito a capacidade de agentes cosmotrópicos (como sacarose e trealose) de deslocar a água diluente da formulação ³⁹; e a teoria de vitrificação, em que lioprotetores formam matriz vítrea

junto à amostra e evitam a evaporação da água de solvatação ⁴⁰. Vale ressaltar que um lioprotetor pode desempenhar seu papel por mais de um mecanismo ³⁸.

2.5 Estudos de Pré-Formulação

Estudos de pré-formulação avaliam características físicas e químicas dos fármacos e excipientes (Figura 4), isolados e combinados, para embasamento científico ao desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis e eficazes. Sua aplicação industrial visa atender as exigências de qualidade, viabilizada pela evolução dos métodos analíticos das últimas décadas ^{41,42}. Fármacos não inovadores tem seus estudos direcionados aos excipientes já utilizados pelo medicamento inovador, ou outros similares de mercado ⁴³.

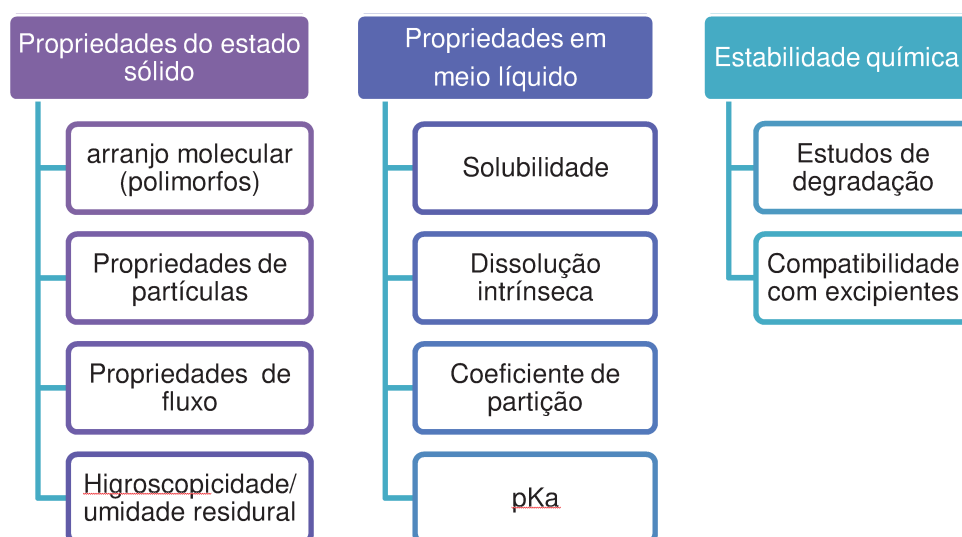


Figura 4 - Sumário das propriedades gerais mais estudadas em pré-formulação farmacêutica, tanto para a análise das características físicas e químicas de fármacos e excipientes. ⁴²

No caso de o fármaco biológico ser instável em meio aquoso, como as asparaginases⁴⁴, a forma farmacêutica mais escolhida é a liofilizada. Estudos de pré-formulação para esse tipo de forma farmacêutica envolvem principalmente solubilidade, estabilidade em diferentes pHs, perfil térmico dos ingredientes e análise de polimorfos. Os atributos de qualidade avaliados incluem potência/teor (no caso da asparaginase, atividade enzimática), proteínas totais (para proteínas), umidade residual (pós- liofilização) e aparência do liofilizado (colapso, cor, volume)⁴⁵.

3. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de processo e formulação liofilizada das enzimas Eco Asnase e Sac ASNase.

3.1 Objetivos Específicos

- a) Produzir e Purificar ASNases recombinantes;
- b) Caracterizar fisico-quimicamente os excipientes e ASNases;
- c) Formular e liofilizar as ASNases;
- d) Caracterizar fisico-quimicamente e potência das formulações de ASNase liofilizadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Enzimas

As enzimas utilizadas nesse projeto são: L-asparaginase II (Asp II) proveniente de *Escherichia coli* (Prospec, 225 U/mg) e L-asparaginase I (Asp I) de *Sacharomicces cerevisiae* (proteína recombinada por pesquisadores do projeto temático para produção em *E. coli* C43(DE3), transformada com vetor PET28pp/mbp (Sac ASNase A) e *E. coli* DH5 α , transformada com vetor PET15b (Sac ASNase B).

4.1.1 Produção e purificação de Sac ASNase (Asp I)

Uma colônia de *E. coli* transformada com o vetor de interesse e selecionada de acordo com resistência a carbenicilina foi transferida para um tubo de pré-inóculo, contendo meio de cultura LB líquido e antibiótico. A cultura foi mantida *overnight* a 37°C e 180 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi transferido para um *erlenmeyer* contendo meio LB líquido e 50 μ g/mL de carbenicilina. A cultura foi crescida a 37 °C sob agitação até atingir a OD_{600nm} entre 0,6 e 1,0 U.A.; então foi adicionado 1 mM do indutor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), seguido de incubação por 3 h/37°C/180 rpm. O caldo cultivado foi centrifugado a 4.000 X g /20 min/4°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi pesado e ressuspensionado em reagente *Bugbuster* (Merck-Millipore, 5mL/g de *pellet*) seguido de agitação em *shaker* por 20 min/180 rpm. A suspensão resultante foi centrifugada por 20 min/9000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 μ m (Merck-Millipore) e seguiu para a cromatografia de afinidade por metal imobilizado em coluna de afinidade de níquel Hi-Trap de 5 mL (GE Healthcare).

A coluna foi previamente lavada com 50 mL de água Mili-Q, carregada com 2,5 mL de sulfato de níquel 0,1 M e lavada novamente com 50 mL de água Milli-Q. A coluna foi equilibrada com 50 mL de *start buffer* (20 mM tampão Tris-HCl pH 7,4, 300 mM de NaCl, 50 mM de imidazol) e a amostra aplicada em seguida. A coluna foi novamente lavada, agora com 50 mL de *wash buffer 1* (20 mM tampão Tris-HCl pH 7,4, 300 mM de NaCl, 50 mM de imidazol) seguida de 50 mL de *wash buffer 2* (20 mM tampão Tris-HCl pH 7,4, 300 mM de NaCl, 150 mM de imidazol) para retirar o excesso de proteínas ligadas de forma inespecífica na coluna. Por fim, a eluição foi realizada com *elute buffer* (20 mM tampão Tris-HCl pH 7,4, 300 mM de NaCl, 500 mM de imidazol). A presença de proteína nas frações coletadas foi verificada por

reagente de Bradford (BioAgency) e a confirmação de purificação e integridade da proteína de interesse foram confirmadas por eletroforese com gel SDS-PAGE 14%⁴⁶. A Proteína foi dessalinizada por cromatografia de exclusão molecular com a PD-10 *Dessalting Columns* (GE Healthcare Life Sciences) seguindo o protocolo do fabricante. Por fim, a proteína foi concentrada por ultrafiltração em membrana usando o Amicon-Ultra 15 mL com corte de 10 kDa NMWL com membrana de celulose regenerada (Merck-Millipore). A quantificação de proteína foi obtida pela leitura a 280_{nm} em espectrofotômetro (coeficiente de extinção molar $\epsilon = 25955 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, obtido com a ferramenta de bioinformática *ProtParam*^{27,47}).

Foi realizada etapa de clivagem da cauda de histidina + MBP utilizando a protease 3C na proporção 1:100, incubada por 16h/4°C⁴⁸. Após incubação, a enzima passa por nova cromatografia em coluna de níquel e nova ultrafiltração para concentração.

4.2 Estudo teórico das formulações de proteínas terapêuticas disponíveis no mercado

Foi realizado um mapeamento de formulações comerciais de medicamentos biológicos aprovadas pelo FDA utilizando as *databases Drugbank*⁴⁹ e *RXlist*⁵⁰, relacionando função fisiológica, forma farmacêutica e vias de administração. Em seguida, foram descritos os excipientes de todas as formulações liofilizadas encontradas, classificando-os de acordo com sua função na formulação e faixa de concentração

4.3 Screening de Formulações

As formulações contendo L-asparaginase foram testadas de acordo com delineamento experimental de misturas com ponto central. Os parâmetros críticos de formulação estudados (*inputs*) foram o sistema tamponante e o agente lioprotetor/diluyente. As melhores formulações foram escolhidas frente aos atributos (*outputs*) de: atividade enzimática; pH; perfil térmico; formação adequada de pastilha de liofilização e concentração/quantidade de excipientes.

4.4 Atividade Enzimática

A atividade da enzima foi determinada através da detecção do produto enzimático amônio, baseado no método de Nessler ⁵¹. Para a curva padrão foram utilizados 3 padrões mais o branco: P1 (1,0 mL de tampão Tris-HCL 0,25 ml de Sulfato de Amônio (6mM) e 0,85 mL de Água Milli-Q), P2 (0,5mL de Sulfato de Amônio), P3 (1,0 mL de Sulfato de Amônio) e Branco (sem adição de Sulfato de Amônio); para as amostras foram feitas duas soluções teste (teste 1 e teste branco) com 1,0 mL de Tampão Tris-HcL, 0,1mL de Asparagina e 0,9 mL de ÁguaMilli-Q. As soluções foram ser incubadas à 37°C por 5 minutos, sendo logo em seguida adicionados 0,1 mL de ASNase no teste 1. Os pontos foram em seguida submetidos à inversão e incubados novamente a 37°C por 30 minutos. Uma solução de 0,1 mL de TCA (Ácido Tricloroacético) foi adicionado a todos os pontos e 0,1 mL de ASNase foi adicionada no teste branco. Em uma microplaca de 12 poços, foi adicionado 0,2 mL de cada ponto com a adição de 0,5 mL o reagente de Nessler. A microplaca teve sua absorbância lida em 436 nm. ⁵².

4.5 Proteínas Totais

A determinação total de proteínas foi realizada por ensaio de BCA (Ácido bicinconínico). As amostras foram adicionadas do Reagente de BCA (Sigma-Aldrich) na proporção de 100 µL para 2000 µL de reagente e incubadas em 37°C durante 30 min. Uma curva padrão foi elaborada utilizando albumina bovina (Sigma Aldrich) na faixa de concentração de 30 à 0,5 µg/mL e branco; a leitura foi realizada em espectrofotômetro (562 nm). Devido a interferência de alguns excipientes no ensaio de BCA, o Método de Absorbância em 280 nm foi utilizado como alternativa⁵³.

4.6 Temperaturas de Colapso

As temperaturas de colapso das amostras selecionadas foram determinadas através de um microscópio acoplado a um módulo de liofilização, Lyostat 2, modelo FDSC 196 (Linkam Instruments, Surrey, UK), equipado com sistema de congelamento por nitrogênio líquido (LNP94/2) e controlador de temperatura programável (TMS94, Linkam). A pressão foi monitorada através de uma válvula de

Pirani. O equipamento foi calibrado com solução aquosa de NaCl (temperatura eutética de $-21,1^{\circ}\text{C}$). A observação direta do congelamento e liofilização foi feita por microscópio de luz polarizada *Nikon*, modelo *Elipse E600* (*Nikon*, Japão), e em rampas de aquecimento-resfriamento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Os dados foram analisados pelo software *Linksys 32*.

4.7 Temperaturas de Transição Vítea/Cristalização

A análise térmica foi realizada por DSC (*Differential Scanning Calorimetry*, Calorímetro Exploratório Diferencial, *Perkin Elmer 4000*) com sistema de refrigeração por nitrogênio líquido. Cada amostra foi analisada em cadinho de alumínio (5 mg), com uma rampa inicial de resfriamento a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 25°C até -70°C e posterior aquecimento a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 25°C . Um cadinho de alumínio vazio foi usado como referência do equipamento. Os dados serão analisados pelo software *Pyris* (*Perkin Elmer*) para determinação das transições térmicas.

4.8 Liofilização

As formulações adicionadas com seus respectivos lioprotetores foram liofilizadas em placas estéreis de polipropileno de 96 poços, com capacidade de 300 μl por poço. O processo foi realizado no liofilizador Lyostar 3 (SP scientific), que contém prateleiras com controle computacional de pressão, rampas de temperatura e fechamento automático de frascos. As amostras foram formuladas de acordo com os resultados do *screening* e submetidas a liofilização, de acordo com os parâmetros indicados no perfil térmico.

