

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 476**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

C12N 9/82 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2010 PCT/EP2010/059599**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11003886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010 E 10730170 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2451486**

54 Título: **L-asparaginasa pegilada**

30 Prioridad:

06.07.2009 US 223320 P
30.03.2010 WO PCT/EP2010/054156

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2017

73 Titular/es:

ALIZE PHARMA II (100.0%)
15 Chemin Du Saquin Espace Europeen
69130 Ecully, FR

72 Inventor/es:

ABRIBAT, THIERRY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 636 476 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

L-asparaginasa pegilada

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un conjugado de una proteína que tiene sustancialmente una actividad L-asparagina aminohidrolasa y polietilenglicol, particularmente en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da, particularmente un conjugado en el que la proteína es una L-asparaginasa de *Erwinia*, y su uso en terapia.

Antecedentes

15 Las proteínas con actividad L-asparagina aminohidrolasa, comúnmente conocidas como L-asparaginasa, se han utilizado satisfactoriamente para el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) en niños durante muchos años. La LLA es la enfermedad maligna más común en la niñez (Avramis y Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44:367-393).

20 La L-asparaginasa se ha utilizado también para tratar la enfermedad de Hodgkin, la leucemia mielocítica aguda, la leucemia mielomonocítica aguda, la leucemia linfocítica crónica, el linfosarcoma, reticulosarcoma, y melanosarcoma (Kotzia y Labrou, J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669). Se cree que la actividad anti-tumoral de la L-asparaginasa se debe a la incapacidad o la capacidad reducida de ciertas células malignas para sintetizar L-asparagina (Kotzia y Labrou, J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669). Estas células malignas necesitan un suministro extracelular de L-asparagina. Sin embargo, la enzima L-asparaginasa cataliza la hidrólisis de L-asparagina a ácido aspártico y amoniaco, agotando de esta manera las reservas de L-asparagina y matando las células tumorales que no pueden llevar a cabo la síntesis proteica sin la L-asparagina (Kotzia y Labrou, J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669).

30 La L-asparaginasa de *E. coli* fue el primer fármaco enzimático utilizado en la terapia de la LLA y se ha comercializado como Elspar® en los EE. UU. o como Kidrolase® y L-asparaginasa Medac® en Europa. Las L-asparaginasa también se han aislado de otros microorganismos, por ejemplo, la L-asparaginasa proteica de *Erwinia chrysanthemi*, llamada crisantaspasa, que se ha comercializado como Erwinase® (Wriston Jr., J.C. (1985) "L-asparaginase" Meth. Enzymol. 113, 608-618; Goward, C.R. et al. (1992) "Rapid large scale preparation of recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase", Bioseparation 2, 335-341). También se han identificado L-asparaginasa de otras especies de *Erwinia*, que incluyen, por ejemplo, *Erwinia chrysanthemi* 3937 (nº de acceso del Genbank AAS67028), *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125 (nº de acceso del Genbank CAA31239), *Erwinia carotovora* (nº de acceso del Genbank AAP92666) y *Erwinia carotovora* subesp. *astroseptica* (nº de acceso del Genbank AAS67027). Estas L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* tienen aproximadamente un 91-98 % de identidad de secuencia de aminoácidos entre ellas, mientras que las L-asparaginasa de *Erwinia carotovora* tienen aproximadamente de un 75-77 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia y Labrou, J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669).

45 Las L-asparaginasa de origen bacteriano tienen un potencial inmunogénico y antigénico alto y provoca frecuentemente reacciones adversas que varían desde una reacción alérgica leve a un choque anafiláctico en pacientes sensibilizados (Wang, B. et al. (2003) "Evaluation of immunologic cross reaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL and lymphoma patients), Leukemia 17, 1583-1588). La L-asparaginasa de *E. coli* es particularmente inmunogénica, con informes de la presencia de anticuerpos anti-asparaginasa contra la L-asparaginasa de *E. coli* tras la administración i.v. o i.m. que alcanzan hasta un 78 % en adultos y un 70 % en niños (Wang, B. et al. (2003) Leukemia 17, 1583-1588).

50 Las L-asparaginasa de *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi* se diferencian en sus propiedades farmacocinéticas y en que tienen perfiles inmunogénicos distintos, respectivamente (Klug Albertsen, B. et al. (2001) "Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system" Brit. J. Haematol. 115, 983-990). Además, se ha demostrado que los anticuerpos que se desarrollan tras un tratamiento con L-asparaginasa de *E. coli*, no tienen reacciones cruzadas con la L-asparaginasa de *Erwinia* (Wang, B. et al., Leukemia 17 (2003) 1583-1588). Por lo tanto, la L-asparaginasa de *Erwinia* (crisantaspasa) se ha utilizado como una segunda línea de tratamiento de la LLA en pacientes que reaccionan contra la L-asparaginasa de *E. coli* (Duval, M. et al. (2002) "Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Children's Leukemia Group phase 3 trial" Blood 15, 2734-2739; Avramis y Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44:367-393).

65 En otro intento para reducir la inmunogenicidad asociada con la administración de L-asparaginasa microbianas, se ha desarrollado una L-asparaginasa de *E. coli* que está modificada con metoxi-polietilenglicol (mPEG). Este método se conoce comúnmente como "PEGilación" y se ha demostrado que altera las propiedades inmunológicas de las

proteínas (Abuchowski, A. et al. (1977) "Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol," J.Biol.Chem. 252 (11), 3578-3581). Esta mPEG-L-asparaginasa o pegaspargasa, comercializada como Oncaspar® (Enzon Inc., EE. UU.), se aprobó en los EE. UU. por primera vez como segunda línea de tratamiento de la LLA en 1994, y se ha aprobado como terapia de primera línea de la LLA en niños y adultos desde 2006. La Oncaspar® tiene una semivida *in vivo* prolongada y una inmunogenicidad/antigenicidad reducidas.

La Oncaspar® es una L-asparaginasa de *E. coli* que se ha modificado en múltiples restos de lisina utilizando succinato de mPEG-succinimidilo de 5 kDa (SS-PEG) (Patente de EE. UU. N° 4.179.337). El SS-PEG es un reactivo PEG de primera generación que contiene un enlace éster inestable que es sensible a la hidrólisis por enzimas o a valores de pH ligeramente alcalinos (Patente de EE. UU. N° 4.670.417; Makromol. Chem. 1986, 187, 1131-1144). Estas propiedades disminuyen la estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo* y pueden alterar la seguridad del fármaco.

Además, se ha demostrado que los anticuerpos que se desarrollan contra la L-asparaginasa de *E. coli* reaccionarán de manera cruzada con la Oncaspar® (Wang, B. et al. (2003) "Evaluation of immunologic cross-reaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL and lymphoma patients)," Leukemia 17, 1583-1588). Incluso aunque estos anticuerpos no eran neutralizantes, este hallazgo demostraba claramente el alto potencial de hipersensibilidad cruzada o inactivación cruzada *in vivo*. Además, en un informe el 30-41 % de los niños que recibieron pegaspargasa tenían una reacción alérgica (2003) Leukemia 17, 1583-1588).

Además de las reacciones alérgicas visibles, se informó recientemente del problema de "hipersensibilidad silente", por el que los pacientes desarrollan anticuerpos anti-asparaginasa sin mostrar ninguna evidencia clínica de una reacción de hipersensibilidad (Wang, B. et al. (2003) Leukemia 17, 1583-1588). Esta reacción puede dar como resultado la formación de anticuerpos neutralizantes contra L-asparaginasa de *E. coli* y pegaspargasa; sin embargo, estos pacientes no se cambian a L-asparaginasa de *Erwinia* debido a que no muestran signos externos de hipersensibilidad, y por lo tanto reciben un tratamiento eficaz con una duración menor (Holcenberg, J., J. Pediatr. Hematol. Oncol. 26 (2004) 273-274).

El tratamiento con L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* a menudo se utiliza en caso de hipersensibilidad a las L-asparaginases derivadas de *E. coli*. Sin embargo, se ha observado que hasta un 30-50 % de los pacientes que recibían L-asparaginasa de *Erwinia* eran positivos a anticuerpos (Avramis y Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44:367-393). Además, debido a que la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* tiene una semivida de eliminación más corta que las L-asparaginases de *E. coli*, se debe administrar más frecuentemente (Avramis y Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44:367-393). En un estudio de Avramis et al., la asparaginasa de *Erwinia* se asoció con perfiles farmacocinéticos inferiores (Avramis et al., J. Pediatr. Hematol. Oncol. 29 (2007) 239-247). La L-asparaginasa de *E. coli* y la pegaspargasa por lo tanto han sido las terapias preferidas de primera línea para la LLA sobre la L-asparaginasa de *Erwinia*.

Se han PEGilado satisfactoriamente numerosos biofarmacéuticos y se han comercializado durante muchos años. Con el fin de acoplar un PEG a una proteína, el PEG tiene que activarse en su extremo OH. El grupo de activación se escoge basándose en el grupo reactivo disponible en la proteína que se PEGilará. En el caso de las proteínas, los aminoácidos más importantes son lisina, cisteína, ácido glutámico, ácido aspártico, ácido carboxílico del extremo C y el grupo amino del extremo N. En vista del amplio intervalo de grupos reactivos en las proteínas casi toda la química peptídica se ha ampliado para activar el resto de PEG. Ejemplos de estos reactivos de PEG activado son carbonatos activados, por ejemplo, carbonato de p-nitrofenilo, carbonato de succinimidilo; ésteres activos, por ejemplo, éster de succinimidilo; y se han desarrollado aldehídos y maleimidias para el acoplamiento específico del sitio (Harris, M., Adv. Drug Del. Rev. 54 (2002), 459-476). La disponibilidad de distintos métodos químicos para la modificación de PEG muestra que cada nuevo desarrollo de una proteína PEGilada será un estudio de caso por caso. Además de la química, el peso molecular del PEG que se acopla a la proteína tiene un fuerte impacto en las propiedades farmacéuticas de la proteína PEGilada. En la mayoría de los casos se espera que, cuanto mayor es el peso molecular del PEG, mejor es la mejora de las propiedades farmacéuticas (Sherman, M. R., Adv. Drug Del. Rev. 60 (2008), 59-68; Holtsberg, F.W., Journal of Controlled Release 80 (2002), 259-271). Por ejemplo, Holtsberg et al. descubrieron que, cuando el PEG se conjuga con arginina desaminasa, otra enzima degradadora de aminoácidos aislada de una fuente microbiana, la función farmacocinética y farmacodinámica de la enzima aumentaba cuando el tamaño del PEG aumentaba de un peso molecular de 5000 Da a 20.000 Da (Holtsberg, F.W., Journal of Controlled Release 80 (2002), 259-271).

Sin embargo, en muchos casos, los biofarmacéuticos PEGilados muestran una actividad significativamente reducida en comparación con los biofarmacéuticos no modificados (Fishburn, C.S. (2008) Review "The Pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics" J. Pharm. Sci., 1-17). En el caso de la L-asparaginasa de *Erwinia carotovora*, se ha observado que la PEGilación deducía su actividad *in vitro* hasta aproximadamente un 57 % (Kuchumova, A.V. et al. (2007) "Modification of Recombinant asparaginase from *Erwinia carotovora* with Polyethylene Glycol 5000" Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 1, 230-232). La L-asparaginasa de *Erwinia carotovora* tiene solo aproximadamente un 75 % de homología con la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspasa). También se sabe que la actividad *in vitro* del Oncaspar® es aproximadamente del 50 % en comparación con la L-asparaginasa de *E. coli* sin modificar.

Las preparaciones de L-asparaginasa disponibles actualmente no proporcionan terapias alternativas o complementarias – particularmente terapias para tratar la LLA– que se caractericen por una alta actividad catalítica y propiedades farmacológicas y farmacocinéticas significativamente mejoradas, así como con una inmunogenicidad reducida.

5

Breve resumen de la invención

Un primer aspecto de la invención proporciona un conjugado para su uso en medicina, comprendiendo el conjugado una L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 y polietilenglicol (PEG), en el que el PEG tiene un peso molecular menor o igual de aproximadamente 5000 Da.

10

La presente invención se refiere a un conjugado para el uso en medicina de una proteína que tiene una actividad sustancial de L-asparagina aminohidrolasa y polietilenglicol, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da, particularmente un conjugado en el que la proteína es una L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización la L-asparaginasa tiene al menos aproximadamente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 Da, 4000 Da, 3000 Da, 2500 Da, o 2000 Da. En una realización, el conjugado tiene una actividad *in vitro* de al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % en comparación con la L-asparagina que no está conjugada al PEG. En otra realización, el conjugado tiene una actividad de agotamiento de L-asparagina de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces más potente que la L-asparagina que no se conjuga al PEG. En otra realización, el conjugado agota los niveles de L-asparagina plasmática hasta un nivel no detectable durante al menos 12, 24, 48, 96, 108, o 120 horas.

15

20

25

En una realización, el conjugado tiene una semivida circulante *in vivo* más larga en comparación con la L-asparaginasa cuando no se conjuga con PEG. En una realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ más larga que la pegaspargasa (es decir, la L-asparaginasa conjugada con PEG de *E. coli*) administrada a una dosis de proteína equivalente (por ejemplo, medida en $\mu\text{g}/\text{kg}$). En una realización más específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 58 a aproximadamente 65 horas a una dosis de aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ basándose en el contenido proteico, y un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 34 a aproximadamente 40 horas a una dosis de aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ basándose en el contenido proteico. En otra realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 34 a aproximadamente 65 horas a una dosis que varía desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente 20-30 mg de proteína/m²). En una realización, el conjugado tiene un área bajo la curva (AUC) mayor en comparación con la L-asparaginasa cuando no se conjuga con PEG. En una realización específica, el conjugado tiene una AUC media que es al menos aproximadamente 3 veces mayor que la pegaspargasa a una dosis de proteína equivalente.

30

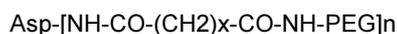
35

40

En una realización, el PEG se une covalentemente a uno o más grupos amino (en el que “grupos amino” incluye restos de lisina y/o el extremo N) de la L-asparaginasa. En una realización más específica, el PEG está unido covalentemente a uno o más grupos amino mediante un enlace amida. En otra realización específica, el PEG está unido a al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N de la proteína) o al menos desde aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 90 % de los grupos amino totales (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N de la proteína). En una realización, el conjugado tiene la fórmula:

45

50



55

en la que Asp es la L-asparaginasa, NH es uno o más de los grupos NH de los restos de lisina y/o el extremo N de la Asp, PEG es un resto de polietilenglicol, n es un número que representa al menos un 40 % a aproximadamente un 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, los restos de lisina y/o el extremo N) en la Asp, y x es un entero que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, más específicamente, desde aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En una realización específica, el PEG es monometoxi-polietilenglicol (mPEG).

El conjugado se puede proporcionar como una composición farmacéutica que comprende el conjugado de la invención.

60

65

En otro aspecto, la invención se refiere al conjugado del primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad tratable por el agotamiento de L-asparagina en un paciente. En una realización, la enfermedad es un cáncer. En una realización específica el cáncer es una LLA. En otra realización específica el conjugado se administra a una cantidad de aproximadamente 5 UI/kg de peso corporal a aproximadamente 50 UI/kg de peso corporal. En otra realización específica, el conjugado se administra a una dosis que varía desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente 20-30 mg de proteína/m²). En algunas realizaciones, el conjugado se administra por administración intravenosa o intramuscular, que puede ser menos de una vez a la

semana (por ejemplo, una vez al mes o una vez cada dos semanas), una vez a la semana, dos veces a la semana, o tres veces a la semana. En otras realizaciones específicas, el conjugado se administra como monoterapia y, más específicamente, sin un inhibidor de la asparagina sintetasa. En otras realizaciones, el conjugado se administra como parte de una terapia de combinación (pero en algunas realizaciones, la terapia de combinación no comprende un inhibidor de la asparagina sintetasa). En una realización específica, el paciente que recibe el tratamiento ha tenido una hipersensibilidad previa a una asparaginasa de *E. coli* o forma PEGilada de la misma o a una asparaginasa de *Erwinia*. En otra realización específica, el paciente que recibe el tratamiento ha tenido una recaída de la enfermedad, en particular una recaída que se produce tras el tratamiento con una asparaginasa de *E. coli* o la forma PEGilada de la misma.

Breve descripción de los dibujos/figuras

Figura 1: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de L-asparaginasa purificada recombinante de *Erwinia chrysanthemi*. Se analizó la L-asparaginasa purificada recombinante de *Erwinia chrysanthemi* (r-crisantaspasa) en SDS-PAGE. Las bandas proteicas se tiñeron con nitrato de plata. Calle 1: Marcador de peso molecular (116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4 y 14,4 kDa), calle 2: L-asparaginasa purificada recombinante de *Erwinia chrysanthemi* (r-crisantaspasa).

Figura 2: Análisis SDS-PAGE de conjugados mPEG-r-crisantaspasa.

Figura 3: Niveles de L-asparagina plasmática después de una única dosis intravenosa de Erwinase® (5 U/kg, 25 U/kg, 125 U/kg y 250 U/kg de peso corporal).

Figura 4: Niveles de L-asparagina plasmática después de una única inyección intravenosa de conjugados mPEG-r-crisantaspasa en comparación con Erwinase® en ratones. Los números "40 %" y "100 %" indican un grado aproximado de PEGilación de, respectivamente, aproximadamente el 40-55 % (PEGilada parcialmente) y aproximadamente el 100 % (PEGilación máxima) de los grupos amino accesibles.

Figura 5: Área bajo la curva (AUC) (actividad enzimática residual) calculada a partir de los perfiles de L-asparaginasa después de una única inyección intravenosa de conjugados mPEG-r-crisantaspasa en ratones.

