

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 508**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 38/50** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008 E 08754910 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2147122**

54 Título: **Terapia anticancerígena enzimática**

30 Prioridad:

**20.04.2007 US 913039 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.10.2014**

73 Titular/es:

**SIGMA-TAU RARE DISEASES S.A. (100.0%)  
Rua dos Ferreiros no. 260  
9000-082 Funchal, PT**

72 Inventor/es:

**FILPULA, DAVID R. y  
SAPRA, PUJA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 507 508 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Terapia anticancerígena enzimática

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a adenosina desaminasa para uso en el tratamiento de tumores, especialmente de tumores malignos. En particular, dicho uso implica la reducción de los niveles en tejido de adenosina y desoxiadenosina.

**Antecedentes de la invención**

10 Un tumor es un crecimiento anormal benigno o maligno de células o tejidos que surge de una proliferación celular descontrolada. Un tumor maligno es aquel que se extiende desde su sitio de origen, y en la técnica también se conoce como cáncer. Por tanto, los tumores y los cánceres son una familia de enfermedades que comparten la propiedad común de un crecimiento celular descontrolado o inapropiado. De forma general, los tumores malignos son tumores derivados de la sangre, tales como la leucemia, o tumores sólidos. Los tumores malignos derivados de sangre generalmente circulan en la sangre, mientras que los tumores malignos sólidos se extienden a través del organismo desde un tumor primario. Las células tumorales distribuidas presentan entonces el potencial de desarrollarse en múltiples tumores secundarios, en un proceso de metástasis. Para que un tumor sólido se vea sometido a una extensión metastásica, las células del tumor sólido deben escapar del tumor primario u original, entrar en la corriente sanguínea o el sistema linfático y a partir de ahí invadir el tejido de otros órganos, donde se multiplican y forman nuevos tumores. La metástasis es un proceso multi-etapa complejo que implica cambios en la adhesión y la movilidad de las células tumorales, la secreción de enzimas proteolíticas, quimioattractores y proteoglicanos, y otros factores. Adicionalmente, la angiogénesis, o la formación de nuevos vasos sanguíneos, también es una etapa vital en el proceso metastásico (Folkman, 1995, Nature Medicine 1: 27-31).

15 También se ha demostrado que el sistema inmune inhibe la metástasis de dichas células tumorales malignas, y se ha publicado que la adenosina, a su vez, puede inhibir dichas reacciones protectoras inmunes. Por ejemplo, Loshkin et al., (2006, Cancer Res. 66: 7758-7765) han publicado que la adenosina inhibe la activación y la producción de citocinas en la producción de células T asesinas. La adenosina influye negativamente en otras funciones inmunes, que incluyen elementos celulares y funciones inflamatorias (véanse, p.ej., las revisiones de Spychala, 2000, Pharmacology & Therapeutics 87: 161-173 y de Sitkovesky et al., 2005 Nature Reviews Immunology 5: 713-721). Sitkovesky et al., en la solicitud de patente WO 03/050241, publicada el 19 de junio de 2003, también describieron métodos para aumentar la respuesta inmune a un antígeno y para tratar tumores, mediante la administración de un antagonista de receptor de adenosina, que puede incluir adenosina desaminasa.

20 También se ha demostrado que la adenosina promueve la migración de células tumorales y la angiogénesis (Barcz et al., 2000, Oncol. Rep. 7 (6): 1285-91; Adair, 2005, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289: R283-R296) y que la adenosina estimula la proliferación de células de cáncer de colon (Mujoomdar et al. 2003, Biochemical Pharmacology 66 1737-1747). Asmar et al., 1966, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. (Resumen nº 73) también han publicado que el crecimiento de determinadas células tumorales se vio inhibido por la inyección de ADA en más de un 50% en un modelo de ascitis de ratón. Se trataba de las leucemias linfáticas L1210 y L4946, el linfosarcoma 6C3HED, el adenocarcinoma mamario TA3 y el carcinoma de Ehrlich E2. En el mismo Resumen, se publicó que un adenocarcinoma 755 era el doble de resistente y un sarcoma 180 fue completamente resistente al efecto. La solicitud de patente WO03050241A2 describe los efectos de un inhibidor de receptores de adenosina sobre células de melanoma B16. Aunque el documento WO03050241A2 menciona ADA como inhibidor de adenosina, no se incluye ninguna descripción específica para aplicar ADA al tratamiento de cánceres específicos, y particularmente cáncer de ovario y cáncer de próstata.

Por tanto, parece que para algunos tumores, la presencia de adenosina proporciona una señal de "arranque" para la proliferación tumoral y para la angiogénesis tumoral, y una señal de "parada" para las células T asesinas que normalmente matarían a estos tumores.

25 En contraposición a los descubrimientos discutidos anteriormente, Lind, et al. (Patente de EE.UU. nº 6.579.857) han publicado que la adenosina, en combinación con un inhibidor de la enzima adenosina desaminasa, y/o en combinación con un agente anticancerígeno tal como la coformicina, es útil en un método para potenciar la muerte celular en células neoplásicas de origen epitelial. Por tanto, esta referencia sugiere que el papel de la adenosina en el cáncer es más complejo y no está establecido.

30 Tal como se ha indicado anteriormente, la enzima adenosina desaminasa es un agente para reducir los niveles de adenosina endógena. La adenosina desaminasa ("ADA"), designada EC 3.5.4.4, es una enzima importante en la ruta de rescate de purina. La ADA convierte adenosina o desoxiadenosina, en presencia de agua, en inosina o desoxinosina y amoníaco. Es conocido que los individuos que albergan mutaciones perjudiciales en el gen de ADA pueden desarrollar grados variables de un trastorno de inmunodeficiencia, desde suave a severo, es decir trastorno de inmunodeficiencia combinada severa ("SCID"). Se ha confirmado que el SCID es el resultado de la acumulación tóxica de los sustratos enzimáticos, adenosina y desoxiadenosina, en células linfoides inmaduras. El inicio del trastorno puede oscilar entre la infancia temprana y la edad adulta, dependiendo de las mutaciones heredadas. Las deficiencias en ADA son una de las causas principales del SCID, en niños, y es una de las dianas principales para

las estrategias de terapia génica (R. Parkman et al., 2000, "Gene therapy for adenosine deaminase deficiency", Ann. Rev. Med., 51: 33-47).

5 La ADA ha sido aislada comercialmente previamente a partir de fuentes bovinas y ha sido empleada en el tratamiento de una serie de trastornos, incluyendo el SCID, en la forma de una ADA bovina conjugada a polímero de polietileno glicol ("PEG"). La ADA PEGilada para uso médico se encuentra disponible comercialmente en Enzon Pharmaceuticals, Inc. como ADAGEN<sup>®</sup>, PEGylated ADA. La conjugación de una función PEG con ADA permite que la enzima alcance su efecto terapéutico completo aumentando la vida en circulación y haciendo que la ADA sea sustancialmente no antigénica, a fin de minimizar el potencial de reacciones inmunogénicas. También es posible producir enzimas ADA recombinantes humanas o bovinas para uso en una forma conjugada, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. compartida con n° de serie 11/738.012, titulada "Stabilized Proteins", y en la Solicitud de Patente de EE.UU. compartida n° 8.071.741, titulada "Stable Recombinant Adenosine Deaminase", presentada en una fecha uniforme con la presente y que reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente de EE.UU. con n° de serie 60/913.009.

15 Por tanto, existe una necesidad antigua en la técnica de moléculas nuevas y mejoradas para uso en el tratamiento o en la inhibición del crecimiento, la extensión y el desarrollo de cánceres.

### Compendio de la invención

20 Por consiguiente, la invención se refiere a ADA para uso en el tratamiento de un tumor en un paciente que lo necesite. Una cantidad efectiva es aquella que se determina fácilmente por parte del especialista en la técnica para reducir los niveles en tejido de adenosina o desoxiadenosina en el paciente, y donde se inhibe el crecimiento o la extensión del tumor mediante niveles en tejido sustancialmente reducidos de adenosina en el paciente. La ruta de administración es una ruta tal como subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, inhalación y transuretral.

El tumor puede ser maligno o no maligno, y preferiblemente es un tumor sólido, p.ej., un tumor tal como un tumor de próstata, un cáncer de ovario y/o un cáncer colorrectal.

25 La adenosina desaminasa se conjuga preferiblemente con un polímero sustancialmente no antigénico, tal como polióxido de alquileo (PAO). El PAO preferiblemente oscila en tamaño entre aproximadamente 4.000 y aproximadamente 45.000 Daltons. Preferiblemente el PAO es un polietileno glicol ("PEG"). La relación molar de ADA a polímero puede ser de 1:1, o puede ser de dos o más moléculas por polímero, o más preferiblemente, proporciona entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 moléculas de polímero (es decir, cadenas de PEG de 11-18 unidades) por cada molécula de ADA.

30 La dosis de ADA conjugada a polímero oscila entre aproximadamente 10U y aproximadamente 30U por kg o más, y durante un periodo de tiempo suficiente para mantener la inhibición del tumor, p.ej., entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 días, o más.

35 La cantidad de adenosina desaminasa que se administra es efectiva para reducir sustancialmente los niveles en tejido de adenosina o desoxiadenosina en el paciente, y donde se inhibe el crecimiento o la extensión del tumor a través de niveles de adenosina en tejido sustancialmente reducidos en dicho paciente. Ésta es, por ejemplo, una dosis de adenosina desaminasa que oscila entre aproximadamente 10U y aproximadamente 30U por kg. La dosis se repite durante un periodo de tiempo suficiente para mantener la inhibición del tumor, p.ej., entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 días, o más. La dosis se administra mediante cualquier ruta conveniente tal como subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, inhalación y transuretral.

40 La adenosina desaminasa se purifica opcionalmente a partir de una fuente bovina o es una adenosina desaminasa recombinante. La adenosina desaminasa recombinante, por ejemplo, es una adenosina desaminasa recombinante bovina (Ser74-rbADA) que comprende la SEQ ID NO: 1, una adenosina desaminasa recombinante humana (Ser74-rhADA) que comprende la SEQ ID NO: 3 y una adenosina desaminasa recombinante bovina que comprende la SEQ ID NO: 5 y/o variaciones o polimorfismos de las mismas. La adenosina desaminasa bovina producida recombinante, p. ej. la SEQ ID NO: 5, se ve completada opcionalmente en la posición Cys74 para mejorar la estabilidad en un medio acuoso.

50 Para propósitos de la presente invención, el término "residuo" debe entenderse como la porción de un compuesto, al cual se refiere, p.ej., PEG, ADA, aminoácido, etc., que permanece después de que haya sido sometido a una reacción de sustitución con otro compuesto.

Para propósitos de la presente invención, el término "residuo polimérico", p.ej., "residuo de PEG", debe ser entendido como la porción del polímero, o PEG, que permanece después de que haya sido sometido a una reacción con otros compuestos, restos, etc.

55 Para propósitos de la presente invención, el término "alquilo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un hidrocarburo alifático saturado, que incluye grupos alquílicos de cadena lineal, de cadena ramificada y cíclicos. El término "alquilo" también incluye grupos alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo y

- alquilcarbonilalquilo C<sub>1-6</sub>. Preferiblemente, el grupo alquilo tiene entre 1 y 12 carbonos. Más preferiblemente, es un alquilo inferior de aproximadamente 1 a 7 carbonos, aún más preferiblemente de aproximadamente 1 a 4 carbonos. El grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando se encuentra sustituido, el(los) grupo(s) sustituido(s) preferiblemente incluye(n) grupos halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquilo, alcoxi, alquil-tio, alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, alquilamino, trihalometilo, hidroxilo, mercapto, hidroxí, ciano, alquilsililo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, hidrocarbonilo C<sub>1-6</sub>, arilo y amino.
- 5
- Para los propósitos de la presente invención, el término "sustituido" tal como se usa en la presente memoria se refiere a añadir o reemplazar uno o más átomos contenidos dentro de un grupo funcional o compuesto por uno de los restos del grupo de halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquilo, alcoxi, alquil-tio, alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, alquilamino, trihalometilo, hidroxilo, mercapto, hidroxí, ciano, alquilsililo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, alquilcarbonilalquilo C<sub>1-6</sub>, arilo y amino.
- 10
- Para los propósitos de la presente invención, el término "alquenilo" se refiere a grupos que contienen al menos un enlace doble carbono-carbono, que incluye grupos de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos. Preferiblemente, el grupo alquenilo tiene aproximadamente de 2 a 12 carbonos. Más preferiblemente, es un alquenilo inferior de aproximadamente 2 a 7 carbonos, aún más preferiblemente de aproximadamente 2 a 4 carbonos. El grupo alquenilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando se encuentra sustituido, el(los) grupo(s) sustituido(s) preferiblemente incluye(n) grupos halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquilo, alcoxi, alquil-tio, alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, alquilamino, trihalometilo, hidroxilo, mercapto, hidroxí, ciano, alquilsililo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, hidrocarbonilo C<sub>1-6</sub>, arilo y amino.
- 15
- Para los propósitos de la presente invención, el término "alquinilo" se refiere a grupos que contienen al menos un enlace triple carbono-carbono, que incluye grupos de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos. Preferiblemente, el grupo alquinilo tiene aproximadamente de 2 a 12 carbonos. Más preferiblemente, es un alquinilo inferior de aproximadamente 2 a 7 carbonos, aún más preferiblemente de aproximadamente 2 a 4 carbonos. El grupo alquinilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando se encuentra sustituido, el(los) grupo(s) sustituido(s) preferiblemente incluye(n) grupos halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquilo, alcoxi, alquil-tio, alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, alquilamino, trihalometilo, hidroxilo, mercapto, hidroxí, ciano, alquilsililo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, hidrocarbonilo C<sub>1-6</sub>, arilo y amino. Los ejemplos de "alquinilo" incluyen propargilo, propino y 3-hexino.
- 20
- Para propósitos de la presente invención, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático hidrocarbonado que contiene al menos un anillo aromático. Opcionalmente, el anillo aromático puede estar fusionado o unido a otros anillos hidrocarbonados aromáticos o anillos hidrocarbonados no aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, por ejemplo, fenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno y bifenilo. Los ejemplos preferidos de grupos arilo incluyen fenilo y naftilo.
- 25
- Para los propósitos de la presente invención, el término "cicloalquilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico C<sub>3-8</sub>. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.
- 30
- Para los propósitos de la presente invención, el término "cicloalquenilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico C<sub>3-8</sub> que contiene al menos un enlace doble carbono-carbono. Los ejemplos de cicloalquenilo incluyen ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexenilo, 1,3-ciclohexadienilo, cicloheptenilo, cicloheptatrienilo y ciclooctenilo.
- 35
- Para los propósitos de la presente invención, el término "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo cicloalquilo C<sub>3-8</sub>. Los ejemplos de grupos cicloalquilalquilo incluyen ciclopropilmetilo y ciclopentiletilo.
- 40
- Para los propósitos de la presente invención, el término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo con el número indicado de átomos de carbono unidos al resto molecular principal a través de un puente de oxígeno. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi e isopropoxi.
- 45
- Para los propósitos de la presente invención, un grupo "alquilarilo" se refiere a un grupo arilo sustituido con un grupo alquilo.
- Para los propósitos de la presente invención, un grupo "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo.
- Para los propósitos de la presente invención, un grupo "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi.
- 50
- Para los propósitos de la presente invención, el término "alquil-tio-alquilo" se refiere a un tioéter de alquil-S-alquilo, por ejemplo metiltiometilo o metiltioetilo.
- Para los propósitos de la presente invención, el término "amino" se refiere a un grupo que contiene nitrógeno tal como se conoce en la técnica derivado de amoníaco por sustitución de uno o más radicales hidrógeno por radicales orgánicos. Por ejemplo, los términos "acilamino" y "alquilamino" se refieren a radicales orgánicos N-sustituidos específicos con grupos sustituyentes acilo y alquilo, respectivamente.
- 55

Para los propósitos de la presente invención, un grupo "alquilcarbonilo" se refiere a un grupo carbonilo sustituido con un grupo alquilo.

Para los propósitos de la presente invención, los términos "halógeno" o "halo" se refieren a flúor, cloro, bromo y yodo.

5 Para los propósitos de la presente invención, el término "heterocicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo no aromático que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Opcionalmente, el anillo de heterocicloalquilo puede estar fusionado o unido de otro modo a otros anillos de heterocicloalquilo y/o anillos hidrocarbonados no aromáticos. Los grupos heterocicloalquilo preferidos tienen entre 3 y 7 miembros. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen, por ejemplo, piperacina, morfolina, piperidina, tetrahidrofurano, pirrolidina y pirazol. Los grupos heterocicloalquilo preferidos incluyen piperidinilo, piperacinilo, morfolinilo y pirrolidinilo.

15 Para los propósitos de la presente invención, el término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo heteroarilo puede estar fusionado o unido de otro modo a uno o más anillos de heteroarilo, anillos hidrocarbonados aromáticos o no aromáticos o anillos de heterocicloalquilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, piridina, furano, tiofeno, 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolina y pirimidina. Los ejemplos preferidos de grupos heteroarilo incluyen tienilo, benzotienilo, piridilo, quinolilo, pirazinilo, pirimidilo, imidazolilo, bencimidazolilo, furanilo, benzofuranilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, isotiazolilo, bencisotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirrolilo, indolilo, pirazolilo y benzopirazolilo.

20 Para los propósitos de la presente invención, el término "heteroátomo" se refiere a nitrógeno, oxígeno y azufre.

25 En algunas realizaciones, los alquilos sustituidos incluyen carboxialquilos, aminoalquilos, dialquilaminos, hidroxialquilos y mercaptoalquilos; los alquenos sustituidos incluyen carboxialquenos, aminoalquenos, dialquenilaminos, hidroxialquenos y mercaptoalquenos; los alquinos sustituidos incluyen carboxialquinos, aminoalquinos, dialquinilaminos, hidroxialquinos y mercaptoalquinos; los cicloalquilos sustituidos incluyen restos tales como 4-clorociclohexilo; los arilos incluyen restos tales como naftilo; los arilos sustituidos incluyen restos tales como 3-bromo fenilo; los aralquilos incluyen restos tales como toloilo; los heteroalquilos incluyen restos tales como etiltiofeno; los heteroalquilos sustituidos incluyen restos tales como 3-metoxi-tiofeno; alcoxi incluye restos tales como metoxi; y fenoxi incluye restos tales como 3-nitrofenoxi. Debe considerarse que halo incluye fluoro, cloro, yodo y bromo.

30 Para los propósitos de la presente invención, "número entero positivo" debe entenderse que incluye un número entero igual o superior a 1, y tal como será interpretado por los especialistas en la técnica, entrará dentro del campo de lo razonable para el especialista.

Para los propósitos de la presente invención, el término "ligado" debe considerarse que incluye la unión covalente (preferiblemente) o no covalente de un grupo a otro, es decir, como resultado de una reacción química.

