

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 940**

51 Int. Cl.:

C12N 9/78 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008** **E 08746255 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016** **EP 2147116**

54 Título: **Adenosina desaminasa recombinante estable**

30 Prioridad:

20.04.2007 US 913009 P

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

13.05.2016

73 Titular/es:

SIGMA-TAU RARE DISEASE LTD (100.0%)
21 Holborn Viaduct
London EC1A 2DY, GB

72 Inventor/es:

FILPULA, DAVID R. y
YOUNGSTER, STEPHEN K.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 569 940 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

Adenosina desaminasa recombinante estable

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos con n.º de serie 60/913.009, presentada el 20 de abril de 2007, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

Campo de la invención

La invención proporciona adenosina desaminasa recombinante mutada para mejorar su estabilidad.

Antecedentes de la invención

- 10 La adenosina desaminasa (ADA) se ha usado en el tratamiento de un trastorno de deficiencia enzimática denominado enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) o durante algún tiempo enfermedad del "niño burbuja". Desde hace más de 15 años, Enzon Pharmaceuticals ha puesto a disposición de los pacientes la ADA terapéutica en forma de ADA pegilada preparada usando una fuente bovina de la enzima ADA.

- 15 Recientemente, se han acometido esfuerzos para reemplazar la enzima de origen bovino con una enzima de origen recombinante (en adelante "rADA"). Tanto la enzima humana recombinante ("rhADA") como la enzima bovina recombinante ("rbADA") han sido consideradas como sustitutos de la ADA bovina purificada natural. Las enzimas rbADA y rhADA son algo menos estables que la enzima bovina purificada nativa que se emplea actualmente. Se cree que tanto rhADA como rbADA se degradan de una manera consistente con la degradación de cisteína: adición de oxígeno; formación de ditioles; aumento de la degradación a medida que aumenta el pH; precipitación, especialmente a medida que aumenta el pH y las muestras se concentran. En estado reducido, la cisteína contiene un grupo -SH (sulfhidrilo) reactivo que es la forma responsable de la degradación.

- 20 Las evidencias han sugerido que una sola cisteína expuesta puede ser responsable de la degradación que se observa tanto para la rbADA como para la rhADA. La ADA bovina (es decir, ADA bovina natural purificada a partir de una fuente bovina) tiene una estructura muy similar a la de la rhADA: tanto la ADA bovina como la rhADA tienen el mismo número de cisteínas en las mismas posiciones de la secuencia primaria. La ADA bovina recombinante y humana recombinante obtenidas actualmente contienen productos de degradación/impurezas (ditioles) que son consistentes con la reactividad de la cisteína. La ADA bovina nativa difiere estructuralmente de la ADA bovina recombinante en que la ADA bovina nativa tiene un solo mol de cisteína unida a cada mol de ADA. La ADA bovina nativa también es estable a pH elevado, lo que sugiere que la cisteína unida a la ADA funciona como grupo protector.

- 25 Un procedimiento para la estabilización de la ADA bovina recombinante y/o humana recombinante es proteger terminalmente el resto Cys activo (Cys 74 tanto de la rbADA madura como de la rhADA madura) con uno cualquiera de glutatión oxidado, yodoacetamida, ácido yodoacético, cistina, otros ditioles y sus mezclas. Este procedimiento se expone en la solicitud de patente de n.º de serie 11/738.012 de propiedad conjunta, titulada "Proteínas estabilizadas", cuyo contenido se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia.

- 30 A pesar de lo anterior, sería ventajoso evitar la necesidad de una etapa de protección terminal adicional modificando la estructura de la proteína para proporcionar estabilidad inherente inmediatamente después de su expresión. La patente de Estados Unidos n.º 5.346.823 describe la estabilización de proteasas procariotas tales como la subtilisina, y proteasa neutra, mediante la sustitución de restos de Cys desestabilizantes con Ser y otros restos de aminoácidos, por mutación. Sin embargo, el análisis mutacional de los sitios activos en ADA reveló que la sustitución de un resto Cys (Cys 262) daba como resultado una enzima con una disminución significativa de la actividad, Bhaumik y col. 1993, The J. of Biol Chem, 268. (8): 5464-5470. Por lo tanto, antes de la presente invención, no se conocía la estabilización de las enzimas adenosina desaminasa mediante la sustitución de un resto de Cys activo y expuesto por otro resto de aminoácido mientras se conserva una actividad enzimática útil óptima.

- 45 El documento WO2007/149686 solo revela la novedad y desvela la sustitución del aminoácido Cys 74 oxidable por protección terminal, es decir, la sustitución con un aminoácido no oxidable.

El documento de Estados Unidos 5.849.549 desvela la sustitución de aminoácidos oxidables en alfa-amilasas. Bhaumik y col., 1993 desvela recombinantes de adenosina desaminasa en los que se han mutado diferentes restos (por ejemplo, C262A).

- 50 El documento de Estados Unidos 5.728.560 desvela el tratamiento de la IDCG con adenosina desaminasa silvestre pegilada (Adagen).

Por lo tanto, sería beneficioso proporcionar tanto rbADA como rhADA que sean estables, es decir, sin degradación significativa durante su almacenamiento y procesamiento, a niveles de pH que sean útiles para la pegilación óptima de la enzima.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una adenosina desaminasa recombinante, en la que un resto de aminoácido oxidable expresado en el tipo silvestre de la adenosina desaminasa se sustituye por un resto de aminoácido no oxidable; en el que el resto de aminoácido no oxidable es serina, y el resto de aminoácido oxidable es cisteína, dicha cisteína se encuentra en la posición 74 de la proteína adenosina desaminasa madura.

La adenosina desaminasa recombinante preferentemente es una adenosina desaminasa humana recombinante o una adenosina desaminasa bovina recombinante, más preferentemente, se traduce a partir de una molécula de ADN según la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, aún más preferentemente, comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.

De acuerdo con una realización preferida, la adenosina desaminasa comprende la SEQ ID NO: 1 con una sustitución del aminoácido seleccionada del grupo que consiste en Gln en lugar de Lys₁₉₈; Ala en lugar de Thr₂₄₅; Arg en lugar de Gly₃₅₁, y sus combinaciones.

Además, la presente invención se refiere a un conjugado de óxido de polialquileno-adenosina desaminasa, en el que la adenosina desaminasa es la adenosina desaminasa recombinante descrita anteriormente.

Preferentemente, el óxido de polialquileno es polietilenglicol. Más preferentemente, el polietilenglicol está conjugado a la adenosina desaminasa recombinante a través de un grupo de enlace seleccionado del grupo que consiste en grupos de enlace a base de carbonato de succinimidilo, tiazolidina tiona, uretano, y amida. Aún más preferentemente, el polietilenglicol se une covalentemente a un grupo épsilon amino de una Lys de la adenosina desaminasa recombinante.

De acuerdo con una realización preferida, la adenosina desaminasa recombinante del conjugado de óxido de polialquileno-adenosina desaminasa comprende una o más cadenas de polietilenglicol unidas a grupos épsilon amino de uno o más restos de Lys de la adenosina desaminasa recombinante.

Preferentemente, la adenosina desaminasa recombinante comprende de 11 aproximadamente a 18 cadenas de polietilenglicol aproximadamente unidas a grupos épsilon amino de uno o más restos de Lys de la adenosina desaminasa recombinante.

De acuerdo con una realización preferida, el polietilenglicol del conjugado de óxido de polialquileno-adenosina desaminasa se conjuga con la adenosina desaminasa recombinante a través de un grupo de enlace de carbonato de succinimidilo. Preferentemente, el polietilenglicol tiene un peso molecular de 2000 aproximadamente a 100.000 aproximadamente. Más preferentemente, el polietilenglicol tiene un peso molecular de 4000 aproximadamente a 45.000 aproximadamente.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la adenosina desaminasa recombinante para su uso en el tratamiento de una dolencia mediada por la adenosina desaminasa en mamíferos. Preferentemente, la dolencia mediada por la adenosina desaminasa es el trastorno de inmunodeficiencia combinada grave. Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para purificar la adenosina desaminasa recombinante que comprende la purificación de la proteína por cromatografía de intercambio de iones. Preferentemente, el procedimiento sirve para purificar la adenosina desaminasa recombinante que comprende la SEQ ID NO: 1 y comprende una etapa de purificación de la proteína por cromatografía de interacción hidrófoba.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una adenosina desaminasa recombinante producida por los procedimientos desvelados anteriormente.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un ADN aislado que codifica una adenosina desaminasa recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

En particular, la adenosina desaminasa recombinante del ADN aislado tiene una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Gln en lugar de Lys₁₉₈; Ala en lugar de Thr₂₄₅; Arg en lugar de Gly₃₅₁, y sus combinaciones.

Descripción detallada de la invención

En este documento se proporcionan enzimas recombinantes estables de adenosina desaminasa. Las enzimas adenosina desaminasa de la invención se proporcionan sustituyendo un resto de cisteína que se somete a procedimientos de oxidación cuando la enzima está en solución, con un resto de aminoácido alternativo aceptable que conserva la actividad, la carga y la estructura terciaria de la enzima, mientras se elimina una fuente de inestabilidad por descomposición.

A. Definiciones

A fin de proporcionar una descripción clara de la invención, se definen varios términos, como sigue.

El término "recombinante" se refiere a una proteína producida usando células que no tienen, en su estado nativo,

una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante porque se han alterado genéticamente con la introducción de la secuencia apropiada de ácido nucleico aislado. El término también incluye la referencia a una célula, o ácido nucleico, o vector, que se ha modificado con la introducción de un ácido nucleico heterólogo (exógeno o extraño) o la alteración de un ácido nucleico nativo a una forma no nativa para esa célula, o que la célula deriva de una célula modificada de este modo. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, expresan mutantes de genes que se encuentran en la forma nativa, o expresan genes nativos que por lo demás se expresan anormalmente, se expresan insuficientemente o no se expresan en absoluto.

En el presente documento, "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" incluye la referencia a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono- o bicatenaria, y a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con ácidos nucleicos de manera similar a nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular incluye su secuencia complementaria.

El término, "que codifica" con respecto a un ácido nucleico especificado, incluye la referencia a ácidos nucleicos que comprenden la información para su traducción en la proteína especificada. La información se especifica mediante el uso de codones.

Una "célula huésped" es una célula que puede soportar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibio, o mamífero.

Como se usa en este documento, "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente e incluyen la referencia a un polímero de restos de aminoácidos.

El término "resto" o "resto de aminoácido" o "aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que se incorpore a una proteína, polipéptido, o péptido (colectivamente "péptido"). El aminoácido puede ser un aminoácido natural y, a menos que se limite de otro modo, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los aminoácidos naturales.

"Transfección" se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped, independientemente de que las secuencias codificantes se expresen de hecho. El experto en la materia conoce numerosos procedimientos de transfección. Por ejemplo, la transfección se lleva a cabo en presencia de un vector de expresión y altas concentraciones de CaPO_4 , mediante electroporación, usando un fago o vector de expresión viral para su inserción en una célula huésped, por inserción mecánica del ácido nucleico, e incluso cultivando las células huésped en presencia de fragmentos de ácido nucleico sin empaquetar. Generalmente se reconoce que la transfección ha tenido éxito cuando se produce cualquier indicación de la actuación del vector de interés dentro de la célula huésped.

"Transformación" describe la introducción de un ácido nucleico en un organismo de modo que el ácido nucleico sea replicable, bien como elemento extracromosómico o por integración en el cromosoma del huésped. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando procedimientos conocidos en la técnica apropiados para las células huésped particulares. Generalmente se usa el tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, como se describe por Cohen, S. N., Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 69: 2110 (1972) y Mandel y col., J. Mol. Biol. 53: 154 (1970) para procariotas u otras células que estén encapsuladas dentro de las paredes celulares (por ejemplo, muchas células bacterianas y/o vegetales). Para células de mamífero sin dichas paredes celulares, se prefiere el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham, F. y Van der Eb, A., Virology, 52: 456-457 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas de células huésped de mamíferos se han descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4.399.216 expedida el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levaduras normalmente se llevan a cabo según el procedimiento de Van Solingen, P., y col., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao, C. L., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN, en células, tales como, por ejemplo, mediante inyección nuclear, lipofección, o por fusión de protoplastos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "complementario" con respecto a un ácido nucleico se refiere a la cadena opuesta (usando el emparejamiento de bases de Watson-Crick) producida cuando se replica una primera molécula de ácido nucleico usando esa molécula como molde, para formar una segunda cadena nueva de ácidos nucleicos. En un aspecto de la invención, dos moléculas de ácido nucleico se considera que son complementarias, la una con la otra, cuando se hibridan o se unen conjuntamente en condiciones rigurosas.

"Unido de forma operable" se refiere a una yuxtaposición de componentes, por ejemplo, una región reguladora y un marco de lectura abierta, de modo que se puede realizar la función normal de los componentes. Por lo tanto, un marco de lectura abierto que está "unido de forma operable" a secuencias de control se refiere a una configuración en la que la secuencia codificante se puede expresar bajo el control de estas secuencias.

"Secuencias de control" se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de forma operable en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de

unión al ribosoma, y opcionalmente, otras secuencias aún poco conocidas. Se sabe que, por ejemplo, las células eucariotas utilizan secuencias de control como promotores, señales de poliadenilación y potenciadores, por nombrar solo unos pocos.

"Sistema de expresión" o "vector de expresión" se refiere a secuencias de ácido nucleico que contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de control unidas de forma operable, de manera que los huéspedes transformados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, el sistema de expresión puede estar incluido en un vector; sin embargo, la molécula de ácido nucleico de referencia entonces también se puede integrar en el cromosoma huésped.