4.9 Umidade residual e dos pós liofilizados

A umidade residual das amostras liofilizadas foi determinada por análise termogravimétrica (TGA). A perda de massa das amostras foi medida durante uma rampa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 25°C à 400°C conforme já previamente descrito para a determinação de umidade residual em pós liofilizados⁵⁴

4.10 Caracterização Estrutural das Proteínas

A Caracterização Estrutural das Proteínas foi realizada por Dicroísmo Circular. Os espectros de CD na região do UV distante (190-260 nm) foram medidos em um

espectropolarímetro JASCO J – 715 (JASCO) equipado com o módulo Peltier para o controle de temperatura disponível no IQ/UNICAMP, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Cada espectro obtido foi o resultado de 4 à 8 acumulações medidas a 25 °C. Os resultados foram expressos em millidegrees (mdeg).

4.11 Métodos estatísticos e análise de dados

Testes estatísticos foram utilizados para testar a normalidade das distribuições (Anderson-Darling), verificar as diferenças entre as médias das amostras de distribuição normal (ANOVA, teste T) ou para testar a linearidade dos dados (regressão linear). O delineamento experimental seguiu o planejamento de misturas, de acordo com o número de níveis e variáveis. Os testes estatísticos, o delineamento experimental e análise combinatória das respostas foi realizado no software Design Expert, versão 10.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo teórico das formulações de proteínas terapêuticas comerciais

De acordo com pesquisa feita do Drugbank (atualizada em outubro de 2016), 96% das formulações proteicas comerciais são administradas por vias parenterais, que correspondem as vias intravenosa, subcutânea, intramuscular e intraocular. As demais 4% correspondem as vias tópica, intranasal, respiratória, oftálmica e oral. Dentre todas as formulações estudadas, 34% delas são apresentadas como pós liofilizados. Como descrito na metodologia, apenas medicamentos aprovados pelo FDA foram levados em consideração. A partir de cada formulação compilada, foi montada a tabela de excipientes (Tabela 2) mais frequentes em formulações comerciais liofilizadas.

Tabela 2 - Excipientes mais frequentes em medicamentos proteicos liofilizados

Excipientes	N.F.	Fr. (%)	F.C. (mg/mL)	Função
Manitol	29	40,3	2,00 - 50,00	Diluyente/Lioprotetor
Sacarose	25	34,7	4,00 - 160,00	Diluyente/Lioprotetor
Polissorbato 80	22	30,6	0,044 - 0,80	Tensoativo
Sódio Fosfato Dibásico	16	22,2	0,04 - 13,45	Tamponante
Sódio Fosfato Monobásico	15	20,8	0,129 - 3,45	Tamponante
Cloreto de Sódio	13	18,1	0,25 - 7,00	Agente de Tonicidade
Histidina	13	18,1	0,77 - 10,00	Tamponante
Citrato de Sódio	10	13,9	1,40 - 4,00	Tamponante
Polissorbato 20	9	12,5	0,04 - 0,86	Tensoativo

N.F. = Número de Formulações; Fr. = Frequência; F.C. = Faixa de Concentração. Total = 72 formulações. Os excipientes abaixo de 10% de frequência não foram tabelados.

O excipiente mais usado é o manitol, presente em 40% das formulações, incluindo uma apresentação de Eco ASNase. Esse poliol tem função lioprotetora, diluyente e de agente de tonicidade. Apesar de muito utilizado, pode apresentar problemas na liofilização em função de suas formas polimórficas⁵⁵.

Em segundo lugar, a sacarose está presente em 35% das formulações; esse dissacarídeo também se encontra em uma apresentação de Eco ASNase que só foi aprovada na Europa, portanto não consta na lista do FDA. A sacarose tem função lioprotetora e é agente de tonicidade, formando matriz amorfa no congelamento do produto^{31,55}.

Os sais de fosfato são os mais utilizados como sistema tampão, com ampla faixa de concentração. No entanto, podem apresentar cristalização seletiva dependendo da formulação e processo de produção, além de diminuir a temperatura de colapso da amostra em altas concentrações⁵⁶. Apenas a ASNase peglada em solução é formulada nesse tampão.

Os tensoativos mais indicados ao uso parenteral são os não iônicos, assim como os polissorbatos, que foram os mais frequentes nas formulações. Os surfactantes dessa classe previnem agregação por estabilização estérica e não apresentam toxicidade nas concentrações utilizadas⁵⁷. No entanto, não foram utilizados para nenhuma formulação de asparaginase comercial.

O cloreto de sódio, agente de tonicidade mais frequente, evita danos teciduais na aplicação parenteral e estabiliza cargas elétricas nas estruturas proteicas, prevenindo a agregação³². Entre as ASNases, apenas a Erwinase utiliza esse excipiente.

5.2 Produção Purificação de ASNases Recombinantes

5.2.1 Sac ASNase A

Após fermentação, lise celular e captura proteica, como descrito na metodologia, a proteína foi purificada em coluna de níquel. Foram coletadas 15 frações de 1mL cada e analisadas por eletroforese. As frações 5 a 11 apresentaram banda única, de peso respectivo ao do monômero da enzima ligada a proteína ligante de maltose (MBP, 84,16 kDa). Essas frações foram então misturadas, concentradas, dessalinizadas e as caudas de histidina + MPB foram clivadas. Após nova purificação, foi obtida solução de 500 µL à 0,85 mg/mL, com atividade específica de 10,08 UI/mg. A proteína final purificada foi então analisada por eletroforese, que apresentou banda única respectiva ao peso molecular do monômero da enzima (41,4 kDa). As bandas da enzima após purificação podem ser vistas na Imagem 5.

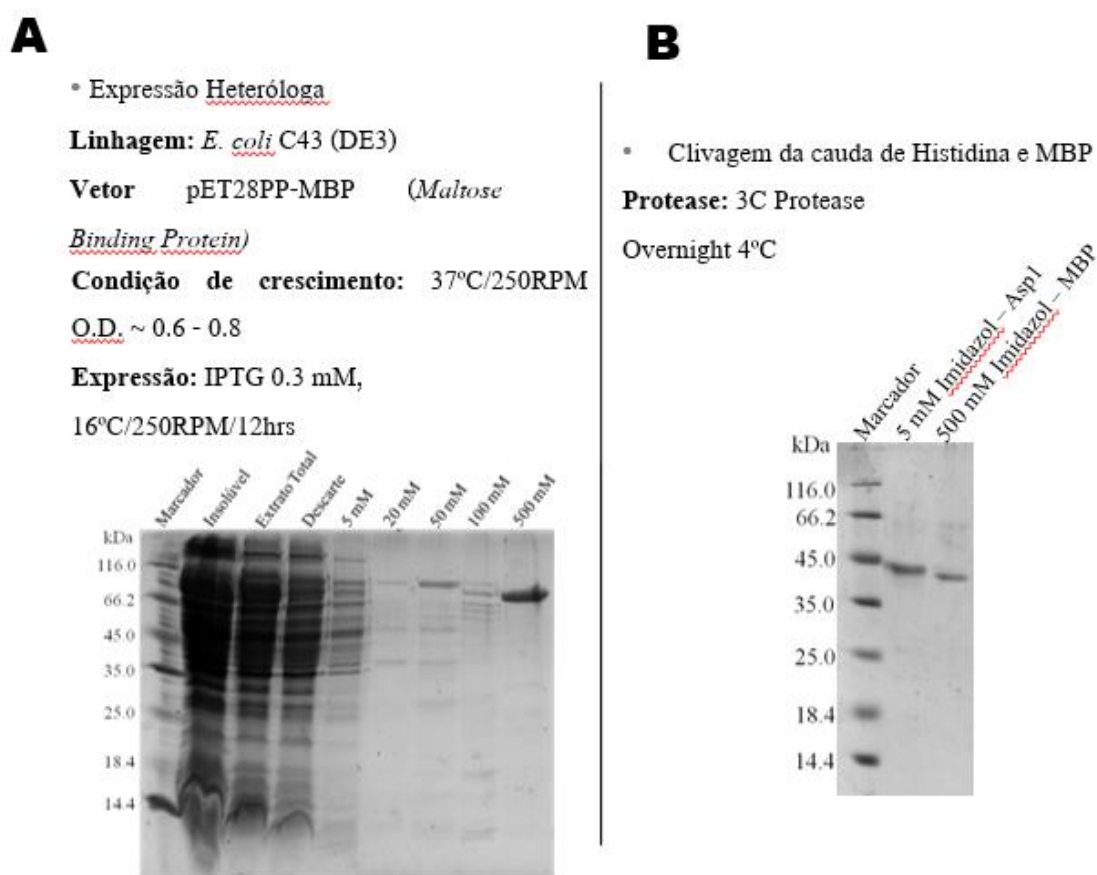


Figura 5 – Gel de eletroforese de Sac ASNase A após purificação por coluna de níquel. A - Banda de ASNase com a cauda de histidina + MBP B - Banda de ASNase pós clivagem da cauda de histidina + MPB

A atividade específica da enzima foi considerada insuficiente, em comparação a versão comercial da Eco ASNase, que possui uma atividade de 255,00 UI/mg ⁵⁸, inviabilizando os estudos de liofilização ⁵⁶. Como o grupo de prospecção de ASNases pertencente ao temático não disponibilizou outra ASNase com potencial aplicação clínica, os estudos seguintes foram realizados com Asp II proveniente de *Escherichia coli* da empresa Prospec foi utilizada na continuidade dos estudos.

5.3 Caracterização Físico-Química dos Excipientes

A seleção inicial de lioprotetores foi baseada nas formulações comerciais, descritos no item 5.1 e em formulações proteicas experimentais.

5.3.1 Temperatura de colapso

Os excipientes escolhidos foram analisados por Microscopia de Liofilização, e caracterizados em relação a temperatura de colapso (Tc) e microcolapso (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação das Temperaturas de Colapso dos Excipientes (Microscopia de Liofilização)

Excipiente	Classificação	Microcolapso	Análise Tc	Tc referência
Frutose	Açúcar	-42,5°C	-40,5°C	-40,0°C ⁵⁹
Glicose	Açúcar	-42,3°C	-41,1°C	-40,0°C/-41,5°C/-43,0°C ⁵⁹
Lactose	Açúcar	-34,5°C	-32,9°C	-31,0°C ⁶⁰
Manose	Açúcar	-43,1°C	-40,2°C	-----
Maltose	Açúcar	-27,6°C	-25,1°C	-----
Sacarose	Açúcar	-32,7°C	-30,2°C	-32°C/-34,0°C ⁶¹
Trealose	Açúcar	-25,9°C	-24,3°C	-29,5°/-34,0°C ⁶⁰
Alanina	Aminoácido	-4,4°C	-2,3°C	-----
Arginina	Aminoácido	-32,1°C	-29,6°C	-----
Glicina	Aminoácido	-15,2°C	-12,7°C	-----
Histidina	Aminoácido	-39,3°C	-37,1°C	-----
Lisina	Aminoácido	-51,4°C	-48,5°C	-----
Prolina	Aminoácido	Não liofilizou	< -60°C	-----
PEG 400	Polímero	Não liofilizou	< -60°C	-----
PEG 8000	Polímero	-18,2°C	-15,8°C	-16,5°C ⁶²
Manitol	Poliol	Indeterminado	Indeterminado	-1,4°C ³⁰
Sorbitol	Poliol	-44,9°C	-43,6°C	-45,0°C ³⁰
Xilitol	Poliol	-48,7°C	-47,1°C	-----

Microcolapso: início do colapso da matriz liofilizada, Tc: Temperatura de Colapso da matriz liofilizada. Resultados em vermelho: excipientes com Tc abaixo da temperatura mínima desejada (-40°C). Amostras analisadas em concentração de 1,0% w/v.

A Tc é parâmetro crítico de produto em formulações liofilizadas, já que a secagem primária acima dessa temperatura pode fluidizar a matriz porosa, o que causa o “colapso” ou a perda da estrutura da pastilha liofilizada. O colapso pode indicar perda de atividade biológica da proteína e diminuição da estabilidade na estocagem. A liofilização de um produto abaixo de -40,0°C geralmente não é viável industrialmente, por limitação do liofilizador em relação a velocidade de secagem e gasto energético ^{33,56}. Por esses motivos, a Tc foi o primeiro parâmetro crítico determinado para *screening* dos potenciais lioprotetores, sendo excluídos os que apresentarem valores abaixo de -40 °C.

Os resultados obtidos experimentalmente estão próximos aos encontrados nas referências bibliográficas, sendo a variação aceitável, já que os excipientes são de marcas diferentes e podem apresentar impurezas diferentes. A exceção foi a trealose, que apresentou uma diferença de 5,0°/10,0°C.