Figura 6: Niveles de L-asparagina plasmática después de una única dosis intravenosa en ratones de 2 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa (5 U/kg, 25 U/kg y 50 U/kg de peso corporal) (Figura 6A), 5 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa (5 U/kg, 25 U/kg y 50 U/kg de peso corporal) (Figura 6B), o 2 kDa 100 % mPEG-r-crisantaspasa (5 U/kg), 5 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa (5 U/kg), y pegaspargasa (Oncaspar®) (1 U/kg) (Figura 6C). La administración de una cantidad equivalente de proteína (10 µg/kg) de 2 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa (5 U/kg), 5 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa (5 U/kg), o pegaspargasa (Oncaspar®, 1 U/kg), daba como resultado un agotamiento de L-asparagina similar durante 72 horas.

Figura 7: Relación dosis-efecto de 2 kDa-100 % r-crisantaspasa PEGilada en comparación con 5 kDa-100 % r-crisantaspasa PEGilada. La Figura 7A muestra la actividad enzimática residual en el plasma después de una única dosis intravenosa de 2 kDa-100 % r-crisantaspasa PEGilada a 5 U/kg (10 µg/kg basándose en el contenido proteico), 25 U/kg, y 50 U/kg. La Figura 7B muestra la actividad enzimática residual en el plasma después de una única dosis intravenosa de 5 kDa-100 % r-crisantaspasa PEGilada a 5 U/kg (10 µg/kg basándose en el contenido proteico), 25 U/kg, y 50 U/kg.

Figura 8: Relación dosis-efecto de 2 kDa-100 % r-crisantaspasa PEGilada en comparación con 5 kDa-100 % r-crisantaspasa PEGilada. AUC de la actividad enzimática residual medida en los ratones después de una única dosis intravenosa de conjugados con 2 kDa-100 % o 5 kDa-100 % de mPEG. En total, cuando se compara al mismo nivel de dosis, las AUC medidas para la 5 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa eran mayores que las que se observaban para 2 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa. Se observó una diferencia del 31, 37 y 14 % a las dosis de 5, 25 y 50 U/kg, respectivamente.

Figura 9: Farmacocinética de conjugados mPEG-r-crisantaspasa vs. pegaspargasa (Oncaspar®) en ratones. La Figura 9A representa la actividad enzimática residual medida en ratones después de una única dosis intravenosa de 2 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa, 5 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa, o pegaspargasa (Oncaspar®). La Figura 9B representa las AUC de actividad enzimática residual medida en ratones después de una única dosis intravenosa de 2 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa, 5 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa, o pegaspargasa (Oncaspar®).

Figura 10: Niveles séricos de anticuerpos específicos anti-crisantaspasa tras el tratamiento con conjugados mPEG-r-crisantaspasa o Erwinase®. Los anticuerpos se dirigen contra la crisantaspasa. Los datos se expresan como media ± SD (N=8).

Figura 11: Niveles séricos de anticuerpos específicos anti-conjugado tras el tratamiento con conjugados mPEG-r-crisantaspasa con PEGilación máxima (100 %). La Figura 11A: resultados presentados como la media ± SD (n=8); Figura 11B: resultados presentados como el porcentaje de animales con valores de absorbancia > 0,5 en el ELISA anti-conjugado.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, el problema que se va a resolver con la invención es proporcionar una preparación de L-asparaginasa con:

- Alta bioactividad *in vitro*;
- Un enlace PEG-proteína estable;

- Una semivida *in vivo* prolongada;
- Una inmunogenicidad significativamente reducida, como se evidencia, por ejemplo, por la reducción o eliminación de una respuesta de anticuerpos contra la preparación de L-asparaginasa después de administraciones repetidas; y
- 5 - Utilidad como una terapia de segunda línea para pacientes que han desarrollado sensibilidad para las terapias de primera línea que utilizan, por ejemplo, L-asparaginasas derivadas de *E. coli*.

Este problema no se resuelto con los conjugados de L-asparaginasa conocidos, que tienen una reactividad cruzada significativa con las preparaciones de L-asparaginasa modificada (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588),
 10 o que tienen una actividad *in vitro* considerablemente reducida (Kuchumova, A.V. et al. (2007) *Biochemistry* (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 1, 230). Este problema se resuelve de acuerdo con la presente invención proporcionando un conjugado de L-asparaginasa de *Erwinia* con un polímero hidrófilo, más específicamente, un polietilenglicol con un peso molecular de 5000 Da o menos, un método para la preparación de dicho conjugado y el uso del conjugado.

15 Se describe en el presente documento una L-asparaginasa PEGilada de *Erwinia* con propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la proteína L-asparaginasa no modificada, así como en comparación con la preparación de pegaspargasa de *E. coli*. El conjugado de L-asparaginasa PEGilada descrito en el presente documento, por ejemplo L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* PEGilada con un PEG de 5000 Da de peso
 20 molecular, funciona como un agente terapéutico para su uso particularmente en pacientes que presentan hipersensibilidad (por ejemplo, una reacción alérgica o una hipersensibilidad silente) al tratamiento con L-asparaginasa o L-asparaginasa PEGilada de *E. coli*, o L-asparaginasa de *Erwinia* no modificada. El conjugado L-asparaginasa PEGilada descrito en el presente documento también es útil como agente terapéutico para su uso en pacientes que han tenido una recaída de la enfermedad, por ejemplo, una recaída de LLA, y que se habían tratado
 25 anteriormente con otra forma de asparaginasa, por ejemplo, con L-asparaginasa o L-asparaginasa PEGilada de *E. coli*.

Como se describe en el presente documento en detalle, el conjugado de la invención presente propiedades inesperadamente superiores en comparación con las preparaciones de L-asparaginasa conocidas tales como la
 30 pegaspargasa. Por ejemplo, la L-asparaginasa no modificada de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspasa) tiene una semivida significativamente menor que la L-asparaginasa no modificada de *E. coli* (Avramis y Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). El conjugado PEGilado de la invención tiene una semivida que es mayor que la de la L-asparaginasa PEGilada de *E. coli* a una dosis proteica equivalente.

35 Definiciones

A menos de que se defina expresamente otra cosa, los términos que se utilizan en el presente documento se entenderán de acuerdo con su significado habitual en la técnica.

40 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “que incluye” significa “que incluye, sin limitación”, y los términos que se utilizan en singular incluirán el plural, y viceversa, a menos de que el contexto dicte otra cosa.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “enfermedad tratable por agotamiento de asparagina” se refiere a una afección o trastorno en el que las células implicadas o responsables de la afección o trastorno o
 45 carecen o tiene una capacidad reducida para sintetizar L-asparagina. El agotamiento o privación de L-asparagina puede ser parcial o sustancialmente completa (por ejemplo, a niveles que sean indetectables utilizando los métodos y aparatos que se conocen en la técnica).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad
 50 de una proteína (por ejemplo, asparaginasa o un conjugado de la misma), necesaria para producir un efecto terapéutico deseado. Un conjugado/compuesto/composición de acuerdo con la presente invención se entiende como un conjugado/compuesto/composición para su uso en medicina de acuerdo con la presente invención.

L-asparaginasa proteica

55 La proteína de acuerdo con la invención es una enzima con actividad L-asparagina aminohidrolasa, a saber una L-asparaginasa.

Se han identificado muchas L-asparaginasas proteicas en la técnica, que se han aislado por métodos conocidos a
 60 partir de microorganismos (véase, por ejemplo, Savitri y Azmi, *Indian J. Biotechnol* 2 (2003) 184-194). Las L-asparaginasas utilizadas más ampliamente y disponibles en el mercado se derivan de *E. coli* o de *Erwinia chrysanthemi*, las cuales comparten un 50 % o menos de homología estructural. En las especies de *Erwinia*, normalmente se informó de una identidad de secuencia normalmente del 75-77 % entre las enzimas derivadas de *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, y se encontró una identidad de secuencia de aproximadamente el 90 %
 65 entre las diferentes subespecies de *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia GA, Labrou E, *Journal of Biotechnology* (2007) 127:657-669). Algunas L-asparaginasas de *Erwinia* representativas incluyen, por ejemplo, las que se proporcionan

en la Tabla 1:

Tabla 1

ESPECIE	Nº de ACCESO del GENBANK	% de IDENTIDAD CON <i>ERWINIA CHRYSANTHEMI</i> NCPPB 1066
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	AAS67028	91 %
<i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPPB 1125	CAA31239	98 %
<i>Erwinia carotovora</i> subesp. <i>Astroseptica</i>	AAS67027	75 %
<i>Erwinia carotovora</i>	AAP92666	77 %

5 Las secuencias de las L-asparaginasas de *Erwinia* y las entradas del GenBank de la Tabla 1 se incorporan en el presente documento por referencia. Las L-asparaginasas preferidas que se utilizan en terapia son las L-asparaginasas aisladas de *E. coli* y de *Erwinia*, específicamente, *Erwinia chrysanthemi*.

10 Las L-asparaginasas pueden ser enzimas nativas aisladas de los microorganismos. También se pueden producir por tecnologías enzimáticas recombinantes en microorganismos productores tales como *E. coli*. Como ejemplos, la proteína que se utiliza en el conjugado de la invención puede ser una proteína de *E. coli* producida en una cepa productora de *E. coli* recombinante, o una proteína de especies de *Erwinia*, particularmente *Erwinia chrysanthemi* producida en una cepa productora de *E. coli* recombinante.

15 Las enzimas se pueden identificar por sus actividades específicas. Esta definición incluye por lo tanto todos los polipéptidos que tengan la actividad específica definida que están presentes también en otros organismos, más particularmente en otros microorganismos. A menudo las enzimas con actividades similares se pueden identificar por su agrupamiento en ciertas familias definidas como PFAM o COG. La PFAM (base de datos de familias proteicas de modelos de alineamientos y oculto de Markov; <http://pfam.sanger.ac.uk/>) representa una gran colección de alineamientos de secuencias proteicas. Cada PFAM hace posible visualizar múltiples alineamientos, ver los dominios proteicos, evaluar la distribución entre organismos, tiene acceso a otras bases de datos, y visualiza estructuras proteicas conocidas. Los COG (Agrupamientos de Grupos Ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando secuencias proteicas de 43 genomas secuenciados completamente que representan las 30 líneas filogenéticas principales. Cada COG se define a partir de al menos tres líneas, que permite la identificación de dominios primarios conservados.

20 Los medios de identificación de secuencias homólogas y su porcentaje de homología y/o identidad son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen en particular los programas BLAST, que se pueden utilizar desde el sitio de internet <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> con los parámetros por defecto que se indican en ese sitio de internet. Las secuencias obtenidas se pueden explotar (por ejemplo, alinear) utilizando por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) o MULTALIN (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) con los parámetros por defecto indicados en esos sitios de internet. Utilizando las referencias que se dan en el GenBank para los genes conocidos, los expertos en la técnica son capaces de determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo de rutina se hace ventajosamente utilizando secuencias de consenso que se pueden determinar llevando a cabo alineamientos de secuencia con genes derivados de otros microorganismos, y diseñando sondas degeneradas para clonar el gen correspondiente en otro organismo. Estos métodos de rutina de biología molecular son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York).

30 Además, un experto en la técnica entenderá cómo seleccionar y diseñar proteínas homólogas que mantengan sustancialmente su actividad L-asparaginasa. Normalmente, se utiliza un ensayo de Nessler para la determinación de la actividad L-asparaginasa de acuerdo con un método descrito por Mashburn y Wriston (Mashburn, L., y Wriston, J. (1963) "Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase," Biochem Biophys Res Commun 12, 50).

35 En una particular realización del conjugado de la invención, la L-asparaginasa proteica tiene al menos un 90 % de homología o identidad con la proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, más específicamente al menos aproximadamente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de homología o identidad con la proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 es la siguiente:

ADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGE
 QFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNEELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTV
 KSDKPVPVFAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSA
 RYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIIGNRIYYQNRIDKLHTTTRSVFDVRGLTSLPKV
 DILYGYQDDPEYLYDAAIQHGKGVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVVI
 RSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIQEYFHTY (SEQ
 ID NO:1)

La expresión “que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1” significa que la secuencia de aminoácidos de la proteína puede no estar limitada estrictamente a SEQ ID NO: 1 sino que puede contener aminoácidos adicionales.

5 En una realización particular, la proteína es la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1. En otra realización, la L-asparaginasa es de *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 (Nº de acceso del Genbank CAA32884), sea con o sin péptidos de señal y/o secuencias líder.

10 Los fragmentos de proteína de SEQ ID NO: 1 también están comprendidos en la definición de la proteína utilizada en el conjugado de la invención. La expresión “un fragmento de SEQ ID NO: 1” significa que la secuencia del polipéptido puede incluir menos aminoácidos que SEQ ID NO: 1 pero tiene aún suficientes aminoácidos para conferir una actividad L-aminohidrolasa.

15 Se sabe bien en la técnica que se puede modificar un polipéptido por sustitución, inserción, eliminación y/o adición de uno o más aminoácidos mientras se mantenga su actividad enzimática. Por ejemplo, es común la sustitución de un aminoácido en una posición determinada por un aminoácido químicamente equivalente que no afecte las propiedades funcionales de una proteína. Las sustituciones pueden definirse como intercambios en uno de los siguientes grupos:

- 20
- restos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
 - restos polares, cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln
 - restos polares, cargados positivamente: His, Arg, Lys
 - restos alifáticos grandes, no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys
- 25
- restos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

Por lo tanto, puede esperarse que los cambios que dan como resultado la sustitución de un resto cargado negativamente por otro (tal como ácido glutámico por ácido aspártico) o un resto cargado positivamente por otro (tal como lisina por arginina) produzcan un producto de funcionalidad equivalente.

30 Las posiciones en las que se modifican los aminoácidos y el número de aminoácidos sometidos a la modificación en la secuencia de aminoácidos no están limitadas particularmente. El experto en la técnica es capaz de reconocer las modificaciones que se pueden introducir sin afectar la actividad de la proteína. Por ejemplo, se puede esperar que las modificaciones en la parte del extremo N o C no alteren la actividad de una proteína en ciertas circunstancias.

35 Con respecto a las asparaginasa, en particular, se ha hecho mucha caracterización, particularmente con respecto a las secuencias, estructuras, y los restos que forman el sitio catalítico activo. Esto proporciona una guía con respecto a restos que se pueden modificar sin afectar la actividad de la enzima. Todas las L-asparaginasa conocidas de fuentes bacterianas tienen características estructurales comunes. Son todas homotetrámeros con cuatro sitios activos entre los dominios del extremo N y C de dos monómeros adyacentes (Aghaipour et al., *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664). Todas tienen un alto grado de similitud en sus estructuras terciaria y cuaternaria (Papageorgiou et al., *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). Las secuencias de los sitios catalíticos de L-asparaginasa están altamente conservados entre *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora*, y L-asparaginasa II de *E. coli* (Papageorgiou et al., *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). El bucle flexible del sitio activo contiene los restos de aminoácidos 14-33, y el análisis estructural muestra que Thr15, Thr95, Ser62, Glu63, Asp96, y Ala120 contactan con el ligando (Papageorgiou et al., *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). Aghaipour et al. han llevado a cabo análisis detallados de los cuatro sitios activos de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* examinando las estructuras cristalinas con alta resolución de la enzima formando complejos con sus sustratos (Aghaipour et al., *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664). Kotzia et al. proporciona secuencias de L-asparaginasa de varias especies y subespecies de *Erwinia* y, incluso aunque las proteínas tienen solo aproximadamente un 75-77 % de identidad entre *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, aún tienen cada una actividad L-asparaginasa (Kotzia et al., *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669). Moola et al. llevaron a cabo estudios de mapeo de epítopos de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* 3937 y eran capaces de mantener la actividad enzimática incluso tras mutar varias secuencias antigénicas en un intento de reducir la inmunogenicidad de la asparaginasa (Moola et al., *Biochem. J.* 302 (1994) 921-927). Cada uno de los artículos citados anteriormente se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En vista de la extensa caracterización que se ha llevado a cabo en las L-asparaginasa, un experto en la técnica podría determinar

55 cómo fabricar fragmentos y/o sustituciones de secuencia mientras se mantiene aún la actividad enzimática.

Polímeros para su uso en el conjugado

Los polímeros se seleccionan de entre el grupo de polímeros hidrosolubles no tóxicos tal como polisacáridos, por ejemplo, hidroxietil almidón, poli-aminoácidos, por ejemplo, poli-lisina, un poliéster, por ejemplo, ácido poliláctico, y óxidos de poli-alquileno, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

El polietilenglicol (PEG) o mono-metoxi-polietilenglicol (mPEG) se conoce bien en la técnica y comprende polímeros lineales y ramificados. Ejemplos de algunos polímeros, particularmente, PEG se proporcionan en las siguientes:

10 Patente de EE. UU. Nº 5.672.662; Patente de EE. UU. Nº 4.179.337; Patente de EE. UU. Nº 5.252.714; Publ. de Solicit. de Patente de EE. UU. Nº 2003/0114647; Patente de EE. UU. Nº 6.113.906; Patente de EE. UU. Nº 7.419.600; y Publ. PCT Nº WO2004/083258.

15 La calidad de dichos polímeros se caracteriza por el índice de poli-dispersión (PDI). El PDI refleja la distribución de pesos moleculares en una muestra de polímero determinada y se calcula a partir de la media de peso del peso molecular dividida por el número medio de peso molecular. Indica la distribución de pesos moleculares individuales en un lote de polímeros. El PDI tiene un valor siempre mayor de 1, pero según se aproximan las cadenas de polímero a la distribución de Gauss ideal (= mono-dispersión), el PDI se aproxima a 1.

20 El polietilenglicol tiene ventajosamente un peso molecular comprendido en el intervalo de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 9.000 Da. Más específicamente, el polietilenglicol (por ejemplo, mPEG) tiene un peso molecular que se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicoles de 2000 Da, 2500 Da, 3000 Da, 3500 Da, 4000 Da, 4500 Da, y 5000 Da. En una realización particular, el polietilenglicol (por ejemplo, mPEG) tiene un peso molecular de 5000 Da.