35 Los términos "cantidades efectivas" y "cantidades suficientes" para los propósitos de la presente invención significarán una cantidad que alcance el efecto deseado o un efecto terapéutico, tal como entienden dicho efecto los especialistas en la técnica.

40 Para los propósitos de la presente invención, el término "adenosina" debe entenderse que incluye los nucleósidos adenosina y desoxiadenosina. La adenosina también incluye la adenosina y la desoxiadenosina presentes en forma de AMP, ADP, ATP, dAMP, dADP ó dATP.

Para los propósitos de la presente invención, "tumor mediado por adenosina" o "tumor que responde a adenosina desaminasa" debe entenderse que incluye de manera amplia cualquier tipo de tumor que se beneficie de la administración de ADA, o de una fracción activa de la misma, etc., independientemente de la ruta de administración.

45 Para los propósitos de la presente invención, "tratamiento de tumor mediado por adenosina" o "tratamiento de tumor que responde a adenosina desaminasa" o "inhibición de crecimiento de tumor mediado por adenosina" o "inhibición de crecimiento de tumor que responde a adenosina desaminasa" deben entenderse con el significado de que los síntomas o afecciones se ven minimizados o atenuados en comparación con lo observado en ausencia del tratamiento de ADA. Las afecciones tratadas pueden confirmarse, por ejemplo, a través de la inhibición del crecimiento tumoral y/o un descenso en los niveles de adenosina en células o tejidos cancerosos.

50 Hablando de forma general, se valorará que un tratamiento tiene éxito cuando se obtenga la respuesta clínica deseada. Por ejemplo, se puede definir un tratamiento exitoso cuando se obtenga, p.ej., un 10% o más (es decir, 20%, 30%, 40%) de inhibición de crecimiento tumoral. Alternativamente, se puede definir un tratamiento exitoso cuando se obtenga una reducción de al menos un 20%, o preferiblemente un 30%, más preferiblemente un 40% o más (es decir, 50% u 80%) en los niveles de adenosina en las células o tejidos cancerosos, incluyendo otros marcadores clínicos contemplados por el especialista en el campo, en comparación con lo observado en ausencia del tratamiento con ADA descrito en la presente memoria.

Adicionalmente, el uso de términos singulares por comodidad durante la descripción no pretende suponer en caso alguno una limitación. Por tanto, por ejemplo, una referencia a una composición que comprende una enzima se refiere a una o más moléculas de dicha enzima. También debe entenderse que esta invención no está limitada a las configuraciones, etapas de proceso y materiales particulares descritos en la presente memoria, ya que dichas configuraciones, etapas de proceso y materiales pueden variar algo.

### Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, la invención proporciona nuevos métodos para tratar tumores, que incluyen cánceres, mediante la administración de enzima ADA a un paciente que lo necesite, en cantidad y duración suficientes para reducir la cantidad de adenosina presente en los tejidos y/o fluidos corporales del paciente. Preferiblemente, la enzima ADA está conjugada a polímero. Para los tumores que depende de la presencia de adenosina para el crecimiento, la extensión metastásica y/o la protección frente al sistema inmune del paciente, una reducción suficiente en la adenosina endógena limitará o prevendrá el crecimiento del cáncer, la extensión metastásica y/o permitirá una operación normal de actividad antitumoral por parte del sistema inmune del paciente.

También se contempla que el tratamiento de tumores con ADA de la invención se lleve a cabo opcionalmente en combinación o coordinación con uno o más métodos y agentes de tratamiento anticancerígenos apropiados adicionales conocidos en la técnica, tal como se discute con mayor profundidad más adelante. El tratamiento de combinación de la presente invención incluye administrar una cantidad efectiva de los compuestos descritos en la presente memoria solos o en combinación, de forma simultánea o secuencial, con un segundo agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de agentes anticancerígenos conocidos en la técnica para dichos tratamientos de combinación incluyen, p.ej., Taxol™, bevacizumab (Avastin®), vincristina, vinblastina, neomicina, combretastatina(s), podofilotoxina(s), TNF-alfa, angiostatina, endostatina, vasculostatina, antagonistas alfa  $\nu$ -beta<sub>3</sub>, ionóforos de calcio, agentes inductores de flujo de calcio, cualquier derivado o profármaco de los mismos.

Los agentes anticancerígenos adicionales incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, citocinas, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis o inmunotoxinas o coaguligandos anticancerígenos. Una de dichas inmunotoxinas es, p.ej., el Erbitux® (cetuximab). "Agentes quimioterapéuticos", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a agentes o fármacos quimioterapéuticos clásicos usados en el tratamiento de malignidades. Este término se usa por simplicidad sin soslayar el hecho de que se pueden describir técnicamente otros compuestos como agentes quimioterapéuticos cuando ejercen un efecto anti-cancerígeno. Sin embargo, "quimioterapéutico" ha alcanzado un significado diferente en la técnica y se usa según dicho significado estándar.

Por lo tanto, el método inventivo se puede emplear en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos que se sabe que son efectivos en el tratamiento del cáncer, que incluyen aunque sin limitación, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, opcionalmente en combinación con leucovorina, 5-fluorodesoxiuridina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, mitoxantrona, aziridinilbenzoquinona (AZQ), Carmustina (BCNU o BiCNU® de Bristol-Myers Squibb), bleomicina, carboplatino (CBDCA), Lomustina (CCNU), metil-CCNU o MeCCNU, clorambuciol, clorodesoxiadenosina, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dactinomicina, daunorubicina, desoxicoformicina, doxorubicina, doxicofomina, DTIC (dacarbazina), epirubicina, etopósido (VP-16), fludarabina, hexametilmelamina, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, ifosfamida y mesna, levamisol, N-acetilcisteína ("NAC"), mostaza de 1-fenilalanina, 4'-(9-acridinilamino)metanosulfon-m-anisidida ("mAMSA"), inhibidores conocidos en la técnica de resistencia múltiple a fármacos (es decir, inhibidores MDR), melfalano, metotrexato, opcionalmente en combinación con leucovorina, mitramicina, mitomicina-c, inhibidores de proteína relacionada con resistencia multifármaco (inhibidores "MRP"), paclitaxel, procarbazona, estreptozotocina, N,N'-trietilentiofosforamida ("tioTEPA"), inhibidores de topoisomerasa I y/o topoisomerasa II, taxol, vinblastina, vincristeína, vincristina, vindesina, teniposide (VM-26®), y otros demasiado numerosos para mencionarlos.

Otros métodos para tratar cáncer contemplados para ser empleados en combinación con los métodos de la invención incluyen la irradiación con rayos X, rayos gamma directamente o con uso de dianas tomográficas, tratamiento de tejidos cancerosos con partículas radioactivas implantadas o "semillas", irradiación con rayos de neutrones de tejidos imprimados con compuestos de boro, y/u otros tipos de terapias de rayos de partículas conocidos en la técnica.

Otros agentes antitumorales o anticancerígenos (agentes antineoplásicos) que se administran opcionalmente en combinación o coordinación con los presentes métodos inventivos incluyen aquellos descritos en "GOODMAN AND GILMAN'S, THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS", décima edición, Eds. Hardman y Limbird.

A fin de apreciar mejor la invención, se definen los siguientes términos.

La referencia a "adenosina" en la presente memoria también abarca la desoxiadenosina, y las variaciones y derivados de la misma conocidos en la técnica que estén presentes *in vivo*, a menos que se especifique lo contrario.

La referencia a adenosina desaminasa o ADA incluye cualquier forma conocida en la técnica de la enzima, incluyendo la enzima natural purificada, p.ej., ADA natural purificada, ADA humana o bovina recombinante y las

variaciones, polimorfismos y derivados de las mismas. La enzima ADA purificada a partir de fuentes bovinas tiene una secuencia según la SEQ ID NO: 5, con el residuo Cys 74 rematado o protegido de forma natural con una cisteína, y los seis residuos C-terminales predichos del gen que codifica la ADA de la SEQ ID NO: 5 no están presentes. Sin embargo, se contempla que la invención pueda llevarse a la práctica con variaciones alternativas en la ADA natural bovina, incluyendo alelos alternativos y polimorfismos, tanto naturales como producidos recombinantemente, con y sin los seis residuos C-terminales predichos. Los polimorfismos de ADA bovina incluyen, p.ej., glutamina en la posición 198 en lugar de lisina; alanina en la posición 245 en lugar de treonina; arginina en la posición 351 en lugar de glicina.

Los derivados preferidos de enzima ADA incluyen enzima ADA producida recombinantemente que ha sido mutada para mejorar la estabilidad respecto a la enzima ADA recombinante no mutada. Éstos incluyen, por ejemplo, enzimas ADA recombinantes modificadas de SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 5 con uno o más de los polimorfismos indicados anteriormente, para reemplazar un residuo Cys oxidable que está expuesto al disolvente por un residuo de aminoácido no oxidable adecuado. Dichos residuos no oxidables incluyen cualquier residuo de aminoácido natural conocido en la técnica y/o cualquier derivado del mismo conocido en la técnica. Por ejemplo, la ADA recombinante madura expresada a partir de un gen aislado primero a partir de una fuente bovina o humana tiene un residuo Cys<sub>74</sub> inestable que es reemplazado preferiblemente por un residuo de aminoácido no oxidable, p.ej., por una Ser<sub>74</sub>. Dichas enzimas ADA recombinantes se ilustran en la SEQ ID NO: 1 (estructura de ADA bovina) y la SEQ ID NO: 3 (estructura de ADA humana). La SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 ilustran moléculas de ADN útiles para expresar las mismas, que han sido optimizadas desde el punto de vista del codón para la expresión de *E. coli*. Detalles adicionales relativos a dichas muteínas de ADA recombinante, y a la producción y purificación de dichas proteínas, se proporcionan en la Solicitud de Patente de EE.UU. compartida con nº de serie \_\_\_\_\_, que reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 60/913.009, titulada "Stable Recombinant Adenosine Deaminase" presentada en fecha uniforme con la presente, e incorporada a modo de referencia a la presente memoria al completo. Los detalles específicos sobre los vectores y métodos de purificación se encuentran en la misma, particularmente en la sección de Ejemplos, y más particularmente en los Ejemplos 1-4.

Alternativamente, las enzimas ADA se pueden estabilizar, según sea necesario, haciendo reaccionar un residuo Cys oxidable expuesto a disolvente, tratando la enzima ADA con una cantidad suficiente de un agente reactivo, en condiciones de reacción suficientes para tapar la cisteína reactiva, sin desactivar sustancialmente la proteína ADA. Este proceso se emplea preferiblemente con ADA producida recombinantemente, tanto enzimas ADA muteínas como naturales.

Por ejemplo, los agentes reactivos para tapar incluyen, sin limitación, glutatona oxidada (preferido), yodoacetamida, ácido yodoacético, cistina y otros ditioles conocidos por los especialistas en la técnica, y mezclas de los mismos. La cantidad y la concentración del agente reactivo de tapado incluido durante la fase de reacción de los métodos descritos en la presente memoria dependerán en cierta medida del agente reactivo de tapado específico y de las necesidades del especialista, pero no será objeto de una experimentación innecesaria. Cuando se usa glutatona oxidada como prototipo, la concentración usada cuando se hace reaccionar con una proteína recombinante tal como rhADA puede oscilar entre aproximadamente 25 µM y aproximadamente 100 mM. Preferiblemente, la glutatona oxidada se hace reaccionar con la proteína recombinante a una concentración de entre aproximadamente 5 nM y aproximadamente 25 mM.

Las condiciones de reacción empleadas durante la reacción del agente reactivo de tapado y la proteína recombinante incluyen además el uso de una disolución acuosa con un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,4, preferiblemente de entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,8. Adicionalmente, la disolución acuosa incluye preferiblemente un tampón adecuado tal como fosfato sódico, fosfato potásico, Tris y Hepes, y mezclas de los mismos en concentraciones que oscilan entre 10 y 150 mM (opcionalmente, la reacción de tapado [del inglés "capping"] puede tener lugar fuera de este rango de tampón, por debajo de 10 ó por encima de 150 mM). Las condiciones de reacción incluyen además permitir que la reacción evolucione a temperaturas que no contribuyan a la degradación de la proteína, es decir, de aproximadamente 4-37°C. Opcionalmente, el tapado puede tener lugar fuera de dicho rango de temperaturas, p.ej., en un rango de temperaturas inferior a 0-4°C o superior a 37°C. La reacción se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para lograr la estabilización deseada de la cisteína reactiva. Simplemente a modo de ejemplo, la reacción se lleva a cabo durante un tiempo que oscila entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 8 horas (p.ej. durante la noche).

Detalles adicionales relativos a ADA recombinante estabilizada y tapada se proporcionan en la Solicitud de Patente de EE.UU. compartida con nº de serie 11/738.012 titulada "Stabilized Proteins", y particularmente en la sección de ejemplos, que se incorpora a la presente memoria a modo de referencia.

Adicionalmente, el uso de términos singulares por comodidad durante la descripción no pretende suponer en caso alguno una limitación. Por tanto, por ejemplo, una referencia a una composición que comprende una enzima se refiere a una o más moléculas de dicha enzima. También debe entenderse que esta invención no está limitada a las configuraciones, etapas de proceso y materiales particulares descritos en la presente memoria, ya que dichas configuraciones, etapas de proceso y materiales pueden variar algo.

**A. Conjugados polímero-ADA**

Una forma preferida de ADA es en la forma de enzima conjugada a polímero. Los conjugados polímero-ADA de la presente invención generalmente corresponden a la fórmula (I):



5 en donde:

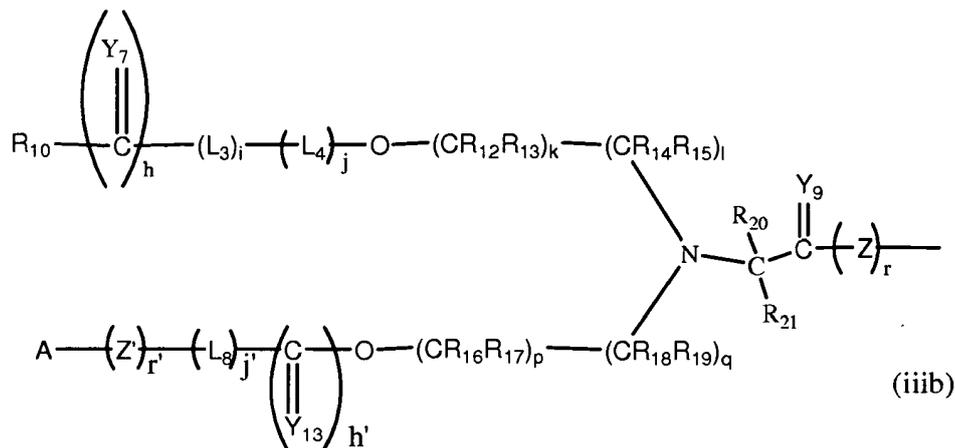
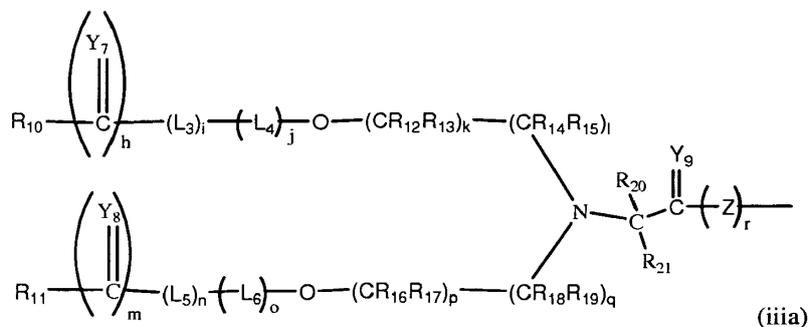
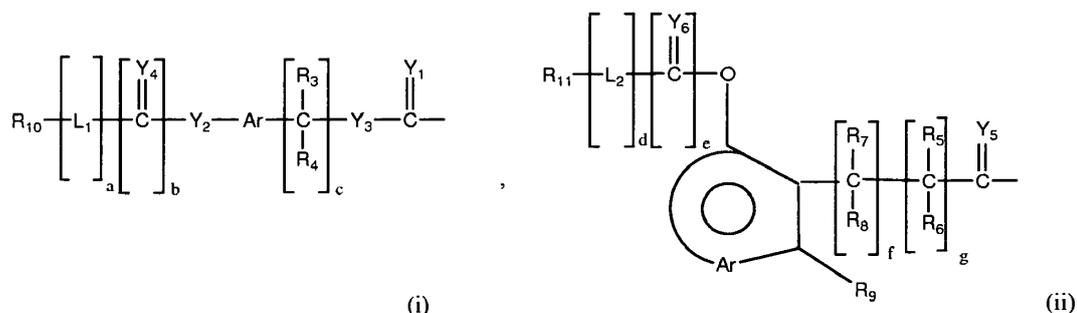
(ADA) representa la enzima adenosina desaminasa u opcionalmente un derivado o fragmento de la misma;