Como se usa en el presente documento, "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie. Así, "transformantes" o "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en contenido genómico, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma funcionalidad que se selecciona en la célula transformada originalmente. Cuando se haga referencia a designaciones diferentes, quedará claro a partir del contexto.

Para los fines de la presente invención, el término "resto" se entiende que significa la parte de un compuesto, a la que se refiera, por ejemplo, PEG, ADA, ácido amino, etc., que permanece después de que se haya sometido a una reacción de sustitución con otro compuesto.

Para los fines de la presente invención, cada uno de los términos "resto polimérico", por ejemplo, "resto de PEG" debe entenderse que se refiere a la parte del polímero o PEG que queda después de que se haya sometido a una reacción con otros compuestos, restos, etc.

Para los fines de la presente invención, el término "alquilo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un hidrocarburo alifático saturado, incluyendo de cadena lineal, de cadena ramificada, y grupos alquilo cíclicos. El término "alquilo" también incluye grupos alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, y alquilcarbonilalquilo C_{1-6} . Preferentemente, el grupo alquilo tiene de 1 a 12 átomos de carbono. Más preferentemente, es un alquilo inferior de 1 a 7 átomos de carbono aproximadamente, aún más preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono aproximadamente. El grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituido incluye preferentemente grupos halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquilo, alcoxi, alquil-tio, alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, alquilamino, trihalometilo, hidroxilo, mercapto, hidroxilo, ciano, alquilsililo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, hidrocarbonilo C_{1-6} , arilo, y amino.

Para los fines de la presente invención, el término "sustituido" como se usa en el presente documento se refiere a la adición o sustitución de uno o más átomos contenidos dentro de un grupo funcional o un compuesto con uno de los restos del grupo halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquilo, alcoxi, alquil-tio, alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, alquilamino, trihalometilo, hidroxilo, mercapto, hidroxilo, ciano, alquilsililo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, carbonilo C_{1-6} , arilo, y grupos amino.

El término "alquenilo" como se usa en el presente documento se refiere a grupos que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono, incluyendo grupos de cadena lineal, de cadena ramificada, y cíclicos. Preferentemente, el grupo alquenilo tiene de 2 a 12 átomos de carbono. Más preferentemente, es un alquenilo inferior de 2 a 7 átomos de carbono aproximadamente, aún más preferentemente de 2 a 4 átomos de carbono aproximadamente. El grupo alquenilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido el grupo sustituido incluye preferentemente grupos halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquilo, alcoxi, alquil-tio, alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, alquilamino, trihalometilo, hidroxilo, mercapto, hidroxilo, ciano, alquilsililo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, alquilcarbonilalquilo C_{1-6} , arilo, y amino.

El término "alquinilo" tal como se usa en el presente documento se refiere a grupos que contienen al menos un triple enlace carbono-carbono, incluyendo grupos de cadena lineal, de cadena ramificada, y cíclicos. Preferentemente, el grupo alquinilo tiene de 2 a 12 átomos de carbono. Más preferentemente, es un alquinilo inferior de 2 a 7 átomos de carbono aproximadamente, aún más preferentemente de 2 a 4 átomos de carbono aproximadamente. El grupo alquinilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido el grupo sustituido incluye preferentemente grupos halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquilo, alcoxi, alquil-tio, alquil-tio-alquilo, alcoxialquilo, alquilamino, trihalometilo, hidroxilo, mercapto, hidroxilo, ciano, alquilsililo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, hidrocarbonilo C_{1-6} , arilo, y amino. Ejemplos de "alquinilo" incluyen propargilo, propino, y 3-hexino.

Para los fines de la presente invención, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo aromático que contiene al menos un anillo aromático. El anillo aromático opcionalmente puede estar condensado o unido de otra manera a otros anillos de hidrocarburos aromáticos o anillos de hidrocarburos no aromáticos. Ejemplos de grupos arilo incluyen, por ejemplo, fenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno y bifenilo. Ejemplos preferidos de grupos arilo incluyen fenilo y naftilo.

Para los fines de la presente invención, el término "cicloalquilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico C_{3-8} . Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

Para los fines de la presente invención, el término "cicloalquenilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico C₃₋₈ que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de cicloalquenilo incluyen ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexenilo, 1,3-ciclohexadienilo, cicloheptenilo, cicloheptatrienilo y ciclooctenilo.

5 Para los fines de la presente invención, el término "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo cicloalquilo C₃₋₈. Ejemplos de grupos cicloalquilalquilo incluyen ciclopropilmetilo y ciclopentiletilo.

Para los fines de la presente invención, el término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo del número indicado de átomos de carbono unidos al resto molecular parental a través de un puente de oxígeno. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi e isopropoxi.

10 Para los fines de la presente invención, un grupo "alquilarilo" se refiere a un grupo arilo sustituido con un grupo alquilo.

Para los fines de la presente invención, un grupo "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo.

Para los fines de la presente invención, el término grupo "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi.

15 Para los fines de la presente invención, el término "alquil-tio-alquilo" se refiere a un grupo tioéter alquil-S-alquilo, por ejemplo metiltiometilo o metiltioetilo.

20 Para los fines de la presente invención, el término "amino" se refiere a un grupo que contiene nitrógeno tal como se conoce en la técnica derivado de amoniaco por la sustitución de uno o más radicales de 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.

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

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

25 Para los fines 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. El anillo heterocicloalquilo opcionalmente puede estar condensado o unido de otro modo a otros anillos heterocicloalquilo y/o anillos de hidrocarburos no aromáticos. Los grupos heterocicloalquilo preferidos tienen de 3 a 7 miembros. Ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen, por ejemplo, piperazina, morfolina, piperidina, tetrahydrofurano, pirrolidina, y pirazol. Los grupos heterocicloalquilo preferidos incluyen piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo y pirrolidinilo.

30 Para los fines 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 condensado o unido de otro modo a uno o más anillos heteroarilo, anillos de hidrocarburo aromático o no aromático o anillos heterocicloalquilo. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, piridina, furano, tiofeno, 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolina y pirimidina. 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.

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

40 En algunas realizaciones, alquilos sustituidos incluyen carboxialquilos, aminoalquilos, dialquilaminos, hidroxialquilos y mercaptoalquilos; alquenilos sustituidos incluyen carboxialquenilos, aminoalquenilos, dialquenilaminos, hidroxialquenilos y mercaptoalquenilos; alquinilos sustituidos incluyen carboxialquinilos, aminoalquinilos, dialquinilaminos, hidroxialquinilos y mercaptoalquinilos; cicloalquilos sustituidos incluyen restos tales como 4-clorociclohexilo; arilos incluyen restos tales como naftilo; arilos sustituidos incluyen restos tales como 3-bromofenilo; aralquilos incluyen restos tales como tolilo; heteroalquilos incluyen restos tales como etiltiofeno; heteroalquilos sustituidos incluyen restos tales como 3-metoxi-tiofeno; alcoxi incluye restos tales como metoxi; y fenoxi incluye restos tales como 3-nitrofenoxi. Halo se entiende que incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

Para los fines de la presente invención, "número entero positivo" se entiende que incluye un número entero igual o superior a 1 y como entenderán los expertos en la materia estará dentro de lo razonable.

Para los fines de la presente invención, el término "unido" se entiende que incluye una unión covalente (preferentemente) o no covalente de un grupo a otro, es decir, como resultado de una reacción química.

50 Los términos "cantidades eficaces" y "cantidad suficiente" a los efectos de la presente invención significa una cantidad que consigue un efecto deseado o un efecto terapéutico, como se entiende por dicho efecto por los expertos en la materia.

Para los fines de la presente invención, el término "adenosina" se entiende que incluye los nucleósidos adenosina y desoxiadenosina. La adenosina también incluye la adenosina y desoxiadenosina presente en forma de AMP, ADP, ATP, dAMP, dADP o dATP.

5 Para los fines de la presente invención, "dolencia mediada por adenosina" o "dolencia sensible a la adenosina desaminasa" se entiende que incluye ampliamente cualquier enfermedad, dolencia o trastorno que se beneficie de la administración de ADA, o una fracción activa de la misma, etc., independientemente de la vía de administración.

10 Para los fines de la presente invención, "tratamiento de una dolencia mediada por adenosina" o "tratamiento de una dolencia sensible a la adenosina desaminasa", tal como IDCG se entiende en el sentido de que se evitan, se reducen al mínimo o se atenúan los síntomas o condiciones en comparación con lo observado en ausencia del tratamiento con ADA. Las dolencias tratadas se pueden confirmar, por ejemplo, por la disminución de la adenosina.

15 En términos generales, se considera que un tratamiento de la dolencia mediada por la adenosina tiene éxito cuando se obtiene la respuesta clínica deseada. Como alternativa, se puede definir un tratamiento con éxito al obtener al menos el 20 % o preferentemente el 30 %, más preferentemente el 40 % o superior (es decir, el 50 % o el 80 %) de disminución de la adenosina, incluyendo otros marcadores clínicos contemplados por el experto en la materia, en comparación con lo observado en ausencia del tratamiento con ADA.

20 Además, el uso por conveniencia de términos en singular en la descripción no está destinado de ninguna manera a limitarse a ello. Así, por ejemplo, la referencia a una composición que comprende una enzima se refiere a una o más moléculas de esa enzima. También debe entenderse que esta invención no está limitada a las configuraciones particulares, etapas de procedimiento, y materiales descritos en este documento ya que dichas configuraciones, etapas de procedimiento, y materiales pueden variar algo.

También se debe entender que la terminología empleada en el presente documento se usa con el fin de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

B. Enzimas de ADA producidas recombinantemente

25 Los esfuerzos iniciales para obtener la enzima ADA recombinante, incluyendo las enzimas expresadas a partir de genes humanos o bovinos, descubrieron una inestabilidad de almacenamiento no observada previamente con ADA natural derivada de intestino bovino. Se llevaron a cabo estudios de los productos de descomposición de rhADA y rbADA, y se confirmó que ambas enzimas ADA se degradan de una manera consistente con la degradación de la cisteína. Por ejemplo, la adición de oxígeno a rhADA da como resultado la formación de compuestos más hidrófilos que la rhADA que tienen masas 16 y 32 Da más altas que la rhADA. Además, esto da lugar a la formación de ditioles (como se indica por la inversión de una subpoblación de degradantes por adición de ditiotretitol ["DTT"]; el aumento de la degradación a medida que se incrementa el pH; precipitación, especialmente a medida que se incrementa el pH y las muestras se concentran, lo que sugiere la formación de enlaces disulfuro intermoleculares produciendo agregados insolubles.

35 Hemos determinado que una sola cisteína expuesta es responsable de la degradación que se observa para la rhADA. La ADA bovina (no degradada) tiene una estructura muy similar a la de la rhADA: tanto la ADA bovina como la rhADA tienen el mismo número de cisteínas en las mismas posiciones de la secuencia primaria. La rbADA también contiene productos de degradación/impurezas (ditioles) que son consistentes con la reactividad de la cisteína. La ADA bovina nativa difiere estructuralmente de la rbADA en que tiene un solo mol de cisteína unida a cada mol de ADA, y la ADA bovina nativa es estable a un pH alto, lo que sugiere que la cisteína unida a la ADA funciona como grupo protector. La cisteína unida a la ADA bovina nativa se puede eliminar por tratamiento con un agente reductor, tal como mercaptoetanol o DTT. Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría o hipótesis, esto sugiere que el grupo cisteína se conjuga con la ADA mediante un enlace disulfuro de la siguiente manera:

45 ADA-S-S-cisteína

50 en la que una cisteína en la secuencia primaria de la ADA se une a una molécula de cisteína. Las cisteínas involucradas en estos enlaces disulfuro son estables respecto a las vías de degradación oxidativa mencionadas en el primer párrafo. Los restos de cisteína aparecen en las posiciones 74, 152, 153, 168, y 261 tanto de la ADA madura humana como bovina. La inspección de la estructura tridimensional de la ADA bovina obtenida por cristalografía de rayos X (Kinoshita y col., 2005, Biochemistry, 44: 10562-10569) indica que las cisteínas en las posiciones 74, 152, 153, 168, y 261 no tienen oportunidad de participar en enlaces disulfuro intramoleculares. Se sabe que las limitaciones geométricas estructurales en general evitan que los restos de cisteína vecinos, tales como los que aparecen en las posiciones 152 y 153 de la ADA, participen en enlaces disulfuro. Por lo tanto, todos los restos de cisteína se encuentran potencialmente en estado reducido y, en consecuencia, son los posibles sitios candidatos para las reacciones de degradación oxidativa. Sin embargo, la inspección visual de la estructura

tridimensional de la ADA bovina citada más arriba indica que la cisteína 74 está claramente expuesta al disolvente en un mayor grado de lo que lo están las otras cuatro cisteínas y, además, que las otras cuatro cisteínas parecen estar enterradas dentro de la estructura de la enzima en un grado que probablemente evita una interacción significativa con los reactivos solvatados (siempre que la proteína no se encuentre desnaturalizada). La existencia de un único resto de cisteína reactivo explicaría la monoderivación de la adenosina desaminasa bovina nativa que presumiblemente es el resultado de la modificación post-traducciona

Los hechos anteriores indican que una cisteína reactiva en la posición 74 puede ser responsable de la degradación observada en la rhADA y la rbADA y que la protección terminal del grupo –S–H de la cisteína reactiva protegerá a la rhADA o la rbADA de las aparentes vías de degradación oxidativas observadas para las enzimas recombinantes. Se realizó el siguiente experimento para determinar si éste era el caso. hADA recombinante, a una concentración de 0,6 mg/ml aproximadamente, se hizo reaccionar con yodoacetamida 125 mM (IAA) en tampón de fosfato sódico a pH 7,4 durante 16 horas a 37 °C. A los pocos minutos de iniciar la reacción, el análisis de la muestra por RP-HPLC con detección UV y espectrometría de masas mostró que aproximadamente el 70,9 % de la rhADA se monoderivó con IAA y el 17,2 % se derivó en dos sitios. Después de 2 y 16 horas de incubación, el perfil cromatográfico no se modificó de forma significativa, lo que indica que el derivado era estable frente a las vías de degradación oxidativa típicas de la rhADA. Se preparó una muestra similar de rhADA que carecía de IAA y se analizó de manera similar. Después de 16 horas de incubación a 37 °C a pH 7,4, la proteína rhADA se degradó hasta el 30 % (más allá de la degradación que tenía inicialmente la muestra). Los resultados son consistentes con una única cisteína predominante expuesta que se puede proteger mediante protección terminal con yodoacetamida. Estos experimentos se describen con mayor detalle en la Solicitud de patente de Estados Unidos de propiedad conjunta n.º de serie 11/738.012, titulada, "Proteínas estabilizadas", incorporada en el presente documento por referencia, como se ha citado más arriba.