Dos açúcares estudados, maltose (-25,1°C) e trealose (-24,3°C) obtiveram as maiores temperaturas de colapso seguidos da lactose e sacarose; já a frutose, glicose e manose apresentaram uma TC inferior a -40,0°C, sendo descartados para futura formulação com ASNases. Dentre os aminoácidos, a alanina (-2,3°C), a arginina (-29,6°C) e a glicina (-12,7°C) apresentaram as maiores Tcs. A lisina, a prolina e a histidina foram descartados por baixa Tc. O polímero polietilenoglicol (PEG) foi estudado em baixo e alto peso molecular, mas somente o segundo, de 8000 kDa (-15,8°C) apresentou uma Tc adequada. Entre os polióis, todos colapsaram abaixo de -40°C, exceto o manitol, que não colapsou até a secagem total da gota, o que significa que seu colapso é próximo de zero graus, como consta em literatura referenciada na tabela. Do nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que determina o perfil térmico de todos os lioprotetores descritos na literatura para proteínas.

5.3.2 Interferência dos excipientes no ensaio de atividade enzimática

Foram testadas as possíveis interferências dos excipientes escolhidos nos testes de atividade enzimática pelo método de Nessler ⁵¹ (Tabela 4):

Tabela 4 - Interferência dos Excipientes analisados em diferentes concentrações pelo Método de Nessler

Excipiente	Classificação	Atividade 0,5% (U/mL)	Atividade 1,0% (U/mL)
Trealose	Açúcar	0,01	0,02
Sacarose	Açúcar	-0,04	-0,04
Lactose	Açúcar	-0,24	-0,23
Manose	Açúcar	-0,23	-0,24
Frutose	Açúcar	-0,04	-0,05
Glicose	Açúcar	-0,24	-0,23
Maltose	Açúcar	-0,06	-0,05
Glicina	Aminoácido	0,01	0,01
Arginina	Aminoácido	-0,05	-0,05
Histidina	Aminoácido	-0,05	-0,05
Alanina	Aminoácido	-0,04	-0,04
Lisina	Aminoácido	-0,04	-0,05
Prolina	Aminoácido	-0,06	-0,06
PEG 400	Polímero	0,02	0,01
PEG 8000	Polímero	0,08	0,24
Manitol	Poliól	0,01	0,02
Sorbitol	Poliól	-0,06	-0,06
Xilitol	Poliól	-0,05	-0,05

*Curva padrão de 0,5-4 Unidades/mL (U/mL)

Dos excipientes analisados, apenas o PEG 8000 (0,077 U/mL em 0,5% e 0,240 U/mL em 1,0%) apresentou interferência significativa, dado esse de acordo com estudos anteriores ⁶³, sendo excluído do estudo com asparaginase.

5.3.3 Interferências dos excipientes nos ensaios de quantificação proteica

A interferência dos excipientes foi testada nos ensaios de BCA ⁶⁴ e absorbância a 280 nm ⁶⁵, utilizados para determinar a concentração de enzima/proteína nas amostras (Tabela 5). O Ensaio de BCA foi realizado com os excipientes nas concentrações de 1,0% à 0,1% baseado na necessidade de diluição das formulações de ASNase para ensaios futuros. O ensaio apresentou interferência em todas as classes de lioprotetores, com destaque aos açúcares, onde 5 de 7 apresentaram alta interferência. Tal fato pode ser explicado devido a parcial redução do cobre II utilizado como reagente no ensaio por açúcares em geral, gerando um falso positivo ⁶⁶. Os demais interferentes em potencial são aquelas substâncias que reagem com os íons cobre (reações de óxido-redução, formação de complexos, precipitação) ⁶⁷. Dos 18 excipientes analisados, 14 apresentaram interferência pelo ensaio de BCA.

Tabela 5 - Interferência dos excipientes em diferentes concentrações nos métodos de dosagem de proteínas totais por BCA e absorvância em 280 nm.

Excipiente	Classificação	BCA (µg/mL)			Abs. 280 nm (mg/ml)		
		1,00%	0,50%	0,10%	5,00%	1,00%	0,50%
Trealose	Açúcar	12,46	7,669	2,514	0,034	0,024	0,023
Sacarose	Açúcar	7,529	4,926	2,175	0,043	0,027	0,034
Lactose	Açúcar	> 30	> 30	> 30	0,154	0,043	0,03
Manose	Açúcar	XXX	XXX	21,27	0,192	0,057	0,039
Frutose	Açúcar	> 30	> 30	> 30	> 1,000	0,042	0,029
Glicose	Açúcar	XXX	XXX	> 30	0,028	0,023	0,022
Maltose	Açúcar	> 30	> 30	> 30	> 1,000	0,057	0,039
Glicina	Aminoácido	2,706	2,629	4,852	0,038	0,025	0,025
Arginina	Aminoácido	11,197	9,618	4,825	0,128	0,055	0,036
Histidina	Aminoácido	6,925	4,353	6,628	000	0,093	0,058
Alanina	Aminoácido	2,612	2,448	3,35	0,209	0,062	0,044
Lisina	Aminoácido	> 30	26,574	13,541	> 1,000	0,903	0,439
Prolina	Aminoácido	3,65	3,705	3,404	0,056	0,02	0,019
PEG 400	Polímero	6,519	5,863	2,803	0,016	0,011	0,013
PEG 8000	Polímero	2,503	2,257	2,093	0,058	0,032	0,029
Manitol	Poliol	5,39	4,983	2,366	0,069	0,033	0,027
Sorbitol	Poliol	6,317	6,737	2,695	0,619	0,028	0,032
Xilitol	Poliol	4,97	6,766	2,844	0,022	0,02	0,035

Amostras diluídas em água na ausência de proteínas. BCA - curva padrão de 5 µg/mL à 30 µg/mL de albumina; Na Absorvância 280 nm (Abs. 280 nm) de 0,125 mg/mL à 1 mg/mL de albumina. **Em amarelo**: interferência moderada dentro da curva padrão do ensaio; **Em Vermelho**: interferência alta, extrapolando a curva padrão do ensaio; **XXX** = Overflow (resultado acima do nível de detecção do aparelho; **000** = Solubilidade da amostra abaixo da concentração especificada, portanto não testado.

Sendo assim, foi proposto o doseamento por absorvância em 280 nm como alternativa. Este método é rápido e não destrutivo, mas está sujeito a interferência de qualquer substância que apresente uma banda de absorção na região de leitura, fato que limita a utilização da metodologia apenas em proteínas altamente purificadas⁶⁷. Apenas 7 excipientes interferiram no teste, com 6 destes interferindo apenas na concentração mais alta testada (5%). A lisina e frutose também apresentam interferência em ambos os testes proteicos e, portanto, foi descartada deste estudo.

5.3.4 pH dos excipientes em solução

Visando uma melhor atividade enzimática (pH ótimo para a atividade da Eco ASNase entre 7,0 e 8,0 ⁶⁸) e uma aplicação da formulação por via endovenosa (pH ideal próximo ao sanguíneo de 7,4, porém tolerável entre 5,0 e 9,0 ⁶⁹) os excipientes tiveram seu pH determinado nas concentrações de 3,0% e 5,0%.

Tabela 6 - pH dos excipientes em solução aquosa

Lioprotetor	Classificação	pH 5%	pH 3%
Glicose	Açúcar	6,9	6,47
Lactose	Açúcar	6,43	6,47
Maltose	Açúcar	6,75	6,43
Sacarose	Açúcar	6,23	6,87
Trealose	Açúcar	6,78	6,82
Alanina	Aminoácido	6,25	6,29
Arginina	Aminoácido	11,3	11,1
Glicina	Aminoácido	6,22	6,27
Manitol	Poliálcool	6,5	6,71
Água MiliQ	Padrão	7,7	

O único excipiente fora da faixa entre 5,0 e 9,0 foi a arginina entre 11,1 e 11,3. A utilização de tampões poderia remediar o pH da formulação contendo arginina para o aceitável dentro da faixa pré-estabelecida, porém a ausência de tampões nas formulações comerciais (conforme levantado no Estudo Teórico de formulações de Proteínas Terapêuticas Disponíveis no Mercado) e devido ao diminuição da Temperatura de Colapso das formulações utilizando tampões como o Tris e o PBS ⁵⁶.

5.3.5 Resultados do screening inicial

Por fim, os excipientes foram escolhidos conforme os resultados dos testes apresentados anteriormente, compilados na Tabela 7.

Tabela 7 - Seleção final dos excipientes conforme os resultados prévios

Excipiente	Classificação	Situação
Frutose	Açúcar	Tc baixa, interferência na Dosagem de Proteínas Totais
Glicose	Açúcar	Tc baixa
Lactose	Açúcar	OK
Maltose	Açúcar	Interferência na Dosagem de Proteínas Totais
Manose	Açúcar	Tc baixa
<u>Sacarose</u>	Açúcar	OK
<u>Trealose</u>	Açúcar	OK
<u>Alanina</u>	Aminoácido	Ok
Arginina	Aminoácido	pH incompatível
<u>Glicina</u>	Aminoácido	OK
Histidina	Aminoácido	Tc baixa
Lisina	Aminoácido	Tc baixa, interferência na Dosagem de Proteínas Totais
Prolina	Aminoácido	Tc baixa
PEG 400	Polímero	Tc baixa
PEG 8000	Polímero	Interferência na Atividade Enzimática
<u>Manitol</u>	Poliól	OK
Sorbitol	Poliól	Tc baixa
Xilitol	Poliól	Tc baixa

Tc = Temperatura de Colapso

Os candidatos ao planejamento experimental de acordo com a tabela, são a sacarose, trealose, alanina, glicina, manitol e lactose. No entanto, para um planejamento de misturas compatível com a quantidade de asparaginase disponível (até 30 combinações), o máximo de excipientes são 5. A lactose foi então o excipiente descartado por ser o único açúcar redutor do grupo, o que torna possível sua reação com proteínas durante o armazenamento, pela reação de Maillard^{70,71}.

5.4. Interação excipiente-ASNase

5.4.1. Temperaturas Críticas de ASNase combinada a excipientes

A formulação comercial de Eco ASNase foi ressuspensa em, 7,5 mL, resultando em uma solução de 333,33 UI/mL. Em seguida, foi adicionada solução estoque de 6% de cada excipiente, resultando em formulações de 166,67 UI/mL e 3% de excipiente entre os previamente escolhidos (trealose, manitol, sacarose, glicina e alanina). ASNase ressuspensa em água foi preparada como branco.

Primeiramente, foi definida a T_c das amostras conforme a Figura 6. As formulações com excipientes apresentaram uma T_c superior a $-40,0^{\circ}\text{C}$, enquanto a formulação de ASNase pura apresentou uma T_c inferior de $-57,2^{\circ}\text{C}$, devido ao tampão usado pela empresa. Em seguida, as Temperaturas Eutéticas (T_e) e/ou de Transição Vítreas (T_g') foram determinadas por DSC conforme a Figura 7 e 8.