25 Método para la preparación del conjugado

Para el acoplamiento posterior del polímero a las proteínas con actividad L-asparagina aminohidrolasa, el resto polimérico contiene una funcionalidad activada que preferentemente reacciona con grupos amino de la proteína. En un aspecto, la invención se refiere a un método para fabricar un conjugado, comprendiendo el método la combinación de una cantidad de polietilenglicol (PEG) con una cantidad de L-asparaginasa en una solución tampón durante un periodo de tiempo suficiente para unir covalentemente el PEG a la L-asparaginasa. En una realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En una realización, el PEG es el mono-metoxi-polietilenglicol (mPEG).

En una realización, la reacción entre el polietilenglicol y la L-asparaginasa se lleva a cabo en una solución tampón. En algunas realizaciones particulares, el valor del pH de la solución tampón varía entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0. El valor de pH más preferido varía entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5, por ejemplo un valor de pH de aproximadamente 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, u 8,5. En una realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente, *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

Además, la PEGilación de L-asparaginasa se lleva a cabo a concentraciones proteicas entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 25 mg/ml, más específicamente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 mg/ml y más específicamente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 mg/ml. Por ejemplo, la concentración proteica es aproximadamente de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 mg/ml. En una realización particular, la PEGilación de L-asparaginasa a estas concentraciones proteicas es de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

A una concentración proteica elevada de más de 2 mg/ml, la reacción de PEGilación se produce rápidamente, en menos de 2 horas. Además, se aplica un exceso molar de polímero sobre los grupos amino de la L-asparaginasa de menos de aproximadamente 20:1. Por ejemplo, el exceso molar es menor de aproximadamente 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7,5:1, 7:1, 6,5:1, 6:1, 5,5:1, 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, o 1:1. En una realización específica, el exceso molar es menor de aproximadamente 10:1 y en una realización más específica, el exceso molar es menor de aproximadamente 8:1. En una realización particular, la L-asparaginasa es de especies *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

60 El número de restos de PEG que se pueden acoplar a la proteína estará sujeto al número de grupos amino libres e, incluso más, a los grupos amino que sean accesibles a la reacción de PEGilación. En una realización particular, el grado de PEGilación (es decir, el número de restos de PEG acoplados a los grupos amino de la L-asparaginasa) está en el intervalo de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 % de los grupos amino libres y/o

accesibles (por ejemplo, aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %). También se hace referencia al 100 % de PEGilación de grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N de la proteína) como "PEGilación máxima". Un método para determinar los grupos amino modificados en los conjugados de mPEG-r-crisantaspasa (grado de PEGilación) es un método descrito por Habeeb (A.F.S.A. Habeeb, "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzensulfonic acid", Anal. Biochem. 14 (1966), p. 328). En una realización, los restos de PEG se acoplan a uno o más grupos amino (en los que los grupos amino incluye restos de lisina y/o el extremo N) de la L-asparaginasa. En una realización particular, el grado de PEGilación está en el intervalo de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino totales o accesibles (por ejemplo, los restos de lisina y/o el extremo N), por ejemplo, aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %. En una realización específica, aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % del total de grupos amino (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están acoplados a un resto de PEG. En otra realización específica, aproximadamente un 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están unidos a un resto de PEG. En una realización específica, el 40-55 % o 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están acoplados a un resto de PEG. En algunas realizaciones, los restos de PEG están unidos a la L-asparaginasa por un enlace covalente. En una realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el conjugado de la invención puede representarse por la fórmula



en la que Asp es una L-asparaginasa proteica, NH es el grupo NH de un resto de lisina y/o el extremo N de la cadena proteica, PEG es un resto de polietilenglicol y n es un número de al menos un 40 % a aproximadamente un 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) de la proteína, que se han definido todos anteriormente y posteriormente en los ejemplos, x es un número entero que varía de 1 a 8 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), preferentemente de 2 a 5 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5). En una realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

Se proporcionan otros métodos de PEGilación que se pueden utilizar para formar los conjugados de la invención, por ejemplo en la Patente de EE. UU. N° 4.179.337, Patente de EE. UU. N° 5.766.897. Publ. de Solic. de Patente de EE. UU. N° US 2002/0065397A1. y Publ. de Solic. de Patente de EE. UU. N° US 2009/0054590A1.

Unas realizaciones específicas incluyen proteínas que tienen una sustancial actividad L-asparagina aminohidrolasa y polietilenglicol, que se selecciona de entre el grupo de conjugados en el que:

(A)

- la proteína tiene al menos un 90 % de homología de estructura con la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* como se desvela en SEQ ID NO: 1
- la proteína y los restos de polietilenglicol están unidos covalentemente a la proteína por enlaces amida, y
- aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están unidos a un resto de polietilenglicol.

(B)

- la proteína tiene al menos un 90 % de homología con la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* como se desvela en la SEQ ID NO: 1
- el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 Da,
- la proteína y los restos de polietilenglicol están unidos covalentemente a la proteína por enlaces amida, y
- aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 45 % y en particular aproximadamente el 43 % de los grupos amida accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N), o aproximadamente el 36 % de los grupos amino totales (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están unidos a un resto de polietilenglicol.

(C)

- la proteína tiene al menos una homología del 90 % de homología con la L-asparagina de *Erwinia chrysanthemi*

como se desvela en SEQ ID NO: 1

- el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 2000 Da,
- la proteína y los restos de polietilenglicol están unidos covalentemente unidos a la proteína por enlaces amida, y
- aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, uno o más restos de lisina y/o el extremo N) o aproximadamente un 80 %-90 %, en particular aproximadamente el 84 % de los grupos amino

5

totales (por ejemplo restos de lisina y/o el extremo N) están unidos a un resto de polietilenglicol.

(D)

- 10 - la proteína tiene al menos una homología del 90 % de homología con la L-asparagina de *Erwinia chrysanthemi* como se desvela en SEQ ID NO: 1
- el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 2000 Da,
- la proteína y los restos de polietilenglicol están unidos covalentemente unidos a la proteína por enlaces amida, y
- aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 60 %, y en particular aproximadamente el 55 % de los grupos
- 15 amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) o aproximadamente el 47 % de los grupos amino totales (por ejemplo restos de lisina y/o el extremo N) están unidos a un resto de polietilenglicol.

Conjugados L-asparaginasa-PEG

- 20 Los conjugados de la invención tienen ciertas propiedades ventajosas e inesperadas en comparación con las L-asparaginasa no modificadas, particularmente en comparación con las L-asparaginasa no modificadas de *Erwinia*, más particularmente en comparación con la L-asparaginasa no modificada de *Erwinia chrysanthemi*, y más particularmente en comparación con la L-asparaginasa que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.
- 25 En algunas realizaciones, el conjugado de la invención reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina durante un periodo de tiempo de al menos 12, 24, 48, 72, 96, o 120 horas cuando se administran a una dosis de 5 U/kg de peso corporal (pc) o 10 µg/kg (basándose en el contenido proteico). En otras realizaciones, el conjugado de la invención reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina a niveles indetectables durante un periodo de tiempo de 12, 24, 48,
- 30 72, 96, 120, o 144 horas cuando se administran a una dosis de 25 U/kg pc o 50 µg/kg (basándose en el contenido proteico). En otras realizaciones, el conjugado reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina a niveles indetectables durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, o 240 horas cuando se administran a una dosis de 50 U/kg pc o 100 µg/kg (basándose en el contenido proteico). En otra realización, el conjugado de la invención reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina a niveles indetectables durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192,
- 35 216, o 240 horas cuando se administran a una dosis que varía de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 15.000 U/m² (aproximadamente 20-30 mg de proteína/m²). En una realización particular, el conjugado comprende L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparagina que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En una realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da. En una
- 40 realización más particular, al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están PEGilados.

En una realización, el conjugado comprende una relación de mol de PEG/mol de monómero de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5, particularmente aproximadamente 6,5; una actividad específica de aproximadamente 450 a aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 501 U/mg; y una actividad relativa de aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 85 %, particularmente aproximadamente el 81 % en comparación con la L-asparaginasa no modificada correspondiente. En una realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, con una PEGilación de aproximadamente un 40-55 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) con un mPEG de 5000 Da.

- 55 En una realización, el conjugado comprende una relación de mol de PEG/mol de monómero de aproximadamente 12,0 a aproximadamente 18,0, particularmente aproximadamente 15,1; una actividad específica de aproximadamente 450 a aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 483 U/mg; y una actividad relativa de aproximadamente un 75 a aproximadamente un 85 %, particularmente aproximadamente el 78 % en comparación con la L-asparaginasa no modificada correspondiente. En una realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, con una PEGilación de aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) con un mPEG de 5000 Da.
- 60

- 65 En una realización, el conjugado comprende una relación de mol de PEG/mol de monómero de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 9,0, particularmente aproximadamente 7,0; una actividad específica de aproximadamente 450 a aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 501 U/mg; y una actividad relativa de aproximadamente un 80 a aproximadamente un 90 %, particularmente aproximadamente el 87 % en comparación

con la L-asparaginasa no modificada correspondiente. En una realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, con una PEGilación de aproximadamente un 40-55 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) con un mPEG de 10.000 Da.

En una realización, el conjugado comprende una relación de mol de PEG/mol de monómero de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 17,0, particularmente aproximadamente 14,1; una actividad específica de aproximadamente 450 a aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 541 U/mg; y una actividad relativa de aproximadamente un 80 a aproximadamente un 90 %, particularmente aproximadamente el 87 % en comparación con la L-asparaginasa no modificada correspondiente. En una realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, con una PEGilación de aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) con un mPEG de 10.000 Da.

En una realización, el conjugado comprende una relación de mol de PEG/mol de monómero de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 10,5, particularmente aproximadamente 8,5; una actividad específica de aproximadamente 450 a aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 524 U/mg; y una actividad relativa de aproximadamente un 80 a aproximadamente un 90 %, particularmente aproximadamente el 84 % en comparación con la L-asparaginasa no modificada correspondiente. En una realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, con una PEGilación de aproximadamente un 40-55 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) con un mPEG de 2.000 Da.

En una realización, el conjugado comprende una relación de mol de PEG/mol de monómero de aproximadamente 12,5 a aproximadamente 15,5, particularmente aproximadamente 6,5; una actividad específica de aproximadamente 450 a aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 515 U/mg; y una actividad relativa de aproximadamente un 80 a aproximadamente un 90 %, particularmente aproximadamente el 83 % en comparación con la L-asparaginasa no modificada correspondiente. En una realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, con una PEGilación de aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) con un mPEG de 2.000 Da.

En otras realizaciones, el conjugado de la invención tiene una potencia aumentada de al menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces tras una única inyección en comparación con la L-asparaginasa no modificada correspondiente. En una realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En una realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tenga un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da. En una realización más particular, al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están PEGilados.

En un aspecto, el conjugado de la invención tiene un perfil farmacocinético de acuerdo con los siguientes parámetros:

Parámetro	Definición
A_{max}	Actividad enzimática residual máxima
$t_{A_{max}}$	Tiempo para la A_{max} tras la exposición al artículo de ensayo
$d_{A_{max}}$	Duración máxima de A_{max} o A sobre cero

El tiempo de semivida de la actividad enzimática residual en el plasma se deriva de la siguiente fórmula:
Media:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 2 \times t}{\ln(c_t / c_0)}$$

donde $t_{1/2}$ es la semivida, t es el punto de tiempo, c_t es la actividad plasmática residual en el punto de tiempo y c_0 es

la actividad plasmática residual al principio. El área bajo la curva (AUC) se calcula utilizando un programa de software de farmacocinética, por ejemplo, SigmaPlot Version 11.

En una realización, el conjugado de la invención tiene un perfil farmacocinético de dosis única de acuerdo con lo siguiente, específicamente en el que el conjugado comprende mPEG con un peso molecular menor o igual a 2000 Da y una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1:

$A_{m\acute{a}x}$: aproximadamente 150 U/l a aproximadamente 250 U/l;
 $T_{Am\acute{a}x}$: aproximadamente 4 h a aproximadamente 8 h, específicamente aproximadamente 6 h;
 $d_{Am\acute{a}x}$: aproximadamente 220 h a aproximadamente 250 h, específicamente, aproximadamente 238,5 h (sobre cero, desde aproximadamente 90 min a aproximadamente 240 h);
 AUC: aproximadamente de 12000 a aproximadamente 30000; y
 $t_{1/2}$: aproximadamente 50 h a aproximadamente 90 h.

En una realización, el conjugado de la invención tiene un perfil farmacocinético de dosis única de acuerdo con lo siguiente, específicamente en el que el conjugado comprende mPEG con un peso molecular menor o igual a 5000 Da y una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1:

$A_{m\acute{a}x}$: aproximadamente 18 U/l a aproximadamente 250 U/l;
 $T_{Am\acute{a}x}$: aproximadamente 1 h a aproximadamente 50 h;
 $d_{Am\acute{a}x}$: aproximadamente 90 h a aproximadamente 250 h, específicamente, aproximadamente 238,5 h (sobre cero, desde aproximadamente 90 min a aproximadamente 240 h);
 AUC: aproximadamente de 500 a aproximadamente 35000; y
 $t_{1/2}$: aproximadamente 30 h a aproximadamente 120 h.

En una realización, el conjugado de la invención da como resultado un nivel de agotamiento de L-asparagina similar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 24, 48, o 72 horas) después de una única dosis en comparación con una cantidad equivalente de proteína de pegaspargasa. En una realización específica, el conjugado comprende una L-asparaginasa de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En una realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tenga un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da. En una realización más particular, al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están PEGilados, más particularmente aproximadamente un 40-55 % o el 100 %.

En una realización, el conjugado de la invención tiene un $t_{1/2}$ más largo que la pegaspargasa administrada a una dosis de proteína equivalente. En una realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, o 65 horas a una dosis de aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (basándose en el contenido proteico). En otra realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39, o 40 horas a una dosis de aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (basándose en el contenido proteico). En otra realización el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 200 horas a una dosis que varía desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente 15.000 U/m^2 (aproximadamente 20-30 mg de proteína/ m^2).

En una realización, el conjugado de la invención tiene una AUC media que es al menos aproximadamente 2, 3, 4, o 5 veces mayor que la de la pegaspargasa a una dosis de proteína equivalente.

En una realización, el conjugado de la invención no produce una respuesta de anticuerpos significativa durante un periodo de tiempo particular después de la administración de una única dosis, por ejemplo, mayor de aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, etc. En una realización particular el conjugado de la invención no produce una respuesta de anticuerpos significativa durante al menos 8 semanas. En un ejemplo, "no produce una respuesta de anticuerpos significativa" significa que el sujeto que recibe el conjugado se identifica con los parámetros reconocidos en la técnica como "negativo a anticuerpos". Los niveles de anticuerpo se pueden determinar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA o análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR-Biacore) (Zalewska-Szewczyk et al., Clin. Exp. Med. (2009) 9:113-116; Avramis et al., Anticancer Research 29 (2009) 299-302). Los conjugados de la invención pueden tener cualquier combinación de estas propiedades.

Uso del conjugado

Los conjugados de la invención se pueden utilizar en el tratamiento de una enfermedad tratable por agotamiento de asparagina. Por ejemplo, el conjugado es útil en el tratamiento o la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) tanto en adultos como en niños, así como otras afecciones en

las que se espera que el agotamiento de asparagina tenga un efecto útil. Dichas afecciones incluyen, pero no se limitan a las siguientes: enfermedades malignas o cánceres, que incluyen pero no se limitan a enfermedades malignas hematológicas, linfoma no de Hodgkin, linfoma NK, cáncer pancreático, enfermedad de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfosarcoma, reticulosarcoma, y melanosarcoma. Las enfermedades hematológicas no malignas representativas que responden al agotamiento de asparagina incluyen enfermedades sanguíneas mediadas por el sistema inmunológico, por ejemplo, enfermedades infecciosas tales como las causadas por la infección por VIH (por ejemplo, SIDA). Enfermedades no hematológicas asociadas con la dependencia de asparagina incluyen las enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, LES autoinmunitario, enfermedades vasculares del colágeno, SIDA, etc. Otras enfermedades autoinmunitarias incluyen osteoartritis, síndrome de Isaac, psoriasis, diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, Panencefalitis esclerosante, lupus eritematoso sistémico, fiebre reumática, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn), cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica, glomerulonefritis, miastenia gravis, pénfigo vulgar, y enfermedad de Graves. Las células sospechosas de producir la enfermedad se pueden ensayar en cuanto a su dependencia de asparagina en cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, un ensayo *in vitro* en el que el medio de cultivo carece de asparagina. Por lo tanto, en una realización del tercer aspecto de la invención, el conjugado es para su uso en el tratamiento de LLA en un paciente. En una realización particular, el conjugado para su uso en el tratamiento de una enfermedad tratable por agotamiento de asparagina comprende una L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. El conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tenga un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da. En una realización más particular, al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están PEGilados, más particularmente aproximadamente un 40-55 % o el 100 %.

En una realización, un conjugado de la invención es para su administración como una primera línea de terapia. En otra realización, un conjugado de la invención es para su administración como una segunda línea de tratamiento en pacientes, particularmente en pacientes con LLA, en los que se han desarrollado signos objetivos de alergia o hipersensibilidad, incluyendo "hipersensibilidad silente" contra otras preparaciones de asparaginasa, en particular contra la L-asparaginasa derivada de *Escherichia coli* o su variante PEGilada (pegaspargasa). Ejemplos no limitantes de los signos objetivos de alergia o hipersensibilidad incluyen el ensayo de "positivo a anticuerpos" de la enzima asparaginasa. En una realización específica, el conjugado de la invención se utiliza en una segunda línea de terapia tras el tratamiento con pegaspargasa. En una realización más específica, el conjugado para su uso en una segunda línea de terapia comprende una L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. El conjugado comprende adicionalmente un PEG (por ejemplo, mPEG) que tenga un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da, más específicamente aproximadamente 5000 Da. En una realización más específica, al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están PEGilados, más particularmente aproximadamente un 40-55 % o el 100 %.