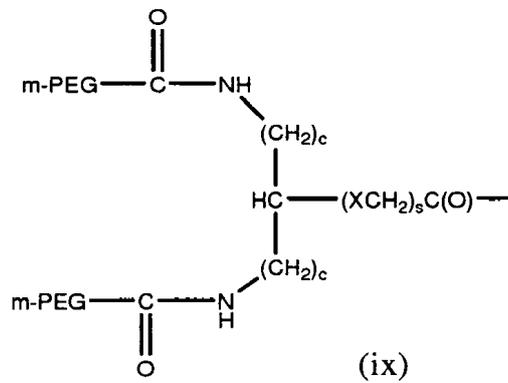
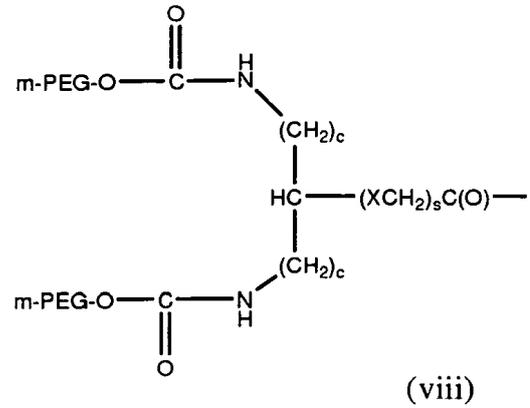
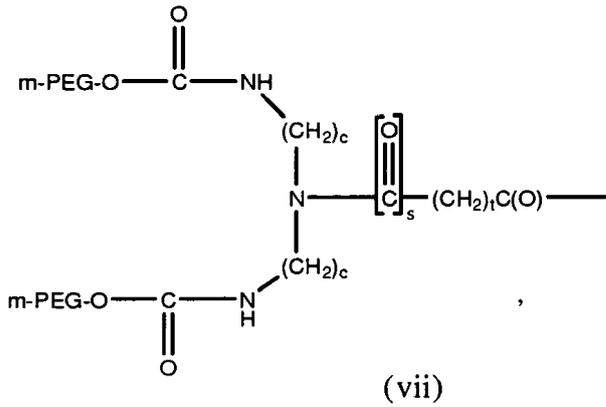
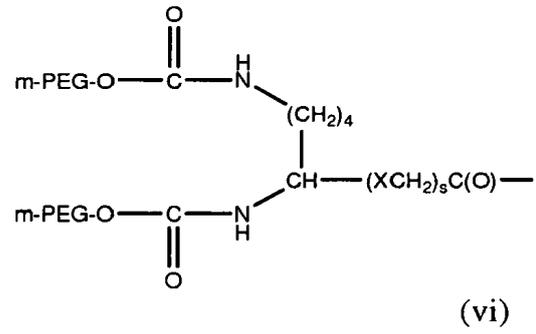
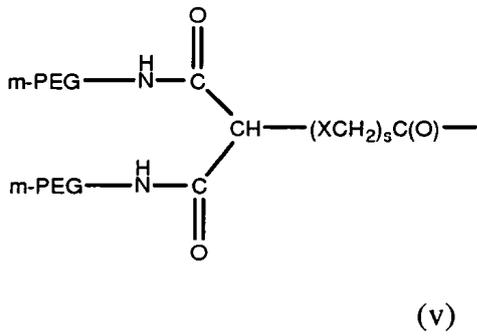
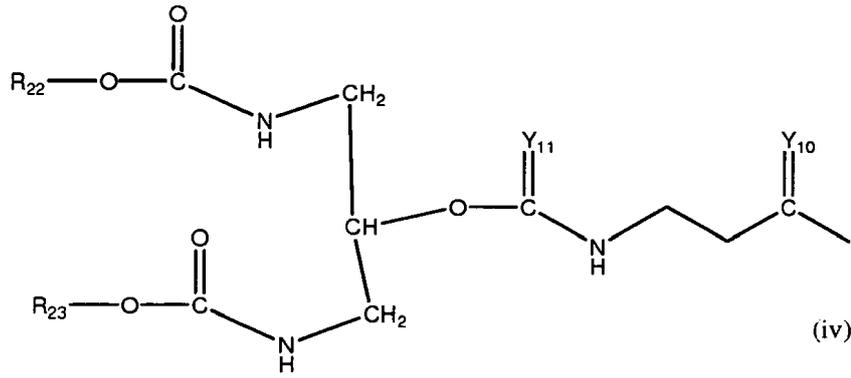
NH- es un grupo amino de un aminoácido que se encuentra en la ADA, derivado o fragmento de la misma, para unión al polímero;

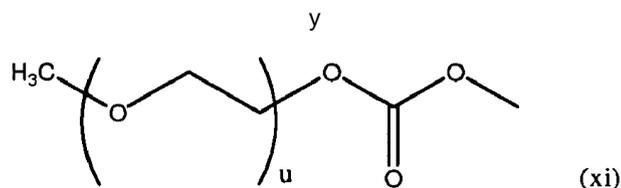
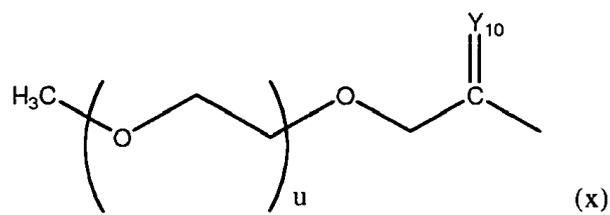
10 (z) es un número entero positivo, preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 80, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80, aún más preferiblemente entre aproximadamente 11 y aproximadamente 18; y

R es un residuo polimérico sustancialmente no antigénico que está unido a la ADA de un modo reversible o no reversible.

15 La porción de residuo polimérico no antigénico del conjugado (R) se puede seleccionar de una lista no limitante de sistemas basados en polímeros tales como:





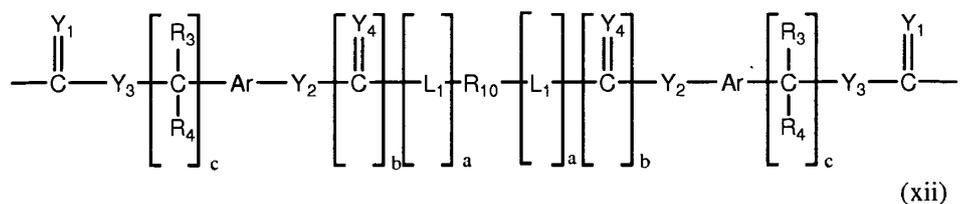


en donde:

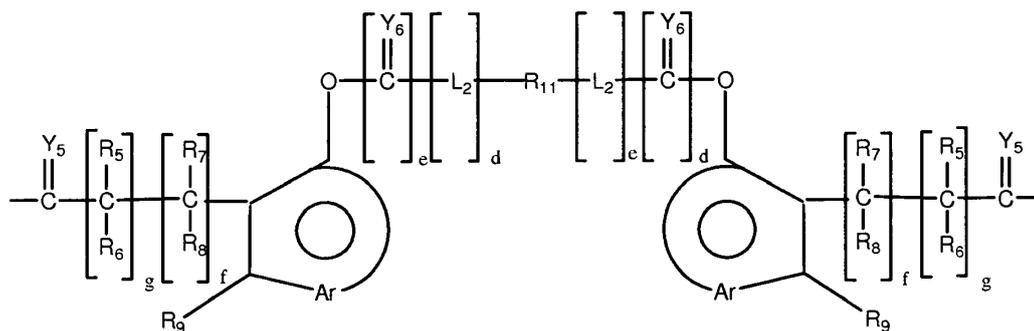
- 5  $R_{10-11}$  y  $R_{22-23}$  pueden ser iguales o diferentes y son residuos poliméricos no antigénicos seleccionados de manera independiente;
- $R_{3-9}$ ,  $R_{12-21}$  y  $R_{24}$  (ver más adelante) son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de manera independiente entre hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo ramificados  $C_{3-12}$ , cicloalquilo  $C_{3-8}$ , alquilo sustituidos  $C_{1-6}$ , cicloalquilo sustituidos  $C_{3-8}$ , arilos, arilos sustituidos, heteroalquilo  $C_{1-6}$ , heteroalquilo  $C_{1-6}$  sustituidos, alcoxi  $C_{1-6}$ , fenoxi y heteroalcoxi  $C_{1-6}$ ;
- 10 Ar es un resto que forma un hidrocarburo aromático multi-sustituido o un grupo heterocíclico multi-sustituido;
- $Y_{1-11}$  e  $Y_{13}$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de manera independiente de entre O, S y  $NR_{24}$ ;
- 15 A se selecciona entre grupos alquilo, restos que actúen como diana, agentes de diagnóstico y funciones biológicamente activas;
- X es O, NQ, S, SO ó  $SO_2$ ; donde Q es H, alquilo  $C_{1-8}$ , alquilo ramificado  $C_{1-8}$ , alquilo sustituido  $C_{1-8}$ , arilo o aralquilo;
- Z y Z' se seleccionan de forma independiente entre restos transportados activamente hacia el interior de una célula diana, restos hidrofóbicos, restos ligandos bifuncionales y combinaciones de los mismos;
- 20  $L_{1-6}$  y  $L_8$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de manera independiente entre grupos ligando bifuncionales;
- (a), (c), (d), (f), (g), (i), (j), (j'), (k), (l), (n), (o), (p), (q) y (t) pueden ser iguales o diferentes y son de manera independiente 0 ó un número entero positivo, preferiblemente, en la mayoría de los aspectos; (b), (e), (r), (r'), (s), (h), (h') y (m) pueden ser iguales o diferentes y son de manera independiente 0 ó 1;
- 25 mPEG es metoxi PEG y
- (u) es un número entero positivo para proporcionar polímeros que tengan un peso molecular total de entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 100.000 Da, preferiblemente de entre aproximadamente 4.000 y aproximadamente 45.000 Da.

30 Dentro de lo anterior, se prefiere que  $Y_{1-11}$  e  $Y_{13}$  sean O;  $R_{3-8}$ ,  $R_{12-21}$  y  $R_{24}$  sean de manera independiente cada uno bien hidrógeno o bien alquilo  $C_{1-6}$ , siendo metilo y etilo los alquilo más preferidos, y  $R_{7-9}$  sea preferiblemente  $CH_3$ .

En un aspecto adicional de la invención, la porción de polímero del conjugado puede ser una que proporcione múltiples puntos de unión para la ADA. Una lista no limitante de dichos sistemas incluye:



y



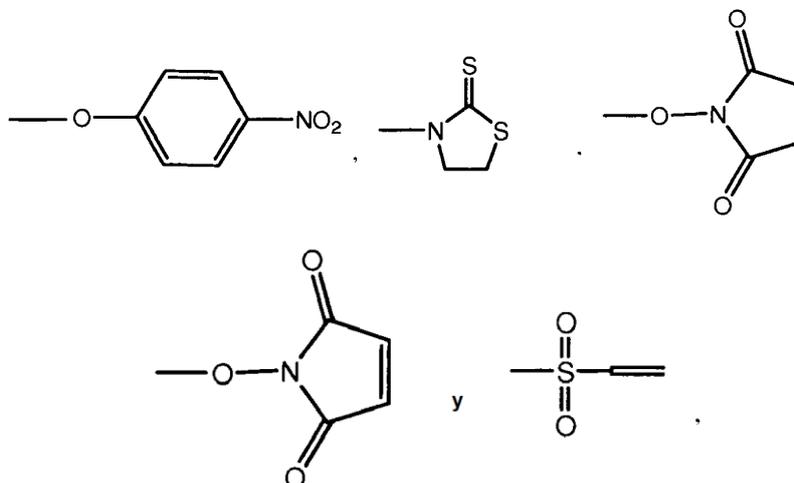
(xiii)

donde todas las variables como se ha indicado anteriormente.

Alternativa y/o preferiblemente, se unen múltiples cadenas de PEG a la ADA. En estos aspectos, los conjugados de polímero y ADA pueden incluir al menos 5 cadenas de polietilenglicol y hasta 80 cadenas unidas en los grupos amino épsilon de Lys de la enzima, pero preferiblemente, pueden incluir aproximadamente 11-18 cadenas PEG unidas a los grupos amino épsilon de Lys de la enzima.

Aunque la ADA se conjuga con entre aproximadamente 11 y aproximadamente 18 moléculas de PEG por molécula de enzima, a través de enlaces de lisina, la relación de PEG a ADA puede variarse con el objetivo de modificar las propiedades físicas y cinéticas del conjugado combinado para ajustarse a cualquier situación clínica particular.

Los polímeros activados que se pueden emplear para preparar conjugados de ADA corresponderán de manera natural directamente con las porciones de polímero descritas anteriormente. La diferencia principal es la presencia de un grupo saliente o activante, algunas veces designado en la presente memoria B<sub>1</sub>, que facilita la unión del sistema de polímero a un grupo amino (p.ej., grupo amino épsilon de la lisina) que se encuentre en la ADA. De este modo, los compuestos (i) - (xiii) incluyen un grupo saliente o activante tal como:



u otros grupos salientes o activantes adecuados tales como N-hidroxibenzotrazolilo, halógeno, N-hidroxifitalimidilo, imidazolilo, O-acil ureas, pentafluorofenol o 2,4,6-triclorofenol, u otros grupos salientes adecuados evidentes para los especialistas, que se encuentran donde la ADA se une tras la reacción de conjugación.

Algunos PEGs activados preferidos incluyen los descritos en las Patentes de EE.UU. asignadas en común nº 5.122.614, 5.324.844, 5.612.460 y 5.808.096 (polietilenglicol activado con carbonato de succinimidilo (SG-PEG) y PEGs activados relacionados), y la Patente de EE.UU. nº 5.349.001 (PEGs activados con imida tiona cíclica), cuyo contenido se incorpora a la presente memoria a modo de referencia. Como apreciarán los especialistas en la técnica, dichas reacciones de conjugación se llevan a cabo típicamente en un tampón adecuado usando un exceso molar importante de PEG activado. Algunos conjugados preferidos preparados con PEGs lineales como los SC-PEG mencionados anteriormente pueden contener, de media, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 80 cadenas de PEG por enzima. Por consiguiente, para éstos, se pueden emplear excesos molares de varios cientos a uno, p.ej. 200-1000:1. El exceso molar usado para polímeros ramificados y polímeros unidos a la enzima será menor y puede determinarse usando las técnicas descritas en las patentes y solicitudes de patente que las describen y que se mencionan en la presente memoria más adelante.

Para los propósitos de la presente invención, debe entenderse que los grupos activados son aquellos grupos que son capaces de reaccionar con un grupo amino (nucleófilo) que se encuentra en una ADA, p.ej. en una Lys.

Para propósitos de la presente invención, lo anterior también se refiere a ligandos poliméricos activados. Los residuos poliméricos preferiblemente están basados en polióxido de alquileo, y más preferiblemente se basan en polietilén glicol (PEG) donde el PEG es lineal, ramificado o con múltiples brazos.

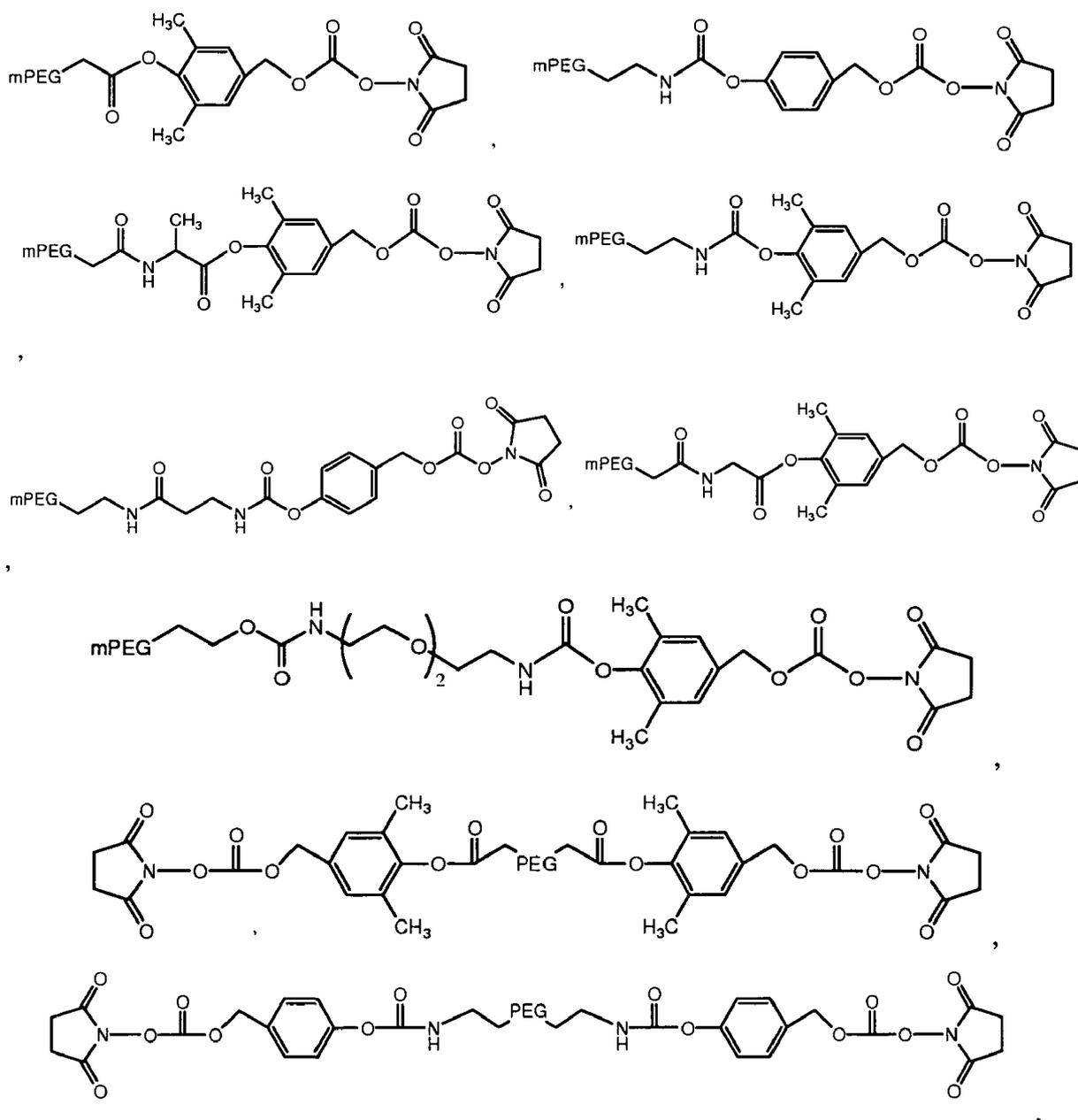
5

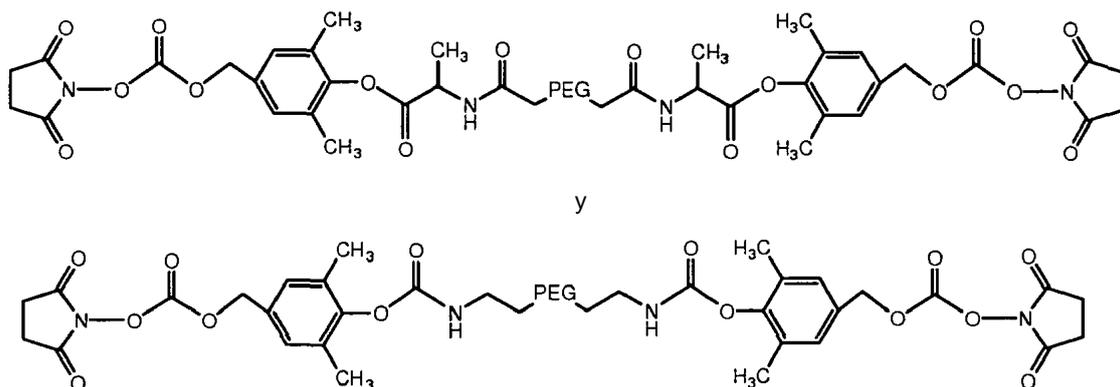
En referencia ahora a los polímeros descritos anteriormente, se puede observar que el Ar es un resto que forma un hidrocarburo aromático multi-sustituido o un grupo heterocíclico multi-sustituido. Una característica clave es que el resto Ar es de naturaleza aromática. Generalmente, para ser aromático, los electrones pi deben estar compartidos en una "nube" por encima y por debajo del plano de una molécula cíclica. Además, el número de electrones pi debe satisfacer la regla de Huckle ( $4n+2$ ). Los especialistas serán conscientes de que el requisito de aromaticidad lo pueden cumplir una miríada de restos y por tanto serían adecuados para su uso en la presente memoria.