Aunque la protección terminal es eficaz para eliminar la degradación oxidativa de la cisteína reactiva en la ADA, el empleo de dicha enzima protegida terminalmente requiere una etapa de fabricación adicional. Por lo tanto, se investigó la eliminación directa del resto de Cys inestable del gen codificante por sustitución con un aminoácido diferente. Un aminoácido de sustitución adecuado es uno que no esté sujeto al mismo tipo de oxidación, no interrumpa la estructura terciaria de la proteína de ADA plegada, y en la realización típica de la invención se seleccione de manera que no experimente conjugación aleatoria a óxido de polialquileño activado durante la formación de conjugado. Se considera que para la sustitución de una cisteína oxidable según la invención es adecuado cualquiera de los aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos no naturales y/o sus derivados conocidos en la técnica que cumplan con este criterio. Una lista de ejemplos de dichos aminoácidos incluye L-aminoácidos de origen natural tales como: alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano y tirosina. El triptófano y la metionina se pueden oxidar de manera relativamente fácil y en ciertas realizaciones opcionales son menos preferidos.

Los procedimientos para la producción de proteínas recombinantes con sitio de incorporación específica de aminoácidos no naturales en células huésped han sido descritos en la literatura, por ejemplo, Liu y col., 2007, Nat. Methods 4(3):239-44, Xie y col., 2006 Nat. Rev. Mod. Cell. Biol. 7(10):775-82, Ryu y col., 2006, Nat. Methods 3(4):263-65, Deiters y col., 2004, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14(23):5743-5, Bogosian y col., 1989, J. Biol. Chem. 264(1):531-9, Tang y col., 2002, Biochemistry 41(34):10635-45, Budisa y col., 1995, Eur. J. Biochem. 230(2): 788-96, y Randhawa y col., 1994, Biochemistry, 33(14):4352-62. Por lo tanto, el aminoácido sustituto también puede incluir un aminoácido modificado o un aminoácido menos típico tal como: ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diamino, n-etilglicina, n-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, n-metilglicina, sarcosina, n-metilisoleucina, 6-n-metilisina, n-metilvalina, norvalina, norleucina y ornitina.

Los aminoácidos de origen natural opcionalmente sustituidos por cisteína más preferidos en ADA recombinante incluyen, por ejemplo, alanina, serina, asparagina, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, tirosina y valina. La serina es el más preferido, y se ejemplifica a continuación.

En consecuencia, se obtuvieron moléculas de ADN que expresan la adenosina desaminasa de tipo silvestre humana y bovina y se sometieron a la optimización de sus codones para la expresión en *E. coli*, y también se mutaron para expresar la muteína rbADA y la muteína rhADA cada una que comprende un resto Ser en la posición 74 de las respectivas proteínas maduras (posición 75 de la proteína traducida) en lugar del resto de Cys de origen natural. Estas son la Ser₇₄-rbADA (SEQ ID NO: 1) y la Ser₇₄-rhADA (SEQ ID NO: 3), respectivamente. Además, se debe tener en cuenta que la ADA bovina natural como se aísla de intestino bovino también tiene 6 restos eliminados post-traduccionalmente del extremo C-terminal. Una característica opcional de la presente invención es que la Ser₇₄-rbADA según la invención se exprese sin los 6 restos C-terminales (como muteína) o se modifique post-traduccionalmente para eliminar los mismos restos C-terminales que faltan en la ADA bovina natural purificada.

Además, se debe indicar que la ADA bovina natural según se aísla de intestino bovino presenta polimorfismos: con referencia a la SEQ ID NO: 5, los polimorfismos de la ADA bovina incluyen, por ejemplo, glutamina en posición 198

en lugar de lisina, alanina en posición 245 en lugar de treonina; arginina en posición 351 en lugar de glicina. Por tanto, se contempla que la muteína de ADA bovina recombinante en posición 74 según la invención también pueda tener sustituciones adicionales en una o más de las posiciones indicadas o análogos de esas posiciones: Gln en lugar de Lys₁₉₈; Ala en lugar de Thr₂₄₅; Arg en lugar de Gly₃₅₁.

- 5 En un aspecto adicional de la invención, la presente invención proporciona ADN aislados que codifican la muteína ADA que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 descrita en el presente documento. También se consideran dentro del alcance de la invención otros ADN que codifican la muteína ADA con una o más sustituciones: Gln en lugar de Lys₁₉₈; Ala en lugar de Thr₂₄₅; Arg en lugar de Gly₃₅₁.

- 10 Se puede preparar un vector de expresión adecuado a partir de ADN genómico o ADNc que codifica rhADA o rbADA, respectivamente, que opcionalmente está bajo el control de un promotor adecuado inducible conectado de forma operable. El ADN preferentemente tiene los codones optimizados para la célula huésped apropiada y mutado por cualquier procedimiento conveniente conocido en la técnica, por ejemplo, por su alta eficiencia de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Olsen DB y Eckstein F, Proc Natl Acad Sci USA 87: 1451-5; 1990), síntesis de genes completos con solapamiento de oligonucleótidos largos (Vasantha N y Filpula D, Gene 76: 53-60; 1989), síntesis de genes mediada por PCR (Jayaraman K y col., Proc Natl Acad Sci USA 88: 4084-88; 1991), PCR de solapamiento por extensión (Pogulis RJ y col., Methods Mol Biol 57: 167-76; 1996).

- 15 En general, se prefieren los procariotas para la clonación inicial de secuencias de ADN y la construcción de los vectores útiles en la invención. Por ejemplo, es particularmente útil la cepa K12 MM 294 de *E. coli* (ATCC n.º 31446). Otras cepas microbianas que se pueden utilizar, simplemente a modo de ejemplo, incluyen cepas de *E. coli* tales como *E. coli* B y *E. coli* X1776 (ATCC n.º 31537). Se pueden usar las cepas mencionadas anteriormente, así como, por ejemplo, las cepas de *E. coli* W3110 (F-, lambda-, prototrófica, ATCC n.º 27325), K5772 (ATCC n.º 53.635), y SR101, bacilos tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans*, y diversas especies de *Pseudomonas*.

- 20 Generalmente, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que proceden de especies compatibles con la célula huésped en conexión con estos huéspedes. Los vectores plasmídicos convencionales son moléculas de doble cadena de ADN circular preferentemente diseñadas con sitios de reconocimiento de enzimas adecuados para la inserción de secuencias de ADN exógeno, un gen de antibiótico seleccionable, un origen de replicación para la propagación autónoma en la célula huésped, y un gen para la discriminación o la selección de clones que contienen ADN inserto recombinante. Los vectores plasmídicos disponibles adecuados para su uso en *E. coli* incluyen, por ejemplo, pET3, pET9, pET11 y la serie pET extendida (catalogado por Novagen Corporation), pBAD, trc, phoA, trp, y los plásmidos O_L/R/P_L/R.

- 25 Simplemente a modo de ejemplo, normalmente *E. coli* se transforma usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (véase, por ejemplo, Bolivar y col., 1977, Gene, 2: 95). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y por tanto proporciona medios fáciles para identificar las células transformadas. De manera similar, los plásmidos pUC proporcionan vectores de clonación convenientes con moléculas de ADN para su selección y replicación (Yanisch-Perron, y col., 1985, Gene 33: 103-119, cuya descripción se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia). El plásmido pBR322, u otro plásmido o fago microbiano, también debe contener, o puede estar modificado para que contenga, promotores que el organismo microbiano puede usar para la expresión de sus propias proteínas codificadas.

- 30 Esos promotores usados más habitualmente en la construcción de ADN recombinante incluyen la beta-lactamasa (penicilinas) y sistemas promotores de lactosa (Chang y col., 1978, Nature, 375: 615; Itakura y col., 1977, Science, 198: 1056; Goeddel y col., 1979, Nature, 281: 544) y un sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel y col., 1980, Nucleic Acids Res., 8: 4057; EPO Appl Publ n.º 0036.776). Si bien estos son los usados más habitualmente, se han descubierto y se han usado otros promotores microbianos, y se han publicado los detalles concernientes a sus secuencias de nucleótidos, permitiendo que un trabajador experto pueda ligarlos funcionalmente con vectores conocidos de la técnica, por ejemplo, vectores plasmídicos.

- 35 Simplemente a modo de ejemplo, se puede conseguir la regulación de la transcripción en *E. coli* con cualquiera de los siguientes promotores inducibles: lac, trp, phoA, araBAD, T7, trc, y derivados de los promotores lambda P_L y PR, así como otros muy conocidos en la técnica (por ejemplo, Makrides, 1996, Microbiol Rev. 60: 512-538, cuya descripción se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia).

Las condiciones inductoras adecuadas opcionalmente compatibles con el vector incluyen, por ejemplo, la inducción con arabinosa, lactosa, o calor, la limitación de fosfato, la limitación de triptófano, por nombrar solo unos pocos. Preferentemente, el elemento inductor es un operón Lac, que es inducible por tiogalactósido de isopropilo ("IPTG").

Una secuencia señal adecuada (péptido señal) se puede obtener de pelB, fd pIII, u ompA.

- 55 Los marcadores de selección de antibióticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los que confieren resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, rifampicina, o tetraciclina, entre otros.

Las secuencias de origen de replicación adecuadas incluyen las que se encuentran en los siguientes plásmidos:

pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, PAMB1, pIJ702, pBR322, pBR327, y pSC101.

Las secuencias de terminación adecuadas incluyen, por ejemplo, el terminador principal del fago fd, TΦ, y rrnB.

Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas, tales como cultivos de levaduras. Entre los microorganismos eucariotas el más usado habitualmente es *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, aunque normalmente se encuentran disponibles varias otras cepas. Para la expresión en *Saccharomyces*, habitualmente se usa el plásmido YRp7, por ejemplo (Stinchcomb y col., 1979, Nature, 282: 39; Kingsman y col., 1979, Gene, 7: 141; Tschemper y col., 1980, Gene, 10: 157). Este plásmido ya contiene el gen trp 1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics, 85: 12). La presencia de la lesión trp 1 como característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

Se ha demostrado que el sistema de expresión de *Pichia pastoris* consigue un alto nivel producción de varias proteínas (Cregg, JM y col., 1993, Bio/Technology 11: 905-910, cuya descripción se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia) y se puede emplear para expresar ADA como proteína soluble en el citoplasma de *Pichia pastoris*.

Las secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., J. 1980, Biol Chem, 255: 2073) u otras enzimas glicolíticas (Hess y col., 1968, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149; Holland y col., 1978, Biochemistry, 17: 4900), tales como la enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa. En la construcción de plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas a estos genes también se ligan en el vector de expresión 3' respecto a la secuencia que se desea expresar para proporcionar la poliadenilación del ARNm y la terminación de la transcripción. Otros promotores, que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son la región promotora para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa antes mencionada, y las enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Es adecuado cualquier vector plasmídico que contenga un promotor, origen de replicación y secuencias de terminación compatibles con la levadura.

Se puede proporcionar un origen de replicación por construcción del vector para que incluya un origen exógeno, tal como el que se puede obtener de SV40 u otra fuente viral (por ejemplo, polioma, adeno, VSV, BPV), o se puede proporcionar por el mecanismo de replicación cromosómica de la célula huésped. Si el vector se integra en el cromosoma de la célula huésped, a menudo este último es suficiente. Otros elementos de plásmidos útiles pueden incluir genes expresados que codifican proteínas chaperonas, proteínas prolina isomerasa, o proteínas de reordenamiento de disulfuro.

C. Conjugados de polímero

En otro aspecto de la invención, la muteína ADA tal como la proteína Ser₇₄-rbADA (SEQ ID NO: 1) y Ser₇₄-rhADA (SEQ ID NO: 3) se conjugan con un polímero adecuado con el fin de hacer conjugados de polímero.

En aspectos preferidos, la muteína polipeptídica ADA se conjuga con un polímero esencialmente no antigénico, preferentemente un óxido de polialquileño ("PAO").

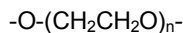
Los conjugados de ADA-polímero en general corresponden a la fórmula (I):



en la que

(ADA) representa la muteína adenosina desaminasa recombinante o un fragmento activo de la misma;
NH- es un grupo amino de un aminoácido que se encuentra sobre la muteína ADA para la unión al polímero;
(z) es un número entero positivo, preferentemente de 1 aproximadamente a 80 aproximadamente, más preferentemente de 5 aproximadamente a 80 aproximadamente, aún más preferentemente de 11 aproximadamente a 18 aproximadamente; y
R incluye un resto de polímero esencialmente no antigénico que se une a la ADA en una forma liberable o no liberable.