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. En una realización, el conjugado se va a administrar a una dosis que varía desde aproximadamente 1500 UI/m² a aproximadamente 15.000 UI/m², normalmente aproximadamente 10.000 a aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente 20-30 mg de proteína/m²), con una programación que varía desde aproximadamente dos veces a la semana a aproximadamente una vez al mes, normalmente una vez a la semana o una vez cada dos semanas, como un agente único (por ejemplo, monoterapia) o como parte de una combinación de fármacos quimioterápicos, incluyendo pero sin limitarse a glucocorticoides, corticosteroides, compuestos anti-cáncer y otros agentes, que incluyen, pero no se limitan a metotrexato, dexametasona, prednisona, prednisolona, vincristina, ciclofosfamida, y antraciclina. Como ejemplo, se administrará a los pacientes con LLA el conjugado de la invención como un componente de una quimioterapia multi-agente durante tres fases de quimioterapia que incluye la inducción, consolidación o intensificación, y mantenimiento. En un ejemplo específico, el conjugado no es para administrarse con un inhibidor de la asparagina sintetasa (por ejemplo, tal como se expone en la Pub. PCT N° WO 2007/103290). En otro ejemplo específico, el conjugado no es para administrarse con un inhibidor de la asparagina sintetasa, pero se administra con otros fármacos quimioterápicos. El conjugado se puede administrar antes, después o simultáneamente con otros compuestos como parte de un régimen de quimioterapia multi-agente. En una realización particular, el conjugado comprende L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. El conjugado comprende un PEG (por ejemplo, mPEG) que tenga un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da. En una realización particular, al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están PEGilados, más particularmente aproximadamente un 40-55 % o el 100 %.

En una realización específica, el conjugado de la invención es para su administración en una cantidad de aproximadamente 1 U/kg a aproximadamente 25 U/kg (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 U/kg) o una cantidad equivalente del mismo (por ejemplo, basándose en el contenido proteico). En una realización más específica, el conjugado es para su administración a una cantidad que se selecciona de entre el grupo que consiste en aproximadamente 5, aproximadamente 10, y aproximadamente 25 U/kg. En otra realización específica, el conjugado es para su administración a una dosis que

varía desde aproximadamente 1.000 UI/m² a aproximadamente 20.000 UI/m² (por ejemplo, 1.000 UI/m², 2.000 UI/m², 3.000 UI/m², 4.000 UI/m², 5.000 UI/m², 6.000 UI/m², 7.000 UI/m², 8.000 UI/m², 9.000 UI/m², 10.000 UI/m², 11.000 UI/m², 12.000 UI/m², 13.000 UI/m², 14.000 UI/m², 15.000 UI/m², 16.000 UI/m², 17.000 UI/m², 18.000 UI/m², 19.000 UI/m², o 20.000 UI/m²). En otra realización específica, el conjugado es para su administración a una dosis que agote la actividad L-asparaginasa a niveles indetectables utilizando los métodos y aparatos conocidos en la técnica durante un periodo de aproximadamente 3 días a aproximadamente 10 días (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 días) con una única dosis. En otra realización, el conjugado para su uso en medicina produce una respuesta inmunogénica menor en un paciente en comparación con una L-asparaginasa no conjugada. En otra realización, el conjugado para su uso en medicina tiene una semivida circulante *in vivo* más larga tras una única dosis en comparación con la L-asparaginasa no conjugada. En una realización, el conjugado para su uso en medicina tiene un $t_{1/2}$ más largo que la pegaspargasa administrada a una dosis proteica equivalente. En una realización específica, el conjugado para su uso en medicina tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, o 65 horas si se administra a una dosis de aproximadamente 50 µg/kg (basándose en el contenido proteico). En otra realización específica, el conjugado para su uso en medicina tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 30, 32, 34, 36, 37, 39, o 40 horas si se administra a una dosis de aproximadamente 10 µg/kg (basándose en el contenido proteico). En otra realización específica, el conjugado para su uso en medicina tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 30 a aproximadamente 65 horas si se administra a una dosis que varía desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente 20-30 mg de proteína/m²). En una realización, el conjugado para su uso en medicina tiene una AUC media que es al menos de aproximadamente 2, 3, 4, o 5 veces mayor que la pegaspargasa a una dosis proteica equivalente. En otra realización, el conjugado para su uso en medicina tiene un valor de la AUC mayor tras una única dosis en comparación con la L-asparaginasa no conjugada. En una realización particular, el conjugado comprende L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. El conjugado comprende un PEG (por ejemplo, mPEG) que tenga un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da. En una realización particular al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están PEGilados, más particularmente aproximadamente un 40-55 % o el 100 %.

La incidencia de recaída en los pacientes con LLA después del tratamiento con L-asparaginasa sigue siendo alta, teniendo aproximadamente un 10-25 % de pacientes pediátricos de LLA una recaída temprana (por ejemplo, durante la fase de mantenimiento a los 30-36 meses tras la inducción) (Avramis y Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44:367-393). Si un paciente tratado con L-asparaginasa derivada de *E. coli* tiene una recaída, el tratamiento posterior con preparaciones de *E. coli* podría dar lugar a un efecto de "vacunación", de manera que la preparación de *E. coli* tiene un aumento de inmunogenicidad durante las siguientes administraciones. En una realización, el conjugado de la invención es para su uso en el tratamiento de pacientes con una recaída de LLA que se han tratado previamente con otras preparaciones de asparaginasa, en particular los que se han tratado previamente con asparaginasas derivadas de *E. coli*.

En algunas realizaciones, el conjugado para su uso de acuerdo con la invención tiene propiedades o combinaciones de propiedades descritas anteriormente en el presente documento (por ejemplo, en la sección titulada "conjugados PEG-L-asparaginasa" o posteriormente en el presente documento).

Composiciones, formulaciones y vías de administración

Se desvela una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la invención. En una realización específica la composición farmacéutica está contenida en un vial como un polvo liofilizado para reconstituirse con un disolvente, tal como las L-asparaginasas nativas disponibles actualmente, cualquiera que sea la fuente bacteriana utilizada para su producción (Kidrolase®, Elspar®, Erwinase®...). En otra realización, la composición farmacéutica es una solución "lista para su uso", tal como la pegaspargasa (Oncaspar®) que hace posible, tras su manejo apropiado, una administración mediante, por ejemplo, las vías intramuscular, intravenosa (en infusión y/o embolada), intracerebroventricular (icv), subcutánea.

Los conjugados de la invención, incluyendo las composiciones que comprenden conjugados de la invención (por ejemplo, una composición farmacéutica) se pueden administrar a un paciente utilizando técnicas convencionales. Las técnicas y formulaciones se pueden encontrar en general en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990.

Las formas de dosificación adecuadas, dependen en parte, del uso o la vía de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica, transmucosa, o por inyección (parenteral). Dichas formas de dosificación deberían permitir que el agente terapéutico alcance una célula diana o de otra manera tenga el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que se inyectan en la corriente sanguínea preferentemente son solubles.

Los conjugados y/o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular como sales farmacéuticamente aceptables y complejos de las mismas. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales no tóxicas presentes en cantidades y concentraciones a las que se administran. La preparación de dichas sales puede facilitar el uso farmacéutico alterando las características físicas del compuesto sin evitar que ejerza su efecto

fisiológico. Las alteraciones útiles en las propiedades físicas incluyen la disminución del punto de fusión para facilitar la administración transmucosa y el aumento de la solubilidad para facilitar la administración de concentraciones mayores del fármaco. La sal farmacéuticamente aceptable de una asparaginasa puede estar presente como un complejo, como apreciarán los expertos en la técnica.

5 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales por adición de ácidos como las que contienen sulfato, hidrocloreuro, fumarato, maleato, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato, y quinato. Las sales farmacéuticamente
10 aceptables se pueden obtener a partir de ácidos, incluyendo ácido clorhídrico, ácido maleico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido sulfámico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido ciclohexilsulfámico, ácido fumárico, y ácido quínico.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales por la adición de bases tales como las que contienen benzatina, clorprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, meglumina, procaína, aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, amonio, alquilamina, y zinc, cuando están presentes grupos funcionales ácidos, tales como el ácido carboxílico o fenol. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, supra. Dichas sales se pueden preparar utilizando las bases apropiadas correspondientes.

20 También se pueden incorporar vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para facilitar la administración de la asparaginasa particular. Ejemplos de los vehículos adecuados para su uso en la práctica de la invención incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, distintos azúcares tales como lactosa, glucosa, o sacarosa, o tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles, y disolventes fisiológicamente compatibles. Ejemplos de disolventes
25 fisiológicamente compatibles incluyen soluciones estériles de agua para inyección (WFI), solución salina, y dextrosa.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar por diferentes vías, incluyendo la administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral, tópica (transdérmica), o transmucosa. Para la administración sistémica, se prefiere la administración oral. Para la administración oral, por ejemplo, se
30 pueden formular los compuestos en formas de dosificación oral convencionales tales como cápsulas, comprimidos, y preparaciones líquidas tales como jarabes, elixires, y gotas concentradas.

De manera alternativa, se puede utilizar la inyección (administración parenteral), por ejemplo, la inyección intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, y subcutánea. Para la inyección, las composiciones farmacéuticas se
35 formulan en soluciones líquidas, preferentemente en soluciones o tampones compatibles fisiológicamente, tales como una solución salina, solución de Hank, o solución de Ringer. Además, los compuestos se pueden formular en una forma sólida y re-disolverla o suspenderla inmediatamente antes de su uso. Por ejemplo, se pueden producir formas liofilizadas del conjugado. En una realización específica, el conjugado se administra por vía intramuscular. En una realización específica, el conjugado se administra por vía intravenosa.

40 La administración sistémica también se puede conseguir por medios transmucoso o transdérmico. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación, penetrantes de la barrera apropiados para que penetren. Dichos penetrantes se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. Además, se pueden utilizar detergentes para facilitar la
45 penetración. La administración transmucosa puede ser, por ejemplo, mediante pulverizadores nasales, inhaladores (para el suministro pulmonar), supositorios rectales, o supositorios vaginales. Para la administración tópica, los compuestos se pueden formular en ungüentos, pomadas, geles o cremas, como es bien conocido en la técnica.

Las cantidades del conjugado que se van a suministrar dependerán de muchos factores, por ejemplo, la CI50, CE50, la semivida biológica del compuesto, la edad, tamaño, peso, y condición física del paciente, y la enfermedad o trastorno que se va a tratar. La importancia de estos y otros factores que se van a considerar son bien conocidos por los expertos habitados en la técnica. En general, la cantidad del conjugado que se va a administrar variará desde
50 aproximadamente 10 Unidades internacionales por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente (UI/m^2) a $50.000 UI/m^2$, siendo preferido un intervalo de dosificación de aproximadamente $1.000 UI/m^2$ a aproximadamente $15.000 UI/m^2$, y siendo más preferido un intervalo de aproximadamente $6.000 UI/m^2$ a aproximadamente $15.000 UI/m^2$, y siendo particularmente preferido un intervalo de aproximadamente $10.000 UI/m^2$ a aproximadamente $15.000 UI/m^2$ (aproximadamente 20-30 mg de proteína/ m^2) para tratar una enfermedad hematológica maligna, por ejemplo, leucemia. Normalmente, estas dosificaciones se administran mediante inyección intramuscular o intravenosa con un intervalo de aproximadamente 3 veces a la semana a aproximadamente una vez
60 al mes, normalmente una vez a la semana o una vez cada dos semanas durante el curso de la terapia. Por supuesto, se pueden emplear otros regímenes de tratamiento y/o dosificaciones, como determine el médico encargado.

En realizaciones particulares, el conjugado y/o composición farmacéutica o formulación que se va a administrar
65 como se ha descrito en el presente documento comprende L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia

de SEQ ID NO: 1. En una realización particular, el conjugado comprende L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente de *Erwinia chrysanthemi* y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En una realización particular, el conjugado comprende un PEG (por ejemplo, mPEG) que tenga un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da. En una realización más particular, al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) están PEGilados.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Preparación de Crisantaspasa recombinante

La cepa bacteriana recombinante para fabricar la L-asparaginasa proteica recombinante de *Erwinia chrysanthemi* (a la que también se hace referencia en el presente documento como "r-crisantaspasa") fue la cepa BL21 de *E. coli* con un gen *ansB* eliminado (el gen que codifica la L-asparaginasa tipo II de *E. coli*) para evitar la potencial contaminación de la L-asparaginasa recombinante de *Erwinia chrysanthemi* con esta enzima. La eliminación del gen *ansB* se produce con métodos de recombinación homóloga y transducción por fago llevada a cabo de acuerdo con las tres etapas siguientes: 1) se transformó una cepa bacteriana (NM1100) que expresa un fago lambda defectuoso que suministra funciones que protegen y recombinan un sustrato de ADN lineal electroporado en la células bacteriana con un plásmido lineal (casete de kanamicina) que contenía el gen de kanamicina flanqueado por una secuencia diana de reconocimiento de FLP (FRT). Se produce la recombinación sustituyendo el gen *ansB* por el casete de kanamicina en el genoma bacteriano, dando como resultado una cepa $\Delta ansB$; 2) se utilizó la transducción del fago para integrar la región del casete de kanamicina integrada de la cepa $\Delta ansB$ NM1100 al locus *ansB* de la cepa BL21. Esto daba como resultado una cepa BL21 de *E. coli* con un gen *ansB* eliminado y resistente a la kanamicina; 3) esta cepa se transformó con un plásmido auxiliar FLP para retirar el gen de kanamicina por recombinación homóloga en la secuencia FRT. El genoma de la cepa vinal (cepa BL21 $\Delta ansB$) se secuenció, confirmando la eliminación completa del gen *ansB* endógeno.

La secuencia de ADN optimizada en *E. coli* que codifica la L-asparaginasa madura de *Erwinia chrysanthemi* fusionada con el péptido de señal ENX de *Bacillus subtilis* se insertó en un vector de expresión. Este vector permite la expresión de L-asparaginasa recombinante de *Erwinia chrysanthemi* bajo el control del promotor híbrido T5/lac inducido por la adición de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y confiere la resistencia a la kanamicina.

La cepa BL21 $\Delta ansB$ se transformó con este vector de expresión. Se utilizaron las células transformadas para la producción de la r-crisantaspasa mediante fermentación de glucosa en cultivo semi-continuo en medio Reisenberg. La inducción de las células se hizo durante 16 h a 23 °C con IPTG como inductor. Tras la recolección de las células y la lisis por homogeneización en tampón de fosfato sódico 10 mM pH 6, 5 mM de EDTA (Tampón A), se clarificó la solución centrifugando dos veces a 15000 g, seguido por etapas de filtración en 0,45 mm y 0,22 mm. La L-asparaginasa recombinante de *Erwinia chrysanthemi* se purificó después utilizando una secuencia de etapas de cromatografía y concentración. En resumen, el punto isoelectrónico teórico de la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (7,23) permite a la enzima recombinante adsorber las resinas de intercambio catiónico a pH 6. Por lo tanto, la enzima recombinante se capturó en una columna Capto S (cromatografía de intercambio catiónico) y se eluyó con un gradiente salino en el Tampón A. Las fracciones que contenían la enzima recombinante se agruparon. La solución se purificó a continuación en una columna Capto MMC (cromatografía de intercambio catiónico) en el Tampón A con un gradiente salino. Las fracciones eluidas que contenían la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* se agruparon y se concentraron antes de la separación proteica en una cromatografía de exclusión por tamaño Superdex 200 pg como etapa de pulido. Las fracciones que contenían la enzima recombinante se agruparon, concentraron, y diafiltraron contra 100 mM de tampón de fosfato sódico pH 8. La pureza de la preparación final de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* se evaluó mediante SDS-PAGE (Figura 1) y RP-HPLC y era al menos del 90 %. La integridad de la enzima recombinante se verificó por secuenciación del extremo N y LC-MS. La actividad enzimática se midió a 37 °C utilizando el reactivo de Nessler. La actividad específica de la L-asparaginasa purificada recombinante de *Erwinia chrysanthemi* era alrededor de 600 U/mg. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 mmol de amoniaco a partir de la L-asparagina por minuto a 37 °C.

55 Ejemplo 2: Preparación de conjugados 10 kDa mPEG-L-asparaginasa

Se agitó una solución de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* en un tampón de fosfato sódico 100 mM a un pH 8,0, con una concentración proteica entre 2,5 y 4 mg/ml, en presencia de 150 mg/ml o 36 mg/ml de 10 kDa mPEG-NHS, durante 2 horas a 22 °C. El 10 kDa mPEG-L-asparaginasa en bruto resultante se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 200 pg en un sistema purificador UPC 100 de Äkta. Las fracciones que contenían la proteína se agruparon y se concentraron para dar una concentración proteica entre 2 y 8 ng/ml. Se prepararon dos conjugados 10 kDa mPEG-L-asparaginasa de esta manera que se diferenciaban en su grado de PEGilación según se determinó por el ensayo TNBS con la L-asparaginasa no modificada como referencia, uno se correspondía con la PEGilación completa (estando conjugados el 100 % de los restos de grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o extremo N) que se corresponden con la PEGilación del 78 % de los grupos amino totales (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N)); correspondiéndose el segundo con la PEGilación parcial (un 39 % de los grupos amino totales (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) o

aproximadamente un 50 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N). Se muestra en la Figura 2 el análisis SDS-PAGE de los conjugados. Los conjugados resultantes aparecían como una banda esencialmente homogénea y no contenía r-crisantaspasa no modificada detectable.

5 Ejemplo 3: Preparación de conjugados 5 kDa mPEG-L-asparaginasa

Se agitó una solución de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* en un tampón de fosfato sódico 100 mM a un pH 8,0, con una concentración proteica de 4 mg/ml, en presencia de 150 mg/ml o 22,5 mg/ml de 5 kDa mPEG-NHS, durante 2 horas a 22 °C. El 5 kDa mPEG-L-asparaginasa en bruto resultante se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 200 pg en un sistema purificador UPC 100 de Äkta. Las fracciones que contenían la proteína se agruparon y se concentraron para dar una concentración proteica entre 2 y 8 ng/ml. Se prepararon dos conjugados 5 kDa mPEG-L-asparaginasa de esta manera que se diferenciaban en su grado de PEGilación según se determinó por el ensayo TNBS con la L-asparaginasa no modificada como referencia, uno se correspondía con la PEGilación completa (estando conjugados el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o extremo N) que se corresponden con la PEGilación del 84 % de los grupos amino totales (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N)); correspondiéndose el segundo con la PEGilación parcial (un 36 % de los grupos amino totales (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) o aproximadamente un 43 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N). Se muestra en la Figura 2 el análisis SDS-PAGE de los conjugados. Los conjugados resultantes aparecían como una banda esencialmente homogénea y no contenía r-crisantaspasa no modificada detectable.