10

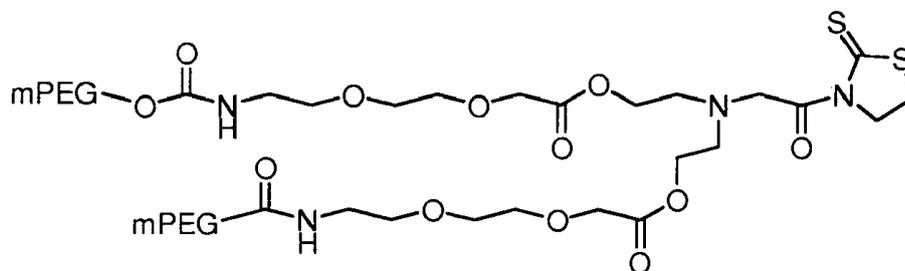
En algunos aspectos preferidos de la invención, los ligandos de polímero activados de los sistemas poliméricos basados en eliminación de bencilo o lactonización de trimetilo se preparan según las Patentes de EE.UU. asignadas en común con n° 6.180.095, 6.720.306, 5.965.119, 6.624.142 y 6.303.569, cuyo contenido se incorpora a la presente memoria a modo de referencia. En este contexto, se prefieren los siguientes ligandos poliméricos activados:

15

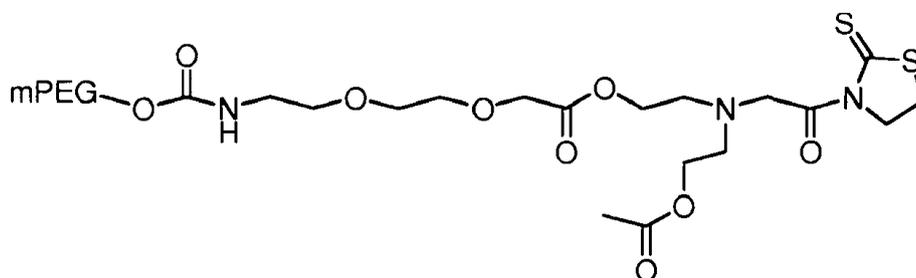




- 5 En un aspecto alternativo, los conjugados de polímero y ADA se preparan usando determinados residuos de polímero de bicina tales como los descritos en las Patentes de EE.UU. asignadas en común con nº 7.122.189 y 7.087.229 y las Solicitudes de Patente de EE.UU. con nº 10/557.522, 11/502.108 y 11/011.818. La descripción de cada una de dichas solicitudes de patente se incorpora a modo de referencia a la presente memoria. Algunos de los polímeros activados preferidos incluyen:

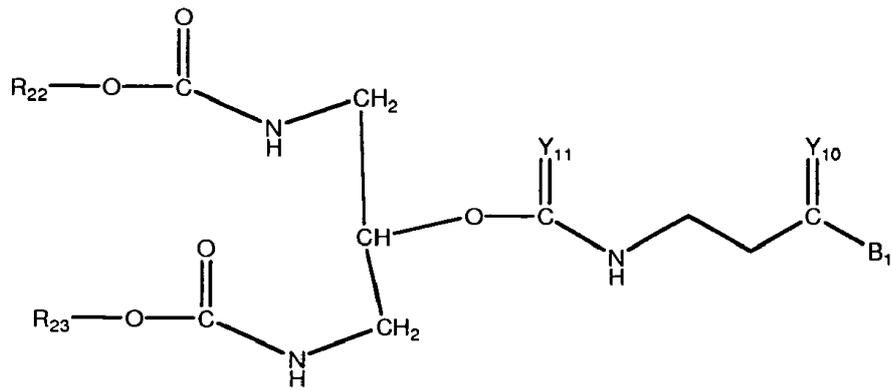


- 10 y



También debe entenderse que el grupo saliente o activante mostrado anteriormente solo es uno de los grupos adecuados, y también pueden utilizarse los demás mencionados en la presente memoria sin necesidad de experimentación indebida.

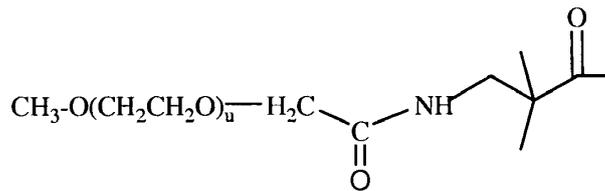
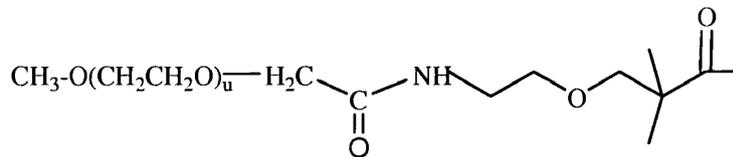
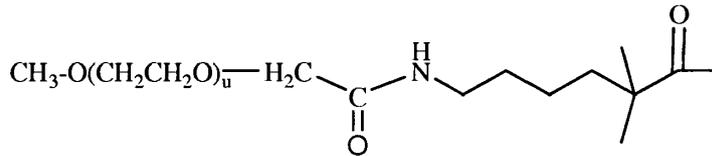
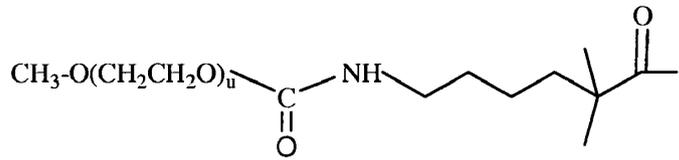
- 15 En aspectos alternativos, los ligandos poliméricos activados se preparan usando residuos poliméricos ramificados como los descritos en las Patentes de EE.UU. asignadas en común con nº 5.681.567, 5.756.593, 5.643.575; 5.919.455, 6.113.906, 6.153.655, 6.395.266 y 6.638.499, 6.251.382 y 6.824.766, cuya descripción se incorpora a la presente memoria a modo de referencia. Dichos polímeros activados corresponden a los sistemas poliméricos (iv) - (ix) siendo representativos los siguientes:



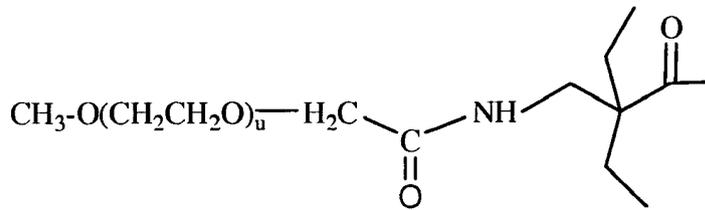
donde B<sub>1</sub> es un grupo activante y todas las variables son como se ha definido previamente.

En otros aspectos alternativos, los polímeros activados pueden emplear un ligando basado en éster impedido. Véase el documento PCT/US07/78593 titulado "Polyalkylene Oxides Having Hindered Ester-Based Biodegradable Linkers", cuyo contenido se incorpora a modo de referencia. Por ejemplo, una lista no limitante de dichos compuestos incluye:

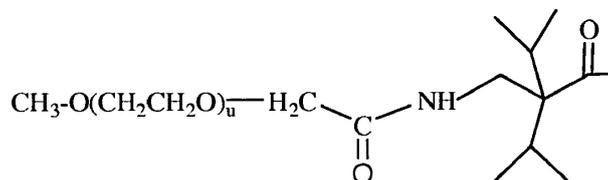
5



10



y



donde (u) es un número entero que oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 2.300, para proporcionar de manera preferible polímeros que tengan un peso molecular total de entre aproximadamente 4.000 y aproximadamente 45.000.

5 En una realización preferida, el polietilén glicol activado es uno que proporciona un enlace de uretano o un enlace de amida con la proteína.

10 Los métodos de preparación de polímeros que tengan ácidos carboxílicos terminales con una elevada pureza se describen en la Solicitud de Patente de los EE.UU. nº 11/328.662, cuyo contenido se incorpora a la presente memoria a modo de referencia. Los métodos incluye en primer lugar preparar un éster de alquilo terciario de un polióxido de alquilen seguido de la conversión al derivado de ácido carboxílico correspondiente. La primera etapa de la preparación de los ácidos carboxílicos de PAO del proceso incluye la formación de un intermedio tal como un *t*-butil éster de ácido carboxílico de polióxido de alquilen. Dicho intermedio se forma haciendo reaccionar un PAO con un haloacetato de *t*-butilo en presencia de una base tal como *t*-butóxido de potasio. Una vez que se ha formado el intermedio de éster de *t*-butilo, se puede proporcionar fácilmente el derivado de ácido carboxílico del polióxido de alquilen en purezas superiores al 92%, preferiblemente superiores al 97%, más preferiblemente superiores al 99% y lo más preferiblemente superiores al 99,5%.

15 En otros aspectos alternativos, se pueden emplear polímeros que tengan grupos amino terminales para preparar conjugados con ADA. Los métodos de preparación de polímeros que contienen aminas terminales con elevada pureza se describen en las Solicitudes de Patente de EE.UU. nº 11/508.507 y 11/537.172, cuyos contenidos se incorporan a modo de referencia. Por ejemplo, los polímeros que tienen azidas reaccionan con un agente reductor basado en fosfina tal como trifenilfosfina o con un agente reductor de borohidruro metálico tal como NaBH<sub>4</sub>. Alternativamente, los polímeros que incluyen grupos salientes reaccionan con sales de amina protegidas tal como la sal potásica de metil-terc-butil imidodicarbonato (KNMeBoc) o la sal potásica de di-terc-butil imidodicarbonato (KNBoc<sub>2</sub>) seguido de la desprotección del grupo amino. La pureza de los polímeros que contienen aminas terminales formadas mediante estos procesos es superior a aproximadamente el 95% y preferiblemente superior al 99%.

## 25 1.- Polímeros sustancialmente no antigénicos

Como se ha indicado antes, R<sub>10-11</sub> y R<sub>22-23</sub> son preferiblemente residuos poliméricos solubles en agua que son preferiblemente sustancialmente no antigénicos, tal como polióxidos de alquilen (PAOs) y más preferiblemente polietilén glicoles tal como mPEG. Para propósitos de ilustración y no de limitación, la porción de residuo de polietilén glicol (PEG) de R<sub>10-11</sub> y R<sub>22-23</sub> se puede seleccionar entre:

30 J-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-  
J-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>C(O)-O-,  
J-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR<sub>25</sub>-,

y

J-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-SH-,

35 en donde:

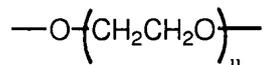
(u) es el grado de polimerización, es decir entre aproximadamente 10 y aproximadamente 2.300;  
R<sub>25</sub> se selecciona entre hidrógeno, alquilos C<sub>1-6</sub>, alquilenilos C<sub>2-6</sub>, alquiniilos C<sub>2-6</sub>, alquilos C<sub>3-12</sub> ramificados, cicloalquilos C<sub>3-8</sub>, alquilos C<sub>1-6</sub> sustituidos, alqueniilos C<sub>2-6</sub> sustituidos, alquiniilos C<sub>2-6</sub> sustituidos, cicloalquilos C<sub>3-8</sub> sustituidos, arilos, arilos sustituidos, aralquilos, heteroalquilos C<sub>1-6</sub>, heteroalquilos C<sub>1-6</sub> sustituidos, alcoxi C<sub>1-6</sub>, fenoxi y heteroalcoxi C<sub>1-6</sub>, y  
40 J es un grupo de tapado, es decir un grupo que se encuentra en el extremo del polímero y que, en algunos aspectos, puede seleccionarse de cualquiera de NH<sub>2</sub> (o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), H, SH (o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), CO<sub>2</sub>H (o CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), alquilos C<sub>1-6</sub>, preferiblemente metilo, u otros grupos activantes terminales de PEG, tal como entienden dichos grupos los especialistas en la técnica.

45 En una realización particularmente preferida, R<sub>10-11</sub> y R<sub>22-23</sub> se seleccionan entre,

CH<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-, CH<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>C(O)-O-,  
CH<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> NH- y CH<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> SH-,

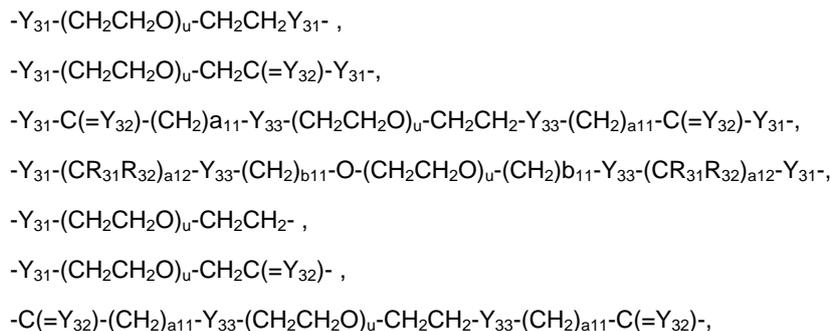
50 donde (u) es un número entero positivo, seleccionado preferiblemente de tal modo que el peso molecular total medio de la porción polimérica oscila entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 100.000 Da. Más preferiblemente, R<sub>10-11</sub> y R<sub>22-23</sub> tienen de manera independiente un peso molecular total medio de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 45.000 Da, siendo lo más preferido un peso molecular medio en peso de aproximadamente 5.000 Da. También se contemplan otros pesos moleculares de tal modo que se acomoden a las necesidades del especialista.

El PEG se representa generalmente mediante la estructura:

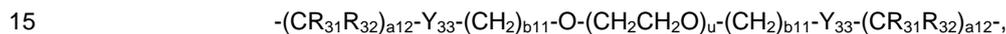


y R<sub>10-11</sub> y R<sub>22-23</sub> comprenden preferiblemente residuos con dicha fórmula. El grado de polimerización del polímero representa el número de unidades de repetición en la cadena polimérica y depende del peso molecular del polímero.

5 Alternativamente, la porción de residuo de polietilén glicol (PEG) de la invención se puede representar mediante la estructura:



y



en donde:

Y<sub>31</sub> e Y<sub>33</sub> son de manera independiente O, S, SO, SO<sub>2</sub>, NR<sub>33</sub> o un enlace;

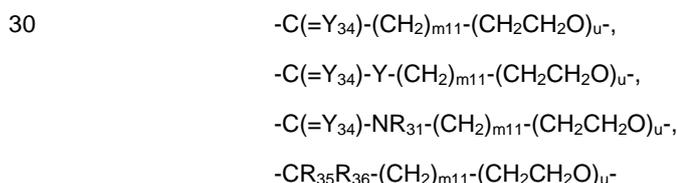
Y<sub>32</sub> es O, S ó NR<sub>34</sub>;

20 R<sub>31-34</sub> se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, alquilo C<sub>3-19</sub> ramificado, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2-6</sub> sustituido, alquino C<sub>2-6</sub> sustituido, cicloalquilo C<sub>3-8</sub> sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroalquilo C<sub>1-6</sub>, heteroalquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1-6</sub>, ariloxi, heteroalcoxi C<sub>1-6</sub>, heteroariloxi, alcanilo C<sub>2-6</sub>, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo C<sub>2-6</sub>, ariloxycarbonilo, alcaniloxi C<sub>2-6</sub>, arilcarboniloxi C<sub>2-6</sub>, alcanilo sustituido, arilcarbonilo sustituido, alcaniloxi C<sub>2-6</sub> sustituido, ariloxycarbonilo sustituido, alcaniloxi C<sub>2-6</sub> sustituido y arilcarboniloxi sustituido;

25 (a11), (a12) y (b11) son de manera independiente cero o un número entero positivo, preferiblemente 0-6, y más preferiblemente 0, 1 ó 2; y

(u) es un número entero entre aproximadamente 10 y aproximadamente 2.300.

A modo de ejemplo, el PEG puede estar funcionalizado de la siguiente manera:



en donde:

35 R<sub>31</sub>, R<sub>35</sub> y R<sub>36</sub> se seleccionan de manera independiente entre H, alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo, arilo sustituido, aralquilo, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido y alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido;

(m11) es cero o es un número entero positivo, y preferiblemente es 1 ó 2;

Y<sub>34</sub> es O ó S; y

(u) representa el grado de polimerización.

40 En estos aspectos, un grupo de tapado (J) tal como un metilo se une al extremo del PEG.

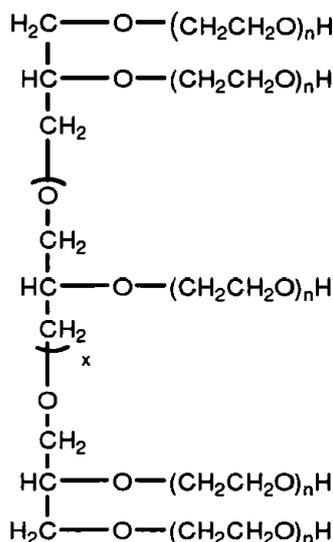
Por ejemplo, los conjugados de la presente invención pueden prepararse mediante métodos que incluyen la conversión del multi-brazo PEG-OH o de los productos "PEG-estrella", tales como los descritos en el catálogo de NOF Corp. Drug Delivery System catalog, Versión 8, abril de 2006, cuya descripción se incorpora a la presente memoria a modo de referencia, en un polímero activado adecuadamente, usando las técnicas de activación descritas en las Patentes de EE.UU. mencionadas anteriormente con nº 5.122.614 ó 5.808.096. Véase también el

45

catálogo de 2001 de la Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Application", incorporado a la presente memoria a modo de referencia.

Los polímeros multi-brazo contienen cuatro o más brazos poliméricos y preferiblemente de cuatro a ocho brazos poliméricos. Para propósitos de ilustración, y no de limitación, el residuo de polietilén glicol (PEG) de multi-brazo puede tener la fórmula:

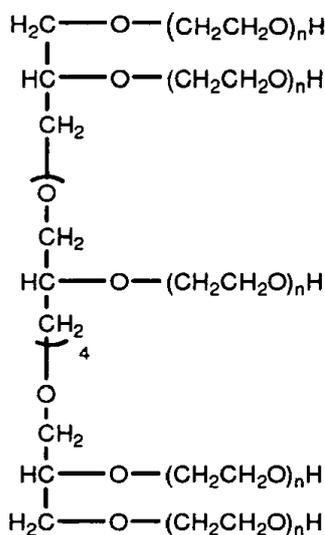
5



en donde:

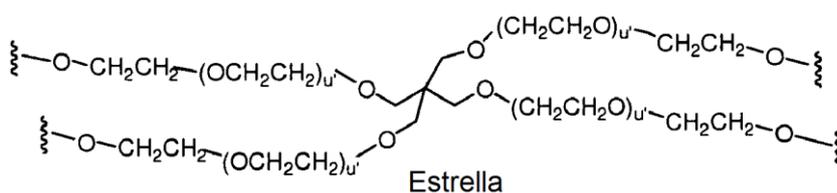
(x) es 0 y un número entero positivo, es decir entre aproximadamente 0 y aproximadamente 28; y  
 (n) es el grado de polimerización.

10 En una realización particular de la presente invención, el PEG multi-brazo tiene la estructura:

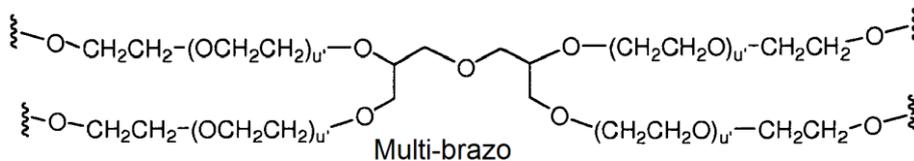


donde (n) es un número entero positivo. En una realización preferida de la invención, los polímeros tienen un peso molecular total de entre aproximadamente 2.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, y preferiblemente entre 4.000 Da y 45.000 Da.

