

PEGUILAÇÃO DA L-ASPARAGINASE EM SISTEMAS DE MICROFLUÍDICA

Mileyde Araujo¹

Prof.^a Carlota de O. Rangel Yagui¹, Prof. Dr. Mário Ricardo Gongora Rubio²

Dr. João Henrique P. M. Santos¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo (USP)

²Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT)

mileydearaudo@usp.br

Objetivos

A enzima L-asparaginase é responsável por converter o aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia e possui importantes aplicações na indústria farmacêutica, como biofármaco antileucêmico para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA). Nos últimos anos, técnicas foram desenvolvidas para aprimorar os biofármacos por bioconjugação, destacando-se a PEGuilação. Como esta técnica apresenta algumas limitações, este estudo inovador visa otimizar as reações de bioconjugação aplicando microrreactores de fluxo contínuo passivo em diferentes geometrias (canais cruzados com diferentes números de secções), visando aumentar o rendimento da PEGuilação e a seletividade da reacção (monoPEGuilação).

Métodos e Procedimentos

O PEG reativo utilizado é metoxipolietilenoglicol carboximetyl N-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS) de três massas moleculares (10, 20 e 40 kDa). Destina-se a comparar o rendimento das reações obtidas em micromisturadores com as obtidas em processos descontínuos por agitação magnética. A reação de PEGuilação em microfluídica, foi conduzida numa geometria de canal transversal do micro misturador, em

que as entradas serão alimentadas com seringas, injetando a solução reativa de PEG (mPEG-NHS) de diferentes tamanhos e a solução de L-asparaginase em tampão fosfato 100 mM (pH = 7.5), num fluxo constante (20-200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), para que resulte num tempo de residência mais específico e forneça uma mistura da reacção entre o PEG reativo e a L-asparaginase num fluxo laminar com advento caótico. Para o emprego de microfluídica, o microrreator (micromisturador passivo) foi desenvolvido no Laboratório de Bionanomanufatura do IPT e foram fabricados pela técnica de LTCC,³² com geometria em *crossing-channels* apresentando três tipos de desenhos: respectivamente G1, G2 e G3. A avaliação prévia dos microrreactores, ocorreu pela mistura de dois corantes alimentares, Brilliant Blue e Tartrazine.

Resultados

A reação de PEGuilação foi inicialmente efetuada em batelada em vials sob agitação magnética, sendo quantificados os rendimentos de PEGuilação e seletividade na formação de formas mono-PEGuiladas (Tabela 1). De seguida, de forma a visar melhorar o processo através do emprego de microfluídica, foram manufacturados os microrreactores para serem testados na reacção de bioconjugação.

Como apresentado na Figura 1a e 1b é possível verificar a mistura efetiva dos corantes

na saída do microcanal, após este atravessar a geometria de *crossing-channels*, indicando um desempenho satisfatório dos mesmos e sinal de uma micromanufatura com qualidade.

Tabela 1 — Rendimentos obtidos nas reações de PEGuilação da L-asparaginase (ASNase) usando o mPEG-NHS de 10, 20 e 40 kDa. O rendimento foi calculado por técnicas cromatográficas SEC-HPLC.

PROTEÍNA	RENDIMENTO (%)
Poli-PEG-ASNase-10	22 ± 4
Mono-PEG-ASNase-10	37 ± 2
Poli-PEG-ASNase-20	5 ± 1
Mono-PEG-ASNase-20	10 ± 1
Mono-PEG-ASNase-40	19 ± 0,5
ASNase Nativa	81 ± 0,5

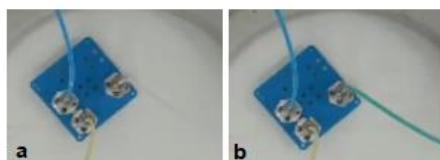


Figura 1 — Processo de avaliação da capacidade de mistura do microdispositivo pela mistura dos corantes.

A geometria G1 apresenta diâmetro hidráulico ($D_h = 26 \mu\text{m}$), volume= $8,33 \text{ mm}^3$; e 22 secções; a geometria G2 apresenta $D_h = 130 \mu\text{m}$, volume= $2,56 \text{ mm}^3$, e 22 secções; a geometria G3 apresenta $D_h = 260 \mu\text{m}$, volume= $87,9 \text{ mm}^3$, e 382 secções. Para caracterizar o tipo de regime de escoamento dos fluidos dentro dos micrreatorios, foi calculado o parâmetro de mecânica dos fluidos (**Tabela 2**): números de Péclet e Reynolds, bem como o tempo de residência, a fim de investigar geometrias em *crossing-channels*, com diferentes números de secções, que provocam advecção caótica e um bom índice de mistura.

Tabela 2 — Cálculo do tempo de residência e parâmetros de escoamento de fluidos (Re e Pe), após a PEGuilação da L-asparaginase pela geometria G1, G2 e G3.

Geometria	G1	G2	G3
Vazão ($\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)	100 - 200	100 - 200	10 - 200
Tempo Residência (s)	$\leq 5,0$	$\leq 1,54$	≤ 1027
Reynolds (Re)	4,06	8,14	4,06
Péclet (Pe) 10^3	50	100	250
Rendimento (%)	≤ 2	≤ 2	87
Seletividade (%)	100	100	100

Após confirmar o funcionamento do microdispositivo, pelas soluções corantes, realizou-se as reações de PEGuilação a partir da geometria G3. Para a realizar as reações de PEGuilação da proteína, diferentes tamanhos moleculares de PEG reactivo foram injetados no inlet (5, 10, 20 e 40 kDa), e em diferentes fluxos (20, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$). Os resultados de quantificação da quantidade de conjugados PEGuiliados foram obtidos por eletroforese, Figura 2, e analisados pelo programa ImageJ, Tabela 2.

Conclusões

Neste trabalho, avaliamos a otimização da PEGuilação da L-asparaginase em micrreatorios. Foi otimizada a reação de PEGuilação da ASNase na escala laboratorial (por agitação magnética) para PEGs de 10, 20 e 40 kDa, obtendo-se rendimentos de monoPEGuilação de (37%) para reações com 10 kDa mPEG-NHS. Os rendimentos obtidos mostraram que a massa molecular do PEG utilizado influencia o rendimento e seletividade (rendimento de monoPEGuilação) da reação. Portanto, a análise dos resultados para o funcionamento do microdispositivo, em comparação a reação de PEGuilação da ASNase na escala laboratorial, fornece dados que comprovam seu melhor desempenho, e otimização, para a reação de PEGuilação, obtendo-se rendimentos de (80%) para reações com 5 kDa mPEG-NHS pela geometria aperfeiçoada (G3) em vazão de $50 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

Referências Bibliográficas

- Madadkar, P., Selvaganapathy, P. R., & Ghosh, R. (2018). Continuous flow microreactor for protein PEGylation. *Biomicrofluidics*, 12(4), 044114. doi:10.1063/1.5030984.
- Gongora-Rubio, M. R., Freitas, K. H. G., de Novais Schianti, J., de Oliveira, A. M., Cerize, N. N. P. & Zanin, M. H. A. *Fab in a Package: LTCC Microfluidic Devices for Micro and Nanoparticle Fabrication*. Addit. Conf. (Device Packag. HiTEC, HiTEN, CICMT) 2012, 000294–000302 (2012).