Ejemplo 4: Preparación de conjugados 2 kDa mPEG-L-asparaginasa

Se agitó una solución de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* en un tampón de fosfato sódico 100 mM a un pH 8,0, con una concentración proteica de 4 mg/ml, en presencia de 150 mg/ml o 22,5 mg/ml de 2 kDa mPEG-NHS, durante 2 horas a 22 °C. El 2 kDa mPEG-L-asparaginasa en bruto resultante se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 200 pg en un sistema purificador UPC 100 de Äkta. Las fracciones que contenían la proteína se agruparon y se concentraron para dar una concentración proteica entre 2 y 8 ng/ml. Se prepararon dos conjugados 2 kDa mPEG-L-asparaginasa de esta manera que se diferenciaban en su grado de PEGilación según se determinó por el ensayo TNBS con la L-asparaginasa no modificada como referencia, uno se correspondía con la PEGilación completa (estando conjugados el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o extremo N) que se corresponden con la PEGilación del 86 % de los grupos amino totales (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N)); correspondiéndose el segundo con la PEGilación parcial (un 47 % de los grupos amino totales (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) o aproximadamente un 55 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N). Se muestra en la Figura 2 el análisis SDS-PAGE de los conjugados. Los conjugados resultantes aparecían como una banda esencialmente homogénea y no contenía r-crisantaspasa no modificada detectable.

Ejemplo 5: Actividad de los conjugados de mPEG-r-crisantaspasa

La actividad L-asparaginasa aminohidrolasa de cada conjugado descrito en los ejemplos precedentes se determinó por análisis de Nessler del amoníaco que se libera de la L-asparagina por la actividad enzimática. En resumen, 50 ml de solución enzimática se mezcló con 20 mM de L-asparagina en un tampón de borato de sodio 50 mM pH 8,6 y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Esta reacción se detuvo por la adición de 200 ml de reactivo de Nessler. La absorbancia de esta solución se midió a 450 nm. La actividad se calculó a partir de una curva de calibración que se obtuvo con sulfato de amonio como referencia. Los resultados se resumen en la Tabla 2, a continuación:

Tabla 2: Actividad de los conjugados de mPEG-r-crisantaspasa

Muestra*	mol PEG/ mol monómero**	Actividad específica [U/mg]	Actividad Rel. %
10 kDa mPEG-r-crisantaspasa 40 %	7,0	543	87
10 kDa mPEG-r-crisantaspasa 100 %	14,1	541	87
5 kDa mPEG-r-crisantaspasa 40 %	6,5	501	81
5 kDa mPEG-r-crisantaspasa 100 %	15,1	483	78
2 kDa mPEG-r-crisantaspasa 40 %	8,5	524	84
2 kDa mPEG-r-crisantaspasa 100 %	15,5	515	83
r-crisantaspasa	-	622	100

* los números "40 %" y "100 %" indican un grado aproximado de PEGilación de respectivamente el 40-55 % y el 100 % de grupos amino accesibles (véase los Ejemplos 2-4, *supra*).

** la relación mol PEG / mol monómero se extrapola de los datos utilizando el ensayo TNBS que asume que todos los grupos amino de la proteína (por ejemplo, restos de lisina y el extremo N) son accesibles.

La actividad residual de los conjugados de mPEG-r-crisantaspasa variaba entre 483 y 543 Unidades/mg. Esto se corresponde con un 78-87 % de actividad L-asparagina aminohidrolasa de la enzima no modificada.

5 Ejemplo 6: Efecto de agotamiento de L-asparagina de la crisantaspasa no modificada

Se determinó el perfil farmacodinámico de Erwinase® en híbridos B6D2F1 (hembras, inmunocompetentes), Charles River Alemania. Erwinase® es una crisantaspasa disponible en el mercado (L-asparaginasa derivada de *Erwinia chrysanthemi*). En resumen, 2 animales por grupo recibieron una única inyección de 5, 25, 125, o 250 unidades/kg pc de Erwinase®. Se recolectaron muestras de plasma a -1 h pre-dosificación y a las 6 h, 12 h, 24 h y 48 h tras la dosificación, a partir del seno orbital y se analizaron en cuanto a niveles plasmáticos de L-asparagina.

Los niveles plasmáticos de aminoácido se determinaron con un kit de análisis de aminoácidos PICO-TAG (Waters). En resumen, se desproteinizaron las muestras de plasma mediante precipitación en metanol. Se derivaron los aminoácidos libres del sobrenadante con fenilisotiocianato y se cuantificaron por RP-HPLC.

Como se muestra en la Figura 3, las dosis de 5 y 25 U/kg no eran eficaces en el agotamiento de los niveles de L-asparagina en ratones después de la administración iv. Solamente la dosis de 250 U/kg inducía un agotamiento completo durante 48 h.

Este resultado ilustra las limitaciones clínicas del Erwinase®, una crisantaspasa modificada, que necesita que se administre hasta 3 veces a la semana en inyecciones dolorosas a los pacientes que padecen de LLA, y a altas dosis que dan como resultado reacciones alérgicas frecuentes e inmunogenicidad.

25 Ejemplo 7: Efecto de agotamiento de L-asparagina y actividad de L-asparaginasa plasmática después de una única administración de seis conjugados mPEG-r-crisantaspasa

Se determinaron los perfiles farmacodinámico y farmacocinético de 6 conjugados mPEG-r-crisantaspasa diferentes en híbridos B6D2F1 (inmunocompetentes, hembras), Charles River Alemania. Los seis conjugados ensayados se diferenciaban en el peso molecular del PEG (2, 5, o 10 kDa) y en el grado de PEGilación (PEGilación máxima vs. parcial). Se utilizó la crisantaspasa no modificada (Erwinase®) como referencia. En resumen, 4 animales por grupo recibieron una única inyección de 5 Unidades/kg pc de conjugado vs. 250 Unidades/kg pc de Erwinase®. Se recolectaron muestras de plasma a -1 h pre-dosificación y a las 6 h, 24 h, 48 h, 96 h y 192 h después de la inyección, a partir del seno orbital de cada animal y se analizaron en cuanto a los niveles plasmáticos de L-asparagina y la actividad enzimática residual, respectivamente.

Se determinaron los niveles plasmáticos de aminoácidos con un kit de análisis de aminoácidos PICO-TAG (Waters). En resumen, las muestras de plasma se desproteinizaron mediante precipitación en metanol. Los aminoácidos libres del sobrenadante se derivaron con fenilisotiocianato y se cuantificaron mediante RP-HPLC.

La actividad enzimática en el plasma se determinó por un ensayo cromogénico. Se utilizó L-aspartato β-hidroxamato (AHA) como sustrato. Las enzimas hidrolizaban el AHA a L-Asp e hidroxilamina, que se determinaron a 710 nm tras la condensación con 8-hidroxiquinolina y oxidación con indooxina. (Analytical Biochemistry 309 (2002): 117-126).

Como se muestra en la Figura 4, los conjugados administrados a 5 U/kg mostraban una potencia de agotamiento de L-asparagina al menos tan buena como la del Erwinase® a 250 U/kg, sugiriendo que la PEGilación aumentaba la potencia de la proteína al menos 50 veces. Todos los conjugados presentaban una potencia similar, agotando los niveles plasmáticos de L-asparagina durante 2 días, excepto el conjugado 5 kDa-100 % que mostraba una duración de acción más larga (96 h = 4 días en comparación con las 48 h = 2 días para los otros conjugados).

Por lo tanto, el aumento del tamaño del PEG conjugado con la r-crisantaspasa de 2 kDa a 5 kDa daba como resultado una potencia y duración de acción mejoradas. Sin embargo, sorprendentemente, el aumento del tamaño del PEG a 10 kDa no mejoraba adicionalmente la potencia y la duración de acción del conjugado, incluso daba como resultado una disminución en comparación con el conjugado con 5 kDa PEGilado máximamente.

La actividad enzimática era consistente con el agotamiento de L-asparagina. Como se muestra en la Figura 5, el conjugado 5 kDa-100 % presentaba la AUC mayor, lo que reflejaba una semivida más larga. Las AUC menores se observaron con los conjugados PEG-40 % (PEGilado parcialmente) vs. PEG-100 % (PEGilado máximamente) para los candidatos de 2 kDa y 5 kDa y no se observó diferencia para los candidatos de 10 kDa.

Consistente con los datos de agotamiento de L-asparaginasa, el aumento del tamaño molecular del PEG conjugado

con la r-crisantaspasa desde 2 kDa a 5 kDa daba como resultado una actividad de L-asparaginasa circulante más larga. Sin embargo, sorprendentemente, el aumento del tamaño del PEG a 10 kDa no mejoraba adicionalmente la actividad enzimática *in vivo* del conjugado, incluso daba como resultado una disminución cuando se comparaba con el conjugado PEGilado con 5 kDa máximamente. También, especialmente, cuando la r-crisantaspasa estaba monoPEGilada en el extremo N con mPEG de alto peso molecular (es decir, 40 kDa), no había un impacto significativo en la estabilidad de la enzima *in vitro* respecto a la proteólisis (datos no mostrados).

Ejemplo 8: Efectos de variación de dosis de dos conjugados mPEG-r-crisantaspasa sobre la L-asparagina plasmática

Se determinó el perfil farmacodinámico de 2 conjugados mPEG-r-crisantaspasa en comparación con la pegaspargasa (Oncaspar®) en Híbridos B6D2F1 (inmunocompetentes, hembras), Charles River Alemania. Los conjugados ensayados eran el de r-crisantaspasa PEGilado máximamente (100 %) de 2 kDa y el de r-crisantaspasa PEGilado máximamente (100 %) de 5 kDa a 3 dosis. En resumen, 8 animales por grupo recibieron una única inyección i.v. de 5, 25 o 50 Unidades/kg pc de los conjugados de r-crisantaspasa, que se corresponden con 10, 50 o 100 µg de proteína/kg. Como arma comparativa, se ensayó el Oncaspar® a 1 Unidad/kg, que se correspondía con 10 µg de proteína/kg. Se recolectaron muestras de plasma a -1 h pre-dosificación y a los 90 min, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 192 h y 240 h tras la dosificación a partir del seno orbital y se analizaron en cuanto a los niveles plasmáticos de L-asparagina.

Los niveles plasmáticos de aminoácido se determinaron con un kit de análisis de aminoácido PICO-TAG (Waters). En resumen, las muestras se desproteinizaron mediante precipitación en metanol. Los aminoácidos libres en el sobrenadante se derivaron con fenilisotiocianato y se cuantificaron por RP-HPLC.

Los efectos relacionados con la dosis de los conjugados sobre los niveles plasmáticos de L-asparagina se muestran en la Figura 6. Como se muestra en las Figuras 6A y 6B, ambos conjugados eran altamente eficaces en el agotamiento de la L-asparagina circulante. Para el conjugado 2 kDa 100 %, se observó un agotamiento total durante 3, 6 y al menos 10 días a las dosis de 5 U, 25 U y 50 U/kg, respectivamente. Para el conjugado de 5 kDa 100 %, el agotamiento total se observó durante 3, 10 y 10 días a las dosis de 5 U, 25 U y 50 U/kg, respectivamente. Para ambos conjugados ensayados, las dosis de 5, 25 y 50 U/kg ensayadas se correspondían con 10, 50 y 100 µg/kg basándose en el contenido proteico, que es una cantidad de proteína muy baja en comparación con otras preparaciones de L-asparaginasa disponibles. Además, el Erwinase® a 250 U/kg se corresponde con aproximadamente 520 µg/kg, y 1 U/kg de Oncaspar® se corresponde aproximadamente con 10 µg/kg (basándose en el contenido proteico). La Figura 6C muestra que la administración de una cantidad equivalente de proteína (10 µg/kg) del conjugado 2 kDa-100 %, el conjugado 5 kDa-100 % o el Oncaspar® daban como resultado un agotamiento de L-asparagina similar durante 72 h.

Ejemplo 9: Perfiles farmacocinéticos de dos conjugados mPEG-r-crisantaspasa

Se determinó el perfil farmacocinético de conjugados mPEG-r-crisantaspasa en Híbridos B6D2F1 (inmunocompetentes, hembras), Charles River Alemania. Los conjugados ensayados eran el de r-crisantaspasa PEGilada de 2 kDa máximamente (100 %) y el de r-crisantaspasa completamente PEGilada de 5 kDa máximamente (100 %) a 3 dosis. La crisantaspasa no modificada (Erwinase®) a 250 U/kg y el Oncaspar® a 1 U/kg se ensayaron también como controles. En resumen, 8 animales por grupo recibieron una única inyección i.v. de 5, 25 o 50 U/kg pc de cada conjugado mPEG-r-crisantaspasa comparada con Erwinase® y Oncaspar®. Se recolectaron los plasmas a -1 h pre-dosificación y a 90 min, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 192 h y 240 h post-dosificación a partir del seno orbital y se analizó en cuanto a los niveles plasmáticos de la actividad enzimática residual.

La actividad enzimática en el plasma se determinó por un ensayo cromogénico. Se utilizó el L-aspártico β-hidroxamato (AHA) como sustrato. Las enzimas hidrolizaban el AHA a L-Asp e hidroxilamina, que se determinó a 710 nm tras la condensación con 8-hidroxiquinolina y oxidación con indooxina. (Analytical Biochemistry 309 (2002): 117-126).

Para el cálculo del tiempo de semivida, se derivaron las líneas de mejor ajuste exponencial de las actividades plasmáticas residuales respectivas utilizando la herramienta de funciones de MS-excel. Los valores de actividad negativa se excluyeron del cálculo.

Parámetro	Definición
A_{max}	Actividad enzimática residual máxima
$t_{A_{max}}$	Tiempo para la A_{max} tras la exposición al artículo de ensayo
$d_{A_{max}}$	Duración máxima de A_{max} o A sobre cero

El tiempo de semivida de la actividad enzimática residual en el plasma se derivó de la siguiente fórmula utilizando la herramienta de función de MS-excel y la fórmula respectiva de las líneas de mejor ajuste exponencial:

Media:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 2 \times t}{\ln(c_t / c_0)}$$

donde $t_{1/2}$ es la semivida, t es el punto de tiempo, c_t es la actividad plasmática residual en el punto de tiempo y c_0 es la actividad residual plasmática al principio.

Las áreas bajo la curva (AUC) se calcularon utilizando el SigmaPlot Version11. Los datos farmacocinéticos se resumen en las Tablas 3 y 4, posteriores, y las Figuras 7-9.

Tabla 3: Farmacocinética primaria de un único tratamiento con 250 U/kg pc de Erwinase®, 1 U/kg pc de pegaspargasa (Oncaspar®), o conjugados 2 kDa mPEG-r-crisantaspasa 100 % (actividad enzimática plasmática residual)

Parámetro	Erwinase®	Pegaspargasa 1 U/kg pc	2 kDa / 100 % 5 U/kg pc	2 kDa 100 % 25 U/kg pc	2 kDa / 100 % 50 U/kg pc
A_{max}	83,9 U/L	6 U/L	14 U/L	153 U/L	208 U/L
t_{Amax}	6 h	90 min	90 min	6 h	6 h
d_{Amax} sobre cero	18 h de 6 h - 24 h	46,5 h 90 min - 48 h	70,5 h 90 min - 72 h	238,5 h 90 min - 240 h	238,5 h 90 min - 240 h
AUC (media)	1205	222	627	12446	28349
$t_{1/2}$	6 h	28 h	31 h	55 h	85 h

Tabla 4: Farmacocinética primaria de un único tratamiento con 250 U/kg pc de Erwinase®, 1 U/kg pc de pegaspargasa (Oncaspar®), o conjugados 5 kDa mPEG-r-crisantaspasa 100 % (actividad enzimática plasmática residual)

Parámetro	Erwinase®	Pegaspargasa 1 U/kg pc	5 kDa / 100 % 5 U/kg pc	5 kDa 100 % 25 U/kg pc	5 kDa / 100 % 50 U/kg pc
A_{max}	83.9 U/L	6 U/L	18 U/L	188 U/L	226 U/L
t_{Amax}	6 h	90 min	90 min	6 h	48 h
d_{Amax} sobre cero	18 h de 6 h - 24 h	46,5 h 90 min - 48 h	94,5 h 90 min - 96 h	238,5 h 90 min - 240 h	238,5 h 90 min - 240 h
AUC (media)	1205	222	798	19748	33151
$t_{1/2}$	6 h	28 h	38 h	63 h	104 h

Los datos muestran que la PEGilación de r-crisantaspasa prolonga significativamente la semivida cuando se compara con la crisantaspasa no modificada, y de una manera dependiente de la dosis (Tablas 3 y 4, Figuras 7-9).

De manera adicional, cuando se compara con el mismo nivel de dosis, las AUC medidas para el 5 kDa-100 % eran mayores que la que se observaban con los conjugados 2 kDa-100 %. Se encontró consistentemente una diferencia del 21 %, 37 % y 14 % en favor del conjugado 5 kDa-100 %, a las dosis de 5, 25 y 50 U/kg, respectivamente (Figura 8). El conjugado 5 kDa-100 % también parecía tener una semivida más larga que el propio Oncaspar® cuando se ensayaba a la misma dosis basándose en el contenido proteico, como se muestra en la Figura 9 y en los parámetros farmacocinéticos derivados que se muestran en la Tabla 4. Los perfiles farmacocinéticos superiores para los conjugados de *Erwinia* son sorprendentes, ya que se sabe que la L-asparaginasa derivada de *E. coli* tiene una semivida más larga en seres humanos y en animales que la L-asparaginasa derivada de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspasa). Por lo tanto, se habría previsto lógicamente una semivida más larga para la L-asparaginasa de *E. coli* PEGilada (pegaspargasa) en comparación con la r-crisantaspasa PEGilada. Sin embargo, inesperada y ventajosamente, la r-crisantaspasa PEGilada tiene una semivida más larga que la pegaspargasa.