15 Específicamente, el PEG puede tener la fórmula:



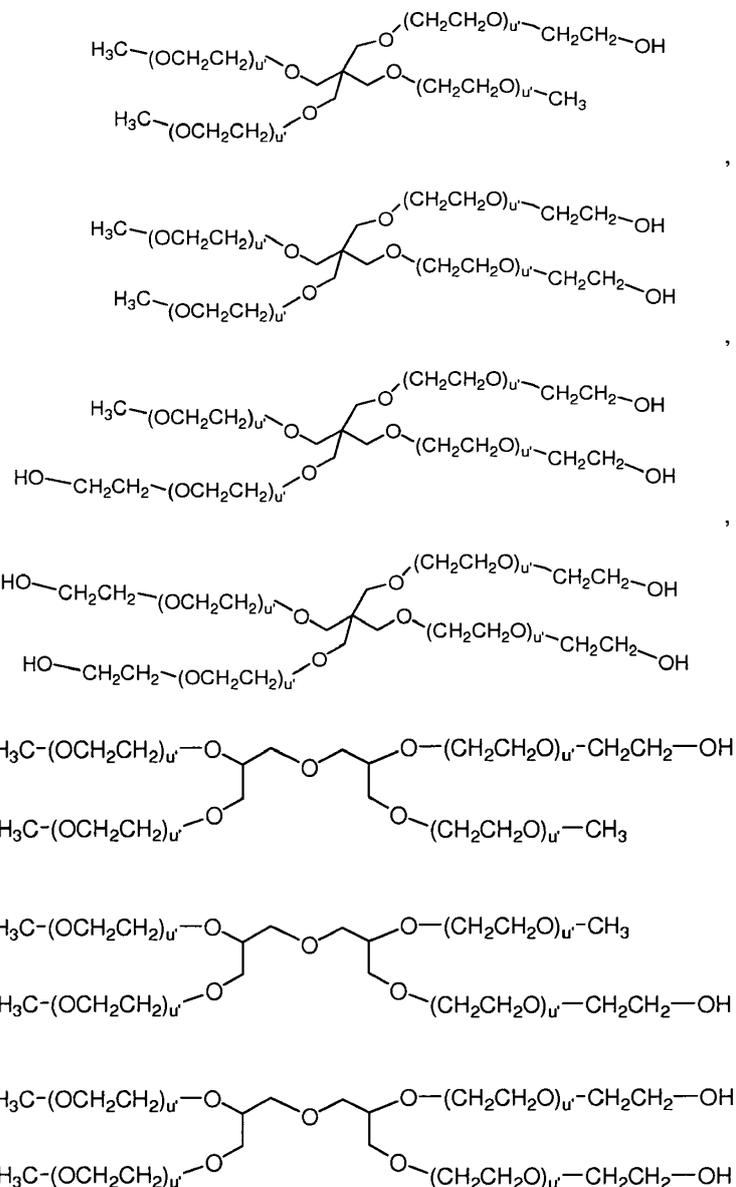
o

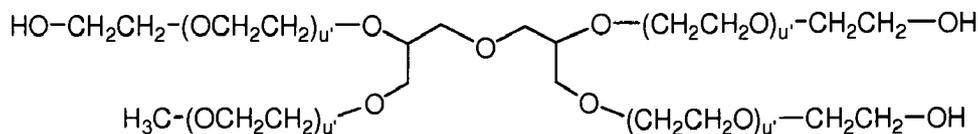
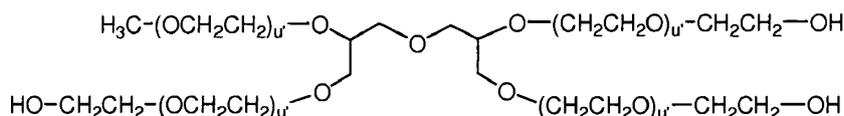
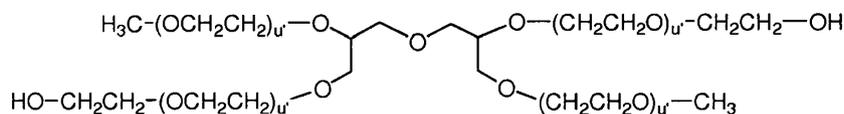
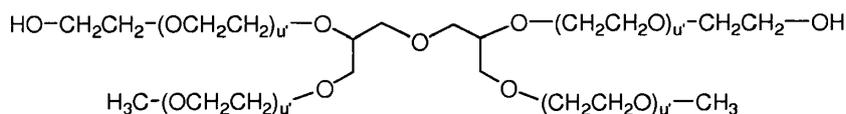


en donde:

5 (u') es un número entero entre aproximadamente 10 y aproximadamente 570, para proporcionar de manera preferible polímeros que tengan un peso molecular total de entre aproximadamente 4.000 y aproximadamente 45.000; y hasta 3 porciones terminales del residuo están rematadas o tapadas con un metilo u otro alquilo inferior.

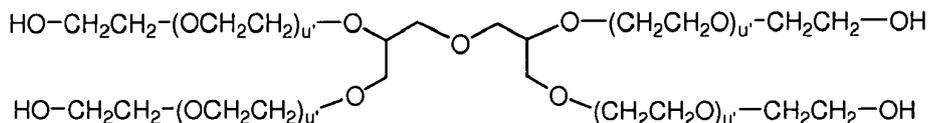
En algunas realizaciones preferidas, los 4 brazos de PEG son convertidos a grupos funcionales adecuados, es decir, SC, etc., para facilitar la unión a la proteína recombinante. Dichos compuestos antes de la conversión incluyen:





5

y



10

Las sustancias poliméricas incluidas en la presente memoria preferiblemente son solubles en agua a temperatura ambiente. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye homopolímeros de polióxido de alquileo tales como polietilén glicol (PEG) o polipropilén glicoles, polioles polioxietinados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloque.

15

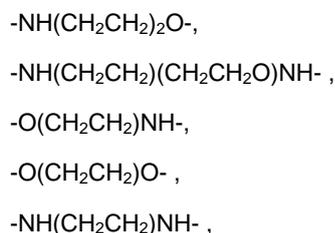
En una realización adicional, y como alternativa a los polímeros basados en PAO, R<sub>10-11</sub> y R<sub>22-23</sub> se seleccionan cada uno de manera independiente entre uno o más materiales efectivamente no antigénicos tales como dextrano, alcoholes de polivinilo, polímeros basados en carbohidratos, hidroxipropilmet-acrilamida (HPMA), polióxidos de alquileo y/o copolímeros de los mismos. Véase también la Patente de EE.UU. asignada en común con nº 6.153.655, cuyo contenido se incorpora a la presente memoria a modo de referencia. Los especialistas en la técnica entenderán que se emplea el mismo tipo de activación descrito en la presente memoria tanto para PAO como para PEG. Los especialistas en la técnica además apreciarán que la lista anterior es meramente ilustrativa y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tengan las cualidades descritas en la presente memoria, y también se contemplan otro derivados de polióxido de alquileo tales como los propilén glicoles, etc.

20

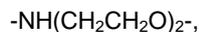
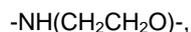
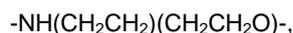
## 2.- Grupos ligando bifuncionales

25

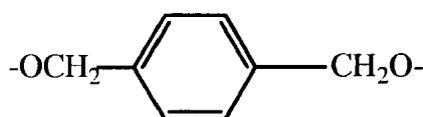
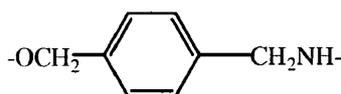
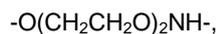
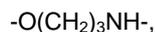
En muchos aspectos de la invención, L<sub>1-6</sub> y L<sub>8</sub> son grupos ligando que facilitan la unión de las cadenas de polímero, p.ej. R<sub>10-11</sub> y/o R<sub>22-23</sub>. El enlace proporcionado puede ser directo o a través de otros grupos de acoplamiento adicionales conocidos por los especialistas en la técnica. En este aspecto de la invención, L<sub>1-6</sub> y L<sub>8</sub> pueden ser iguales o diferentes y pueden seleccionarse a partir de una amplia variedad de grupos bien conocidos por los especialistas tal como los grupos alifáticos heterobifuncionales y los grupos aromático-alifáticos, aminoácidos, etc. De este modo, L<sub>1-6</sub> y L<sub>8</sub> pueden ser iguales o diferentes e incluyen grupos tales como:



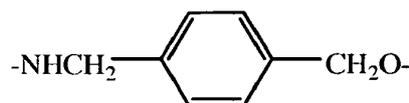
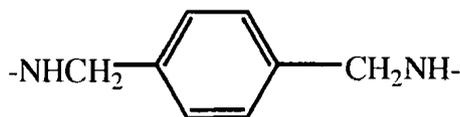
30



5



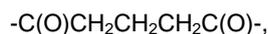
10



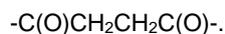
Preferiblemente, L<sub>1-6</sub> y L<sub>8</sub> se seleccionan entre:



15



y



20

Alternativamente, se pueden seleccionar residuos de aminoácido adecuados a partir de cualquiera de los L-aminoácidos naturales conocidos, p.ej., alanina, valina, leucina, etc., y/o una combinación de los mismos, por nombrar unos pocos. L<sub>1-6</sub> y L<sub>8</sub> también pueden incluir un péptido que oscila en tamaño, por ejemplo, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 residuos de aminoácido.

Dentro del alcance de la invención también se contemplan los derivados y análogos de aminoácidos naturales, así como varios aminoácidos no naturales (D ó L) conocidos en la técnica, hidrofóbicos o no hidrofóbicos.

25

### 3.- Restos Z y su función

30

En un aspecto de la invención, Z y Z' son L<sub>7</sub>-C(=Y<sub>12</sub>), donde L<sub>7</sub> es un ligando bifuncional seleccionado del grupo que define a L<sub>1-6</sub>, e Y<sub>12</sub> se selecciona entre los mismos grupos que definen a Y<sub>1</sub>. En este aspecto de la invención, el grupo Z actúa como enlace entre la ADA y el resto del sistema de aporte del polímero. En otros aspectos de la invención, Z es un resto que es transportado activamente hasta una célula diana, un resto hidrofóbico, y combinaciones de los mismos. El Z', cuando está presente, puede actuar como un ligando bifuncional, un resto que es transportado activamente hasta una célula diana, un resto hidrofóbico, y combinaciones de los mismos.

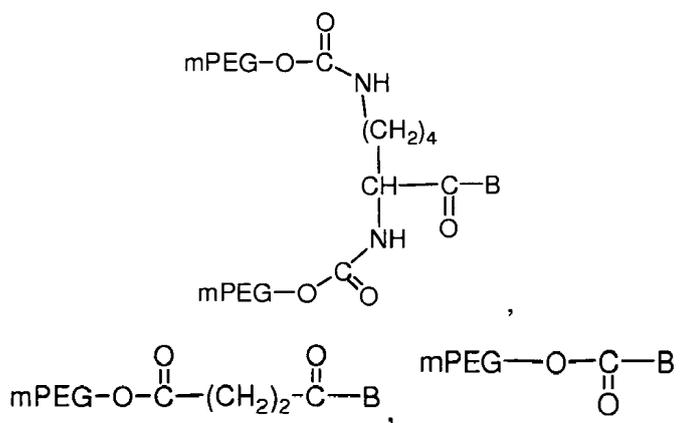
En este aspecto de la invención, los sistemas poliméricos liberables se preparan de tal modo que una hidrólisis *in vivo* separe el polímero de la ADA y libere la enzima al fluido extracelular, aún ligada al resto Z. Por ejemplo, algunas combinaciones Z-B potenciales son leucina-ADA y Gly-Phe-Leu-Gly-ADA.

35

**B. Preparación de conjugados de ADA**

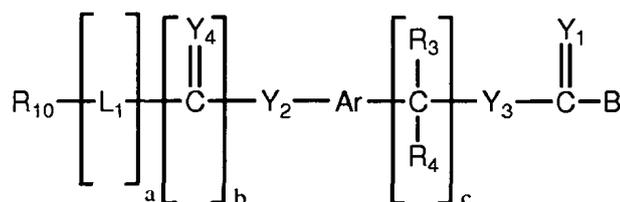
Con fines ilustrativos, las reacciones de conjugación adecuadas incluyen hacer reaccionar ADA con un sistema polimérico activado adecuadamente descrito en la presente memoria. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo usando condiciones bien conocidas por los especialistas en la técnica para la modificación de proteínas, que incluyen el uso de un sistema tamponado con PBS, etc., con un pH en el intervalo de aproximadamente 6,5-8,5. Se contempla que en la mayoría de los casos, se hará reaccionar un exceso del polímero activado con la ADA.

Las reacciones de este tipo a menudo darán como resultado la formación de conjugados que contengan uno o más polímeros unidos a la ADA. Como puede apreciarse, a menudo será deseable aislar las diversas fracciones y proporcionar un producto más homogéneo. En la mayoría de los aspectos de la invención, la mezcla de reacción se recoge, se carga en una columna de resina adecuada y se eluyen secuencialmente las fracciones deseadas con niveles crecientes de tampón. Las fracciones se analizan mediante herramientas analíticas adecuadas para determinar la pureza de la proteína conjugada antes de seguir con el procesamiento. Independientemente de la ruta de síntesis y del polímero activado seleccionado, los conjugados se conformarán como en la Fórmula (I) tal como se define en la presente memoria. Algunos de los conjugados preferidos que resultarán de las técnicas sintéticas descritas en la presente memoria incluyen:



donde B es ADA.

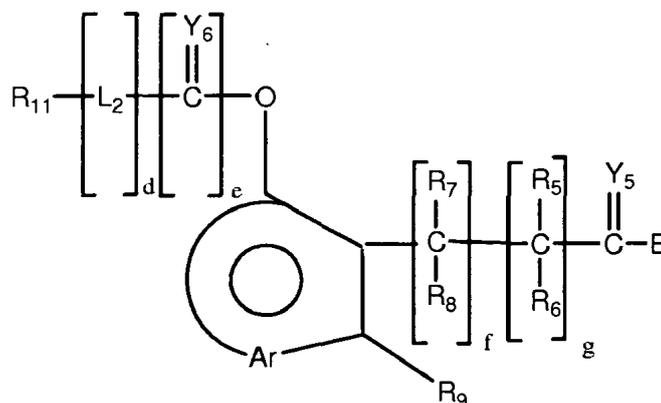
Otros conjugados adicionales preparados según la presente invención incluyen:



20

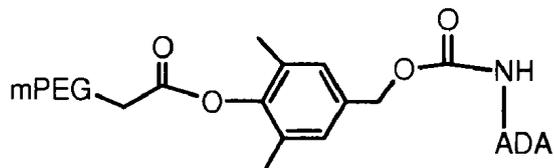
donde todas las variables son iguales a como se ha establecido anteriormente y B es ADA.

Otros conjugados adicionales incluyen:



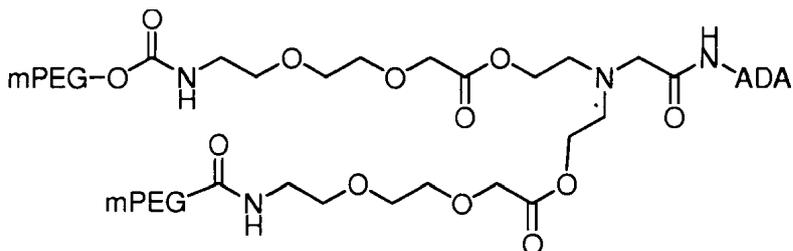
donde B es ADA.

Un conjugado particularmente preferido es:



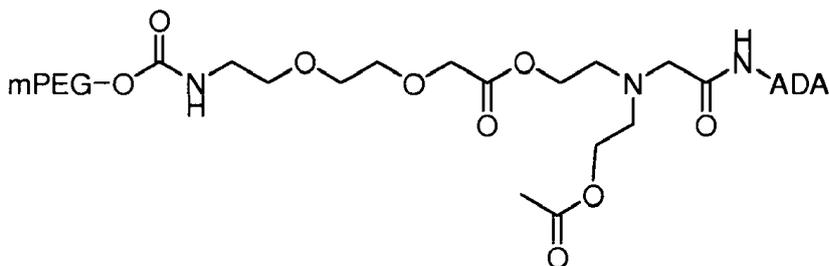
donde el peso molecular del mPEG es de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 45.000.

Cuando se usan los sistemas poliméricos basados en bicina, dos conjugados preferidos son:



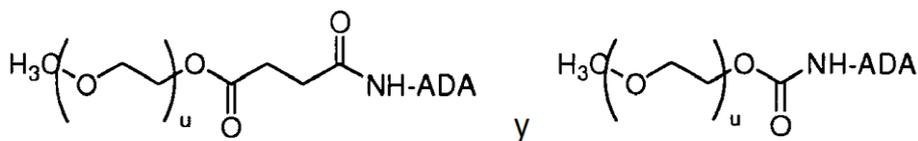
5

y



donde los pesos moleculares del mPEG son igual que antes.

Los conjugados más preferidos incluyen



10

Cabe destacar que la PEGilación de ADA se optimizará empíricamente respecto al total de uniones de PEG por proteína, el tamaño de polímero PEG y el diseño del ligando de PEG. Las características clave del ADA PEGilado para evaluación de la optimización de la PEGilación incluyen ensayos tanto *in vitro* (p.ej., actividad y estabilidad enzimática) como *in vivo* (p.ej., farmacocinéticos y farmacodinámicos).

### 15 c. Tumores a tratar

Los métodos inventivos son aplicables al tratamiento de todo tipo de tumores, incluyendo cánceres, que sean susceptibles a una reducción de los niveles de adenosina o desoxiadenosina en sangre y/o tejidos de un humano o animal en tratamiento. De forma general, éstos incluyen tumores de la sangre al igual que tumores sólidos. Entre los tumores sólidos se incluyen aquellos que se ven suprimidos cuando una reducción de los niveles de adenosina permiten al sistema inmune del paciente suprimir de forma más efectiva el tumor y/o tumores que son suprimidos cuando los niveles reducidos de adenosina inhiben el suministro sanguíneo, p.ej., en tumores ya hipóxicos.

20

Más preferiblemente, los tumores susceptibles al tratamiento mediante los métodos de la invención son tumores sólidos, que se benefician del efecto adicional de una reducción en la estimulación angiogénica, que acompaña a una reducción en los niveles de adenosina en tejidos.

Los tumores a tratar incluyen, simplemente a modo de ejemplo, aquellos que se originan en el sistema inmune, el sistema esquelético, los músculos y el corazón, la mama, el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central y periférico, el sistema renal, el sistema reproductivo, el sistema respiratorio, la piel, los sistemas de tejidos conectivos, incluyendo articulaciones, los tejidos grasos, el sistema circulatorio, que incluye las paredes de los vasos sanguíneos, y similares.