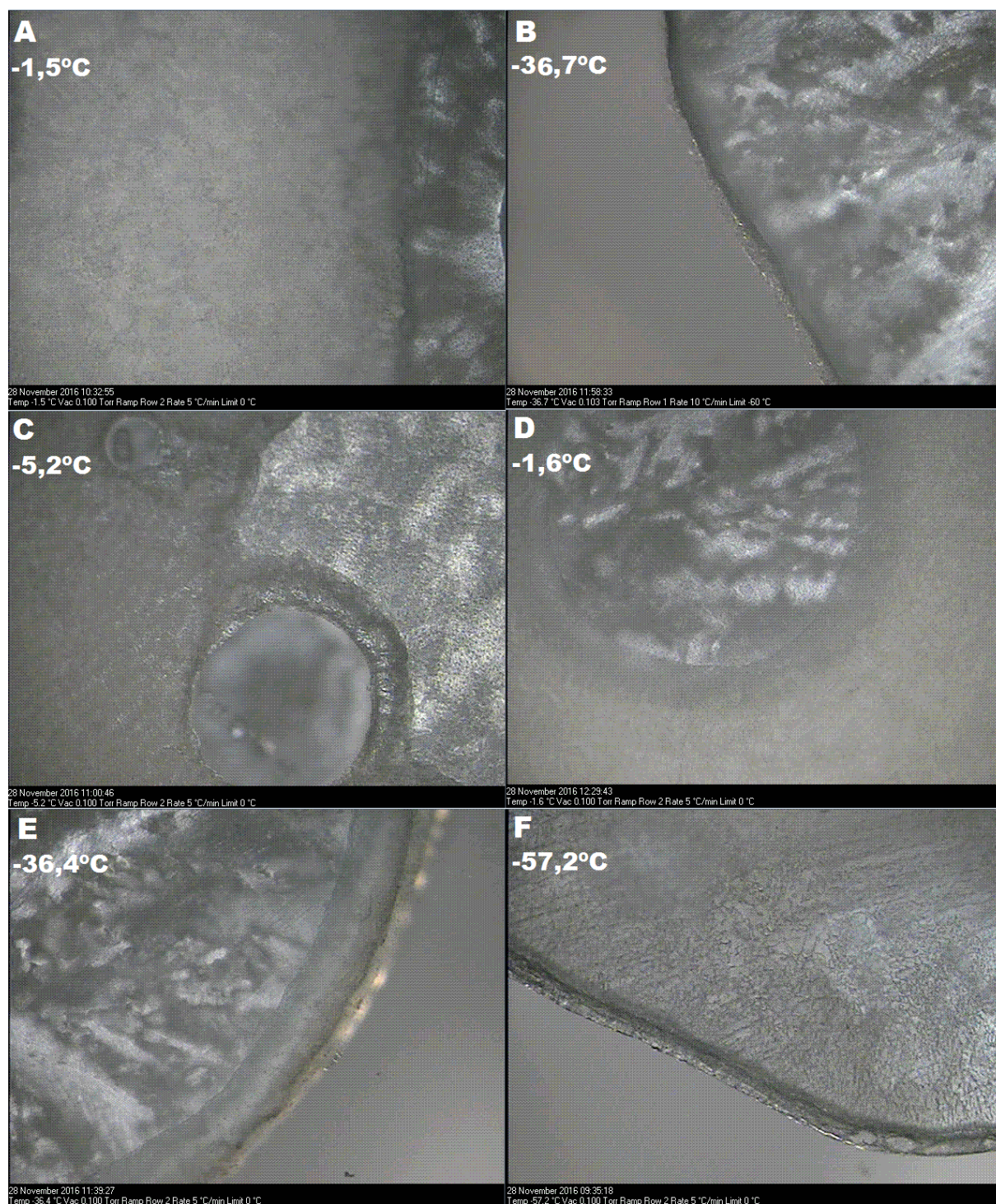


Figura 6 – Imagens do colapso das formulações de Eco ASNase por Microscopia de Liofilização.

A) Alanina 3%; B) Sacarose 3%; C) Glicina 3%; D) Manitol 3%;
E) Trealose 3%; F) ASNase Pura.

E)

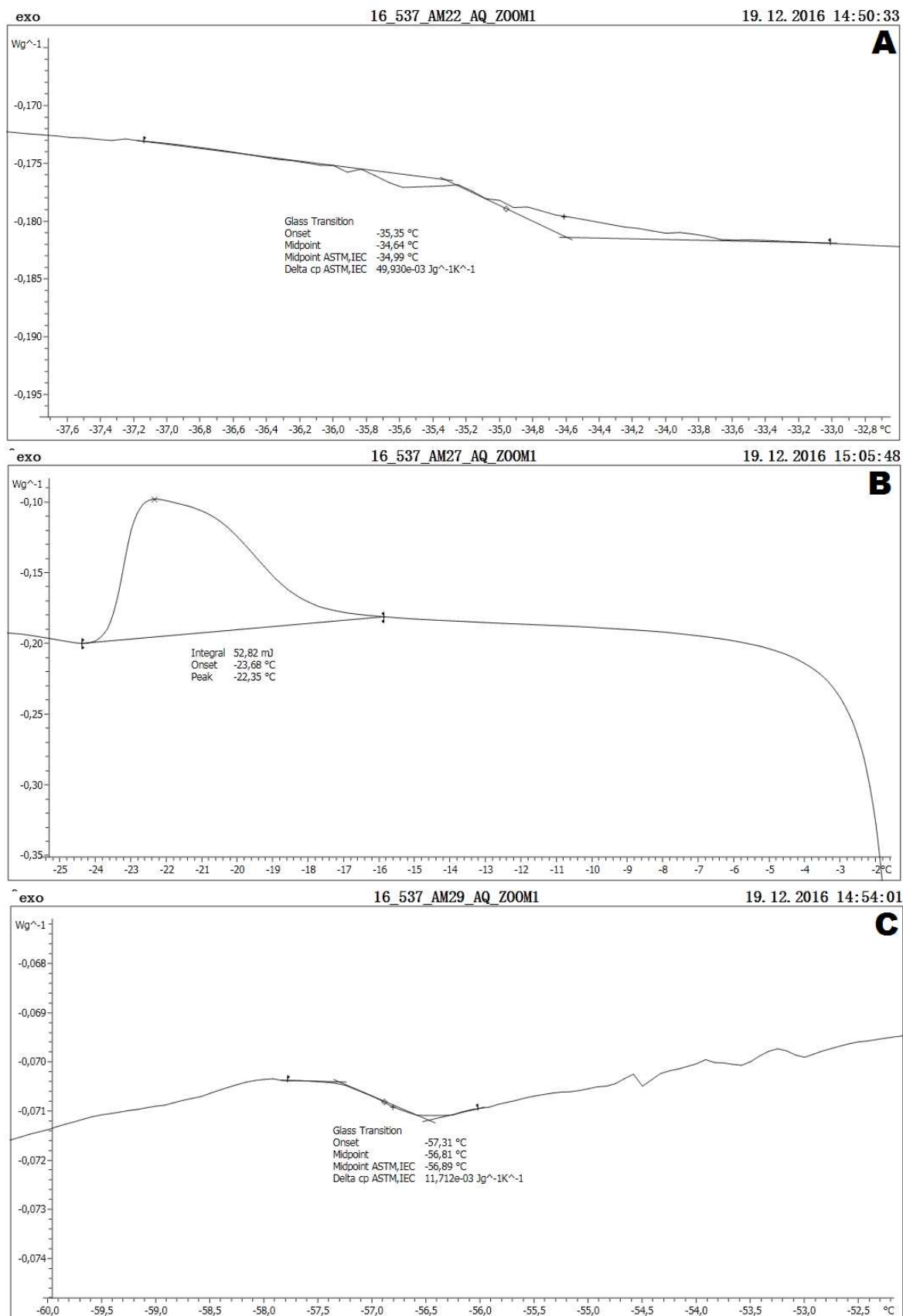


Figura 7 – Temperatura Eutética/de Transição vítrea das Formulações de ASNase por DSC (1). A) Sacarose 3%; B) Manitol 3%; C) ASNase Pura. Os espectros foram obtidos com rampa de 5°C/min, na faixa de -70°C até 25°C.

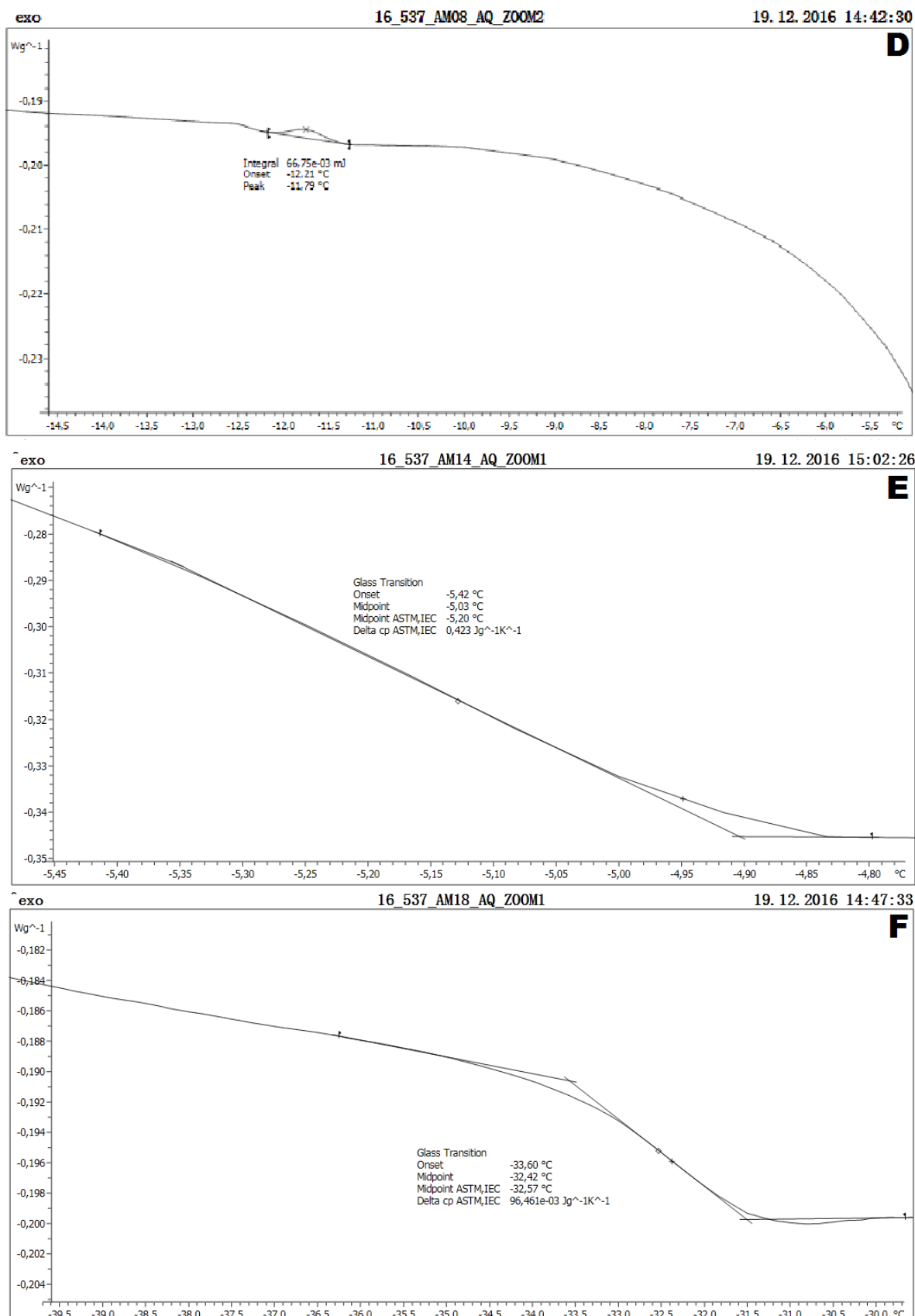


Figura 8 – Temperatura eutética/de transição vítrea das formulações de ASNase por DSC (2). D) Alanina 3%; E) Glicina 3%; F) Trealose 3%. Os espectros foram obtidos com rampa de 5°C/min, na faixa de -70°C até 25°C.

A Formulação contendo Alanina apresentou um ligeiro pico em $-11,8^{\circ}\text{C}$, no entanto, a mesma apresenta uma baixa TC ($-1,5^{\circ}\text{C}$) que pode ter sido mascarada devido ao pico de água presente (-5°C à 10°C).

As Ts/Tg's das formulações de ASNase, juntamente com suas Tcs, Tcs de excipientes puros e referências da bibliografia, estão apresentadas na Tabela 8. Entre as formulações testadas, apenas a alanina (explicado acima) e o manitol apresentaram temperaturas diferentes no DSC, quando comparado a microscopia de liofilização. Tal fato pode ser explicado devido a presença de polimorfos encontrados no manitol⁷². Referente as Tcs das Formulações de ASNase com a Tcs dos excipientes puros, em média houve uma variação de 6°C , com exceção da Trealose que apresentou uma variação de $11,9^{\circ}\text{C}$.

Tabela 8 - Comparação entre temperaturas de colapso (Tc), temperaturas eutéticas/de transição vítrea (Te/Tg') experimentais com as temperaturas de referência na bibliografia (Ref)

Excipiente	Tc Excip. 1 ($^{\circ}\text{C}$)	Tc ASNase ($^{\circ}\text{C}$)	Tc Ref ($^{\circ}\text{C}$)	Te/Tg' ASNase ($^{\circ}\text{C}$)	Te/Tg' Ref ($^{\circ}\text{C}$)
Trealose	-24,3	-36,4	-29,5/-34,0 ⁵⁶	-32,4	-27,06
Manitol	Ñ Colapsou	-1,6	-1,43	-22,7	-35,0/-28,0 ³⁰
Sacarose	-30,2	-36,7	-32,0/-34,0 ⁶¹	-34,6	-32/-35 ⁵⁷
Glicina	-12,7	-5	-----	-5	-2,8/-3,6 ⁶⁹
Alanina	-2,3	-1,5	-----	-11,8	-----

Excip: Excipientes diluídos em água; ASNase: formulações de ASNase com excipientes; Ref: valor encontrado na bibliografia.