La Tabla 5 posterior, resume los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos recopilados de varios experimentos, incluyendo los que se describen en los Ejemplos 7-9 del presente documento, que muestran que: 1) tanto el

conjugado 2 kDa-100 % como el 5 kDa-100 % eran muy potentes en el aumento de la potencia y duración de acción de la crisantaspasa, según se muestra por las marcadas diferencias observadas en comparación con el Erwinase®; 2) El conjugado 5 kDa-100 % tenía una actividad más larga que el conjugado 2 kDa-100 % y el Oncaspar®, como se muestra por la semivida más larga que se observó en todas las dosis ensayadas. En vista de los resultados sorprendentemente inferiores obtenidos con el conjugado 10 kDa-100 %, estos datos sugieren que el beneficio de la PEGilación aumenta con el tamaño del resto de PEG anclado a la crisantaspasa hasta los 5 kDa. El peso molecular de PEG más alto no añadía un beneficio adicional, y, al menos en el caso de 10 kDa, puede incluso ser perjudicial. Esto es inesperado y contrario a los resultados que se había visto, por ejemplo, cuando Holtsberg et al. conjugaron distintos pesos moleculares de PEG a la arginina desaminasa, otra enzima degradante de aminoácidos aislada de una fuente microbiana. En estos estudios, la función farmacocinética y farmacodinámica de la enzima arginina desaminasa aumentaba según aumentaba el tamaño del PEG unido desde un peso molecular de 5000 Da a 20.000 Da (Holtsberg, F.W., Journal of Controlled Release 80 (2002), 259-271).

Tabla 5

	Erwinase®	2 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa		5 kDa-100 % mPEG-r-crisantaspasa		Oncaspar®	
Dosis (µg/kg)	520	10	50	10	50	10	50
Dosis (U/kg)	250	5	25	5	25	1	5
T _{1/2} (h)	6	31	55	38	63	28	51
Duración del agotamiento de L-asparagina (días)	2	2-3	6	3-4	10+	3	8+

Además, como se ve con más detalle posteriormente, los datos de inmunogenicidad mostraban que el 10 kDa-100 % presentaba un perfil de inmunogenicidad inaceptable, un problema principal cuando se considera la administración del compuesto a pacientes que son alérgicos a la L-asparaginasa de *E. coli* o que han desarrollado anticuerpo anti-L-asparaginasa. A este respecto, el conjugado 10 kDa-100 % no es realmente adecuado. Se prefieren el 2 kDa-100 % y el 5 kDa-100 %, y el conjugado 5 kDa-100 % es particularmente preferible.

Ejemplo 10: Inmunogenicidad

Se determinó la inmunogenicidad de los conjugados mPEG-r-crisantaspasa en Híbridos B6D2F1 (inmunocompetentes, hembras), Charles River Alemania. Los animales se trataron dos veces por semana las semanas 1, 2, 3, 4, y 8 mediante inyección i.v. de 250 U/kg pc para el Erwinase® y 5 U/kg pc para todos los conjugados de r-crisantaspasa. Las muestras de suero se recolectaron a -1 h pre-dosificación y tras 1 sem., 2 sem., 4 sem., 6 sem., y 8 sem. a partir del seno orbital. Se determinaron los niveles de anticuerpos anti-crisantaspasa o anti-mPEG-r-crisantaspasa en el suero mediante ELISA. Los resultados se resumen en las Figura 10 y 11.

Se observaron altos títulos de anticuerpos anti-crisantaspasa contra la Erwinase® que comenzaban la semana 2 y se mantenían durante todo el periodo de estudio. Por el contrario, no se observaron niveles de anticuerpos significativos para los conjugados de r-crisantaspasa (Figura 10).

Como se muestra en la Figura 11, la producción de anticuerpos anti-conjugado se mantenía a baja intensidad y frecuencia para los conjugados 2 kDa y 5 kDa mPEG-r-crisantaspasa, y aumentaba con valores y frecuencia más altos para los conjugados de 10 kDa mPEG-r-crisantaspasa. No se notó una clara diferencia entre los conjugados PEGilados total y parcialmente (no mostrado).

Por lo tanto, estos datos demostraban que la estrategia de PEGilación que se seleccionó reducía la inmunogenicidad de los conjugados en comparación con la L-asparaginasa no modificada, disminuyendo marcadamente la respuesta de anticuerpos anti-crisantaspasa. Sin embargo, se detectaban anticuerpos anti-conjugado, especialmente con los conjugados de 10 kDa, y con menor intensidad con los conjugados de 2 kDa y 5 kDa.

En conclusión, parece que, hasta los 5 kDa, la PEGilación tiene éxito en la mejora del perfil farmacocinético, potencia y duración de acción de la r-crisantaspasa, mientras que se reduce la inmunogenicidad en comparación con la proteína no modificada, con una potencia y duración de acción que aumenta con el tamaño del polímero utilizado, siendo el conjugado 5 kDa mPEG-r-crisantaspasa ligeramente más potente que el conjugado 2 kDa mPEG-r-crisantaspasa. Sin embargo, el aumento adicional del tamaño del PEG a 10 kDa fallaba en mejorar adicionalmente la potencia y la duración de acción, ya que el conjugado 10 kDa mPEG-r-crisantaspasa era menos potente *in vivo* que el conjugado 5 kDa mPEG-r-crisantaspasa, a pesar de tener potencias *in vitro* similares.

Además, los conjugados 10 kDa mPEG-r-crisantaspa presentaban un perfil de inmunogenicidad inaceptable, un resultado inesperado en vista de los resultados publicados para otras proteínas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> ALIZE PHARMA II ABRIBAT, THIERRY
<120> L-ASPARAGINASA PEGILADA
- 10 <130> 356729D28474
<150> US 61/223.320
<151> 06-07-2009
- 15 <150> PCT/EP2010/054156
<151> 30-03-2010
<160> 1
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 327
<212> PRT
- 25 <213> *Erwinia chrysanthemi*
<400> 1

ES 2 636 476 T3

Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly
 20 25 30

Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
 35 40 45

Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn
 50 55 60

Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
 65 70 75 80

Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
 85 90 95

Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
 100 105 110

Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
 115 120 125

Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
 130 135 140

Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile
 145 150 155 160

ES 2 636 476 T3

Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr
 165 170 175

Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
 180 185 190

Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
 195 200 205

Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
 210 215 220

Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
 225 230 235 240

Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser
 245 250 255

Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
 260 265 270

Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
 275 280 285

Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg
 290 295 300

Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile
 305 310 315 320

Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
 325

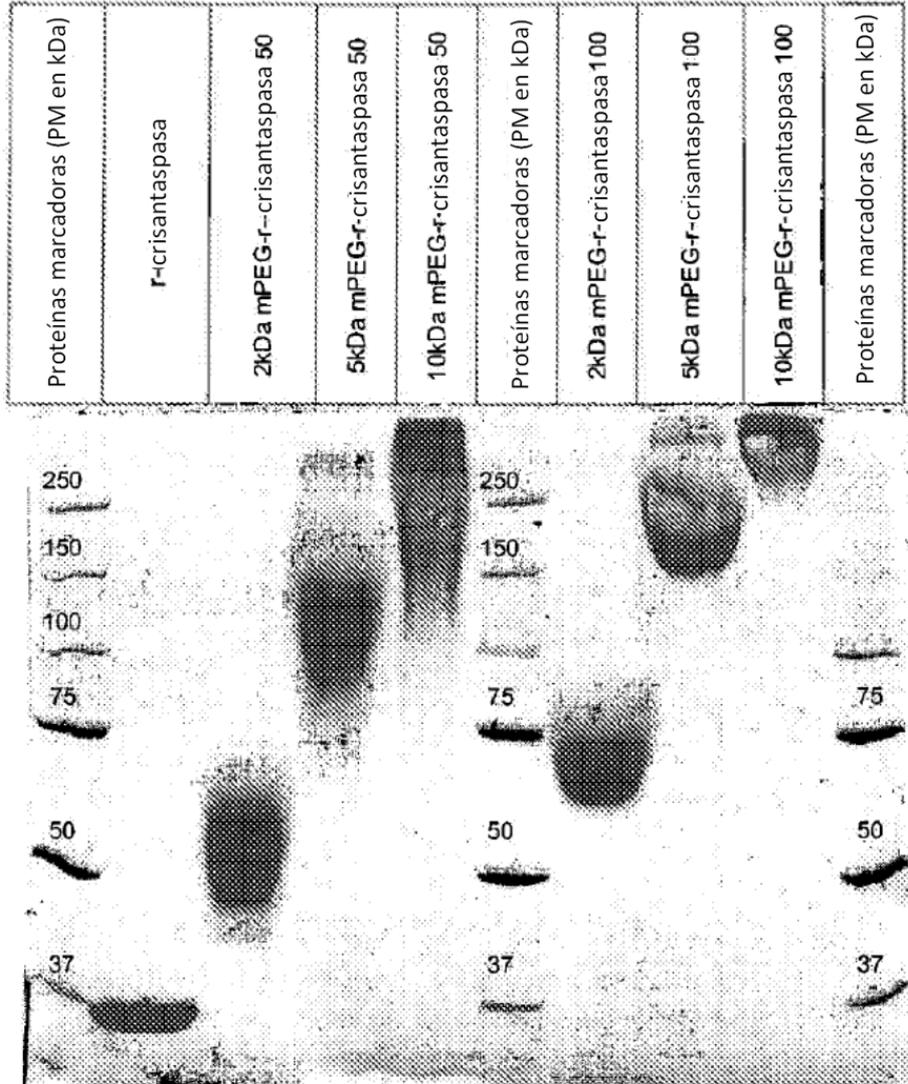
REIVINDICACIONES

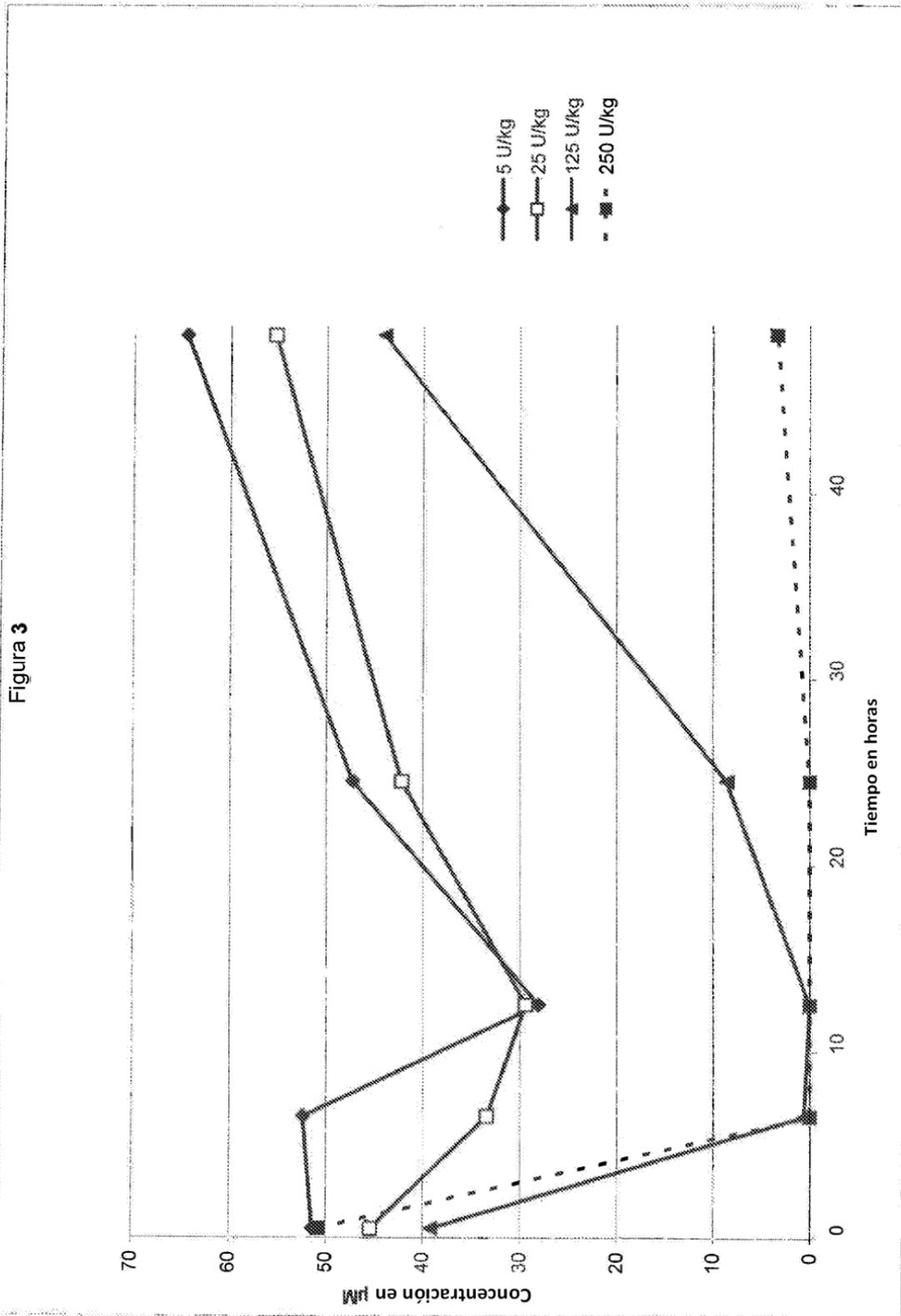
1. Un conjugado para su uso en medicina, teniendo el conjugado que comprende una L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y polietilenglicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5000 Da.
2. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha L-asparaginasa tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o al menos un 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
3. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha L-asparaginasa es idéntica a SEQ ID NO: 1.
4. El conjugado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho PEG tiene un peso molecular en el intervalo de al menos 500 Da.
5. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 Da, menos de aproximadamente 5000 Da, menos de aproximadamente 4000 Da, menos de aproximadamente 3000 Da o menos de aproximadamente 2500 Da.
6. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha L-asparaginasa es idéntica a SEQ ID NO: 1 y dicho PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 Da.
7. El conjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el PEG está unido covalentemente a uno o más grupos amino de dicha L-asparaginasa.
8. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el PEG está unido covalentemente a dichos uno o más grupos por un enlace amida.
9. El conjugado para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en el que el PEG está unido covalentemente a desde un 40 % al 100 % de los grupos amino accesibles, tal como desde el 40 % a aproximadamente el 90 % de los grupos amino totales.
10. El conjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que tiene la fórmula:
- $$\text{Asp-[N H-CO-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO-N H-PEG]}_n$$
- en la que Asp es la L-asparaginasa, NH es uno o más de los grupos NH de los restos de lisina y/o el extremo N de la Asp, PEG es un resto de polietilenglicol, n es un número que representa al menos un 40 % a aproximadamente el 100 % de los grupos amino accesibles (por ejemplo, restos de lisina y/o el extremo N) de la Asp, y x es un número entero que varía de 1 a 8, tal como en el que x es un número entero que varía de 2 a 5.
11. El conjugado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho PEG es monometoxi-polietilenglicol.
12. El conjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el tratamiento de un paciente para una enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina, opcionalmente en donde dicha enfermedad es una enfermedad hematológica maligna y se administra al paciente una dosis de desde 10.000 unidades internacionales por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente (UI/m²) a 15.000 UI/m².
13. El conjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el tratamiento de un paciente para una enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina, opcionalmente en donde la enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina es un cáncer, opcionalmente en donde dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no de Hodgkin, linfoma NK y cáncer pancreático.
14. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho cáncer es linfoma NK.
15. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho paciente ha tenido:
- (a) una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa de *E. coli* o una forma PEGilada de la misma o una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa de *Erwinia*, en donde dicha hipersensibilidad opcionalmente se selecciona de entre el grupo que consiste en reacción alérgica, choque anafiláctico e hipersensibilidad silente; o
 - (b) una recaída de la enfermedad, opcionalmente en donde dicha recaída de la enfermedad se produce tras el tratamiento con una L-asparaginasa de *E. coli* o una forma PEGilada de la misma.