25

Los tumores del sistema esquelético incluyen, p.ej., tanto sarcomas como blastomas tales como osteosarcoma, condrosarcoma, condroblastoma, etc. Los tumores musculares y del corazón incluyen tumores de músculos tanto esqueléticos como lisos, p.ej., leiomiomas (tumores benignos de músculo liso), leiomiosarcomas, rabdomiomas (tumores benignos de músculo esquelético), rabdomiosarcomas, sarcoma cardíaco, etc. Los tumores del tracto gastrointestinal incluyen, p.ej., tumores de la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el colon y tumores colorrectales, así como tumores de órganos secretores gastrointestinales tales como las glándulas salivales, el hígado, el páncreas, el tracto biliar, y similares.

Los tumores del sistema nervioso central incluyen tumores de cerebro, retina y espina dorsal, y también se pueden originar en tejidos conectivos asociados, huesos, vasos sanguíneos o tejido nervioso. También se contempla el tratamiento de tumores del sistema nervioso periférico. Adicionalmente, los tumores del sistema nervioso periférico incluyen tumores malignos de vaina de nervios periféricos.

Los tumores del sistema renal incluyen los del riñón, p.ej., carcinoma de célula renal, así como tumores de los uréteres y la vejiga. Los tumores del sistema reproductivo incluyen tumores de cuello de útero, útero, ovario, próstata, testículos y glándulas secretoras relacionadas. Los tumores del sistema inmune incluyen tanto tumores relacionados con la sangre como tumores sólidos, que incluyen linfomas, p.ej., tanto de Hodgkin como no de Hodgkin.

Los tumores del sistema respiratorio incluyen tumores de los conductos nasales, bronquios y pulmones. Los tumores de mama incluyen, p.ej., carcinoma tanto lobular como ductal.

Los tipos particularmente comunes de tumores malignos a tratar incluyen, simplemente a modo de ejemplo: cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer endometrial, cáncer de ovario, melanoma cutáneo, linfomas, linfoma no de Hodgkin, cáncer pancreático, neuroblastoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma (que surge del músculo), retinoblastoma, osteosarcoma y sarcoma de Ewing, por nombrar unos pocos.

#### D. Selección de dosis

El especialista apreciará que, en un experimento clínico, la dosis de Adagen<sup>®</sup> se individualiza dependiendo de la respuesta clínica del tumor y del perfil de efectos secundarios de un paciente individual, tanto animal como humano. En el estudio de ejemplo proporcionado a continuación en la presente memoria, la dosis más alta es la dosis posible máxima que es tolerada. Adagen<sup>®</sup> se suministra comercialmente con una concentración de 250 U/mL. Esto se traduce a 2000 U/kg para un ratón de aproximadamente 25 g inyectado con 0,2 mL de Adagen<sup>®</sup>. La dosis más baja empleada en los estudios de los ejemplos proporcionados a continuación en la presente memoria se aproxima a la dosis clínica para humanos. El calendario de dosis recomendado para tratar humanos con SCID es de 10 U/kg para la primera dosis, 15 U/kg para la segunda dosis y 20 U/kg para la tercera dosis. Se permiten incrementos adicionales de 5 U/kg/semana, hasta una dosis individual máxima de 30 U/kg. La dosis del protocolo del ejemplo mostrado más adelante (100 U/kg) es la dosis equivalente en ratones a una dosis clínica infantil de aproximadamente 12 U/kg.

La dosis en base a la cantidad de enzima oscilará, por ejemplo, entre aproximadamente 0,10 U/kg y aproximadamente 30 U/kg, o más, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 U/kg y aproximadamente 20 U/kg, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 U/kg y hasta 12 U/kg (esto es, por kg de peso corporal del paciente) tal como entre aproximadamente 0,5 U/kg y aproximadamente 5 U/kg. La dosis semanal total puede ser de hasta 40 U/kg, o más, según lo tolere el receptor. Se permiten incrementos adicionales de 5 U/kg/semana, hasta una dosis individual máxima de 30 U/kg, o más, según lo tolere el receptor. En general, después de inyecciones semanales de ADAGEN<sup>®</sup> a 15 U/kg, el nivel medio mínimo de actividad de ADA en plasma está entre 20 y 25  $\mu\text{mol/h/mL}$ .

Por supuesto, el especialista apreciará que la dosis de ADA conjugada a polímero también puede ajustarse para un tamaño de polímero, química de ligando y valencia particulares. Por ejemplo, el régimen de dosificación para un conjugado de polímero que comprende dos o cuatro enzimas ADA por polímero se ajustará según las unidades de ADA por mL de disolución de cualquier conjugado polimérico de ADA particular.

Al proporcionar la ADA o el conjugado de ADA y PEG por inyección, el intervalo de dosis óptimo se puede ajustar monitorizando los niveles de adenosina en plasma. Generalmente es deseable proporcionar al receptor una dosis que mantenga la actividad de ADA en plasma (niveles mínimos) en el intervalo de entre aproximadamente 10 y 100  $\mu\text{mol/h/mL}$ , preferiblemente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35  $\mu\text{mol/h/mL}$  (ensayado a 37°C); y que demuestre un descenso de adenosina de eritrocitos, es decir, dATP a  $\leq$  de aproximadamente 0,001- 0,057  $\mu\text{mol/mL}$ , preferiblemente aproximadamente 0,005- aproximadamente 0,015  $\mu\text{mol/mL}$  en eritrocitos empaquetados, o  $\leq$  de aproximadamente 1% del contenido total de adenosina de eritrocito (es decir, contenido de ATP + dATP), con un nivel normal de adenosina, medido en una muestra pre-inyección. El valor normal de dATP es por debajo de aproximadamente 0,001  $\mu\text{mol/mL}$ .

Los detalles sobre la información de dosis de ADA se describen en el prospecto de prescripción del ADAGEN<sup>®</sup> (Enzon, Inc.).

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos sirven para proporcionar una apreciación adicional de la invención.

**Ejemplo 1****EFICACIA ANTITUMORAL DE ADAGEN® EN EL MODELO DE XENOINJERTO DE TUMOR DE PRÓSTATA HUMANO DU145**

5

**A) SISTEMA DE ENSAYO**

<u>Especie:</u>	Ratón, <i>Mus musculus</i>
<u>Cepa:</u>	Nude atímico
<u>Suministrador:</u>	Harlan-Sprague Dawley
<u>Sexo:</u>	Hembras
<u>Peso inicial medio:</u>	27,2 g
<u>Nº en estudio:</u>	40
<u>Periodo de aclimatación:</u>	7 días tras la llevada
<u>Identificación:</u>	Número de jaula y punción en la oreja

**B) MÉTODOS**Diseño de experimentos:

- 10 Se obtuvieron células de cáncer de próstata humana DU 145 del "American Type Culture Collection" (ATCC), Manassas, VA. Se establecieron tumores en ratones nude mediante inyección subcutánea de  $2,0 \times 10^6$  DU 145 células/ratón en el costado axilar derecho. Se monitorizó el crecimiento tumoral dos veces por semana y se midió una vez que era palpable. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de  $78 \text{ mm}^3$ , se dividieron los ratones en grupos experimentales (8/grupo). Los ratones fueron tratados con Adagen® a una concentración de 2000, 500 ó
- 15 100 IU/kg dos veces por semana durante 5 semanas. Como control positivo, los ratones recibieron Avastin® (Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF) a una concentración de 5 mg/kg de dosis con la misma frecuencia que el Adagen®. Los grupos experimentales se fijaron como se muestra en la Tabla 1, presentada a continuación. El primer día de dosificación se designó como Día 1. Se determinó el volumen de tumor para cada
- 20 ratón midiendo dos dimensiones con calibres y se calculó usando la fórmula: volumen de tumor =  $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$ . Se midió el peso del ratón y el tamaño del tumor al inicio del estudio y dos veces por semana a lo largo del periodo de 8 semanas.

**Tabla 1**

Grupo nº	Grupo	nº de animales (n)	Dosis (IU/kg)	Ruta de inyección	Calendario de dosis
1	Referencia	8	disolución salina	i.p.	Dos veces por semana x 5
2	Adagen®	8	2000	i.p.	Dos veces por semana x 5
3	Adagen®	8	500	i.p.	Dos veces por semana x 5
4	Adagen®	8	100	i.p.	Dos veces por semana x 5
5	Avastin®	8	5 mg/kg	i.p.	Dos veces por semana x 5

Selección de dosis:

- 25 Se administró Adagen® o Avastin® por ruta intraperitoneal ("i.p.") dos veces por semana durante cinco semanas (total: 10 dosis).

Adagen®: Número de lote: NV0604, Concentración: 229 IU/mL  
 Avastin®: Número de lote: M66781, Concentración: 25 mg/mL

Los cálculos de dosis se hicieron en base al peso corporal determinado el día 1.

Exámenes clínicos:

5 Los ratones fueron examinados visualmente al llegar. Después de ello, los ratones fueron examinados individualmente dos veces por semana después de una palpación inicial del tumor, para determinar signos clínicos, cambios generales de comportamiento, y se monitorizó el peso corporal. Se registraron todas las muertes y signos clínicos. No se monitorizó el consumo de comida y agua. Los ratones que portaban tumores que mostraron lesiones necróticas abiertas fueron sacrificados. Los ratones que perdieron más del 20% de peso corporal también fueron sacrificados con humanidad.

Análisis estadístico:

10 Las diferencias en % de cambio de volumen tumoral entre los diversos tratamientos se compararon usando análisis de varianza de un sentido. Todas las comparaciones múltiples por pares se realizaron usando el método de Holm-Sidak.

**C) RESULTADOS**

Definiciones de los términos usados:

- 15 (a) % de volumen de tumor inicial:  $(\text{Volumen tumoral a un día dado} / \text{Volumen tumoral en el Día 1}) \times 100$   
 (b) % de cambio de volumen tumoral:  $[(\text{Volumen tumoral a un día dado} - \text{Volumen tumoral en el Día 1}) / \text{Volumen tumoral en el Día 1}] \times 100$   
 (c) % de Inhibición de crecimiento tumoral (TGI):  $[(\text{Volumen tumoral medio de grupo de control} - \text{Volumen tumoral medio de grupo de tratamiento}) / \text{Volumen tumoral medio de grupo de control}] \times 100$   
 20 (d) La regresión del tumor se define como un volumen tumoral negativo en comparación con el día 1  
 (e) La cura se define como la ausencia completa de tumor según se puede observar con el ojo humano directamente.

25 El tamaño tumoral medio al inicio del estudio fue de 78 mm<sup>3</sup>. El peso corporal medio al inicio del estudio fue de 27,20 g. Los ratones de todos los grupos ganaron peso y al final del estudio los pesos de los ratones de los diversos grupos aumentaron en entre un 20 y un 25% de su peso de pretratamiento. El estudio finalizó el día 57, cuando la mayoría de los animales tenía tumores ulcerados o presentaba un volumen tumoral de más de 1500 mm<sup>3</sup>.

30 Las Tablas 2 y 3, presentadas a continuación, resumen los resultados finales observados en el día 49 del estudio (último día con un 100% de supervivencia de los animales de control), y proporcionan una comparación de supervivencia de grupo entre los animales tratados con Adagen<sup>®</sup> y los animales tratados con Avastin<sup>®</sup>. Los tumores del grupo de control crecieron sostenidamente durante el estudio. En el día 49, el tamaño de volumen tumoral medio fue de 783,1 (± 556,2) mm<sup>3</sup>. El cambio porcentual en el crecimiento tumoral fue de 833,3 % (± 622,7). El tratamiento con Adagen<sup>®</sup> a los tres niveles de dosis fue efectivo para inhibir el crecimiento tumoral. Cabe destacar que para todos los grupos de tratamiento, los tumores crecieron a un ritmo lento hasta el último día de dosificación (día 33), tras lo cual los tumores presentaron una tasa de crecimiento más rápida (datos no mostrados). Consistente con esta observación es el hecho de que el % de cambio del volumen tumoral de los tres niveles de dosis de Adagen<sup>®</sup> era significativamente diferente de aquel del grupo de control hasta el día 36 (P<0,05) (datos no mostrados).

40 Esto sugiere que el Adagen<sup>®</sup> tiene un efecto citostático sobre el crecimiento tumoral. Aunque el % de cambio de volumen tumoral no fue estadísticamente diferente de los controles tras el día 36 y hasta el final del estudio, el tratamiento con Adagen<sup>®</sup> dio como resultado una inhibición detectable del crecimiento tumoral. En particular, los tumores tratados con 2000 IU/kg de Adagen<sup>®</sup> presentaron un volumen tumoral medio de 343,0 (±249,8) mm<sup>3</sup> en el día 49. El cambio porcentual en el volumen tumoral fue de 424,2 % (±360,6). El Adagen<sup>®</sup> a una concentración de 2000 IU/kg demostró una inhibición de crecimiento tumoral del 56%.

45 Los tumores tratados con 500 IU/kg de Adagen<sup>®</sup> presentaron un volumen tumoral medio de 696,3 (±290,4) mm<sup>3</sup> en el día 49. El cambio porcentual en el volumen tumoral fue de 797,6% (±492,7), y el cambio respecto al tumor inicial fue de 897,6% (±492,7). La inhibición de crecimiento tumoral fue de 11,1%. Los tumores de este grupo presentaron tasas de crecimiento tumoral similares a las de los otros grupos tratados con Adagen<sup>®</sup> hasta el día 40 tras lo cual crecieron a un ritmo mucho más rápido. La razón para esta discrepancia se desconoce.

50 Los tumores tratados con 100 IU/kg de Adagen<sup>®</sup> presentaron un volumen tumoral medio de 414,8 (±219,0) mm<sup>3</sup> en el día 49. El cambio porcentual en el volumen tumoral fue de 489,9% (±307,0), y el cambio porcentual medio respecto al tumor inicial fue de 589,9% (±307,0). La inhibición del crecimiento tumoral o TGI (del inglés "Tumor growth inhibition") fue del 47,0%.

## ES 2 507 508 T3

El efecto terapéutico del Adagen® alcanzó un efecto máximo con la menor dosis, de 100 IU/kg. Cabe destacar que la dosis de 100 IU/kg se aproxima a la dosis clínica humana de Adagen® (dosis usada para tratar niños de SCID). El Avastin® demostró la disminución de tamaño tumoral más efectiva con una inhibición de crecimiento tumoral o TGI de 92,5%.

En conclusión, el tratamiento con Adagen® a los tres niveles de dosis fue efectivo para inhibir el crecimiento de tumores DU 145 *in vivo*.

Tabla 2: Resumen final (Día 49)

Grupo n°	Compuesto	Medias de Volumen Tumoral Final	Medianas de Volumen Tumoral Final	% de Cambio de Volumen Tumoral	% de Volumen Tumoral Inicial	% de Volumen Tumoral Inicial	n° de Regresiones	n° Curados	% de Supervivencia
1	disolución salina	783,1 (556,2)	680,0	833,3 (622,7)	933,3 (622,7)	-	0	0	62,5
2	Adagen (2000 IU/kg)	343,0 (249,8)	283,8	424,2 (360,6)	524,2 (360,6)	56,2	0	0	75,0
3	Adagen (500 IU/kg)	696,3 (290,4)	766,2	797,6 (492,7)	897,6 (492,7)	11,1	0	0	75,0
4	Adagen (100 IU/kg)	414,8 (219,0)	349,8	489,9 (307,0)	589,9 (307,0)	47,0	0	0	75,0
5	Avastin (5 mg/kg)	58,5 (36,1)	49,3	-15,7 (59,6)	84,3 (59,6)	92,5	7/8	0	87,5

Los datos de n° de regresión, n° de curados y % de supervivencia corresponden al día 56.  
Los datos de medias, medianas, % de cambio de volumen tumoral, % de volumen tumoral inicial y % de inhibición de crecimiento tumoral corresponden al día 49.

Tabla 3: Comparación de Supervivencia de Grupo (nº de Animales Vivos)

Grupo	1	5	8	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	49	51	55	57
1: Disolución salina	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	5 <sup>á</sup>	5	5	5
2: Adagen (2000 U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 <sup>é</sup>	7	6 <sup>ñ</sup>	6	6	6
3: Adagen (500 U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 <sup>é</sup>	7	6 <sup>ñ</sup>	6	5 <sup>í</sup>	5
4: Adagen (100 U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6 <sup>ó</sup>	6	6	6	5 <sup>í</sup>	5
5: Avastin (5 mp/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 <sup>ñ</sup>	7	7	7

<sup>á</sup> Se sacrificaron dos animales debido a que presentaron tamaños de tumor superiores a 1500 mm<sup>3</sup>. Se sacrificó un animal debido a un tumor ulcerado.

<sup>é</sup> Animal sacrificado debido a un tumor ulcerado en el día 40.

<sup>ñ</sup> Animal sacrificado debido a un tumor ulcerado en el día 49.

<sup>í</sup> Animal sacrificado debido a un tumor ulcerado en el día 55.

<sup>ó</sup> Se sacrificaron dos animales debido a tumores ulcerados en el día 49.

## Ejemplo 2

### EFICACIA ANTITUMORAL DE ADAGEN® EN EL MODELO DE XENOINJERTO DE TUMOR DE OVARIO HUMANO SK-OV-3

5

#### A) SISTEMA DE ENSAYO

<u>Especie:</u>	Ratones, Mus musculus
<u>Cepa:</u>	Nude atímico
<u>Suministrador:</u>	Harlan-Sprague Dawley
<u>Sexo:</u>	Hembras
<u>Peso inicial medio:</u>	22,18 g
<u>Nº en estudio:</u>	54
<u>Periodo de aclimatación:</u>	7 días tras la llevada

#### B) MÉTODOS

##### Diseño de experimentos:

- 10 Se establecieron tumores de adenocarcinoma de ovario humano SK-OV-3 en ratones nude mediante inyección subcutánea de  $3 \times 10^6$  células/ratón en el costado axilar derecho. Se monitorizó el crecimiento tumoral dos veces por semana y se midió una vez que era palpable. Se determinó el volumen de tumor para cada ratón midiendo dos dimensiones con calibres y se calculó usando la fórmula: volumen de tumor = (longitud x anchura<sup>2</sup>)/2). Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 90 mm<sup>3</sup>, se dividieron los ratones en grupos experimentales (9/grupo). Los
- 15 grupos experimentales se fijaron como se muestra en la tabla presentada a continuación. El primer día de dosificación se designó como Día 1. Se midió el peso del ratón y el tamaño del tumor al inicio del estudio y dos veces por semana hasta la finalización del estudio. El estudio finalizó tras aproximadamente 7 semanas (52 días), cuando la mayoría de los animales presentaron masas tumorales grandes o ulceradas.