Com base em tais resultados a Microscopia de Liofilização foi escolhida como método para dar sequência nos estudos de pré-formulação, enquanto o DSC foi utilizado posteriormente para a determinação do perfil térmico do material liofilizado (Tg).

5.5 Delineamento Experimental – planejamento de misturas

Visando compreender as possíveis interações entre a mistura de diferentes excipientes na formulação de ASNases, um Delineamento Experimental de Misturas foi realizado utilizando o programa *Design Expert*, ferramenta *Design Wizard*. O design proposto com 5 excipientes selecionados e massa total de 3% em cada formulação resultou em 26 amostras diferentes, incluindo cinco duplicatas para cálculo do erro puro. Foi adicionado ao planejamento uma triplicata do ponto central para avaliar a curvatura da superfície de resposta, no caso de os dados coletados

serem compatíveis com um modelo matemático significativo, sem falta de ajuste. Além dos pontos do delineamento, a asparaginase pura também foi analisada, perfazendo 29 formulações conforme a Tabela 9. As amostras foram aleatorizadas para evitar tendências e interferências de fatores externos.

Tabela 9 - Delineamento experimental de misturas de ASNases acrescidas de excipientes

Amostra	Quantidade excipientes	Trealose (%)	Manitol (%)	Sacarose (%)	Glicina (%)	Alanina (%)
1 ^a	2	1,5	0	1,5	0	0
2 ^b	2	0	1,5	0	1,5	0
3	2	0	1,5	0	0	1,5
4 ^c	2	0	0	1,5	1,5	0
5	5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
6	5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
7	5	0,3	0,3	0,3	0,3	1,8
8	1	0	0	0	0	3
9	5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
10 ^c	2	0	0	1,5	1,5	0
11	2	0	1,5	1,5	0	0
12	5	0,3	0,3	0,3	1,8	0,3
13	2	1,5	1,5	0	0	0
14	1	0	0	0	3	0
15 ^b	2	0	1,5	0	1,5	0
16	5	1,8	0,3	0,3	0,3	0,3
17 ^a	2	1,5	0	1,5	0	0
18	1	3	0	0	0	0
19	5	0,3	0,3	1,8	0,3	0,3
20	2	0	0	1,5	0	1,5
21	2	1,5	0	0	0	1,5
22	1	0	0	3	0	0
23	5	0,3	1,8	0,3	0,3	0,3
24 ^d	2	1,5	0	0	1,5	0
25 ^d	2	1,5	0	0	1,5	0
26 ^e	2	0	0	0	1,5	1,5
27	1	0	3	0	0	0
28 ^e	2	0	0	0	1,5	1,5
29	0	0	0	0	0	0

Azul: amostras do ponto central. Verde: amostras dos excipientes individuais. Pares de letras subscritas: duplicatas.

5.5.1 Temperaturas de Colapso das Misturas

As misturas tiveram sua Tcs analisadas conforme a Tabela 10.

Tabela 10 - Temperatura de colapso das misturas de ASNase

Amostra	Tc (°C)	Amostra	Tc (°C)
1 ^a	-33	16	-50
2 ^b	-56	17 ^a	-34
3	-55	18	-36
4 ^c	-53	19	-46
5	-55	20	-51
6	-52	21	-48
7	XX	22	-37
8	-2	23	-53
9	-51	24 ^d	-56
10 ^c	-57	25 ^d	-55
11	-46	26 ^e	-54
12	-53	27	-1
13	-43	28 ^e	-58
14	-5	29	-57
15 ^b	-56		

Em vermelho: misturas com a Tc inferior a -40°C. Azul: amostras do ponto central. Pares de letras subscritas: duplicatas. A amostra 7 foi desprezada e não determinada.

Das amostras analisadas, apenas as que continham um excipiente (8, 14, 18, 22 e 27) e combinações de trealose+sacarose (1 e 17) apresentaram uma Tc superior a -40°C. Surpreendentemente, todas as amostras que continham manitol, que tem Tc alta (-1°C), combinado a outro excipiente, apresentaram Tc muito inferior ao poliol individualmente. A análise de dados pelo software indicou que Manitol é o excipiente que mais interfere nos dados de Tc, sendo o valor de Tc do manitol puro considerado um *outlier* (resíduo maior que 2 vezes o desvio padrão), retirado do modelo. O modelo quadrático também não foi significativo com o ponto central, que foi retirado, o que significa que não é recomendado para prever valores, apenas para avaliar tendências. O modelo quadrático (*Scheffe*) final que se adequou as respostas foi significativo, sem falta de ajuste, como mostra a tabela de ANOVA (Tabela 11). No entanto, como esperado, as amostras com manitol apresentaram valores preditos significativamente diferentes do real (valor previsto de Tc manitol = -40).

Tabela 11 - Tabela ANOVA para modelo de misturas quadráticas (misturas de ASNase)

ANOVA para Modelo de Misturas Quadrático Reduzido					
*** Código dos Componentes da Mistura é Real. ***					
Análise de Tabela de Variância [Soma Quadrática Parcial - Tipo III]					
Fonte	Soma Quadrática	df	Média Quadrática	F Valor	valor-p Prob > F
Modelo	4796.47	12	399.71	70.00	< 0.0001
¹ Mistura Linear	650.03	4	162.51	28.46	< 0.0001
AB	1.66	1	1.66	0.29	0.6024
AD	1362.79	1	1362.79	238.66	< 0.0001
AE	610.15	1	610.15	106.85	< 0.0001
BC	4.55	1	4.55	0.80	0.3955
BD	92.97	1	92.97	16.28	0.0030
BE	64.35	1	64.35	11.27	0.0084
CD	1282.98	1	1282.98	224.68	< 0.0001
DE	2770.34	1	2770.34	485.16	< 0.0001
Residual	51.39	9	5.71		
Falta de Ajuste	16.39	4	4.10	0.59	0.6880
Erro Puro	35.00	5	7.00		
Cor Total	4847.86	21			

¹ Interferência para misturas lineares utilizando soma quadrática Tipo 1.

O Valor de F Modelo de 70.00 implica que o modelo é significativo. Há apenas 0,01% de chance que um Valor de F de tal magnitude seja devido a ruído. Valor de Probabilidade > F menor que 0.0500 indica que os termos do modelo são significativos. Neste caso, A, B, C, AD, AE, BD, BE, CD, DE são termos do modelo significativos. Valores maiores que 0,1000 indicam que os termos do modelo não são significativos. O Valor de F da Falta de Ajuste de 0,59 implica que a Falta de Ajuste não é significativa relativo ao erro puro.

A: Trealose, **B:** Manitol, **C:** Sacarose, **D:** Glicina, **E:** Alanina

Sendo assim, a predição das misturas foi analisada para todos os excipientes, exceto manitol. O gráfico de contorno da Figura 9 mostra o primeiro sistema: os dois dissacarídeos frente a um aminoácido (no caso glicina). A combinação dos dissacarídeos não tem efeito significativo na Tc (aresta da direita), porém a combinação de um aminoácido com cada dissacarídeo tem efeito antagônico (aresta da esquerda e da base, ponto 2 = 1,5% de cada componente da aresta; alanina com mesmo perfil da glicina, gráfico não mostrado).

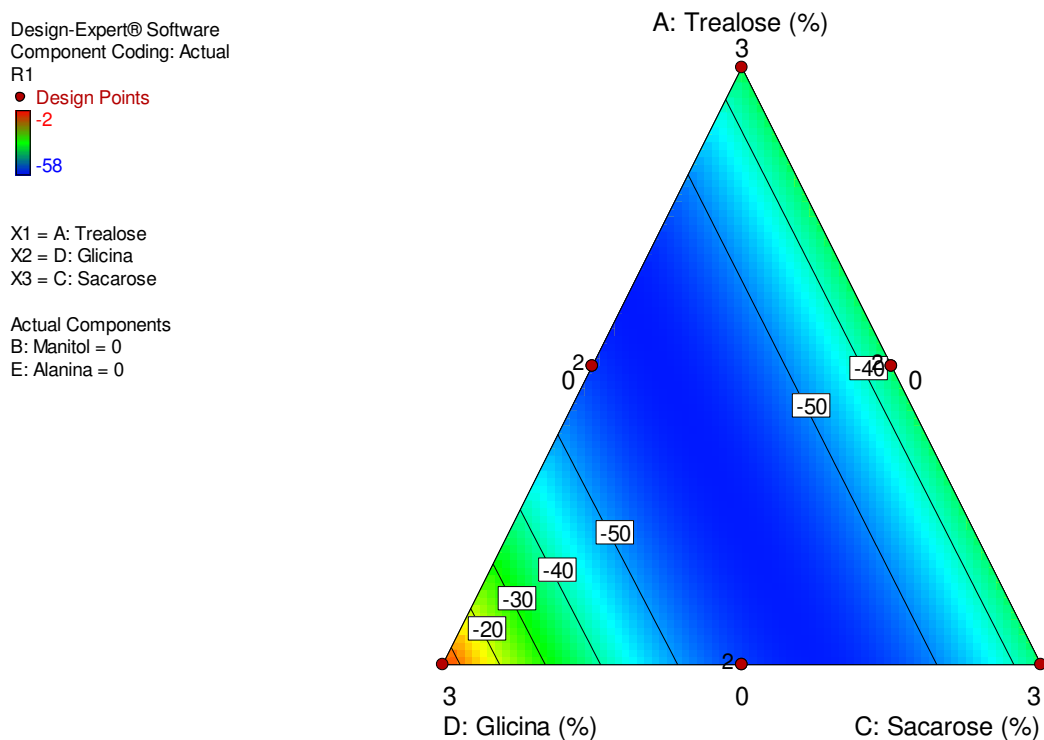


Figura 9 - Gráfico de Contorno do Modelo de Misturas Trealose/Glicina/Sacarose

O gráfico de contorno da Figura 10 mostra o segundo sistema: os dois aminoácidos frente a um dissacarídeo (no caso trealose). A combinação dos aminoácidos tem efeito antagônico na t_c (aresta da direita), assim como cada aminoácido em combinação com um dissacarídeo (aresta da esquerda e da base). Não foi detectado efeito sinérgico em nenhuma mistura dos excipientes.

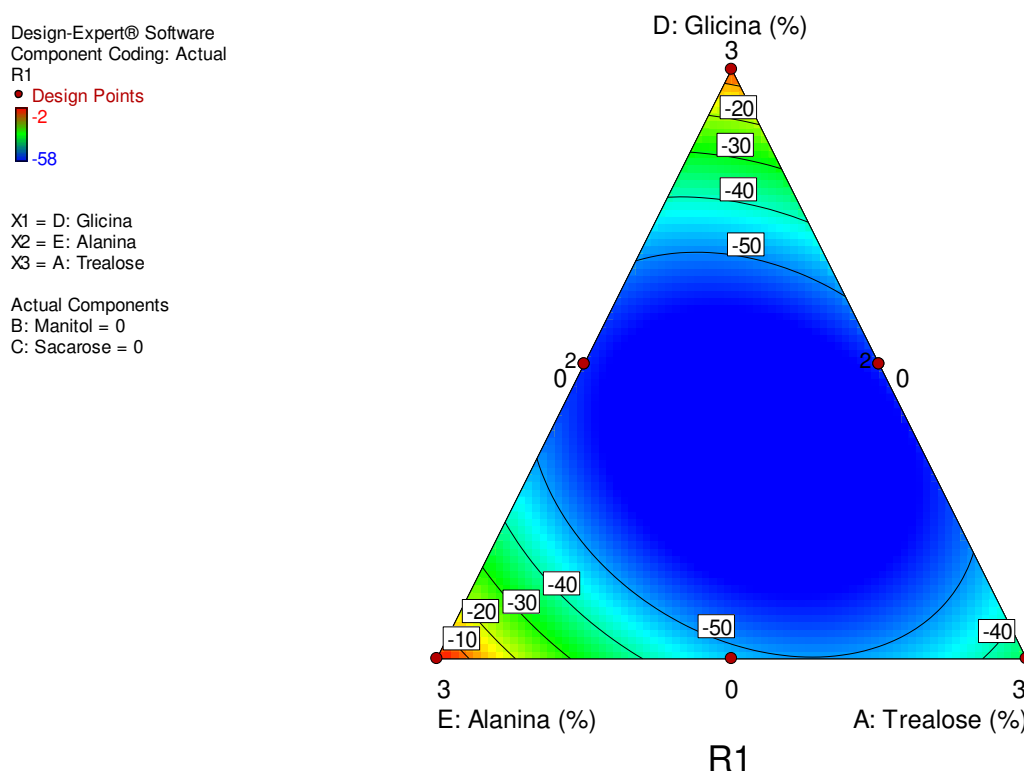


Figura 10 - Gráfico de Contorno de Modelo de Misturas Glicina/Alanina/Trealose

Esses dados evidenciam que a combinação de 3 desses excipientes apresentará TC muito baixa (área azul, menor que 50°C nos dois gráficos acima), mesmo com concentrações diferentes de cada um. Combinações de dois componentes também terão efeito negativo ou inerte (no caso da mistura de dissacarídeos).