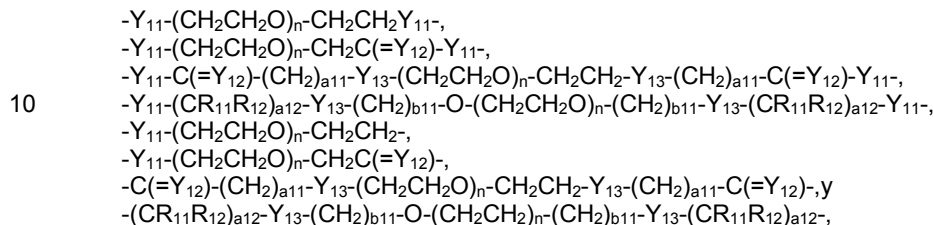
En aspectos más preferidos, los polímeros incluyen polietilenglicol (PEG) en el que el PEG puede ser lineal, ramificado o PEG de múltiples brazos. Generalmente, el polietilenglicol tiene la fórmula:



en la que (n) es un número entero positivo, preferentemente de 10 aproximadamente a 2300 aproximadamente, más preferentemente de 40 aproximadamente a 2300 aproximadamente. El peso molecular promedio de los polímeros

varía de 2000 aproximadamente a 100.000 Da aproximadamente. Más preferentemente, los polímeros tienen un peso molecular promedio de 4000 Da aproximadamente a 45.000 Da aproximadamente, aún más preferentemente de 4000 Da a 20.000 Da aproximadamente. Más preferentemente, el PEG es de 5000 Daltons aproximadamente. También se contemplan otros pesos moleculares para acomodar las necesidades del experto.

- 5 Como alternativa, la parte del resto de polietilenglicol (PEG) de la invención puede estar representada por la estructura:



- 15 en la que:

Y_{11} e Y_{13} son independientemente O, S, SO, SO_2 , NR_{13} o un enlace;

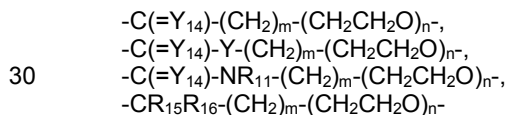
Y_{12} es O, S, o NR_{14} ;

20 R_{11-14} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenoilo C_{2-6} , alquinoilo C_{2-6} , alquilo C_{3-19} ramificado, cicloalquilo C_{3-8} , alquilo C_{1-6} sustituido, alquenoilo C_{2-6} sustituido, alquinoilo C_{2-6} sustituido, cicloalquilo C_{3-8} sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroalquilo C_{1-6} , heteroalquilo C_{1-6} sustituido, alcoxi C_{1-6} , ariloxi, heteroalcoxi C_{1-6} , heteroariloxi, alcanoilo C_{2-6} , arilcarbonilo, alcoxicarbonilo C_{2-6} , ariloxicarbonilo, alcanoiloxi C_{2-6} , arilcarboniloxi, alcanoilo C_{2-6} sustituido, arilcarbonilo sustituido, alcanoiloxi C_{2-6} sustituido, ariloxicarbonilo sustituido, arilcarboniloxi C_{2-6} sustituido y alcanoiloxi sustituido;

25 (a_{11}) , (a_{12}) , y (b_{11}) son independientemente cero o un número entero positivo, preferentemente 0-6, y más preferentemente 0, 1, o 2; y

(n) es un número entero de 10 aproximadamente a 2300 aproximadamente.

Como ejemplo, el PEG puede estar funcionalizado de la siguiente manera no limitante:



en la que

R_{11} , R_{15} y R_{16} se seleccionan independientemente entre H, alquilos C_{1-6} , arilos, arilos sustituidos, aralquilos, heteroalquilos, heteroalquilos sustituidos y alquilos C_{1-6} sustituidos;

35 (m) es cero o es un número entero positivo, y preferentemente 1 o 2;

Y_{14} es O o S; y

(n) representa el grado de polimerización.

En estos aspectos, el polímero (grupo R) incluye un grupo de protección terminal, es decir, un grupo que se encuentra en el extremo del polímero. El grupo de protección terminal se puede seleccionar entre cualquiera de NH_2 , OH, SH, CO_2H , alquilos C_{1-6} , preferentemente metilo, como entienden por tales grupos los expertos en la materia.

40 En un aspecto adicional, la parte polimérica del conjugado puede ser una que ofrezca múltiples puntos de unión para la ADA. Por otra parte, pueden estar unidos varios PEG a la ADA.

La farmacocinética y otras propiedades de la ADA pegilada se pueden ajustar según sea necesario para una aplicación clínica deseada mediante la manipulación del peso molecular del PEG, la química del grupo de enlace y la proporción de cadenas de PEG a la enzima.

45 En estos aspectos, la ADA se puede unir al polímero no antigénico en forma liberable o no liberable a través de diversos grupos de enlace conocidos en la técnica.

Los sistemas de polímeros liberables pueden estar basados en la eliminación de bencilo o la lactonización de bloqueo con trimetilo. Los grupos de enlace de polímeros activados de los sistemas de polímeros liberables se pueden preparar según las patentes de Estados Unidos n.º 6.180.095, 6.720.306, 5.965.119, 6.624.142 y 6.303.569 cedidas en común, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia. Como alternativa, los conjugados de ADA-polímero se preparan usando ciertos restos de polímeros de bicina tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 7.122.189 y 7.087.229 cedidas en común y las solicitudes de patente de Estados Unidos n.º 10/557.522, 11/502.108 y 11/011.818, que se incorporan en el presente documento por referencia.

55 También se describen otros sistemas de polímeros liberables contemplados en el documento PCT/US07/78600,

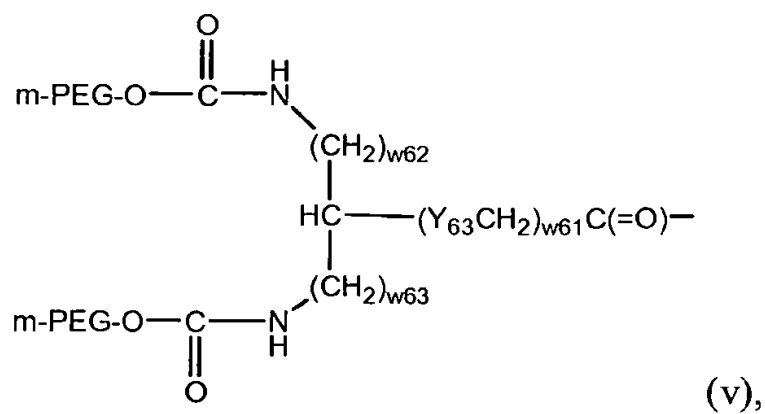
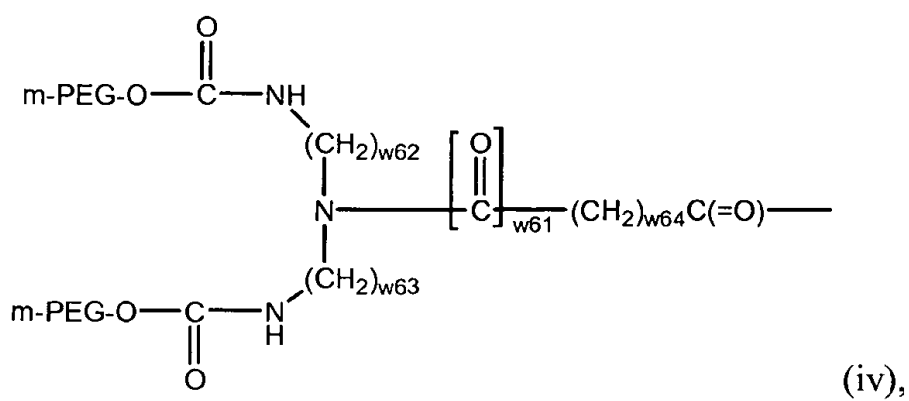
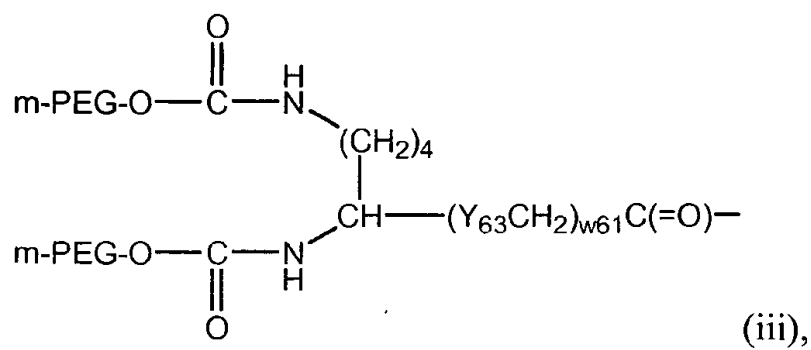
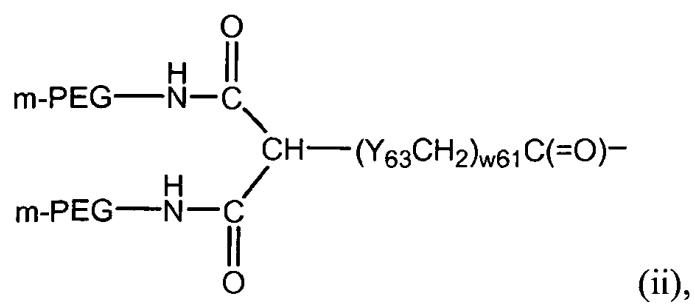
La conjugación del polímero preferentemente es una reacción de pegilación, reacciones que son conocidas por los expertos en la materia. En pocas palabras, la muteína rbADA o rhADA se hace reaccionar con un polímero activado para formar conjugados ADA-polímero. En este sentido, se puede utilizar una amplia variedad de polietilenglicoles activados o funcionalizados, incluyendo los descritos, por ejemplo en las patentes de Estados Unidos n.º 5.122.614, 5.324.844, 5.612.460 y 5.808.096 cedidas en común (polietilenglicol activado por carbonato de succinimidilo (SC-PEG) y PEGs activados relacionados), la patente de Estados Unidos n.º 5.349.001 (PEG activados con imida tiona cíclica), la patente de Estados Unidos n.º 5.650.234, y otras conocidas por los expertos en la materia. La divulgación de cada una de las anteriores se incorpora en el presente documento por referencia. Véanse también los polímeros activados disponibles en Nektar/Shearwater Polymers. Los expertos pueden utilizar diversas formas activadas de los polímeros para su unión sin experimentación indebida.

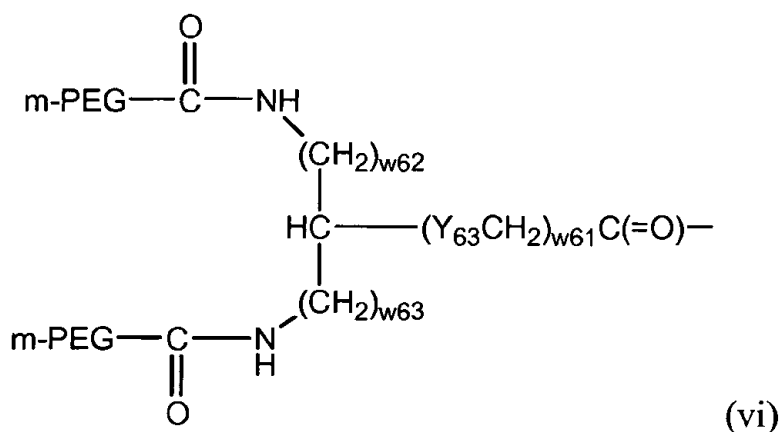
En estos aspectos, el óxido de polialquileno se conjuga a la proteína mediante la química del grupo de enlace incluyendo, por ejemplo, grupos de enlace a base de carbonato de succinimidilo, tiazolidina tiona, uretano, y amida. Preferentemente, el óxido de polialquileno se une covalentemente a un grupo épsilon amino de una Lys en la ADA, aunque en la técnica son muy conocidos otros sitios para la unión covalente. Los conjugados poliméricos de la ADA pueden incluir al menos 5 cadenas de polietilenglicol unidas a grupos épsilon amino de la Lys en la enzima, pero, como alternativa, pueden incluir 11-18 cadenas de PEG aproximadamente unidas a los grupos épsilon amino de la Lys en la enzima.

De lo anterior será evidente que los aspectos adicionales de la invención incluyen el uso de cualquier PEG activado o polímero similar presentados o disponibles en el mercado para conjugar la enzima ADA o un fragmento de la misma con el fin de proporcionar conjugados útiles para los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, el catálogo de pegilación avanzada de Nektar de 2004 (Nektar, San Carlos, California), que se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia.

Los PEG activados pueden incluir derivados lineales, ramificados o de U-PEG, tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.681.567, 5.756.593, 5.643.575, 5.919.455, 6.113.906, 6.566.506, 6.153.655, 6.395.266 y 6.638.499, 6.251.382 y 6.824.766 (también incorporadas en el presente documento por referencia). Una lista no limitante de dichos polímeros corresponde a los sistemas de polímeros (i)-(vii) con las siguientes estructuras:







en la que:

Y_{61-62} son independientemente O, S o NR_{61} ;

Y_{63} es O, NR_{62} , S, SO o SO_2

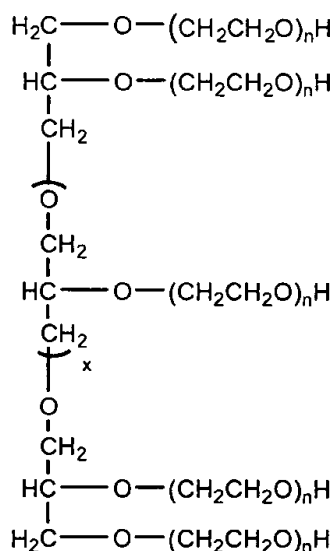
(w62), (w63) y (w64) son independientemente 0 o un número entero positivo, preferentemente de 0 aproximadamente a 10 aproximadamente, más preferentemente de 1 aproximadamente a 6 aproximadamente; (w61) es 0 o 1;

mPEG es metoxi PEG

en el que PEG se ha definido anteriormente y el peso molecular total de la parte polimérica se encuentra entre 2000 aproximadamente a 100.000 Daltons aproximadamente; y

R_{61} y R_{62} son independientemente los mismos restos que se pueden utilizar para R_{11} .