Tabla 4

Grupo nº	Grupo	nº de ratones (n)	Dosis (U/kg)	Ruta de inyección	Calendario de dosis
1	Referencia	9	disolución salina	i.p	Dos veces por semana x 5
2	Adagen®	9	2000	i.p	Dos veces por semana x 5
3	Adagen®	9	500	i.p	Dos veces por semana x 5
4	Adagen®	9	100	i.p	Dos veces por semana x 5
5	Avastin®	9	100 ug/ratón	i.p	Dos veces por semana x 5
6	ADA nativa	<u>9</u>	2000	i.p.	Dos veces por semana x 5

Régimen de dosis:

5 Se administró Adagen®, Avastin® o ADA nativa intravenosamente dos veces por semana durante cinco semanas (total: 10 dosis).

Artículos de ensayo:

Adagen®: Número de lote: NV0604, Concentración: 229 IU/mL

Avastin®: Número de lote: M66781, Concentración: 25 mg/mL

ADA nativa: Número de lote: 06-0315-111

10 Cálculo de dosis:

En base al peso corporal medido el día 1.

Exámenes clínicos:

15 Los ratones fueron examinados visualmente al llegar. Después de ello, los ratones fueron examinados individualmente dos veces por semana después de una palpación inicial del tumor, para determinar signos clínicos, cambios generales de comportamiento, y se monitorizó el peso corporal. Se registraron todas las muertes y signos clínicos. No se monitorizó el consumo de comida y agua. Los ratones que portaban tumores que mostraron lesiones necróticas abiertas fueron sacrificados. Los ratones que perdieron más del 20% de peso corporal también fueron sacrificados con humanidad.

Análisis estadístico:

20 Las diferencias en % de cambio de volumen tumoral entre los diversos tratamientos se compararon usando análisis de varianza de un sentido. Todas las comparaciones múltiples por pares se realizaron usando el método de Tukey-Kramer.

**C) RESULTADOS**Definiciones de los términos usados:

- 25 (a) % de volumen de tumor inicial:  $(\text{Volumen tumoral a un día dado} / \text{Volumen tumoral en el Día 1}) \times 100$   
 (b) % de cambio de volumen tumoral:  $[(\text{Volumen tumoral a un día dado} - \text{Volumen tumoral en el Día 1}) / \text{Volumen tumoral en el Día 1}] \times 100$   
 (c) % de Inhibición de crecimiento tumoral (TGI):  $[(\text{Volumen tumoral medio de grupo de control} - \text{Volumen tumoral medio de grupo de tratamiento}) / \text{Volumen tumoral medio de grupo de control}] \times 100$   
 30 (d) La regresión del tumor se define como un volumen tumoral negativo en comparación con el día 1  
 (e) La cura se define como la ausencia completa de tumor según se puede observar con el ojo humano directamente.

35 El tamaño tumoral medio al inicio del estudio fue de  $90 \text{ mm}^3$ . El peso corporal medio al inicio del estudio fue de 22,2 g. El peso corporal medio de todos los grupos no varió significativamente a lo largo del estudio. El estudio finalizó en el día 52. Se sacrificaron cuatro de los ratones debido a que sus tumores crecieron por encima de  $1500 \text{ mm}^3$ .

La Tabla 5, presentada a continuación, proporciona el resumen final de resultados correspondiente al día 32 (último día de supervivencia del 66% de los animales de control). Los tumores del grupo de control crecieron sostenidamente durante el estudio. En el día 32, el tamaño de volumen tumoral medio fue de  $754,9 (\pm 700,7) \text{ mm}^3$ . El cambio porcentual en el crecimiento tumoral fue de  $693,2 \% (\pm 673,6) \text{ mm}^3$ .

Tabla 5: Resumen final (Día 32)

Grupo nº	Compuesto	Medias de Volumen Tumoral Final	Medianas de Volumen Tumoral Final	% de Cambio de Volumen Tumoral	% de Volumen Tumoral Inicial	% de Volumen Tumoral Inicial	nº de Regresiones	nº Curados	% de Supervivencia
1	disolución salina	754,9 (700,7)	485,5	693,2 (673,6)	793,2 (673,6)	-	0	0	66
2	Adagen® (2000 IU/kg)	437,7 (122,2)	446,4	402,1 (177,7)	502,1 (177,7)	42,0	0	0	100
3	Adagen® (500 IU/kg)	471,1 (60,0)	465,8	421,3 (102,2)	521,3 (102,2)	37,6	0	0	89
4	Adagen® (100 IU/kg)	497,7 (152,6)	478,9	450,7 (172,7)	550,7 (172,7)	34,1	0	0	100
5	Avastin® (5 mg/kg)	210,2 (65,9)	198,6	161,6 (88,3)	261,6 (88,3)	72,2	0	0	100
6	ADA nativa (2000 IU/kg)	356,6 (213,0)	329,7	340,1 (239,1)	440,1 (239,1)	52,8	0	0	77

Los tumores tratados con 2000 IU/kg de Adagen® presentaron un volumen tumoral medio de 437,7 ( $\pm 122,2$ ) mm<sup>3</sup> en el día 32. El cambio porcentual en el volumen tumoral fue de 402,1 % ( $\pm 177,7$ ). El Adagen® a una concentración de 2000 IU/kg demostró una inhibición de crecimiento tumoral del 42%.

5 Los tumores tratados con 500 IU/kg de Adagen® presentaron un volumen tumoral medio de 471,1 ( $\pm 60,0$ ) mm<sup>3</sup> en el día 32. El cambio porcentual en el volumen tumoral fue de 421,3% ( $\pm 102,2$ ), y el cambio respecto al tumor inicial fue de 521,3% ( $\pm 102,2$ ). La inhibición de crecimiento tumoral fue de 37,6%.

Los tumores tratados con 100 IU/kg de Adagen® presentaron un volumen tumoral medio de 497,7 ( $\pm 152,6$ ) mm<sup>3</sup> en el día 32. El cambio porcentual en el volumen tumoral fue de 450,7% ( $\pm 172,7$ ), y el cambio porcentual medio respecto al tumor inicial fue de 550,7% ( $\pm 172,7$ ). La inhibición de crecimiento tumoral fue de 34,1%.

10 Los tumores tratados con 2000 IU/kg de ADA nativa presentaron un volumen tumoral medio de 356,6 (213,0) mm<sup>3</sup> en el día de estudio 32. El cambio porcentual en el volumen tumoral fue de 340,1% ( $\pm 210,0$ ), y el cambio porcentual medio respecto al tumor inicial fue de 440,1% (239,1). La inhibición de crecimiento tumoral fue de 52,8%.

El tratamiento con Adagen a cualquier nivel de dosis fue conmensurado con los resultados de los controles. Sin embargo, el Adagen a todos los niveles de dosis produjo un TGI como se ha indicado anteriormente.

15 El efecto terapéutico del Adagen® alcanzó un efecto máximo con la menor dosis, de 100 IU/kg. Cabe destacar que la dosis de 100 IU/kg se aproxima a la dosis clínica humana de Adagen® (dosis usada para tratar niños de SCID). El Avastin®, actuando como control positivo en este estudio, demostró la disminución de tamaño tumoral más efectiva con una TGI de 72%.

20 En conclusión, el tratamiento con Adagen® a las concentraciones de 100, 500 ó 2000 IU/kg dio como resultado una inhibición de crecimiento tumoral que osciló entre 34 y 42%.

Las enzimas ADA recombinantes alternativas para los métodos de la invención se describen como se indica a continuación.

### Ejemplo 3

#### 25 **CONSTRUCCIÓN DE CEPA DE EXPRESIÓN DE *E. COLI* QUE EXPRESA ADA HUMANA RECOMBINANTE CON UN CAMBIO DE CYS POR SER EN LA POSICIÓN 74 DE LA PROTEÍNA MADURA**

La secuencia de 363 aminoácidos reportada para la adenosina desaminasa humana (GenBank NP\_000013, incorporada a la presente memoria a modo de referencia) fue analizada para determinar la presencia de codones de cisteína. Cinco posiciones del polipéptido maduro (la Met N-terminal es separada) codifican cisteína (C74, C152, C153, C168, C261). En el gen diseñado y modificado que expresa ADA humana, solo se cambió uno de estos cinco codones de cisteína (Cisteína 74, TGC) a un codón de serina (TCC) (esta es la posición 75 de la proteína no traducida). La secuencia de polipéptido definida (véase la SEQ ID NO: 3) fue proporcionada a Blue Heron Corporation (Bothell, Washington, EE.UU.) para la síntesis génica completa de un nuevo gen que tiene codones optimizados para la expresión en *E. coli*, usando síntesis química estándar de segmentos de oligonucleótido solapados. En resumen, la secuencia se optimizó para expresión bacteriana mediante el uso de codón bacteriano estándar para *Escherichia coli* K12, usando los datos de codón descritos por Grantham R. et al.; 1981; "Codon catalogue usage in genome strategy modulated for gene expressivity," Nucleic Acid Res. 9: r43-r47, y de Lathe, R. 1985; "Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data, Theoretical and practical considerations." J. Mol Biol; 183: 1-12.

40 A continuación se analizó la correspondiente secuencia de ARN para la formación de estructura de horquilla o la formación de lazo y se sometió a cálculos de energía libre mínima. Los sitios de restricción flanqueantes, *NdeI* y *BamHI* se incluyeron en los extremos del gen. Tras digestión del ADN sintético con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, el gen de 1,1 kilobases fue ligado vía T4 ADN ligasa en el vector plásmido pET-28a (Novagen Corporation), que también había sido digerido con estas dos enzimas. Se introdujo el plásmido recombinante en la cepa de *E. coli* BLR (DE3) o HMS174 (DE3) por electroporación usando BTX Electro Cell Manipulator 600 según las instrucciones del fabricante. La mezcla de transformación se llevó a placa sobre placas de agar LB que contenían canamicina (15 µg/mL) con el objetivo de permitir la selección de colonias que contuvieran el plásmido pET-28a/ADAcysSer (designado ADAc75s/pET28a: BLR(DE3) o ADAc75s/pET28a:HMS174(DE3)). La secuencia de nucleótido de gen variante de ADA fue verificada mediante análisis de secuencia de ADN con un ABI Prism 310 Genetic Analyzer usando los Terminadores Big Dye. La secuencia de ADN que codifica el marco de lectura abierto de Ser<sub>74</sub>-rhADA sigue la SEQ ID NO: 4.

Las colonias aisladas fueron purificadas adicionalmente mediante colocación en placa y se analizaron para determinar la expresión génica inducible por IPTG en medio LB mediante métodos estándar tales como los descritos en "Novagen pET System Manual Ninth Edition", incorporado a la presente memoria a modo de referencia.

55 Se examinaron varios parámetros de inducción, que incluían tiempo, temperatura y concentración de inductor. Una condición preferida fue la inducción con IPTG 50 µM durante 12 h a 25 °C, que permitió una producción de nivel

elevado de ADA dentro del citoplasma de las bacterias hospedantes a aproximadamente un 20% de proteína celular total. Con el análisis de SDS PAGE se confirmó que la proteína ADA expresada exhibía el peso molecular correcto de aproximadamente 40 kDa (datos no mostrados).

#### Ejemplo 4

##### 5 **CONSTRUCCIÓN DE CEPA DE EXPRESIÓN DE *E. COLI* QUE EXPRESA ADA BOVINA RECOMBINANTE CON UN CAMBIO DE CYS POR SER EN LA POSICIÓN 74 DE LA PROTEÍNA MADURA**

La proteína ADA madura purificada derivada de preparaciones intestinales bovinas es una proteína de 356 aminoácidos que carece de la metionina N-terminal y que también carece de los seis residuos C-terminales predichos a partir de la secuencia de ADNc (GenBank NP\_776312, incorporada a la presente memoria a modo de referencia). La secuencia de aminoácidos de ADA bovina se analizó para determinar la presencia de codones de cisteína. Cinco posiciones del polipéptido maduro codifican cisteína (C74, C152, C153, C168, C261). En el gen sintético de ADA bovina diseñado y modificado, solo una de estas cinco posiciones de cisteína (la cisteína 74) fue cambiada a un residuo de serina. Esto se llevó a cabo insertando un codón de serina (TCC) en lugar del codón de cisteína normal en la posición 74 del polipéptido maduro (o en la posición 75 del producto de traducción). El gen también fue optimizado en relación a codón para la expresión en *E. coli*.

Resumidamente, la secuencia de polipéptido definida (véase la SEQ ID NO: 1) fue proporcionada por BioCatalytics Inc. para la síntesis génica completa de un nuevo gen que tiene codones optimizados para la expresión en *E. coli*, usando sus métodos que incluyen la síntesis química de segmentos de oligonucleótidos solapados. Los métodos de BioCatalytics se describen con mayor detalle en la Patente de EE.UU. nº 6.366.860, cuyo contenido se incorporan a la presente memoria a modo de referencia en su plenitud.

Se investigó la expresión de ADA bovina en varios sistemas de expresión. Por ejemplo, los sitios de restricción flanqueantes, *NdeI* y *BamHI* se incluyeron en los extremos del gen. Tras digestión del ADN sintético con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, el gen de 1,1 kilobases fue ligado vía T4 ADN ligasa en el vector plásmido pET-9d (Novagen Corporation), que también había sido digerido con estas dos enzimas. Se introdujo el plásmido recombinante en la cepa de *E. coli* BLR (DE3) o HMS174 (DE3) por electroporación usando BTX Electro Cell Manipulator 600 según las instrucciones del fabricante. La mezcla de transformación se llevó a placa sobre placas de agar LB que contenían canamicina (15 µg/mL) con el objetivo de permitir la selección de colonias que contuvieran el plásmido pET-9d/bADA (designado bADA/pET9d: BLR(DE3) o bADA/pET9d:HMS174(DE3)). La secuencia de nucleótido de gen variante de ADA fue verificada mediante análisis de secuencia de ADN con un ABI Prism 310 Genetic Analyzer usando los Terminadores Big Dye. El marco de lectura abierto del ADN se muestra en la SEQ ID NO: 2.-

Las colonias aisladas fueron purificadas adicionalmente mediante colocación en placa y se analizaron para determinar la expresión génica inducible por IPTG en medio LB mediante métodos estándar tales como los descritos en "Novagen pET System Manual Ninth Edition". Se examinaron varios parámetros de inducción, que incluían tiempo, temperatura y concentración de inductor. Una condición preferida fue la inducción con un 0,3 % de lactosa durante 12 h a 37 °C, que permitió una producción de nivel elevado de ADA dentro del citoplasma de las bacterias hospedantes a aproximadamente un 20% de proteína celular total. Mediante análisis de SDS-PAGE se confirmó que el producto ADA exhibía el peso molecular correcto de aproximadamente 40 kDa.

#### Ejemplo 5

##### 40 **PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA ADA MUTEÍNA HUMANA RECOMBINANTE**

La purificación de rhADA se llevó a cabo en un protocolo cromatográfico 3 desarrollado por Enzon. Se realizó una fermentación bacteriana para que la *E. coli* expresara la proteína rhADA a partir de un gen sintético sobre el plásmido pET28a (Novagen) en la célula hospedante HMS174(DE3). Se incluyó rifampicina (200 µg/mL) y canamicina (30 µg/mL) en un medio mínimo de glicerol suplementado con extracto de levadura (30 g/L) y las células fueron cultivadas a 28°C hasta una DO<sub>600</sub> de 11, cuando se añadió el IPTG inductor a una concentración final de 5 mM. Tras 40 horas (DO<sub>600</sub> ~ 110), las células fueron recolectadas mediante centrifugación y congeladas a -20 °C. Resumidamente, la pasta celular congelada (50 g) fue re-suspendida en 1800 mL de tampón de Tris 10 mM, DTT 1 mM, pH 8,0, y homogeneizada a 1200 RPM durante 10 segundos con Tempest Virtis (Sentry™, Microprocessor, Boston, MA). Dicha suspensión se hizo pasar a través de una malla de acero inoxidable (Apertura micrométrica 250µ, N°60, W.S Tyler) para eliminar las partículas grandes. La suspensión celular homogénea se microfluidizó durante 3 ciclos a 1034 bar (15.000 psi) (la unidad se colocó en un baño de hielo) (Micro Fluidizer, Microfluidics Corp., Modelo nº 110Y, Boston, MA). Al final de la micro fluidización, se usaron 200 mL del mismo tampón anterior para lavar la unidad y dicha disolución se combinó con la anterior suspensión. La proteína soluble procedente de los lisatos celulares fue extraída mediante centrifugación a 16.000 rpm durante 40 minutos a 4° C (Sorvall RC 5C plus, rotor SLA-1000). Se recogió el sobrenadante con cuidado para evitar una mezcla no deseada. El pH se ajustó a 8,0 y se añadió MgCl<sub>2</sub> 1 mM y 20 mg/mL de ADNasa y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces se ajustó el pH a 6,5 con HCl 1 N. Se llevó a cabo una segunda centrifugación con la anterior, se recogió el sobrenadante y se ajustó con EDTA 2 mM, seguido de filtración con Nalgene (unidad de filtro de 90 mm). El volumen

del sobrenadante filtrado fue de 500 mL, la concentración de proteína total mediante el método BCA fue de 8,5 mg/mL.

5 El extracto celular (100 mL) se ajustó a pH 7,2, 4,5 mS/cm y se cargó en una columna HiTrap DEAE ff a una concentración de Bis-Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,5, y se eluyó con Bis-Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 6,5. Se identificaron las fracciones de picos mediante ensayo enzimático y SDS-PAGE y se ajustó a sulfato amónico 1,5 M en NaHPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 6,5, y se cargó en una columna HiTrap Phenyl ff. La proteína se eluyó con un gradiente de tampón de carga y NaHPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 6,5. La fracción máxima (55 mL; 0,4 mg/mL) se diafiltró contra NaHPO<sub>4</sub> 20mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,5, y se cargó en una HiTrap SP-Sepharose ff y se eluyó con NaHPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,5. La fracción recogida contenía proteína ADA purificada (77 mL; 0,1 mg/mL).

### Ejemplo 6

#### PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA ADA BOVINA RECOMBINANTE

15 La purificación de rbADA expresada por el clon del Ejemplo 4 se llevó a cabo en un protocolo cromatográfico 3 desarrollado por Enzon. Resumidamente, una pasta congelada (obtenida de Blue Hereon o Biocatalytics, respectivamente) de 200 g que se almacenó a -80°C, se re-suspendió en 1800 mL de Bis-Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4, y se homogeneizó a 1200 RPM durante 5 minutos con Tempest Virtis (Sentry™, Microprocessor, Boston, MA). Dicha suspensión se hizo pasar a través de una malla de acero inoxidable (Apertura micrométrica 250µ, N°60, W.S Tyler) para eliminar las partículas grandes. La suspensión celular homogénea se microfluidizó durante 3 ciclos a 1034 bar (15.000 psi) (la unidad se colocó en un baño de hielo) (Micro Fluidizer, Microfluidics Corp., Modelo n° 110Y, Boston, MA). Al final de la micro fluidización, se usaron 200 mL del mismo tampón anterior para lavar la unidad y dicha disolución se combinó con la anterior suspensión. La proteína soluble procedente de los lisatos celulares fue extraída mediante centrifugación a 7100 rpm (12000 x g) durante 60 minutos a 4° C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor n° JLA8.1000). Se recogió el sobrenadante con cuidado para evitar una mezcla no deseada.