Figura 1

Figura 2





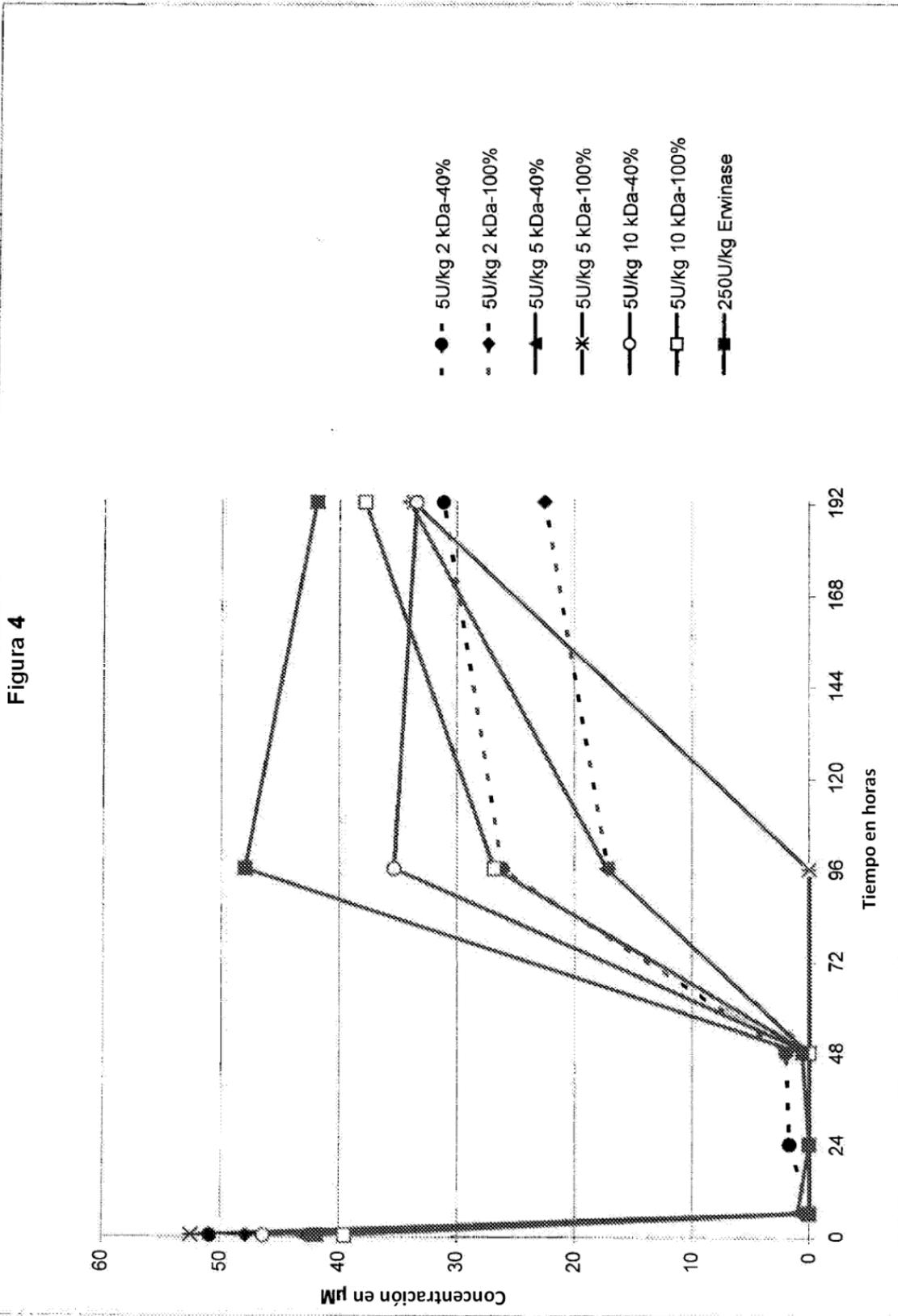


Figura 5

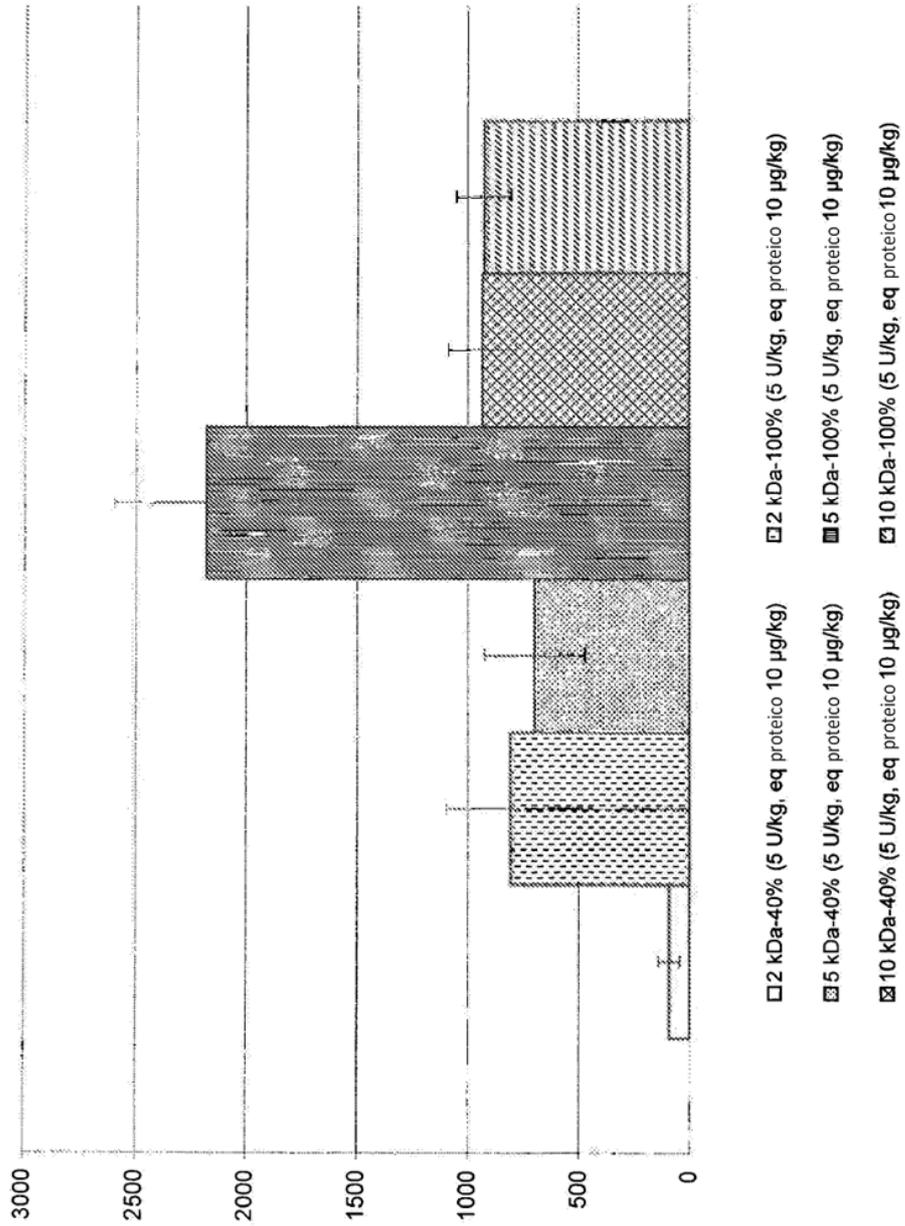
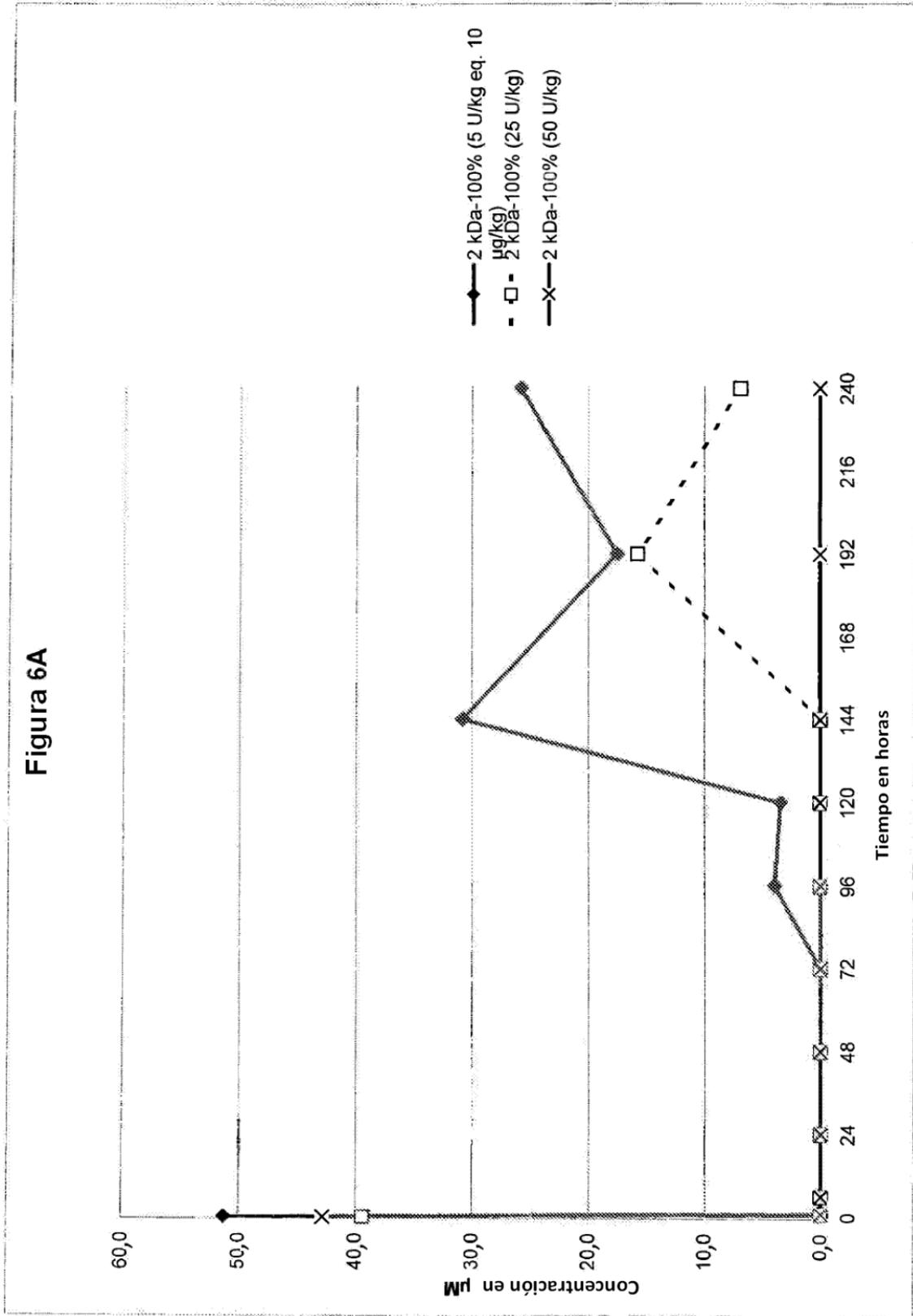