Además se entiende que, aparte de los polímeros a base de PEG, también se pueden usar algunos otros óxidos de polialquileño. Por ejemplo, los conjugados de la presente invención se pueden preparar por procedimientos que incluyen la conversión los productos de PEG-OH de varios brazos y "estrella-PEG", tales como los descritos en el catálogo 2001 de Shearwater Corporación "Polietilenglicol y derivados para su aplicación biomédica". Véase también el catálogo del Sistema de administración de medicamentos de NOF Corp., Ver. 8, abril de 2006. La descripción de cada uno de ellos se incorpora en el presente documento por referencia. Los polímeros de múltiples brazos contienen cuatro o más brazos de polímero y preferentemente cuatro u ocho brazos de polímero. Para fines ilustrativos y no de limitación, el resto de polietilenglicol de múltiples brazos (PEG) puede ser de la fórmula:

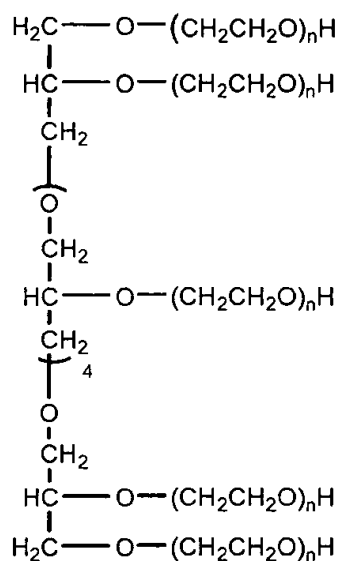


en la que:

(x) es 0 y un número entero positivo, es decir, de 0 aproximadamente a 28 aproximadamente; y

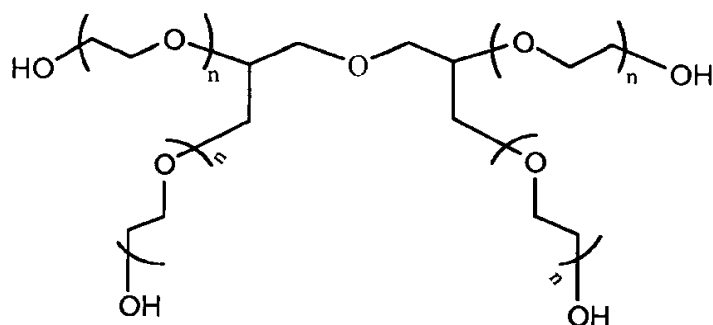
(n) es el grado de polimerización.

En una realización particular de la presente invención, el PEG de múltiples brazos tiene la estructura:

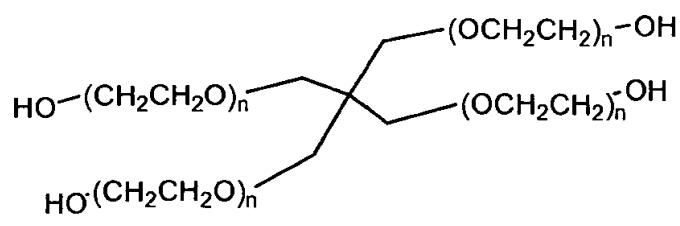


en la que (n) es un número entero positivo. En una realización preferida de la invención, los polímeros tienen un peso molecular total de 2000 Da aproximadamente a 100.000 Da aproximadamente, y preferentemente de 4000 Da a 45.000 Da.

- 5 En otra realización particular, el PEG de múltiples brazos tiene la estructura:

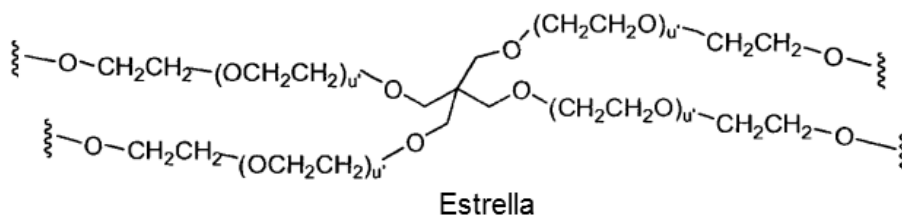


o

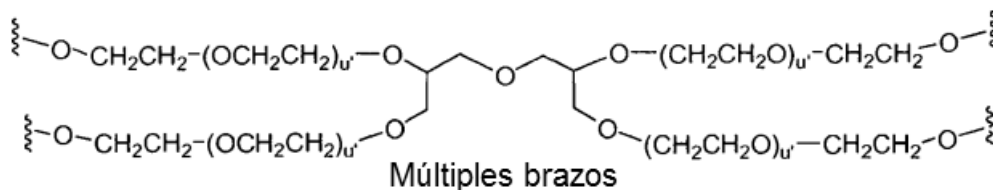


- 10 en la que n es un número entero positivo. En una realización preferida de la invención, los polímeros tienen un peso molecular total de 2000 Da aproximadamente a 100.000 Da aproximadamente, y preferentemente de 4000 Da a 45.000 Da.

Los polímeros se pueden convertir en un polímero convenientemente activado, usando las técnicas de activación que se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 5.122.614 o 5.808.096. Específicamente, dichos PEG pueden ser de la fórmula:



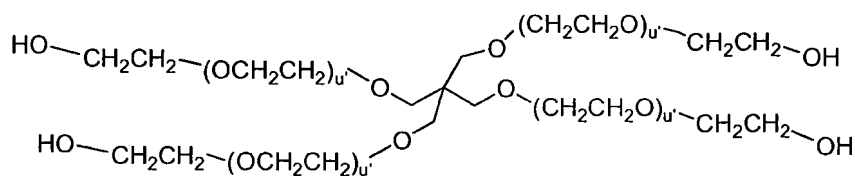
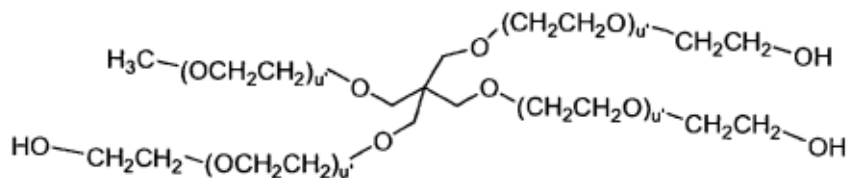
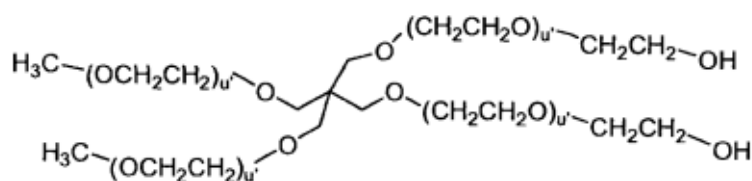
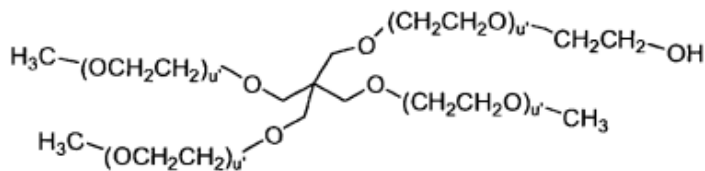
o

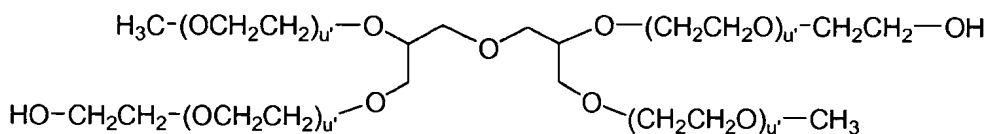
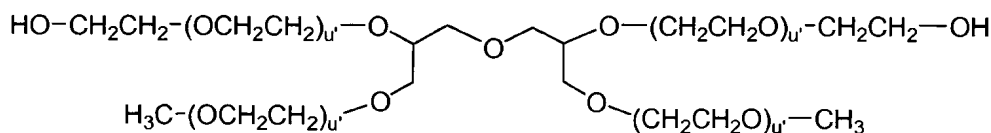
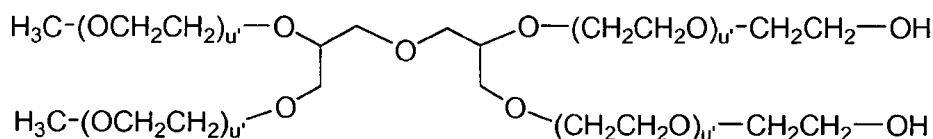
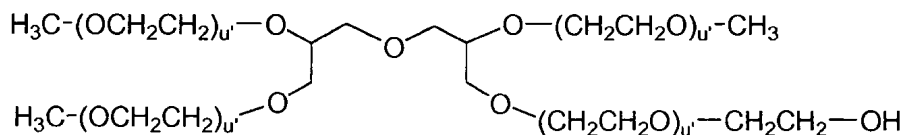
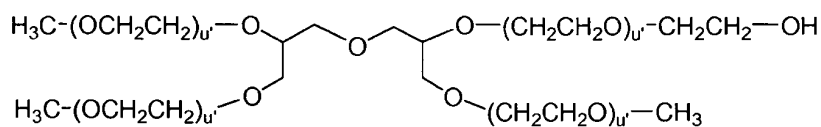


5 en las que:

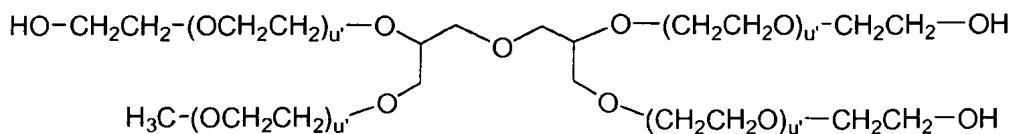
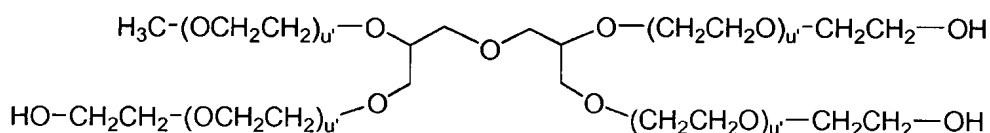
(u') es un número entero de 10 aproximadamente a 570 aproximadamente, para proporcionar preferentemente polímeros que tienen un peso molecular total de 2000 Da aproximadamente a 100.000 Da aproximadamente, y preferentemente, de 4000 Da aproximadamente a 45.000 Da aproximadamente; y hasta 3 porciones terminales de los restos están protegidas terminalmente con un metilo u otro alquilo inferior.

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

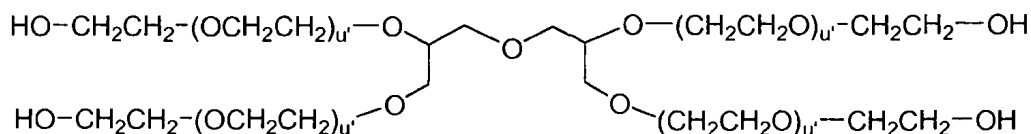




5



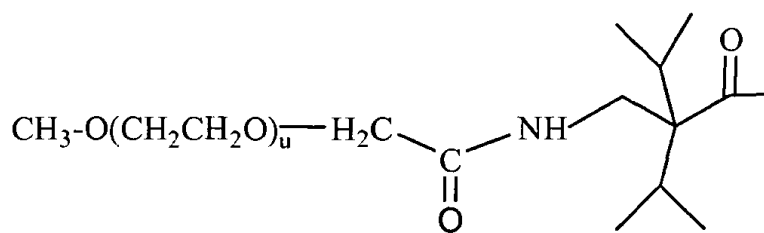
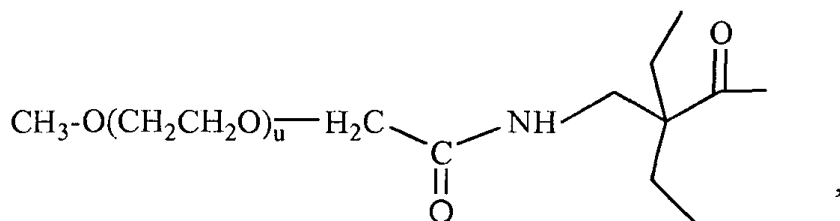
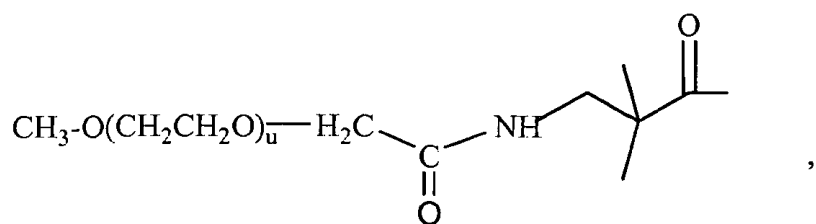
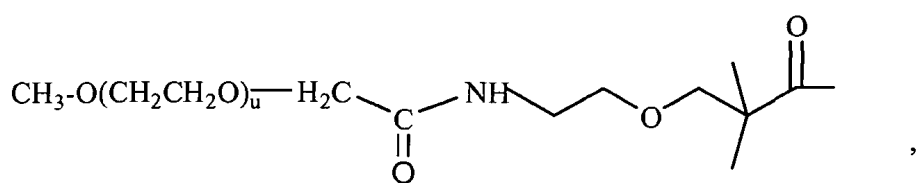
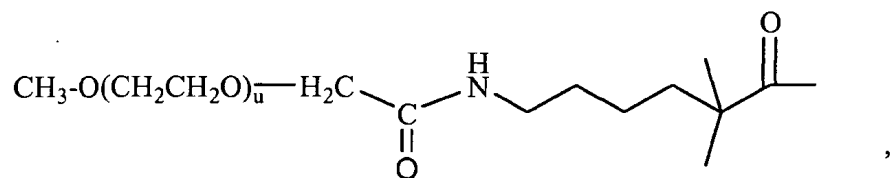
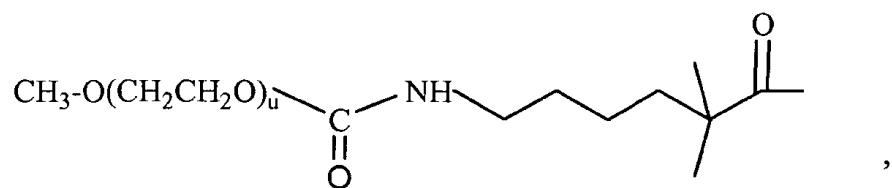
y



- 10 En los aspectos más preferidos de la invención, el polietilenglicol activado es uno que proporciona un enlace de uretano o enlace de amida con la proteína.