5.5.2 Análise Estrutural das Amostras

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) da Formulação de ASNase pura (amostra 29) indicaram a presença de uma mistura entre as estruturas secundárias α -hélices e folhas- β , pois os picos negativos em 222 e 208 nm, característicos de α -hélices não estão tão bem definidos (Figura 11). A porção positiva entre 200 e 190 nm não foi observada, uma vez que os dados foram cortados em 207 nm, pois o sinal ultrapassou o limite de detecção do equipamento. A presença da mistura de dois tipos de estrutura secundária já era esperada, pois a estrutura cristalográfica da ASNase de *E. coli* (código PDB: 3ECA) demonstrou que a enzima é constituída por 8

α -hélices e 14 folhas- β , pertencendo à classe *alpha/beta fold* e possui uma topologia do tipo Rossmann ($\beta\alpha\beta$)^{72,73}.

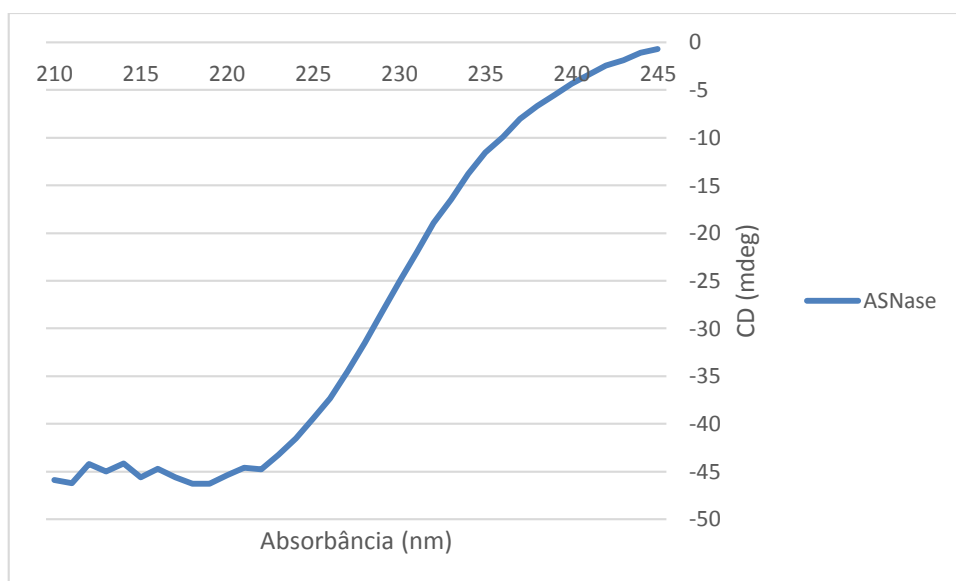


Figura 11 - Espectro de dicroísmo circular (CD) da formulação de ASNase pura

Os excipientes testados não alteraram a configuração da estrutura secundária da ASNase (Figura 12). Entretanto, o espectro de CD das Misturas com alanina apresentou curvas atípicas que inclusive superaram o limite de detecção do equipamento de 200 mdeg. Tal interferência poderia ser atribuída a quiralidade da alanina⁷⁴ ou pela presença de contaminantes no excipiente. O espectro de CD de Alanina pura de diferentes fornecedores também foi analisado, porém as curvas atípicas se mantêm (Figura 13).

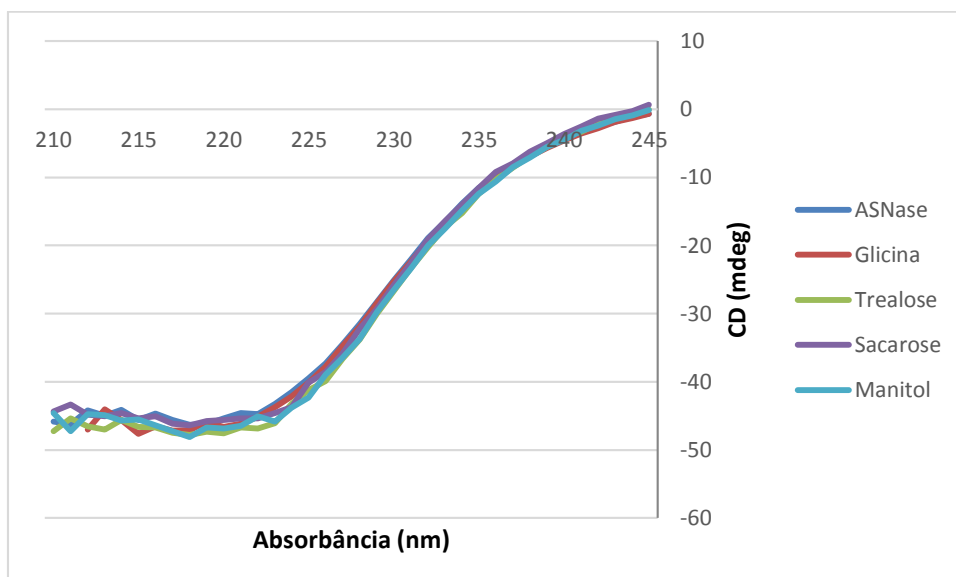


Figura 12 – Espectro de dicroísmo circular (CD) das formulações de ASNase contendo todos os excipientes com exceção da alanina.

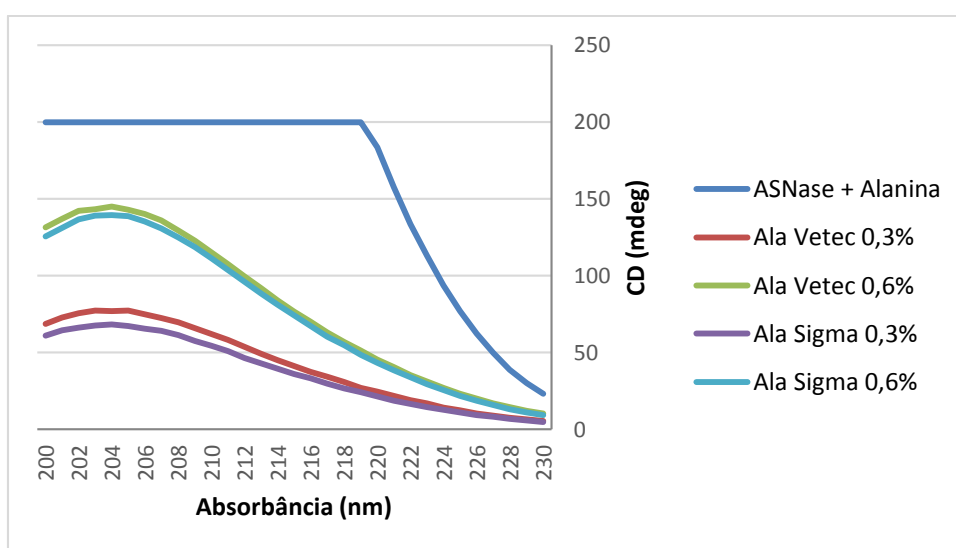


Figura 13 - Espectro de dicroísmo circular (CD) de Formulações de Alanina
 ASNase + Alanina: Formulação de 3% de alanina utilizada nos testes anteriores.
 Ala Vetec: L-Alanina proveniente da empresa Vetec Química
 Ala Sigma: L-Alanina proveniente da empresa Sigma-Aldrich

As demais amostras sem alanina apresentaram o mesmo perfil que a de ASNase pura (Figura 14). Dessa forma, é possível afirmar que a adição desses excipientes não provocou mudança na estrutura secundária das proteínas até 24 horas pós adição.

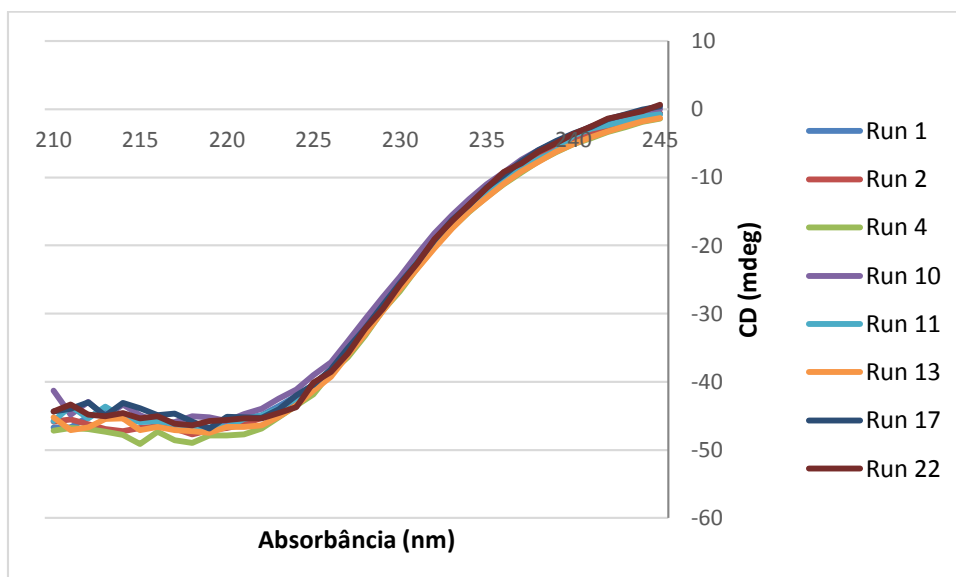


Figura 14 - Espectro de dicroísmo circular das demais misturas de ASNase sem alanina.

5.6 Liofilização das Misturas

5.5.1 Parâmetros de Liofilização em função do delineamento

Como algumas amostras do delineamento apresentaram baixa T_c , o congelamento das 29 amostras (150 μ L por amostra, placa de 96 pocos) foi feito no liofilizador a -50°C (prateleiras pré-resfriadas, 120 minutos) seguido de um ciclo de secagem conservador: $-50^\circ\text{C}/100$ mTorr por 360 minutos; aquecimento de $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ - *hold time* 120 min a cada acréscimo de 5°C , ponto final a 0°C . Terminado o processo, as amostras foram retiradas e armazenadas em *freezer* convencional na temperatura de -4°C .

5.5.2 Caracterização Visual e Tempo de Ressuspensão do Material Liofilizado

As amostras foram caracterizadas visualmente conforme a integridade do liofilizado (Figura 15) e tempo de ressuspensão, sendo os resultados tabelados em conjunto com as T_c s previamente medidas (Tabela 12).

Tabela 12 - Caracterização visual, tempo de ressuspensão, temperatura de colapso e atividade enzimática das misturas de ASNase liofilizadas

<i>Amostra</i>	Visual	Ressuspensão (Min:seg)	Tc (°C)	Atividade Enz. * (%)
1^a	Encolhimento	00:05	-33	114,89
2^b	Ok	00:49	-56	61,25
3	Ok	00:40	-55	57,52
4^c	Encolhimento	>1:30	-53	52,49
5	Encolhimento	01:01	-55	112,48
6	Encolhimento	00:55	-52	113,36
7	Ok	01:15	XX	107,01
8	Ok	>1:30	-2	54,02
9	Encolhimento	01:00	-51	100,22
10^c	Borbulhou	00:35	-57	99,34
11	Ok	00:29	-46	103,72
12	Ok	00:25	-53	67,38
13	Ok	00:09	-43	87,74
14	Ok	00:40	-5	62,34
15^b	Ok	01:08	-56	78,98
16	Encolhimento	00:45	-50	79,42
17^a	Encolhimento	00:20	-34	106,79
18	Ok	>1:30	-36	147,24
19	Encolhimento	00:46	-46	143,79
20	Encolhimento	>1:30	-51	76,13
21	Ok	>1:30	-48	126,27
22	Encolhimento	00:25	-37	107,66
23	Encolhimento	>1:30	-53	84,67
24^d	Borbulhou	00:07	-56	113,36
25^d	Borbulhou	00:13	-55	77,45
26^e	Ok	00:35	-54	79,64
27	Ok	>1:30	-1	57,52
28^e	Ok	00:50	-58	63,44
29	Encolhimento	00:06	-57	100,00

Em vermelho: misturas que apresentaram indícios de colapso (coluna Visual) ou tempo de ressuspensão superior a 40 segundos (coluna Ressuspensão). Azul: amostras do ponto central. Pares de letras subscritas: duplicatas. A amostra 7 (Tc = XX) foi desprezada e não determinada. Atividade Enz.: Atividade Enzimática



Figura 15 - Aspecto visual das misturas de ASNase liofilizadas em microplaca de 96 poços. Primeira fileira (superior, horizontal): misturas 1-8; segunda fileira: misturas 9-16; terceira fileira: misturas 17-24, Quarta fileira: misturas 25-29.