25 Para eliminar los nucleótidos de este extracto celular, se añadió polietilenimina (PEI) al anterior sobrenadante (concentración final de 0,15%, p/v) y se mezcló intensamente agitando durante 10 minutos. Entonces se dejó dicho extracto celular a 4 °C durante una noche. El precipitado de dicha muestra de una noche fue eliminado mediante centrifugación a 7.100 rpm (12.000 x g), durante 60 minutos a 4° C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor n° JLA8.1000). De forma similar, se recogió el sobrenadante con cuidado para evitar cualquier mezcla no deseada. Para ayudar a que la ADA se uniera a la primera columna, se añadió PEG4600 al 10% a dicho extracto celular lentamente y se ajustó el pH del extracto celular a 6,5 lentamente con NaOH 1 N y HCl 1N. Este sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 7100 rpm (12000 x g), durante 60 minutos a 4° C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor n° JLA8.1000) antes de ser cargado en la siguiente columna.

35 El extracto celular se cargó en una columna Capto Q pre-equilibrada (n° de catálogo 17-5316-01, GE Healthcare, Piscataway, NJ. volumen de lecho 350 mL pre-empaquetado en una columna XK-50) con un tampón de Bis-Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5. Antes de que la ADA fuera eluida de la columna a NaCl 80 mM en el tampón de equilibrio, primero se llevaron a cabo eluciones con NaCl 60 mM y 70 mM para eliminar impurezas. El perfil de elución se analizó mediante actividad ADA, análisis de SDS-PAGE, Western blots y RP-HPLC.

40 Después de la columna Capto Q, se usaron 2 purificaciones cromatográficas de interacción hidrofóbica (HIC), una a una para pulir aún más la pureza de la proteína. La primera HIC fue de Octyl Sepharose 4FF (N° de cat. 17-0946-02, GE Healthcare, Piscataway, NJ). El conjunto de las fracciones de ADA procedentes de la columna Capto Q se ajustó a (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M directamente con polvo de sulfato amónico y el pH se ajustó a 6,5. La muestra filtrada (Nalgene Nunc, n° de cat. 540887, MEMB 0.2 PES, Rochester, NY) se cargó en la 1ª columna HIC que se había pre-equilibrado con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M, fosfato potásico 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5 (volumen de lecho 150 mL, en XK-50, GE Healthcare, Piscataway, NJ). La proteína ADA se eluyó con un gradiente de sulfato amónico y se determinó el perfil de pureza de dicha elución mediante SDS-PAGE y RP-HPLC. La proteína ADA de las fracciones de la primera columna HIC se reunió y se ajustó a (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se cargó directamente en la segunda columna HIC (volumen de lecho 150 mL, XK-50, HIC Phenyl HP, n° de cat. 17-1082-01, Piscataway, NJ) que fue pre-equilibrada con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5. La ADA se eluyó con un gradiente de sulfato amónico desde 1 M hasta 300 mM en el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5. La pureza de ADA de estas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y RP-HPLC. La rbADA o rhADA purificada se desaló adicionalmente y se concentró en un sistema LabScale™ TFF (Membrana BioMax 5, Bedford, MA) contra el tampón de almacenamiento (por ejemplo, fosfato sódico 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5).

### Ejemplo 7

#### PREPARACIÓN DE SER<sub>74</sub>-rbADA PEGILADA VÍA ENLACE DE URETANO

55 Se añade SC-PEG (polietilen glicol activado con carbonato de N-hidroxisuccinimidilo, 0,084 mmol) a una disolución de Ser<sub>74</sub>-rbADA (0,0027 mmol) en 3 mL de tampón de fosfato sódico (0,1 M, pH 7,8) con agitación suave. La disolución se agita a 30 °C durante 30 minutos. Se usa una columna GPC (Zorbax GF-450) para monitorizar la conjugación de PEG. Al final de la reacción (tal como se evidencia por la ausencia de enzima nativa), la mezcla se

diluye con 12 mL de tampón de formulación (fosfato sódico 0,05 M, cloruro sódico al 0,85%, pH 7,3) y se diafiltra con un concentrador Centriprep (Amicon) para eliminar el PEG no reaccionado. Se continua con la diafiltración según sea necesario a 4 °C hasta que no se detecta más PEG libre, mezclando una cantidad igual de filtrado y PMA al 0,1% (ácido polimetacrílico en HCl 0,1 M).

5 **Ejemplo 8**

**PREPARACIÓN DE SER<sub>74</sub>-rhADA PEGILADA VÍA ENLACE DE URETANO**

Se hace reaccionar SC-PEG (0,084 mmol) con Ser<sub>74</sub>-rhADA (0,00027 mmol) usando las mismas condiciones descritas en el Ejemplo 7.

**Ejemplo 9**

10 **PREPARACIÓN DE SER<sub>74</sub>-rbADA PEGILADA VÍA ENLACE DE AMIDA**

Se añade SS-PEG (polietilen glicol activado con succinato de N-hidroxisuccinimidilo, 0,084 mmol) a una disolución de Ser<sub>74</sub>-rbADA (0,00027 mmol) en 3 mL de tampón de fosfato sódico (0,1 M, pH 7,8) con agitación suave. La disolución se agita a 30 °C durante 30 minutos. Se usa una columna GPC (Zorbax GF-450) para monitorizar la conjugación de PEG. Al final de la reacción (tal como se evidencia por la ausencia de enzima nativa), la mezcla se diluye con 12 mL de tampón de formulación (fosfato sódico 0,05 M, cloruro sódico al 0,85%, pH 7,3) y se diafiltra con un concentrador Centriprep (Amicon) para eliminar el PEG no reaccionado. Se continua con la diafiltración según sea necesario a 4 °C hasta que no se detecta más PEG libre, mezclando una cantidad igual de filtrado y PMA al 0,1% (ácido polimetacrílico en HCl 0,1 M).

**Ejemplo 10**

20 **PREPARACIÓN DE rhADA MUTEÍNA PEGILADA VÍA ENLACE DE AMIDA**

Se hace reaccionar SS-PEG (0,084 mmol) con rhADA muteína (0,00027 mmol) usando las mismas condiciones descritas en el Ejemplo 9.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ENZON PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> TERAPIA ENZIMÁTICA ANTICÁNCER
- 5 <130> 27.L8308.12.EP.2W
- <140> Sin asignar todavía
- <141> En fecha uniforme con la presente
- 10 <150> PCT/US08/60733
- <151> 2008-04-18
- <150> US 60/913.039
- 15 <151> 2007-04-20
- <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.1
- 20 <210> 1
- <211> 356
- <212> PRT
- <213> Bovino
- 25 <220>
- <221> características\_misceláneas
- <222> (74)..(74)
- <223> muteína de Cys a Ser
- 30 <400> 1

Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asn Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val His  
 1 5 10 15

Leu Asp Gly Ala Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Lys  
 20 25 30

Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Pro Glu Glu Leu Gln Asn Ile  
 35 40 45

Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Ser Leu Pro Glu Phe Leu Ala Lys Phe  
 50 55 60

Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Ser Arg Glu Ala Val Lys Arg  
 65 70 75 80

Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Asp Gly Val Val Tyr  
 85 90 95

Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val Glu  
 100 105 110

Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu Val  
 115 120 125

Val Ser Leu Val Asn Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe Gly  
 130 135 140

ES 2 507 508 T3

Val Lys Val Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Ser Trp  
 145 150 155 160

Ser Ser Glu Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Glu Gln Thr Val  
 165 170 175

Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Glu Gly Ser Ser Leu  
 180 185 190

Phe Pro Gly His Val Lys Ala Tyr Ala Glu Ala Val Lys Ser Gly Val  
 195 200 205

His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Asn Val Val Lys  
 210 215 220

Glu Ala Val Asp Thr Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr His  
 225 230 235 240

Thr Leu Glu Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn Met  
 245 250 255

His Phe Glu Val Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp Lys  
 260 265 270

Pro Asp Thr Glu His Pro Val Val Arg Phe Lys Asn Asp Gln Val Asn  
 275 280 285

Tyr Ser Leu Asn Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu Asp  
 290 295 300

Thr Asp Tyr Gln Met Thr Lys Asn Glu Met Gly Phe Thr Glu Glu Glu  
 305 310 315 320

Phe Lys Arg Leu Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro Glu  
 325 330 335

Asp Glu Lys Lys Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly Met  
 340 345 350

Pro Ser Pro Ala  
 355

<210> 2  
 <211> 1074  
 <212> ADN  
 <213> Bovino

5

<400> 2  
 atggctcaga ccccggttt caacaaaccg aaggtagaac tgcacgtaca cctggatggt 60  
 gctatcaaac cggagactat cctgtactat ggtcgtaac gtggcatcgc tctgccggct 120  
 gacactccgg aagaactgca gaacatcatc ggcattgaca aaccgctgtc tctgccggaa 180

ES 2 507 508 T3

```

ttcctggcta aattcgacta ctacatgccg gctatcgctg gttctcgtga agcagtcaaa 240
cgtatcgctt acgaattcgt agaaatgaaa gctaaagatg gtgtagtata cgttgaagtt 300
cgttactctc cgcacctgct ggcaaaactct aaagttgaac cgatcccgtg gaaccaggca 360
gaaggcgatc tgactccgga tgaagtagtt tctctgggta accagggctc gcaggagggt 420
gaacgcgatt tcggcgtaaa agttcgttct atcctgtgct gcatgcgcca ccagccgtct 480
tggctcttctg aagttgttga actgtgcaag aaataccgtg agcagaccgt agttgctatc 540
gatctggcag gtgatgaaac catcgaaggt tcttctctgt ttccgggtca cgtaaaggct 600
tatgctgaag ctgttaaadc tggcgtaac cgtactgtac acgcaggtga agttggttct 660
gctaacgttg ttaaagaagc tgttgacacc ctgaaaactg aacgcctggg tcacggctac 720
cacaccctgg aagacaccac cctgtacaac cgtctgcgtc aggaaaacat gcacttcgaa 780
gtttgtccgt ggtcctctta cctgactggg gcttggaaac cggacaccga acacccggtt 840
gttcgtttca aaaacgacca ggtaaaactac tctctgaaca ctgacgatcc gctgatcttc 900
aaatctacc tggacaccga ctaccagatg accaaaaacg aaatgggttt cactgaagaa 960
gaattcaaac gtctgaacat caacgctgct aagtcctctt ttctgccgga agatgagaaa 1020
aaagaactgc tggacctgct gtacaaggca tacgggatgc cgtctccggc ttaa 1074

```

<210> 3  
 <211> 362  
 5 <212> PRT  
 <213> Humano

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 10 <222> (74)..(74)  
 <223> muteína de Cys a Ser

<400> 3  
 Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asp Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val His  
 1 5 10 15  
 Leu Asp Gly Ser Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Arg  
 20 25 30  
 Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asn Thr Ala Glu Gly Leu Leu Asn Val  
 35 40 45  
 Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Thr Leu Pro Asp Phe Leu Ala Lys Phe  
 50 55 60  
 Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Ser Arg Glu Ala Ile Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Glu Gly Val Val Tyr  
 85 90 95

ES 2 507 508 T3

Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val Glu  
100 105 110

Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu Val  
115 120 125

Val Ala Leu Val Gly Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe Gly  
130 135 140

Val Lys Ala Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Asn Trp  
145 150 155 160

Ser Pro Lys Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Gln Gln Gln Thr Val  
165 170 175

Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Pro Gly Ser Ser Leu  
180 185 190

Leu Pro Gly His Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Val Lys Ser Gly Ile  
195 200 205

His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Glu Val Val Lys  
210 215 220

Glu Ala Val Asp Ile Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr His  
225 230 235 240

Thr Leu Glu Asp Gln Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn Met  
245 250 255

His Phe Glu Ile Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp Lys  
260 265 270

Pro Asp Thr Glu His Ala Val Ile Arg Leu Lys Asn Asp Gln Ala Asn  
275 280 285

Tyr Ser Leu Asn Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu Asp  
290 295 300

Thr Asp Tyr Gln Met Thr Lys Arg Asp Met Gly Phe Thr Glu Glu Glu  
305 310 315 320

Phe Lys Arg Leu Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro Glu  
325 330 335

Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly Met  
340 345 350

Pro Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Asn Leu  
355 360

<210> 4  
<211> 1089  
<212> ADN  
<213> Humano

ES 2 507 508 T3

<400> 4  
atggctcaga caccgcatt tgataaacg aaagtggaac tgcattgtcca cctggatggt 60  
agcatcaaac cggaaactat cttatattac ggtcggcgctc gtggatttgc gttgccggca 120  
aacacggctg aaggtttctg gaacgtgatc ggcatggaca aaccgctgac cttgccggat 180  
tttttgccga aatttgatta ttatatgccg gcgattgctg gttcccgcga ggcaatcaaa 240  
cgcatcgcgt atgagtttgt tgaaatgaaa gcgaaagaag gcgttgtgta tgttgaggtc 300  
cgttacagtc cgcatctgct ggctaacagc aaggtagaac ctatcccctg gaaccaagct 360  
gaaggcgatc tgacgccgga tgaagtgggt gctctgggtg gtcagggttt acaggagggg 420  
gagcgcgatt ttggcgtaa agctcgtctc attttatggt gcatgcgcca tcagcccaat 480  
tggtcccga aagtggttga actttgtaa aagtaccaac aacagaccgt tgtcgcgatt 540  
gatttggcag gcgatgaaac aattccaggc agctccctgt tgccagggca cgtgcaagcg 600  
taccaagaag cagtgaaaag cggcatccac cggactgtcc acgccggcga ggtcggtagc 660  
gccgaggttg tgaaagaagc cgtggacatc ctgaaaaccg agcggctggg ccatgggtac 720  
cacacactgg aggatcaggc attatataac cgcttacgcc aggaaaatat gcatttcgaa 780  
atgtgtccgt ggagtagtta cttactggc gcgtggaaac cggataccga acatgcggtt 840  
atccgcttaa agaattgatca agcaaattac agtctgaata cagatgatcc cctgattttc 900  
aagtctacc tggacacaga ttatcagatg acgaagcggg atatgggatt tacggaagaa 960  
gaatttaagc gtctcaatat caatgcggcg aaatcttcat ttctgccgga agatgagaaa 1020  
cgtgagttgc tggatcttct gtacaaggcc tacggatgac cgccgagcgc atcggccggg 1080  
cagaacctg 1089

5 <210> 5  
<211> 356  
<212> PRT  
<213> Bovino

10 <400> 5  
Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asn Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val His  
1 5 10 15  
Leu Asp Gly Ala Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Lys  
20 25 30  
Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Pro Glu Glu Leu Gln Asn Ile  
35 40 45  
Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Ser Leu Pro Glu Phe Leu Ala Lys Phe  
50 55 60

ES 2 507 508 T3

Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Cys Arg Glu Ala Val Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Asp Gly Val Val Tyr  
 85 90 95  
 Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val Glu  
 100 105 110  
 Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu Val  
 115 120 125  
 Val Ser Leu Val Asn Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe Gly  
 130 135 140  
 Val Lys Val Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Glu Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Glu Gln Thr Val  
 165 170 175  
 Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Glu Gly Ser Ser Leu  
 180 185 190  
 Phe Pro Gly His Val Lys Ala Tyr Ala Glu Ala Val Lys Ser Gly Val  
 195 200 205  
 His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Asn Val Val Lys  
 210 215 220  
 Glu Ala Val Asp Thr Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr His  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Glu Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn Met  
 245 250 255  
 His Phe Glu Val Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp Lys  
 260 265 270  
 Pro Asp Thr Glu His Pro Val Val Arg Phe Lys Asn Asp Gln Val Asn  
 275 280 285  
 Tyr Ser Leu Asn Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu Asp  
 290 295 300  
 Thr Asp Tyr Gln Met Thr Lys Asn Glu Met Gly Phe Thr Glu Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Lys Arg Leu Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro Glu  
 325 330 335  
 Asp Glu Lys Lys Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly Met  
 340 345 350  
 Pro Ser Pro Ala  
 355

**REIVINDICACIONES**

1. Una adenosina desaminasa conjugada a un polímero sustancialmente no antigénico para uso en el tratamiento de un tumor.
- 5 2. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, para uso para reducir sustancialmente los niveles en tejido de adenosina o desoxiadenosina, y donde el crecimiento o la extensión del tumor son inhibidos por los niveles reducidos de adenosina.
3. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, donde el tumor es un tumor sólido.
4. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en tumor de próstata, cáncer de ovario y cáncer colorrectal.
- 10 5. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 4, donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en tumor de próstata y cáncer de ovario.
6. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, donde el polímero sustancialmente no antigénico es un polióxido de alquileo.
7. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 6, donde el polióxido de alquileo es polietilen glicol.
- 15 8. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 6, donde el polímero sustancialmente no antigénico oscila en tamaño entre aproximadamente 4.000 y aproximadamente 45.000 Daltons.
9. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, donde la dosis de adenosina desaminasa conjugada oscila entre aproximadamente 10U y aproximadamente 30U por kg.
- 20 10. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, donde el uso de adenosina desaminasa es para un periodo de tiempo que oscila entre 1 y aproximadamente 20 días.
11. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, donde el conjugado comprende dos o más moléculas de adenosina desaminasa por polímero sustancialmente no antigénico.
12. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, donde la adenosina desaminasa comprende entre aproximadamente 11 y aproximadamente 18 cadenas de polietilen glicol unidas a grupos amino épsilon de uno o más residuos de Lys de la adenosina desaminasa.
- 25 13. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 6 ó 12, donde la adenosina desaminasa está conjugada al polietilen glicol vía un enlace de uretano.
14. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1, donde la adenosina desaminasa es una adenosina desaminasa purificada a partir de una fuente bovina o es una adenosina desaminasa recombinante.
- 30 15. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 14, donde la adenosina desaminasa recombinante se selecciona del grupo que consiste en adenosina desaminasa recombinante que comprende la SEQ ID NO: 1, adenosina desaminasa humana recombinante que comprende la SEQ ID NO: 3 y una adenosina desaminasa recombinante bovina que comprende la SEQ ID NO: 5.-
- 35 16. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1 ó 15, donde la adenosina desaminasa recombinante es adenosina desaminasa recombinante bovina que comprende la SEQ ID NO: 1.
17. La adenosina desaminasa para uso de la reivindicación 1 ó 15, donde la adenosina desaminasa recombinante es adenosina desaminasa recombinante bovina que comprende la SEQ ID NO: 5.
18. La adenosina desaminasa para uso de cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde la adenosina desaminasa bovina recombinante que comprende la SEQ ID NO: 5 comprende una Cys74 que está tapada para prevenir la oxidación en un medio acuoso.
- 40 19. La adenosina desaminasa para uso de cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde la adenosina desaminasa recombinante es según la SEQ ID NO: 1 ó la SEQ ID NO: 5, con una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en Gln en lugar de Lys<sub>198</sub>; Ala en lugar de Thr<sub>245</sub>; Arg en lugar de Gly<sub>351</sub>, y combinaciones de las mismas.

45