En otros aspectos alternativos, los polímeros activados pueden emplear un grupo de enlace a base de éster impedido. Véase el documento PCT/US07/78593 titulado "Óxidos de polialquileño que tienen grupos de enlace biodegradables a base de éster impedido", cuyo contenido se incorpora por referencia. Por ejemplo, una lista no

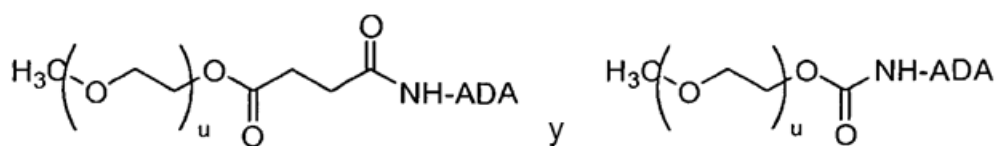
limitante de dichos compuestos incluye:



Y

en la que (u) es un número entero para proporcionar preferentemente polímeros que tienen un peso molecular total de 2000 Da aproximadamente a 100.000 Da aproximadamente.

En una realización preferida, el conjugado de PEG incluye



en las que (u) es un número entero para proporcionar la parte polimérica que tiene un peso molecular de 2000 Da aproximadamente a 100.000 Da aproximadamente, y preferentemente de 4000 Da aproximadamente a 45.000 Da aproximadamente, aún más preferentemente de 5000 Da aproximadamente.

Los polímeros adecuados variarán sustancialmente en peso. Para los efectos de la presente invención se suelen seleccionar polímeros que tienen pesos moleculares promedio en número que oscilan entre 2000 aproximadamente y 100.000 aproximadamente. Se prefieren pesos moleculares de entre 4000 aproximadamente y 45.000 aproximadamente y se prefieren en particular entre 5000 y 12.000 aproximadamente. Las sustancias poliméricas incluidas preferentemente también son solubles en agua a temperatura ambiente. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileño tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, sus copolímeros y sus copolímeros en bloque, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros en bloque. Además de mPEG, también son útiles polímeros terminados en alquilo C₁₋₄.

Los procedimientos para preparar polímeros que tienen ácidos carboxílicos terminales de alta pureza se describen en la Solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/328.662, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia. Los procedimientos incluyen primero la preparación de un éster de alquilo terciario de un óxido de polialquileño, seguido por la conversión en su derivado de ácido carboxílico. La primera etapa de la preparación de los ácidos carboxílicos de PAO del procedimiento incluye la formación de un intermedio tal como éster terc-butilo del ácido carboxílico de óxido de polialquileño. Este producto intermedio se forma por reacción de un PAO con un haloacetato de t-butilo en presencia de una base tal como t-butoxido 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 óxido de polialquileño con purezas superiores al 92 %, preferentemente superior al 97 %, más preferentemente superior al 99 % y más preferentemente superior al 99,5 % de pureza.

En otros aspectos alternativos, se pueden emplear polímeros que tienen grupos amino terminales para preparar los conjugados de la ADA. Los procedimientos de preparación de polímeros que contienen aminas terminales en alta pureza se describen en las Solicitudes de patente de Estados Unidos n.º 11/508.507 y 11/537.172, cuyos contenidos se incorporan por referencia. Por ejemplo, polímeros que tienen azidas reaccionan con un agente reductor a base de fosfina tal como trifenilfosfina o un agente reductor de borohidruro de un metal alcalino tal como NaBH₄. Como alternativa, los polímeros que incluyen grupos salientes reaccionan con sales de amina protegida como la sal de potasio de imidodicarbonato de metil-terc-butilo (KNMeBoc) o la sal de potasio de imidodicarbonato de di-terc-butilo (KNBoc₂), seguido de la desprotección del grupo amina protegida. La pureza de los polímeros que contienen las aminas terminales formadas por estos procedimientos es superior al 95 % aproximadamente y preferentemente superior al 99 %.

La ramificación proporcionada por los polímeros de la patente 6.153.655, citada anteriormente, permite la ramificación secundaria o terciaria como modo de incrementar la carga de polímero en una molécula biológicamente activa a partir de un único punto de unión. Se entenderá que el polímero soluble en agua se puede funcionalizar por unión a los grupos de enlace bifuncionales, si fuera necesario, sin experimentación indebida.

Las sustancias poliméricas incluidas en este documento preferentemente son solubles en agua a temperatura ambiente. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileño tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, sus copolímeros y sus copolímeros en bloque, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros en bloque.

Como alternativa a los polímeros a base de PAO, se pueden usar materiales efectivamente no antigénicos tales como dextrano, polivinilpirrolidonas, poliacrilamidas tales como HPMA (hidroxipropilmetacrilamidas), alcoholes de polivinilo, polímeros a base de carbohidratos, copolímeros de los anteriores, y similares. Los expertos en la materia se darán cuenta de que la lista anterior es meramente ilustrativa y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas en el presente documento. Para los fines de la presente invención, "esencial o efectivamente no antigénico" significa todos los materiales conocidos en la técnica como no tóxicos y que no provocan una respuesta inmunogénica apreciable en mamíferos.

D. Utilidad

El experto apreciará que la muteína ADA de la invención se emplea fácilmente en un entorno clínico para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno sensible a la enzima ADA. Dicha enfermedad o trastorno es uno que responda a la reducción de los niveles de la adenosina o desoxiadenosina en tejido o sangre. Una enfermedad o trastorno de este tipo puede incluir, por ejemplo, IDCG, enfermedades pulmonares, por ejemplo, asma, y cánceres que responden a la disminución de los niveles locales o sistémicos de adenosina o desoxiadenosina. Se proporcionan más detalles sobre el uso de ADA en el tratamiento de tumores o cánceres en la patente de Estados Unidos n.º 8.741.283 de propiedad conjunta presentada en la misma fecha que la presente (que reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/913.039), titulada: "Terapia enzimática contra el cáncer", e incorporada en su totalidad en el presente documento por referencia. El agente de tratamiento puede ser, por ejemplo, la enzima muteína rhADA o muteína rbADA. Preferentemente, la muteína rADA de tratamiento está conjugada con polímero, como se describe más arriba, por ejemplo, pegilada. La dosificación de la ADA o la ADA conjugada con polímero se individualiza dependiendo de la respuesta clínica del

tumor y del perfil de efectos secundarios de un paciente individual, ya sea animal o un ser humano. En el ejemplo de estudio proporcionado en el presente documento a continuación, la dosis más alta es la dosis viable máxima que se tolera.

5 Por ejemplo, Adagen® se suministra a nivel comercial como 250 U de ADA bovina/ml. Esto se traduce en 2000 U/kg para un ratón de 25 g aproximadamente inyectado con 0,2 ml de Adagen®. Por supuesto, el experto apreciará que la dosis de ADA conjugada con polímero también se puede ajustar para el tamaño particular del polímero, la química del grupo de enlace, y la valencia. Por ejemplo, el régimen de dosificación para un conjugado polimérico que comprende dos o más enzimas ADA por polímero se ajustará según las unidades de ADA por ml de solución de cualquier conjugado de polímero particular de ADA.

10 Al suministrar la ADA o el conjugado de ADA PEG por inyección, preferentemente se ajusta el intervalo de la dosis óptima mediante control plasmático. En general, es deseable proporcionar al receptor una dosis que mantenga la actividad de la ADA en plasma (concentraciones mínimas) en el intervalo de 10 aproximadamente a 100 $\mu\text{mol/h/ml}$ aproximadamente, preferentemente de 15 aproximadamente a 35 $\mu\text{mol/h/ml}$ aproximadamente (a 37 °C); y demostrar una disminución de la adenosina en eritrocitos, es decir, dATP a $\leq 0,001\text{-}0,057 \mu\text{mol/ml}$ aproximadamente, preferentemente de 0,005-0,015 $\mu\text{mol/ml}$ aproximadamente en eritrocitos empaquetados, o $\leq 1\%$ aproximadamente de la adenosina total en eritrocitos (es decir, contenido de ATP + dATP), con un nivel normal de adenosina, tal como se mide en una muestra de pre-inyección. El valor normal de dATP es inferior a 0,001 $\mu\text{mol/ml}$ aproximadamente.

20 La dosis en base a la cantidad de enzima estará en el intervalo de, por ejemplo, 0,10 U/kg aproximadamente hasta 30 U/kg aproximadamente, o superior, preferentemente de 0,5 U/kg aproximadamente hasta 20 U/kg aproximadamente, y más preferentemente de 0,5 U/kg hasta 12 U/kg aproximadamente (es decir, por kg de peso corporal del paciente) tal como de 0,5 U/kg aproximadamente hasta 5 U/kg aproximadamente. Una dosis semanal total puede ser de hasta 40 U/kg, o superior, dependiendo de la tolerancia del receptor. Se permiten aumentos adicionales de 5 U/kg/semana, hasta una dosis única máxima de 30 U/kg, o superior, dependiendo de la tolerancia del receptor. En general, después de inyecciones semanales de Adagen® a 15 U/kg, el nivel mínimo medio de actividad de ADA en plasma es de entre 20 y 25 $\mu\text{mol/h/ml}$.

Se debe tener en cuenta que una dosis de 100 U/kg es la dosis equivalente de ratón de una dosis clínica en niño de 12 U/kg aproximadamente.

30 Los detalles de la información acerca de la dosificación de ADA son conocidos en la técnica como se describe en el prospecto para Adagen® (Enzon, Inc.), cuyos contenidos se incorporan en el presente documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para proporcionar una apreciación adicional de la invención pero no están destinados en modo alguno a restringir el alcance efectivo de la invención.

Ejemplo 1

35 Construcción de la cepa de expresión de *E. coli* que expresa ADA humana recombinante con un cambio de Cys a Ser en la posición 74 de la proteína madura

La secuencia de 363 aminoácidos presentada de la adenosina desaminasa humana (GenBank NP_000013, incorporado por referencia en este documento) se analizó para la presencia de codones de cisteína. Cinco posiciones en el polipéptido maduro (se escinde la Met N-terminal) codifican para cisteína (C74, C152, C153, C168, C261). En el gen diseñado y modificado que expresa ADA humana, solo uno de estos cinco codones de cisteína (cisteína 74, TGC) se ha cambiado por un codón de serina (TCC) (esta es la posición 75 en la proteína traducida). La secuencia polipeptídica definida (véase SEQ ID NO: 3) se suministró a la Blue Heron Corporation (Bothell, Washington, EE.UU.) para la síntesis génica total de un nuevo gen que tiene codones optimizados para la expresión en *E. coli*, usando síntesis química convencional de superposición de segmentos de oligonucleótidos. En resumen, la secuencia se ha optimizado para la expresión bacteriana, siguiendo el uso de codones convencionales de bacterias para *Escherichia coli* K12, usando los datos de codones descritos por Grantham R. y col.; 1981, "Codon catalogue usage in genome strategy modulated for gene expressivity," Nucleic Acid Res. 9:r43-r47, y Lathe, R. 1985, "Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data, Theoretical and practical considerations." J. Mol Biol; 183:1-12.

50 A continuación, se analizó la secuencia correspondiente de ARN para la formación de la estructura de horquilla o la formación de bucle y se sometió a cálculos de energía libre mínima. Se incluyeron los sitios de restricción que flanquean, NdeI y BamHI, en los extremos del gen. Después de la digestión del ADN sintético con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, el gen de 1,1 kilobases se ligó mediante ADN ligasa de T4 en el plásmido vector pET-28a (Novagen Corporation), que también se había digerido con estas dos enzimas. El plásmido recombinante se introdujo en la cepa de *E. coli* BLR (DE3) o HMS174 (DE3) mediante electroporación usando un BTX Electro Cell Manipulator 600 según las instrucciones del fabricante. La mezcla de transformación se sembró en placas de agar LB que contienen kanamicina (15 $\mu\text{g/ml}$) con el fin de permitir la selección de las colonias que contienen el plásmido

pET-28a/ADAcysSer (designado ADAC75s/pET28a:BLR (DE3) o ADAC75s/pET28a:HMS174 (DE3)). La secuencia de nucleótidos del gen de la variante ADA se verificó por análisis de la secuencia de ADN con un analizador genético ABI Prism 310 usando Big Dye Terminators. La secuencia de ADN que codifica el marco de lectura abierto Ser₇₄-rhADA está de acuerdo con la SEQ ID NO: 4.