As misturas 1/17 (1,5% trealose e 1,5% sacarose) e 22 (3% sacarose) mesmo tendo temperaturas de colapso elevadas apresentaram sinais de colapso. Tais misturas, porém, também apresentaram uma rápida ressuspensão (assim como a 10, a 24, a 25 e a 29) e atividade enzimática conforme (superior a amostra de ASNase pura), ao contrário das misturas 8, 14, 18 e 27 que possuem uma T_c elevada, não apresentaram colapso aparente porém com um tempo de ressuspensão elevado e atividade enzimática inferior a 100% (com a amostra 18 como exceção).

Tal comportamento pode ser associado ao fato que as amostras com colapso aparente não tiveram sua estrutura de poros prejudicada, enquanto as que se apresentaram intactas podem ter formado poros pouco volumosos o que dificultaria sua ressuspensão, a distribuição de partículas no material liofilizado ou então possíveis polimorfismos do mesmo ⁷⁵. Porém, tais suspeitas só se confirmariam com a análise de microscopia de varredura.

Já as misturas 11 (1,5% manitol e 1,5% sacarose), 12 (1,8% glicina e 0,3% dos demais), 13 (1,5% trealose e 1,5% manitol) e 26 (1,5% glicina e 1,5% alanina) não apresentaram colapso aparente e um tempo de ressuspensão adequado, mesmo possuindo T_c s muito baixas e atividade enzimática inferior a 100% (com exceção da amostra 11).

5.5.3 Atividade Enzimática do Material Liofilizado

A Atividade Enzimática do material antes e após a liofilização, assim como as respectivas dosagens de proteínas totais e seu colapso, podem ser observadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Comparação das atividades enzimáticas (pre e pós liofilização), proteínas totais e colapso das misturas de ASNase

DoE	Pre Liofilização (%)	Pós Liofilização (%)	Prot. Totais (%)	Colapso
1 ^a	94,53 +- 8,84	114,89	148	Encolheu
2 ^b	140,44 +- 12,63	61,25	100	Ok
3	114,87 +- 4,60	57,52	68	Ok
4 ^c	110,74 +- 15,26	52,49	36	Encolheu
5	117,81 +- 37,54	112,48	80	Encolheu
6	137,25 +- 13,62	113,36	88	Encolheu
7	127,17 +- 23,757	107,01	72	Ok
8	125,43 +- 14,50	54,02	80	Ok
9	141,08 +- 22,88	100,22	60	Encolheu
10 ^c	108,04 +- 19,08	99,34	76	Borbulhou
11	207,36 +- 0,15	103,72	104	Ok
12	95,53 +- 6,33	67,38	12	Ok
13	117,34 +- 11,86	87,74	60	Ok
14	119,44 +- 8,27	62,34	60	Ok
15 ^b	108,11 +- 12,05	78,98	52	Ok
16	122,47 +- 9,49	79,42	16	Encolheu
17 ^a	92,00 +- 12,65	106,79	224	Encolheu
18	93,17 +- 10,24	147,24	XXX	Ok
19	109,63 +- 5,99	143,79	296	Encolheu
20	116,69 +- 13,56	76,13	96	Quebrou
21	127,53 +- 7,83	126,27	248	Ok
22	120,28 +- 17,38	107,66	84	Quebrou
23	89,56 +- 8,90	84,67	96	Encolheu
24 ^d	110,85 +- 11,03	113,36	100	Borbulhou
25 ^d	134,17 +- 16,05	77,45	156	Borbulhou
26 ^e	101,39 +- 25,62	79,64	56	Ok
27	99,80 +- 17,88	57,52	132	Ok
28 ^e	105,05 +- 13,94	63,44	104	Ok
29	100	100,00	100	Encolheu

Comparativo baseado no resultado da mistura 29 (ASNase pura) como sendo 100%. Azul: amostras do ponto central. Pares de letras subscritas: duplicatas. A amostra 7 foi desprezada e não determinada.

Infelizmente a atividade enzimática apresentou grande variação, tal variação poderia ser devido a sensibilidade do método ou a interferência dos excipientes combinados em concentrações maiores do que havia sido medida durante a pré

formulação (vide que a atividade enzimática da ASNase sozinha sempre se encontrou dentro dos valores calculados, sendo inclusive utilizada como valor de referência), podendo ser usado como alternativa no futuro o Método do aspartil β -hidroxamato⁷⁶.

As proteínas totais das amostras após a ressuspensão também apresentaram grande variação, entre 16% à 148%. É possível que haja perda de concentração após o processo de liofilização⁷⁷, sendo então recomendado que as proteínas totais anterior ao processo tivesse sido medidas.

Por fim, não se pode observar qualquer relação entre o colapso das amostras e sua atividade enzimática resultante. Ao contrário do conhecimento convencional, o colapso de um produto liofilizado não acarreta necessariamente em perda de atividade e conformação. A liofilização acima da T_g' de um produto liofilizado acarreta em uma diminuição significativa do tempo e custo do processo⁷⁷.

Tradicionalmente, amostras amorfas são mantidas em um estado “vítreo” abaixo de sua T_g' durante a secagem primária, permanecendo em um estado de alta viscosidade (*rubbery*) porém fluído até uma significativa diminuição na concentração de água da amostra. Tal viscosidade fluída pode levar a dano ou não formação dos poros da pastilha liofilizada, acarretando em um produto não conforme (alto tempo de ressuspensão, secagem apenas parcial, perda de estrutura/atividade da amostra, etc)⁷⁸.

Porém, se mesmo em tal estado acima da T_g' a estrutura dos poros se mantém, o produto pode apresentar conformidade no final do processo com apenas características visuais de colapso, sendo chamado de microcolapso⁷⁹. Exemplo: soluções concentradas de imunoglobulina G tipo 4 mantiveram-se estáveis físico e quimicamente após secagem primária acima de T_g' , apresentando apenas uma diminuição na concentração de imunoglobulina após o processo⁷⁷.

5.5.4 Análise Estrutural das Misturas Pós-Liofilização

A Análise Estrutural das Misturas Pós-Liofilização por CD se encontra conforme a Figura 16. As misturas apresentaram variação em seus milidegrees, porém apresentaram perfil muito similar entre elas, indicando a presença de uma mistura entre as estruturas secundárias α -hélices e folhas- β . Tal variação pode ser devido a diferença de concentração entre as misturas (como evidenciado na Tabela 13). A única mistura que se mostrou diferente das demais foi a 22 (3% de sacarose) que

apresentou um predomínio de folhas- β . Por fim, nenhuma das misturas apresentou perda de estrutura secundária após o processo.

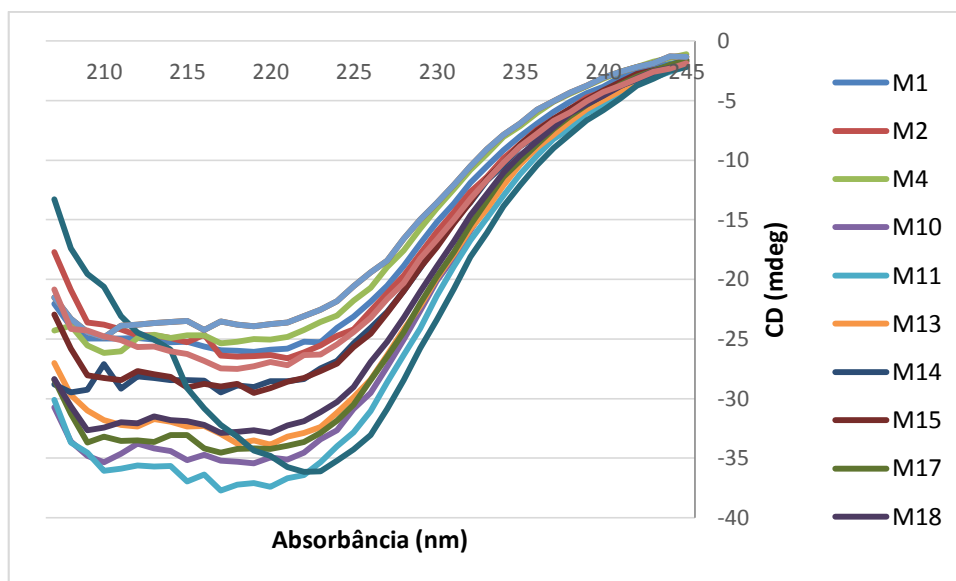


Figura 16 – Caracterização por dicroísmo circular (CD) das misturas de ASNase pós-liofilização sem alanina.

As amostras com alanina não foram medidas devido a problemas de interferência do excipiente.

6. CONCLUSÃO

A produção de ASNases recombinantes resultou em proteína purificada, porém com baixa atividade e quantidade insuficiente para o *screening* dos excipientes. Foi utilizada então uma versão da Eco ASNase comercial como enzima modelo.

A caracterização físico-química dos excipientes resultou em cinco excipientes candidatos para a formulação: trealose, manitol, sacarose, glicina e alanina.

As formulações com combinação entre os excipientes resultaram em Tcs muito baixas, mostrando uma relação quadrática de efeitos, enquanto individualmente mantiveram valores elevados. O manitol mostrou interferir nas Tcs de todas as combinações que esteve presente, mas sua interferência não resultou em modelo matemático consistente.

Já a alanina apresentou interferência na análise estrutural e a sacarose foi o único excipiente que apresentou mudança na estrutura secundária proteica. Quanto à atividade enzimática, houve variação no método de Nessler para as misturas, sendo necessária a busca de uma alternativa futura.

Por fim as formulações de melhor desempenho foram as de ASNase contendo trealose 3%, manitol 3%, alanina 3%, sacarose 3% e glicina 3%.

7. REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao>; acessado em Dezembro de 2016.
2. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Asparaginase desdobramentos. Disponível em <http://www.abhh.org.br/noticia/l-asparaginase-desdobramentos/>; acessado de Setembro de 2014.
3. Lorenzi T. F.; Manual de Hematologia – Propedêutica e Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 4ed, 2006.
4. Remédio que trata principal leucemia da infância só tem estoque para seis meses. *Medicando* Available at: <http://www.medicando.com.br/conteudo/destaque/remedio-que-trata-principal-leucemia-da-infancia-so-tem-estoque-para-seis-meses>. (Accessed: 3rd June 2016)
5. Avramis, V. I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. *Anticancer Res.* **32**, 2423–2437 (2012).
6. Wagner, O., Irion, E., Arens, A. & Bauer, K. Partially deaminated L-asparaginase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 383–392 (1969).
7. Leucemia Aguda - INCA. Available at: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344. (Accessed: 3rd June 2016)
8. O imperador de todos os males mukherjee siddhartha. (02:27:34 UTC).
9. Pedrosa, F. & Lins, M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. *Rev. Bras. Saúde Materno Infant.* **2**, 63–68 (2002).
10. Instituto Oncoguia; Tratamento Quimioterápico da Leucemia Linfóide Crônica. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamento-quimioterapico-da-leucemia-linfoide-cronica-llc/1442/328/>; acessado em Setembro de 2014.
11. Devarai Santhosh Kumar, K. S. L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review. *Adv. Bioresarch* **3**, 137–157 (2012).
12. Chan, W. K. *et al.* The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* **123**, 3596–3606 (2014).
13. L-Asparaginase Structure and Dynamics. Available at: <http://www.man.poznan.pl/CBB/POSTER1/poster.html>. (Accessed: 7th June 2016)
14. Rizzari, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* **25 Suppl 1**, S1-9 (2013).
15. Pegaspargase. *DrugBank* (2016).
16. Asparaginase. *DrugBank* (2016).
17. Asparaginase *Erwinia chrysanthemi*. *DrugBank* (2016).
18. 23, N. & 2011. FDA approves orphan drug to treat ALL. Available at: <http://www.healio.com/hematology-oncology/practice-management/news/online/%7B1c002dea-a3d7-4a92-8f87-dbb79a184cca%7D/fda-approves-orphan-drug-to-treat-all>. (Accessed: 3rd June 2016)

19. Truven Health Products: Please Login. Available at: <https://www.micromedexsolutions.com/home/dispatch/ssl/true>. (Accessed: 3rd June 2016)
20. Kafkewitz, D. & Bendich, A. Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *Am. J. Clin. Nutr.* **37**, 1025–1030 (1983).
21. Sahoo, S. & Hart, J. Histopathological features of L-asparaginase-induced liver disease. *Semin. Liver Dis.* **23**, 295–299 (2003).
22. Pieters, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *Cancer* **117**, 238–249 (2011).
23. Dunlop, P. C. & Roon, R. J. L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme. *J. Bacteriol.* **122**, 1017–1024 (1975).
24. PAULING, K. D., HANN, J. E. & JONES, G. E. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of a Mutation that Affects Expression in Rapidly Growing Cells. *J. Gen. Microbiol.* **119**, 539–542 (1980).
25. Frank, B. H., Pekar, A. H., Veros, A. J. & Ho, P. P. K. Crystalline I-Asparaginase from *Escherichia coli* B II. PHYSICAL PROPERTIES, SUBUNITS, AND RECONSTITUTION BEHAVIOR. *J. Biol. Chem.* **245**, 3716–3724 (1970).
26. Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539–539 (2014).
27. ExPASy - ProtParam tool. Available at: <http://web.expasy.org/protparam/>. (Accessed: 7th June 2016)
28. John F Carpenter, Ken-ichi Izutsu & Theodore W Randolph. in *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products* 167–197 (Informa Healthcare, 2010).
29. Staerk, J., Haupt, H. & Kranz, T. Crystallization and properties of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Experientia* **26**, 131–132 (1970).
30. Baheti, A., Kumar, L. & Bansal, A. K. Excipients used in lyophilization of small molecules. *J. Excip. Food Chem.* **1**, 41–54 (2010).
31. European Medicines Agency - Find medicine - Spectrila. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002661/human_med_001954.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. (Accessed: 8th June 2016)
32. Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. & American Pharmacists Association. *Handbook of pharmaceutical excipients*. (Pharmaceutical Press ; American Pharmacists Association, 2009).
33. Tattini Jr, V., Parra, D. F. & Pitombo, R. N. de M. Influence of cooling rate on the structural and phase changes during lyophilization of bovine serum albumin. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **42**, 127–136 (2006).
34. Welcom to rotech. Available at: <http://www.rotechmachinery.com/news.asp?id=56>. (Accessed: 8th June 2016)
35. Large-Scale Freezing of Biologics. *BioProcess International* (2009).
36. Jameel, F., Kalonia, D. & Bogner, R. The effect of hetastarch on the stability of L-asparaginase during freeze-thaw cycling. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **49**, 127–131 (1995).

37. Costantino, H. R. & Pikal, M. J. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. (Springer Science & Business Media, 2004).
38. Crowe, J. H., Leslie, S. B. & Crowe, L. M. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology* **31**, 355–366 (1994).
39. Koynova, R. D., Tenchov, B. G. & Quinn, P. J. Sugars favour formation of hexagonal (HII) phase at the expense of lamellar liquid-crystalline phase in hydrated phosphatidylethanolamines. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **980**, 377–380 (1989).
40. Wolfe, J. & Bryant, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. *Cryobiology* **39**, 103–129 (1999).
41. Laboratory training courses on HPLC, GC, AAS, Lab Safety, Spectroscopy. *Lab-Training.com*
42. A REVIEW ON PHARMACEUTICAL PREFORMULATION STUDIES IN FORMULATION AND DEVELOPMENT OF NEW DRUG MOLECULES | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH.
43. Mandal, U. K. *PREFORMULATION AND PRODUCT DEVELOPMENT*. (2015).
44. Verma, S., Mehta, R. K., Maiti, P., Röhm, K.-H. & Sonawane, A. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of E. coli asparaginase II. *Biochim. Biophys. Acta* **1844**, 1219–1230 (2014).
45. Florence, A. T. S.K. Niazi, Handbook of Preformulation. Chemical, Biological and Botanical Drugs, Informa Healthcare, New York (2007) \$ 115.00, ISBN: 0-8493-7193-7. *ResearchGate* **336**, 396–396 (2007).
46. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
47. Costa, I. M. Produção, caracterização cinética e engenharia de proteína Asparaginase 1 de *Saccharomyces cerevisiae* para avaliação de seu uso como biofármaco. (Universidade de São Paulo, 2015).
48. Waugh, D. S. An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags. *Protein Expr. Purif.* **80**, 283–293 (2011).
49. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* **36**, D901–D906 (2008).
50. Hatfield, C. L., May, S. K. & Markoff, J. S. Quality of consumer drug information provided by four Web sites. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **56**, 2308–2311 (1999).
51. Jackson, R. C. & Handschumacher, R. E. Escherichia coli L-asparaginase. Catalytic activity and subunit nature. *Biochemistry (Mosc.)* **9**, 3585–3590 (1970).
52. Ramakrishnan, M. S. & Joseph, R. Characterization of an extracellular asparaginase of *Rhodospiridium toruloides* CBS14 exhibiting unique physicochemical properties. *Can. J. Microbiol.* **42**, 316–325 (1996).
53. Measuring protein concentration using absorbance at 280 nm. Available at: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs280.html>. (Accessed: 9th June 2016)
54. May, J. C., Wheeler, R. M. & Grim, E. The gravimetric method for the determination of residual moisture in freeze-dried biological products. *Cryobiology* **26**, 277–284 (1989).

55. Hawe, A. & Friess, W. Impact of freezing procedure and annealing on the physico-chemical properties and the formation of mannitol hydrate in mannitol-sucrose-NaCl formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* **64**, 316–325 (2006).
56. Carpenter, J. F., Pikal, M. J., Chang, B. S. & Randolph, T. W. Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice. *Pharm. Res.* **14**, 969–975 (1997).
57. Oliveira, J. M. de & Mei, L. H. I. Surfactantes reativos não-iônicos em polimerização em emulsão de látices de acetato de vinila - vinil neodecanoato: influência nas propriedades de barreira à água. *Polímeros* **19**, 22–30 (2009).
58. Elspar (Asparaginase) Drug Information: Description, User Reviews, Drug Side Effects, Interactions - Prescribing Information at RxList. Available at: <http://www.rxlist.com/elspar-drug.htm>. (Accessed: 12th June 2016)
59. Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. & Fessi, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1688–1713 (2006).
60. Chang, B. S. & Randall, C. S. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* **29**, 632–656 (1992).
61. Townsend, M. W. & Deluca, M. E. P. P. Use of Lyoprotectants in the Freeze-Drying of a Model Protein, Ribonuclease A. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **42**, 190–199 (1988).
62. David Gregory, P. J. Conservation and in situ preservation of wooden shipwrecks from marine environments. *J. Cult. Herit.* **13**, S139–S148 (2012).
63. Ingham, K. C. & Ling, R. C. A quantitative assay for poly(ethylene glycol) without interference by proteins. *Anal. Biochem.* **85**, 139–145 (1978).
64. Vasudev, S. S. *et al.* Formulation of PEG-ylated L-asparaginase loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of PEGylation on enzyme loading, activity and in vitro release. *Pharm. - Int. J. Pharm. Sci.* **66**, 956–960 (2011).
65. Measuring protein concentration using absorbance at 280 nm. Available at: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs280.html>. (Accessed: 9th June 2016)
66. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
67. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000600020. (Accessed: 9th June 2016)
68. Cedar, H. & Schwartz, J. H. Production of I-Asparaginase II by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **96**, 2043–2048 (1968).
69. Stranz, M. & Kastango, E. S. A Review of pH and Osmolarity. *Int. J. Pharm. Compd.* **6**, 216–220 (2002).
70. Lea, C. H., Hannan, R. S. & Greaves, R. I. N. The reaction between proteins and reducing sugars in the 'dry' state. Dried human blood plasma. *Biochem. J.* **47**, 626–629 (1950).
71. Kadoya, S. *et al.* Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols. *Int. J. Pharm.* **389**, 107–113 (2010).

72. RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB. Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. (Accessed: 3rd June 2016)
73. Swain, A. L., Jaskólski, M., Housset, D., Rao, J. K. & Wlodawer, A. Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1474–1478 (1993).
74. Fukuyama, T., Matsuo, K. & Gekko, K. Vacuum-Ultraviolet Electronic Circular Dichroism of L-Alanine in Aqueous Solution Investigated by Time-Dependent Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. A* **109**, 6928–6933 (2005).
75. Bansal, A. K. Product development issues of powders for injection. *ResearchGate* **26**, (2002).
76. Dunlop, P. C., Meyer, G. M. & Roon, R. J. Reactions of asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. A mechanistic analysis of hydrolysis and hydroxylaminolysis. *J. Biol. Chem.* **255**, 1542–1546 (1980).
77. Depaz, R. A., Pansare, S. & Patel, S. M. Freeze-Drying Above the Glass Transition Temperature in Amorphous Protein Formulations While Maintaining Product Quality and Improving Process Efficiency. *J. Pharm. Sci.* **105**, 40–49 (2016).
78. Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **203**, 1–60 (2000).
79. MacKenzie, A. P. Collapse during freeze drying--qualitative and quantitative aspects. *Free. Dry. Adv. Food Technol. Goldblith Rey W W Rothmayr Eds* (1975).

ANEXO 1 – DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA



DECLARAÇÃO



Declaro que, quanto aos aspectos legais, a pesquisa a ser por mim desenvolvida só poderá ser iniciada após as autorizações necessárias, quando houver:

- Experimentação com seres humanos:

Estou ciente de que, se o meu projeto de pesquisa envolver seres humanos, de forma individual ou coletiva, em sua totalidade ou partes dele, e o envolva de forma direta ou indireta, incluindo o manejo de seus dados, informações ou materiais biológicos, nos termos da Resolução CNS/MS Nº 466/12, devo submeter o meu projeto de pesquisa para apreciação ética junto ao Comitê de Ética em Pesquisa/Unicamp (CEP) (<http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/login.jsf>) e somente iniciar o estudo após a aprovação pelo sistema CEP/CONEP. Em caso de dúvidas, devo enviar e-mail para: cep@fcm.unicamp.br

- Experimentação com animais:

Estou ciente de que, se o meu projeto de pesquisa envolver experimentação com animais, devo observar a Lei nº 11.794, de 2008; conhecida como Lei Arouca e submeter o meu projeto de pesquisa para apreciação ética junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEAU) (<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>) e, somente iniciar o estudo após a aprovação. Em caso de dúvidas, devo enviar e-mail para: comisib@unicamp.br

- Patrimônio genético e conhecimento tradicional associado:

Estou ciente que, tratando-se, meu projeto, de pesquisa que envolva **patrimônio genético** (amostras de plantas e animais nativos, microorganismos, e todos os derivados) com ou sem **conhecimento tradicional** associado, devo consultar a Medida Provisória nº 2.186/2001 (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm) para verificar se há necessidade de solicitação de autorização prévia junto ao CNPq (Plataforma Chagas). Em caso de dúvida, devo enviar mensagem ao órgão responsável pelas autorizações no e-mail: apq@cnpq.br

Nome do aluno: Danilo Costa Geraldes

CPF: 410.107.738-01

Programa de Pós-Graduação Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

OBS: O pesquisador também poderá usar as orientações disponibilizadas na página inicial da Pró-Reitoria de Pós-Graduação (www.prog.unicamp.br, item "Aspectos legais da pesquisa científica").

Assinatura do Aluno

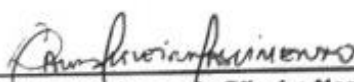
ANEXO 2 – DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudo de parâmetros farmacotécnicos e de processo para a obtenção de asparaginases liofilizadas**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 10 de maio de 2017

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Danilo Costa Geraldes**
RG n.º **49773134-2**

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Laura de Oliveira Nascimento**
RG n.º **29992007-0**