- 5 Las colonias aisladas se purificaron adicionalmente en placas y se analizaron para la expresión génica inducible por isopropilo (β -D-1-tiogalactopiranosido ("IPTG")) en medio LB por procedimientos convencionales tales como los descritos en el Manual de Sistema pET de Novagen, novena edición, incorporado en el presente documento por referencia.

- 10 Se examinaron varios parámetros de inducción incluyendo el tiempo, la temperatura y la concentración de inductor. Una condición preferida era la inducción con IPTG 50 mM durante 12 horas a 25 °C, lo que permitió un alto nivel de producción de ADA dentro del citoplasma de la bacteria huésped al 20 % aproximadamente de la proteína celular total. Se confirmó que la proteína ADA expresada en el análisis de SDS PAGE presenta el peso molecular correcto de 40 kDa aproximadamente (datos no mostrados).

Ejemplo 2

- 15 Construcción de la cepa de expresión de *E. coli* que expresa ADA bovina recombinante con un cambio de Cys a Ser en la posición 74 de la proteína madura

- La proteína ADA madura purificada derivada de preparaciones de intestino bovino es una proteína de 356 aminoácidos que carece de la metionina N-terminal y también carece de los seis restos C-terminales finales predichos de la secuencia de ADNc (GenBank NP_776312, incorporado por referencia en este documento). La secuencia de aminoácidos de ADA bovina se analizó para la presencia de codones de cisteína. Cinco posiciones en el polipéptido maduro codifican cisteína (C74, C152, C153, C168, C261). En el gen sintético de ADA bovino diseñado y modificado, solo una de estas cinco posiciones de cisteína (cisteína 74) se cambió por un resto de serina. Esto se realizó insertando un codón de serina (TCC) en lugar del codón de cisteína normal en la posición 74 del polipéptido maduro (o la posición 75 del producto de traducción). También se optimizaron los codones del gen para la expresión en *E. coli*.

- En resumen, la secuencia polipeptídica definida (véase SEQ ID NO: 1) se proporcionó a Biocatalytics Inc. para la síntesis génica completa de un nuevo gen que tiene codones optimizados para la expresión en *E. coli*, usando sus procedimientos que incluyen la síntesis química de superposición de segmentos de oligonucleótidos. Los procedimientos de Biocatalytics se describen con mayor detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.366.860, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad en el presente documento por referencia.

- Se ha investigado la expresión de ADA bovina en varios sistemas de expresión. Por ejemplo, se incluyeron los sitios de restricción que flanquean, NdeI y BamHI, en los extremos del gen. Después de la digestión del ADN sintético con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, el gen de 1,1 kilobases se ligó mediante ADN ligasa de T4 en el plásmido vector pET-9d (Novagen Corporation), que también se había digerido con estas dos enzimas. El plásmido recombinante se introduce en la cepa de *E. coli* BLR (DE3) o HMS174 (DE3) mediante electroporación usando un BTX Electro Cell Manipulator 600 según las instrucciones del fabricante. La mezcla de transformación se sembró en placas de agar LB que contenían kanamicina (15 µg/ml) para permitir la selección de las colonias que contienen el plásmido pET-9d/bADA (designado bADA/pET9d: BLR (DE3) o bADA/pET9d: HMS 174 (DE3)). La secuencia de nucleótidos del gen de la variante ADA se verificó por análisis de la secuencia de ADN con un analizador genético ABI Prism 310 usando Big Dye Terminators. La molécula de ADN que codifica la muteína de ADA se muestra en la SEQ ID NO: 2.

- Las colonias aisladas se purificaron adicionalmente en placas y se analizaron para la expresión génica inducible por IPTG en medio LB por procedimientos convencionales tales como los descritos en el Manual de Sistema de pET Novagen, Novena Edición. Se examinaron varios parámetros de inducción incluyendo el tiempo, la temperatura y la concentración de inductor. Una condición preferida era la inducción con el 0,3 % de lactosa durante 12 horas a 37 °C, lo que permitió un alto nivel de producción de ADA dentro del citoplasma de la bacteria huésped al 20 % aproximadamente de la proteína celular total. Se confirmó que el producto de la ADA en el análisis de SDS-PAGE presenta el peso molecular correcto de 40 kDa aproximadamente.

Ejemplo 3

- 50 Purificación de la proteína muteína rhADA

- La purificación de la muteína rhADA se llevó a cabo en un protocolo de 3 cromatografías desarrollado por Enzon. La fermentación bacteriana se llevó a cabo para *E. coli* que expresa la proteína rhADA a partir de un gen sintético en el plásmido pET28a (Novagen) en la célula huésped HMS174 (DE3). Se incluyeron rifampicina (200 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml) en un medio de glicerol mínimo suplementado con extracto de levadura (30 g/l) y las células se cultivaron a 28 °C hasta una DO₆₀₀ de 11 cuando se añadió el inductor IPTG a una concentración final de 5 mM. Después de 40 horas (DO₆₀₀ ~110), las células se recogieron por centrifugación y se congelaron a -20 °C. Brevemente, la pasta celular descongelada (50 g) se resuspendió en 1800 ml de tampón Tris 10 mM [tris

hidroximetilaminometano], DTT 1 mM, pH 8,0, y se homogeneizó a 1200 rpm durante 10 segundos con Tempest Virtis (Sentry™, Microprocessor, Boston, MA). Esta suspensión se pasó a través de una malla de acero inoxidable (micrómetro de apertura 250 μ , n.º 60, WS Tyler) para eliminar las partículas grandes. La suspensión celular homogénea se microfluidizó durante 3 ciclos a 15.000 psi (la unidad estaba bañada en hielo) (Micro Fluidizer, Microfluidics Corp., Modelo # 110Y, Boston, MA). Al final de la microfluidización se usaron 200 ml del mismo tampón que se había usado antes para enjuagar la unidad y esta solución se combinó con la suspensión anterior. La proteína soluble de los lisados celulares se extrajo por centrifugación a 16.000 rpm durante 40 minutos a 4 °C (Sorvall RC 5C® plus, rotor SLA-1000). El sobrenadante se recogió cuidadosamente para evitar la mezcla no deseada. El pH se ajustó a 8,0, y se añadió $MgCl_2$ 1 mM y 20 mg/ml de DNasa y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El pH se ajustó a 6,5 con HCl 1 N. Se llevó a cabo una segunda centrifugación como anteriormente, se recogió el sobrenadante, y se ajustó a EDTA 2 mM, seguido de filtración en una unidad de filtro de 90 mm Nalgene®. El volumen del sobrenadante filtrado era de 500 ml, la concentración total de proteína por el procedimiento de BCA era de 8,5 mg/ml.

El extracto de células (100 ml) se ajustó a pH 7,2, 4,5 mS/cm y se cargó sobre HiTrap® DEAE ff (ff indica "flujo rápido") en Bis-Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,5 y se eluyó con Bis-Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 6,5. Las fracciones de los picos se identificaron mediante un ensayo enzimático y SDS-PAGE y se ajustó a sulfato de amonio 1,5 M en $NaHPO_4$ 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 $NaHPO_4$ 20 mM, pH 6,5. La fracción del pico (55 ml; 0,4 mg/ml) se diafiltró contra $NaHPO_4$ 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,5 y se cargó en HiTrap SP-Sepharose ff y se eluyó con $NaHPO_4$ 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 4

Purificación de la proteína ADA bovina recombinante

La purificación de la muteína rbADA expresada por el clon del Ejemplo 2 se llevó a cabo en un protocolo de 3 cromatografías desarrollado por Enzon. Brevemente, la pasta celular descongelada (obtenida de Blue Hereon o Biocatalytics, respectivamente) de 200 g que se almacenó a -80 °C se re-suspendió en 1800 ml de tampón Bis-Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4, y se homogeneizó a 1200 rpm durante 5 min con Tempest Virtis (Sentry™, Microprocessor, Boston, MA). Esta suspensión se pasó a través de una malla de acero inoxidable (micrómetro de apertura 250 μ , n.º 60, WS Tyler) para eliminar las partículas grandes. La suspensión celular homogénea se microfluidizó durante 3 ciclos a 15.000 psi (la unidad estaba bañada en hielo) (Micro Fluidizer, Microfluidics Corp., Modelo # 110Y, Boston, MA). Al final de la microfluidización se usaron 200 ml del mismo tampón que se había usado antes para enjuagar la unidad y esta solución se combinó con la suspensión anterior. La proteína soluble de los lisados celulares se extrajo por centrifugación a 7100 rpm (12.000 x g) durante 60 minutos a 4 °C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor # JLA8.1000). El sobrenadante se recogió cuidadosamente para evitar la mezcla no deseada.

Para eliminar los nucleótidos en este extracto de células, se añadió polietilenimina (PEI) al sobrenadante anterior (0,15 % final, en p/v) y se mezcla a fondo agitando durante 10 min. Este extracto de células se deja a 4 °C durante toda la noche. El precipitante de esta muestra durante toda la noche se eliminó por centrifugación a 7100 rpm (12.000 x g), durante 60 minutos a 4 °C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor # JLA8.1000). Del mismo modo, el sobrenadante se recogió con cuidado para evitar cualquier mezcla no deseada. Para ayudar a que la ADA se uniese a la primera columna, se añadió lentamente PEG4600 al 10 % a este extracto de células y el pH de este extracto de células se ajustó lentamente a 6,5 con NaOH 1 N y HCl 1N. Este sobrenadante se centrifugó de nuevo a 7100 rpm (12.000 x g), durante 60 minutos a 4 °C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor # JLA8.1000) antes de cargarlo en la columna siguiente.

El extracto celular se cargó en una columna Capto Q preequilibrada (Cat # 17-5316-01, GE Healthcare, Piscataway, NJ; volumen de lecho 350 ml pre-enpaquetados en una columna XK-50) con un tampón Bis-Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5. Antes de eluir la ADA de la columna en NaCl 80 mM en el tampón de equilibrado, primero se realizaron eluciones en NaCl 60 mM y 70 mM para eliminar las impurezas. El perfil de elución se analizó por la actividad de la ADA, el análisis SDS-PAGE, las transferencias Western, y RP-HPLC.

Después de la columna Capto Q, se usaron dos purificaciones cromatográficas de interacción hidrófoba ("HIC"), una por una, para aumentar aún más la pureza de la proteína. La primera HIC fue Octyl Sepharose 4FF (Cat # 17-0946-02, GE Healthcare, Piscataway, NJ). El total de las fracciones de ADA de la columna Capto Q se ajustó a 1,5 M $(NH_4)_2SO_4$ directamente con polvo de sulfato de amonio y el pH se ajustó a 6,5. La muestra filtrada (Nalgene Nunc, Cat # 540887, MEMB 0,2 PES, Rochester, NY) se cargó en la primera columna de HIC que se equilibró previamente con $(NH_4)_2SO_4$ 1,5 M, fosfato de potasio 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5 (150 ml de volumen del lecho, en XK-50, GE Healthcare, Piscataway, NJ). La proteína de ADA se eluyó con un gradiente de sulfato de amonio y el perfil de pureza de esta elución se determinó por SDS-PAGE y RP-HPLC. La proteína ADA se reunió en las fracciones de la primera columna de HIC y se ajustó a $(NH_4)_2SO_4$ 1 M y se cargó directamente en la segunda columna (150 ml de volumen del lecho HIC, XK-50, HIC Phenyl HP, Cat # 17-1082 -01, Piscataway, NJ), que se equilibró previamente con $(NH_4)_2SO_4$ 1 M, KH_2PO_4 - K_2HPO_4 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5. La ADA se eluyó con un gradiente de sulfato de amonio de 1 M a 300 mM en KH_2PO_4 - K_2HPO_4 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5. Se analizó la pureza de la ADA de estas

fracciones mediante SDS-PAGE y RP-HPLC. La rbADA o rhADA purificada se desalinizó 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 5

5 Estudios de estabilidad sobre rbADA y Ser₇₄-rbADA

Se realizaron los siguientes estudios para demostrar que realmente se ha mejorado la estabilidad de la rbADA frente a la degradación oxidativa mediante la mutación de cys74 a ser. Se usaron muestras de ADA bovina recombinante (rbADA) y la ADA bovina recombinante mutada de cys74 a ser74 (Ser₇₄-rbADA) a concentraciones de 0,5 mg/ml aproximadamente en tampón de fosfato sódico (pH 7,8) para el estudio de estabilidad. La estabilidad se controló por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) usando tanto detección UV a 220 nm como detección de espectrometría de masas (espectrómetro de masas de electropulverización Micromass Q-TOF). Las condiciones de HPLC eran las siguientes:

Columna:	Zorbax 300 SB-C8 (Agilent, 250 x 4,6 mm, tamaño de poro 300 angstrom, tamaño de partícula 5 micrómetros).	
Fase móvil A:	Ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua.	
Fase móvil B:	Ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo/agua (80/20; v/v).	
Gradiente:	Tiempo	% de Fase móvil B
	0	20
	5	20
	45	80
	46	20
	60	20
Temperatura de la columna:	40 °C.	
Caudal:	1,0 ml/min.	
Volumen de inyección:	50 µl.	

La pureza de los compuestos se determinó por análisis de RP-HPLC en el momento inicial en el que se comenzó el estudio de estabilidad y en varios puntos de tiempo, incluyendo a los 4, 8, y 17 días, después de iniciar el estudio. Cabe señalar que las muestras de rbADA (no-mutaina) tenían dos meses de edad aproximadamente al inicio de este estudio y ya habían sufrido cierta degradación. La muestra de Ser₇₄-rbADA estaba recién preparada y era relativamente pura. Sin embargo, para el fin del presente estudio, el parámetro pertinente a examinar es la diferencia de pureza entre el momento inicial y después de 17 días de incubación a 25 °C.

Como se muestra en la Tabla 1, la pureza de rbADA era del 83,7 % en el momento inicial y se redujo al 66,1 % después de 17 días, lo que indica que el 17,6 % de la rbADA se ha degradado durante este período de tiempo. El análisis de espectrometría de masas de los picos separados cromatográficamente indicaba que el principal producto de degradación que eluía a los 31,851 min, que representa el 30,5 % del área del cromatograma, tenía una masa 32 Da más alta que la de rbADA. Este cambio de masa es consistente con la adición de 2 oxígenos a la rbADA para formar el producto de degradación del ácido sulfínico de la cisteína libre en posición 74 de la rbADA. El pico de degradación más pequeño, que eluye a los 32,538 min, tenía una masa consistente con la adición de 1 de oxígeno a la rbADA para formar el producto de degradación del ácido sulfónico de la cisteína libre en posición 74 de la rbADA. La Ser₇₄-rbADA, que tiene un resto de serina que sustituye al resto reactivo de la cisteína 74, muestra poca degradación en el transcurso de 17 días, con purezas prácticamente idénticas en el momento inicial (97,2 %) y 17 días más tarde (97,9 %). Esto demuestra que la cisteína 74 es de hecho la fuente de la degradación oxidativa que se produce en la rbADA y la mutación de este resto de serina, que no es susceptible a la oxidación, elimina la degradación.

Tabla 1. Estabilidad de la rbADA, y la Ser₇₄-rbADA en tampón de fosfato sódico (pH 7,8) a 25 °C

Punto de tiempo	% de pureza según lo determinado por RP-HPLC	
	rbADA	Mut-rbADA
Inicial	83,7	Inicial
4 días	83,6	4 días
8 días	76,3	8 días
17 días	66,1	17 días

Ejemplo 6Uso de proteínas de la muteína de ADA en terapia de pacientes de IDCG con deficiencia de ADA

Se usan las enzimas ADA mutadas descritas en entornos terapéuticos que ahora emplean Adagen. La Ser₇₄-rb o rhADA se pueden modificar por conjugación con polietilenglicol (PEG), por ejemplo, con 11-17 polímeros de PEG de 5 kDa por proteína ADA. Se formulan preparaciones pegiladas de muteína ADA en solución salina estéril a un pH de 7,2-7,4 y a una concentración de 250 unidades por mililitro aproximadamente. La muteína ADA pegilada se administra a pacientes mediante administración parenteral, tal como por administración intramuscular. Los pacientes que se benefician de este tipo de tratamiento incluyen aquellos con enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave causada por una actividad insuficiente de la ADA. La administración de la muteína PEG-ADA normalmente es cada siete días con un calendario de dosificación de 10 U/kg para la primera dosis y 20 U/kg por semana para las dosis de mantenimiento. La Ser₇₄-rb o rh PEG-ADA se almacena a 2-8 °C en solución acuosa con una sola dosis por vial de 1,5 ml. El calendario de dosificación está diseñado para mantener los niveles de actividad de ADA en plasma a 15-35 µmol/h/ml (a 37 °C) y reducir el dATP de eritrocitos a ≤0,005-0,015 µmol/ml de eritrocitos empaquetados.

Ejemplo 7Preparación de Ser₇₄-rbADA pegilada mediante enlace de uretano

Se añade SC-PEG (polietilenglicol activado con carbonato de N-hidroxisuccinimidilo, 0,084 mmol) a una solución de Ser₇₄-rbADA (0,00027 mmol) en 3 ml de tampón de fosfato sódico (0,1 M, pH 7,8) con agitación suave. La solución se agita a 30 °C durante 30 minutos. Se usa una columna de GPC (Zorbax GF-450) para controlar la conjugación con PEG. Al final de la reacción (como resulta evidente por la ausencia de la 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 diafiltró con un concentrador Centriprep (Amicon) para eliminar el PEG sin reaccionar. Se prosiguió con la diafiltración según sea necesario a 4 °C hasta que no se detecta más PEG libre mezclando cantidades iguales de filtrado y 0,1 % de PMA (ácido polimetacrílico en HCl 0,1 M).

Ejemplo 8Preparación de Ser₇₄-rhADA pegilada mediante enlace de uretano

SC-PEG (0,084 mmol) se hace reaccionar con Ser₇₄-rhADA (0,00027 mmol) usando las mismas condiciones que se describen en el Ejemplo 7.

Ejemplo 9Preparación de Ser₇₄-rbADA pegilada mediante enlace amida

Se añade SS-PEG (polietilenglicol activado con succinato de N-hidroxisuccinimidilo, 0,084 mmol) a una solución de Ser₇₄-rbADA (0,00027 mmol) en 3 ml de tampón de fosfato sódico (0,1 M, pH 7,8) con agitación suave. La solución se agita a 30 °C durante 30 minutos. Se usa una columna de GPC (Zorbax GF-450) para controlar la conjugación con PEG. Al final de la reacción (como se pone de manifiesto por la ausencia de la 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 diafiltró con un concentrador Centriprep (Amicon) para eliminar el PEG sin reaccionar. Se prosiguió con la diafiltración según sea necesario a 4 °C hasta que no se detecta más PEG libre mezclando cantidades iguales de filtrado y 0,1 % de PMA (ácido polimetacrílico en HCl 0,1 M).

Ejemplo 10Preparación de muteína rhADA pegilada mediante enlace amida

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FILPULA, David R.
 YOUNGSTER, Stephen K.
 ENZON PHARMACEUTICALS, Inc.
 <120> ADENOSINA DESAMINASA RECOMBINANTE ESTABLE
 <130> 213.1282-PCT
 <140> Todavía no ha sido asignado
 <141> En la misma fecha
 <150> US 60/913.009
 <151> 20-04-2007
 <160> 5
 <170> PatentIn Versión 3.3

ES 2 569 940 T3

<210> 1
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Bovino
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (74).. (74)
 <223> muteína de Cys a Ser
 <400> 1

5

10

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		

ES 2 569 940 T3

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

ES 2 569 940 T3

Pro Ser Pro Ala
355

5
<210> 2
<211> 1074
<212> ADN
<213> Bovino
<400> 2

```

atggctcaga ccccggtttt caacaaaccg aaggtagaac tgcacgtaca cctggatggt      60
gctatcaaac cggagactat cctgtactat ggtcgttaagc gtggcatcgc tctgccggct      120
gacactccgg aagaactgca gaacatcatc ggcatggaca aaccgctgtc tctgccggaa      180
ttcctggcta aattcgacta ctacatgccg gctatcgctg gttctcgtga agcagtcaaa      240
cgtatcgctt acgaattcgt agaaatgaaa gctaaagatg gtgtagtata cgttgaagtt      300
cgttactctc cgcacctgct ggcaaaactct aaagttgaac cgatcccgtg gaaccaggca      360
gaaggcgatc tgactccgga tgaagtagtt tctctggtta accagggctc gcaggagggg      420
gaacgcgatt tcggcgtaaa agttcgttct atcctgtgct gcatgcgcca ccagccgtct      480
tggtcttctg aagttgttga actgtgcaag aaataccgtg agcagaccgt agttgctatc      540
gatctggcag gtgatgaaac catcgaaagg tcttctctgt ttccgggtca cgtaaaggct      600
tatgtggaag ctgttaaata tggcgtacac cgtactgtac acgcaggtga agttggttct      660
gctaacgttg ttaaagaage tgttgacacc ctgaaaactg aacgcctggg tcacggctac      720
cacaccctgg aagacaccac cctgtacaac cgtctgcgtc aggaaaacat gcacttcgaa      780
gtttgtccgt ggctcctctta cctgactggt gcttggaaac cggacaccga acacccggtt      840
gttcgtttca aaaacgacca ggtaaaactac tctctgaaca ctgacgatcc gctgatcttc      900
aaatctaccc tggacaccga ctaccagatg accaaaaacg aaatgggttt cactgaagaa      960
gaattcaaac gtctgaacat caacgctgct aagtcctctt ttctgccgga agatgagaaa     1020
aaagaactgc tggacctgct gtacaaggca tacggtatgc cgtctccggc ttaa          1074

```

10
<210> 3
<211> 362
<212> PRT
<213> Humano
15
<220>
<221> misc_feature
<222> (74).. (74)
<223> Muteína de Cys a Ser
20
<400> 3

ES 2 569 940 T3

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	
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				

ES 2 569 940 T3

	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
 <400> 4

5

atggctcaga caccgcatt tgataaacgc aaagtggaac tgcattgtcca cctggatggc	60
agcatcaaac cggaaactat cttatattac ggtcggcgctc gtggtattgc gttgccggca	120
aacacggctg aaggtttgct gaacgtgac gccatggaca aaccgctgac cttgccggat	180
tttttggcga aatttgatta ttatatgccg gcgattgctg gttcccgca ggcaatcaaa	240
cgcacgcgt atgagtttgt tgaaatgaaa gcgaaagaag gcgttgtgta tgttgaggtc	300
cgttacagtc cgcacgtgct ggctaacagc aaggtagaac ctatcccctg gaaccaagct	360
gaaggcgatc tgacgccgga tgaagtgggt gctctgggtg gtcagggttt acaggagggg	420
gagcgcgatt ttggcgtaa agctcgtct attttatgtt gcatgcgcca tcagcccaat	480
tggtccccga aagtgggtga actttgtaaa aagtaccaac aacagaccgt tgcgcgatt	540
gatttggcag gcgatgaaac aattccaggc agctccctgt tgccagggca cgtgcaagcg	600
taccaagaag cagtgaaaag cggcatccac cggactgtcc acgccggcga ggtcggtagc	660
gccgaggttg tgaaagaagc cgtggacatc ctgaaaaccg agcggctggg ccatgggtac	720

ES 2 569 940 T3

```

cacacactgg aggatcaggc attatataac cgcttacgcc aggaaaatat gcatttcgaa      780
atttgtcogt ggagtagtta cttactgggc gcgtggaaac cggataccga acatgcggtt      840
atccgcttaa agaattgatca agcaaattac agtctgaata cagatgatcc cctgattttc      900
aagtctaccc tggacacaga ttatcagatg acgaagcggg atatgggatt tacggaagaa      960
gaatttaagc gtctcaatat caatgcggcg aaatcttcat ttctgccgga agatgagaaa     1020
cgtgagttgc tggatcttct gtacaaggcc tacggtatgc cgccgagcgc atcgccggg      1080
cagaacctg                                     1089

```

<210> 5
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Bovino
 <400> 5

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

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

ES 2 569 940 T3

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
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
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 recombinante, en la que un resto de aminoácido oxidable expresado en el tipo silvestre de la adenosina desaminasa se sustituye por un resto de aminoácido no oxidable; en la que el resto de aminoácido no oxidable es serina, y el resto de aminoácido oxidable es cisteína, dicha cisteína se encuentra localizada en posición 74 de la proteína de adenosina desaminasa madura.
2. La adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 1 que es una adenosina desaminasa humana recombinante o una adenosina desaminasa bovina recombinante.
3. La adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 2 que se traduce a partir de una molécula de ADN según la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
4. La adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 2 que comprende la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.
5. La adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 4 que comprende la SEQ ID NO: 1 con una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Gln en lugar de Lys₁₉₈; Ala en lugar de Thr₂₄₅; Arg en lugar de Gly₃₅₁, y sus combinaciones.
6. Un conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa, en el que la adenosina desaminasa es la adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 1.
7. El conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa de la reivindicación 6, en el que el óxido de polialquileo es polietilenglicol.
8. El conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa de la reivindicación 7, en el que el polietilenglicol está conjugado a la adenosina desaminasa recombinante a través de un grupo de enlace seleccionado del grupo que consiste en grupos de enlace a base de carbonato de succinimidilo, tiazolidina tiona, uretano y amida.
9. El conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa de la reivindicación 7, en el que el polietilenglicol está unido covalentemente a un grupo épsilon amino de una Lys de la adenosina desaminasa recombinante.
10. El conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa de la reivindicación 7, en el que la adenosina desaminasa recombinante comprende una o más cadenas de polietilenglicol unidas a grupos épsilon amino de uno o más restos de Lys de la adenosina desaminasa recombinante.
11. El conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa de la reivindicación 7, en el que la adenosina desaminasa recombinante comprende de aproximadamente 11 a aproximadamente 18 cadenas de polietilenglicol aproximadamente unidas a grupos épsilon amino de uno o más restos de Lys de la adenosina desaminasa recombinante.
12. El conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa de la reivindicación 7, en el que el polietilenglicol está conjugado a la adenosina desaminasa recombinante a través de un grupo de enlace de carbonato de succinimidilo.
13. El conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa de la reivindicación 7, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular de 2000 a 100.000.
14. El conjugado de óxido de polialquileo-adenosina desaminasa de la reivindicación 7, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular de 4000 a 45.000.
15. Una adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una dolencia mediada por la adenosina desaminasa en mamíferos.
16. La adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 15, en la que la dolencia mediada por la adenosina desaminasa es el trastorno de inmunodeficiencia combinada grave.
17. Un procedimiento de purificación de la adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 6, que comprende la purificación de la proteína por cromatografía de intercambio de iones.
18. Un procedimiento de purificación de la adenosina desaminasa recombinante de la reivindicación 6 que comprende la SEQ ID NO: 1, que comprende purificar la proteína mediante cromatografía de interacción hidrófoba.
19. Una adenosina desaminasa recombinante producida por el procedimiento de la reivindicación 17.
20. Una adenosina desaminasa recombinante producida por el procedimiento de la reivindicación 18.
21. Un ADN aislado que codifica una adenosina desaminasa recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

22. El ADN aislado de la reivindicación 21, en el que la adenosina desaminasa recombinante tiene una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Gln en lugar de Lys₁₉₈; Ala en lugar de Thr₂₄₅; Arg en lugar de Gly₃₅₁, y sus combinaciones.