Figura 6A



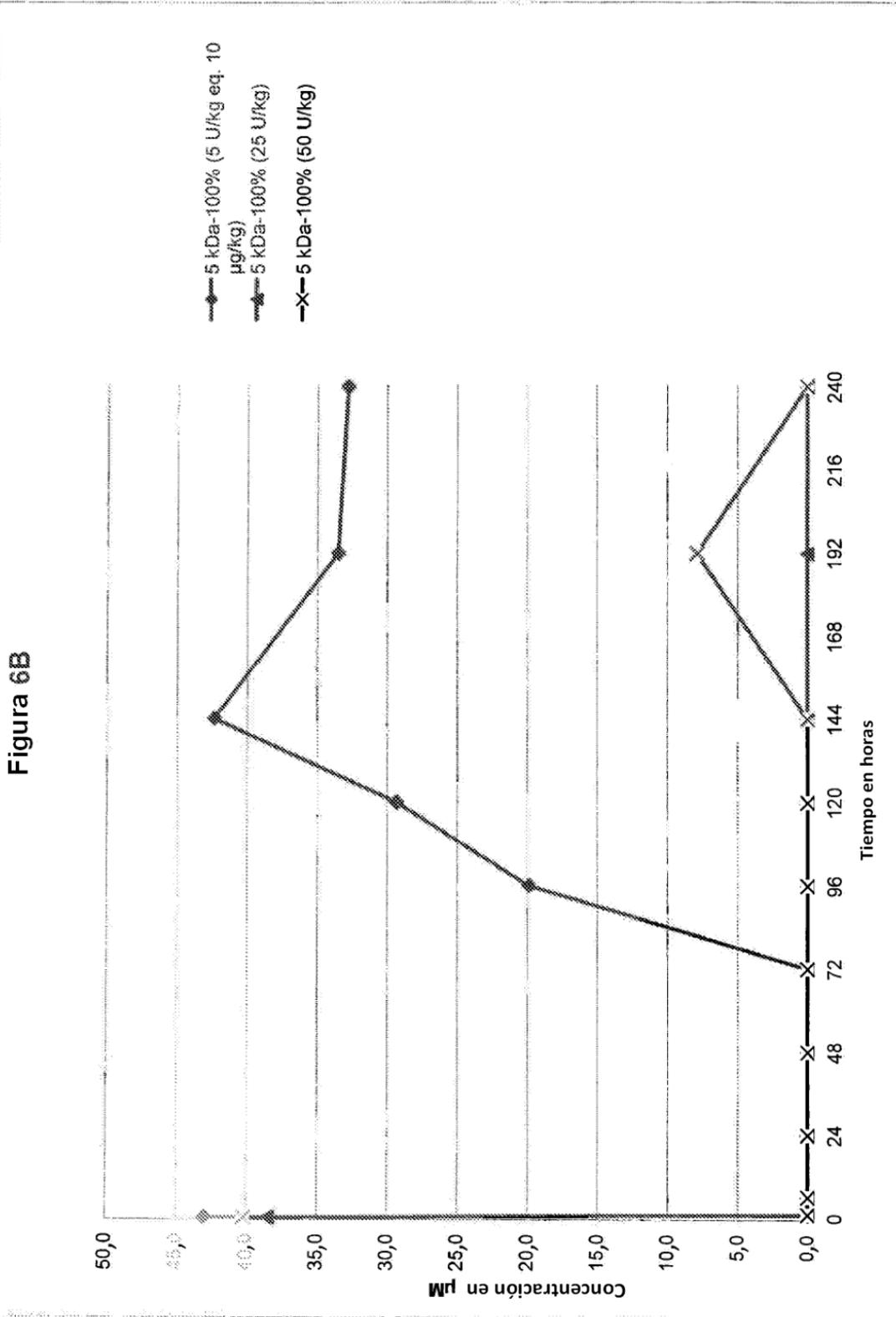


Figura 6C

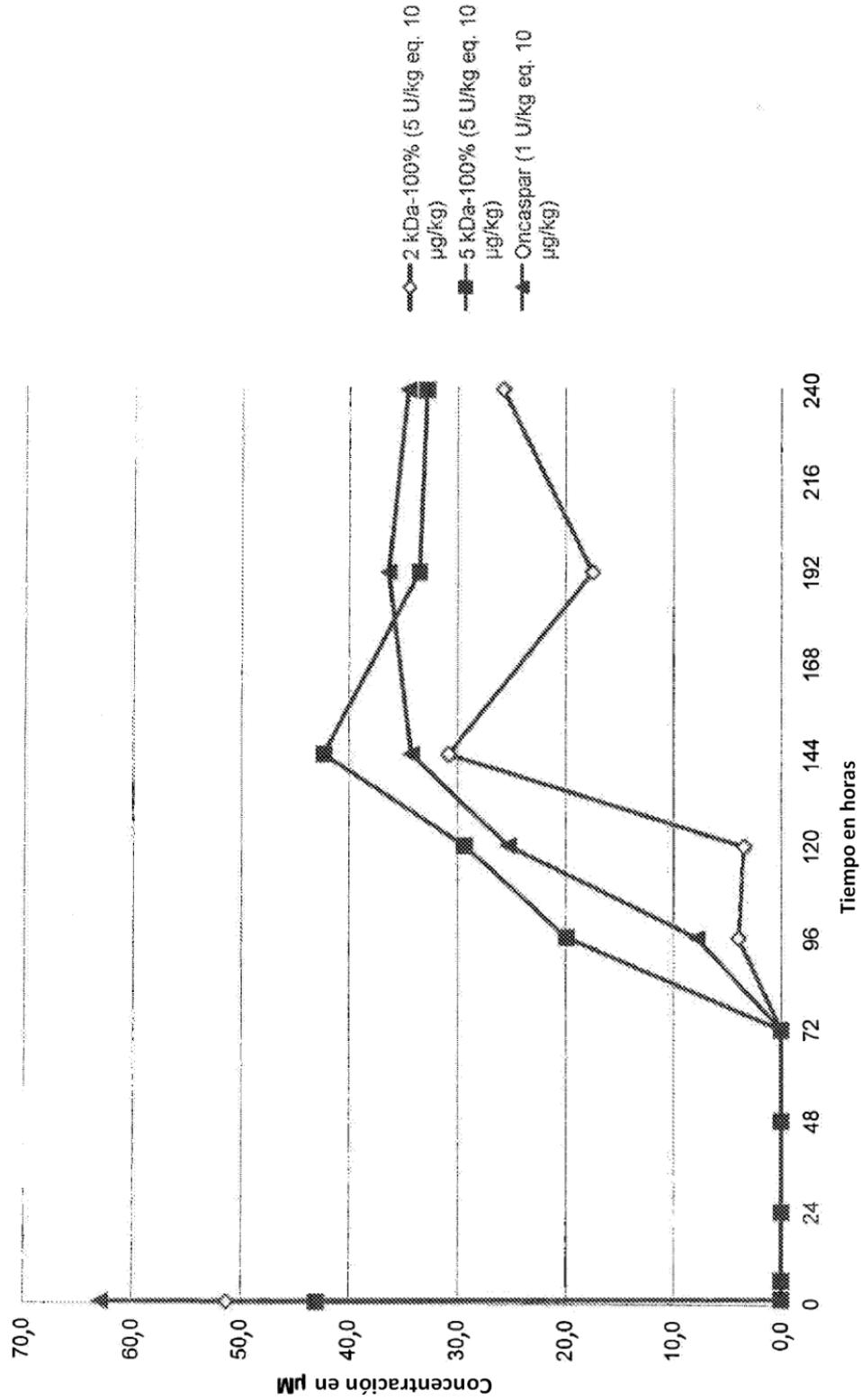


Figura 7A

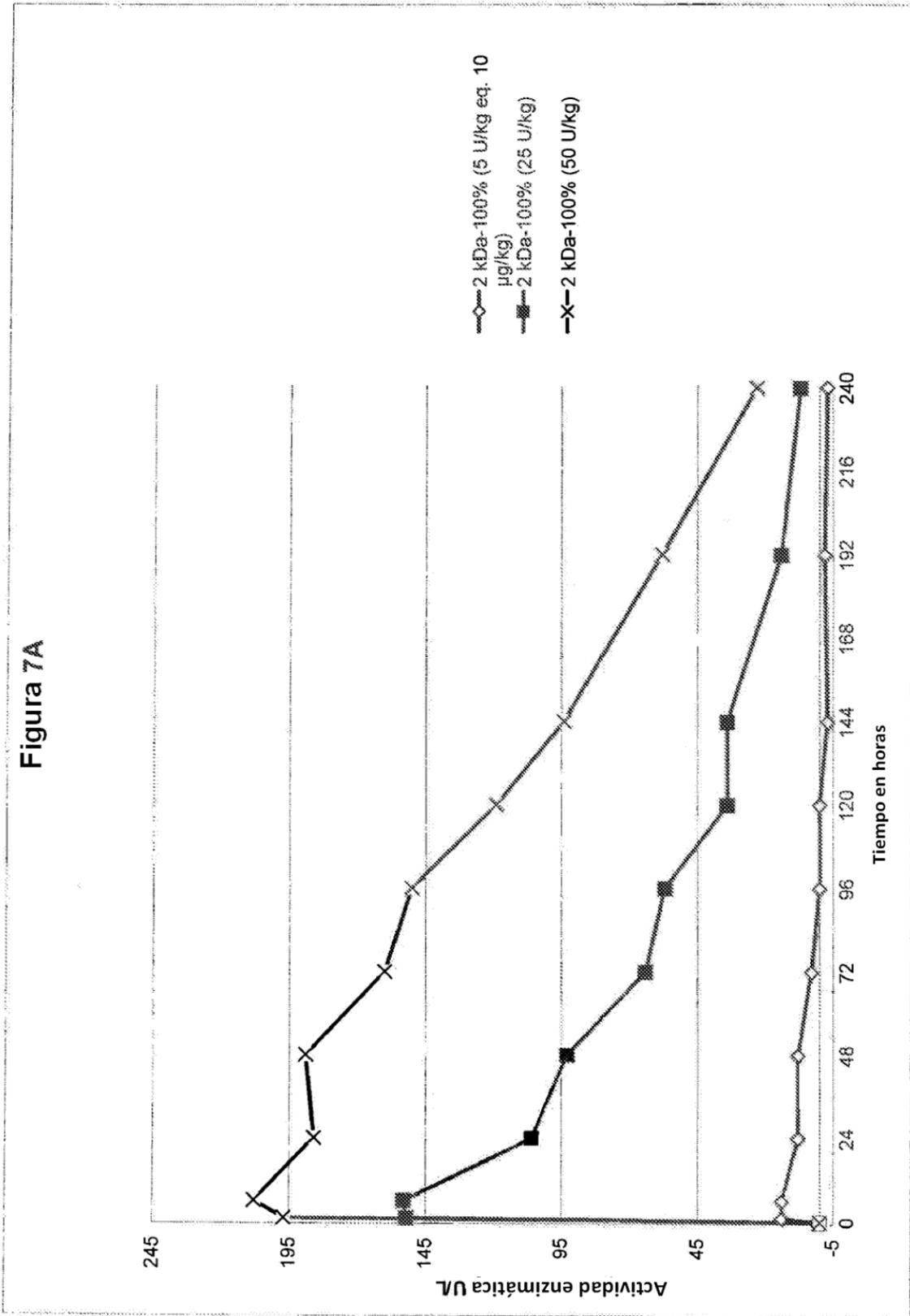
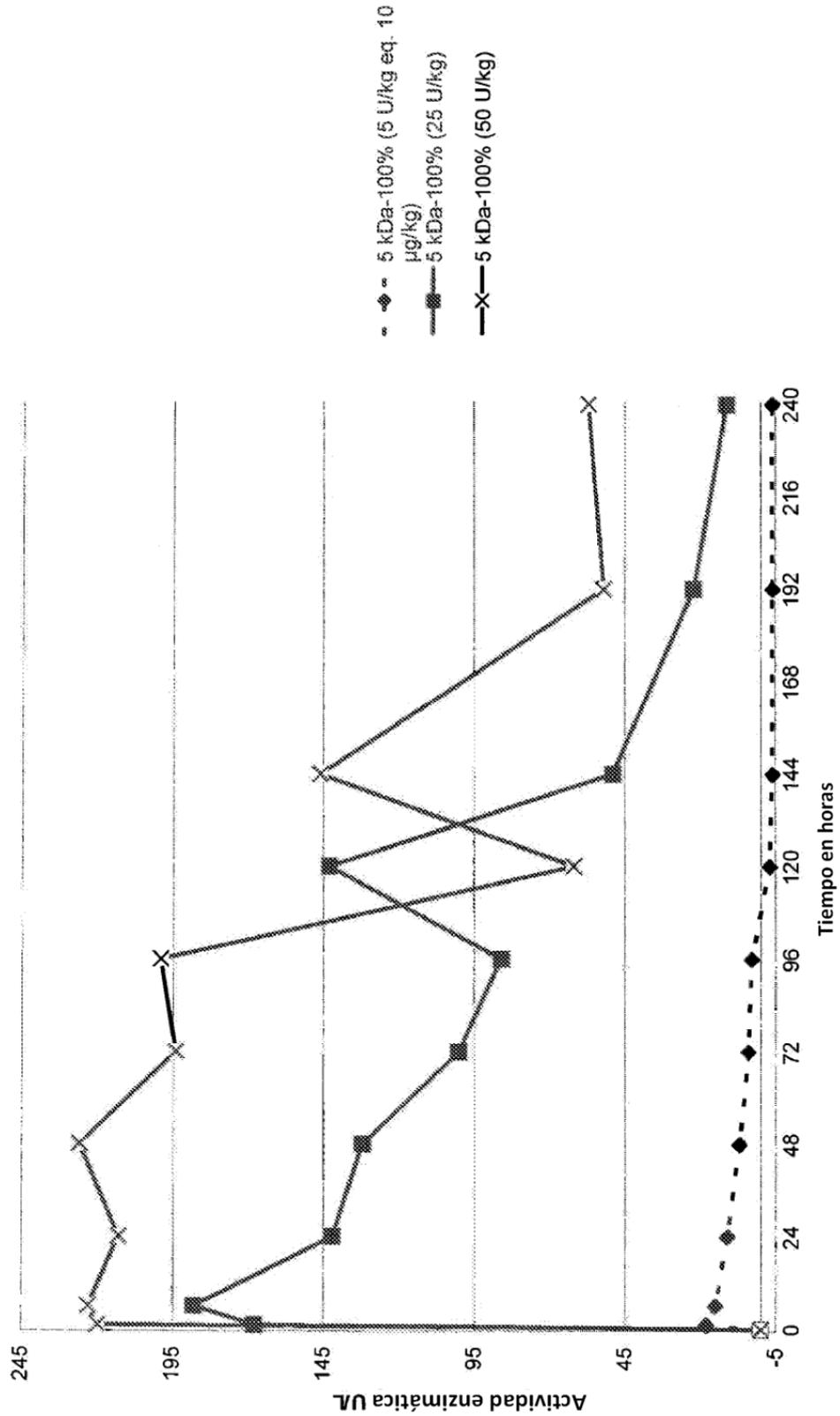


Figura 7B



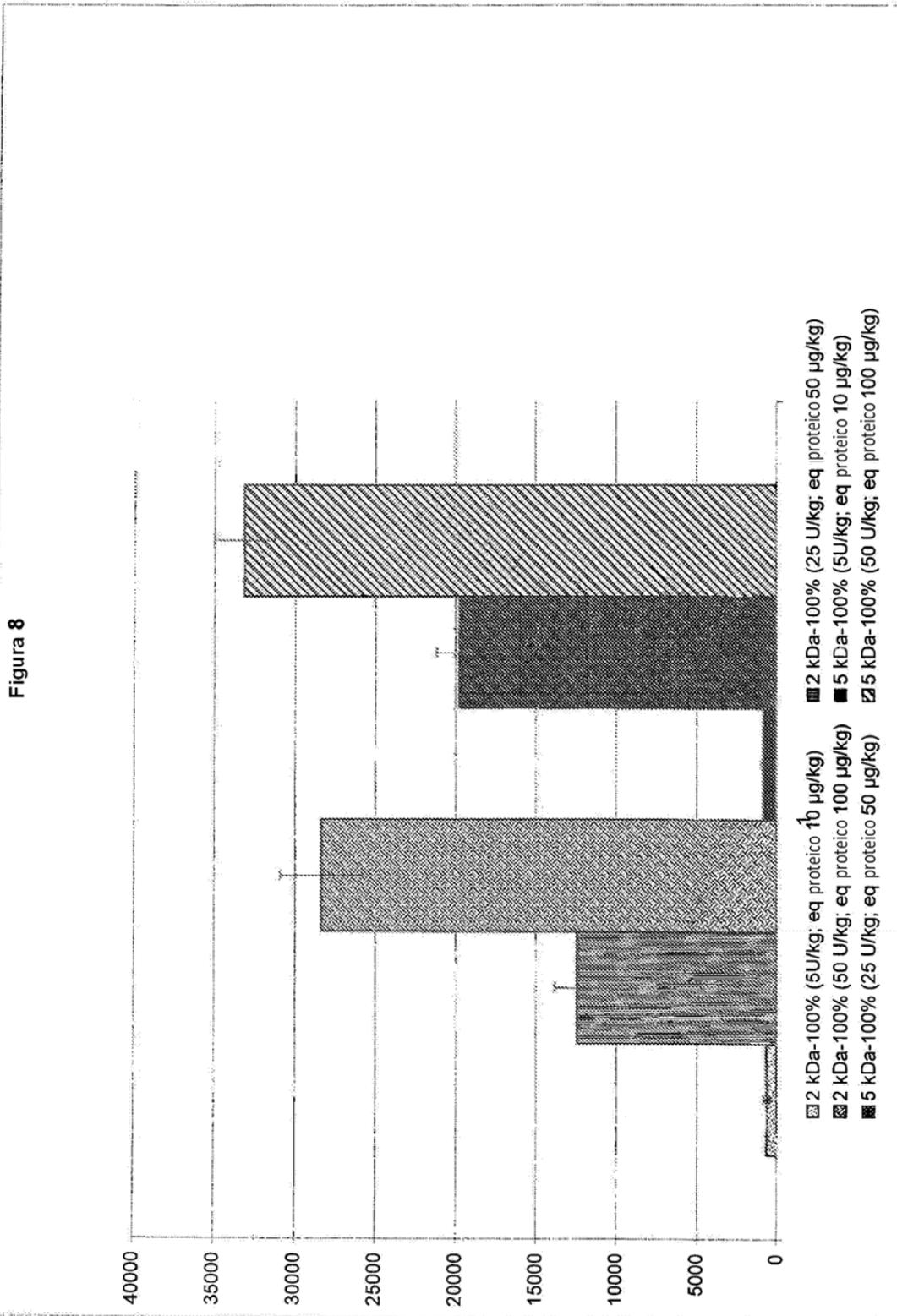


Figura 9A

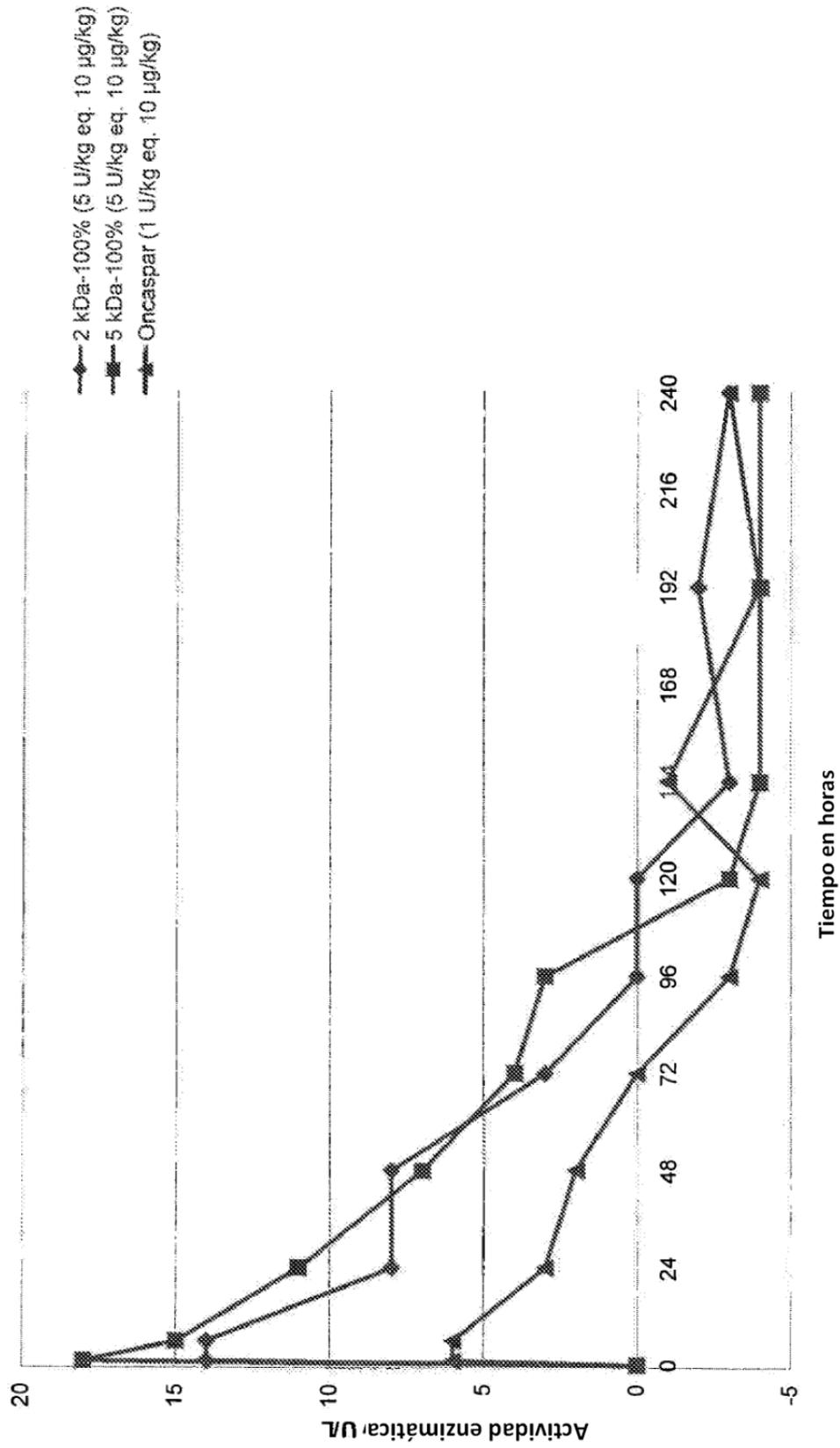


Figura 9B

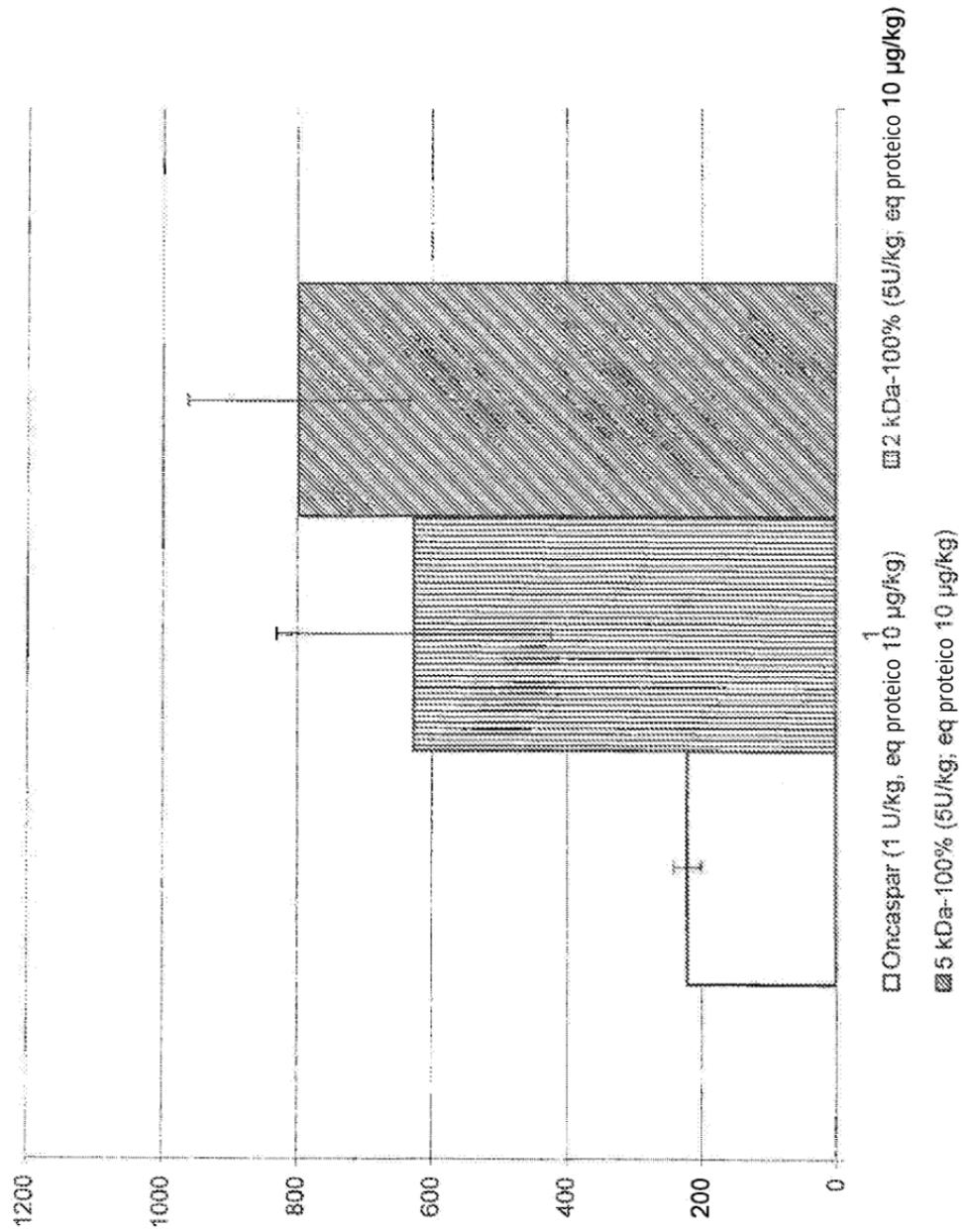


Figura 10

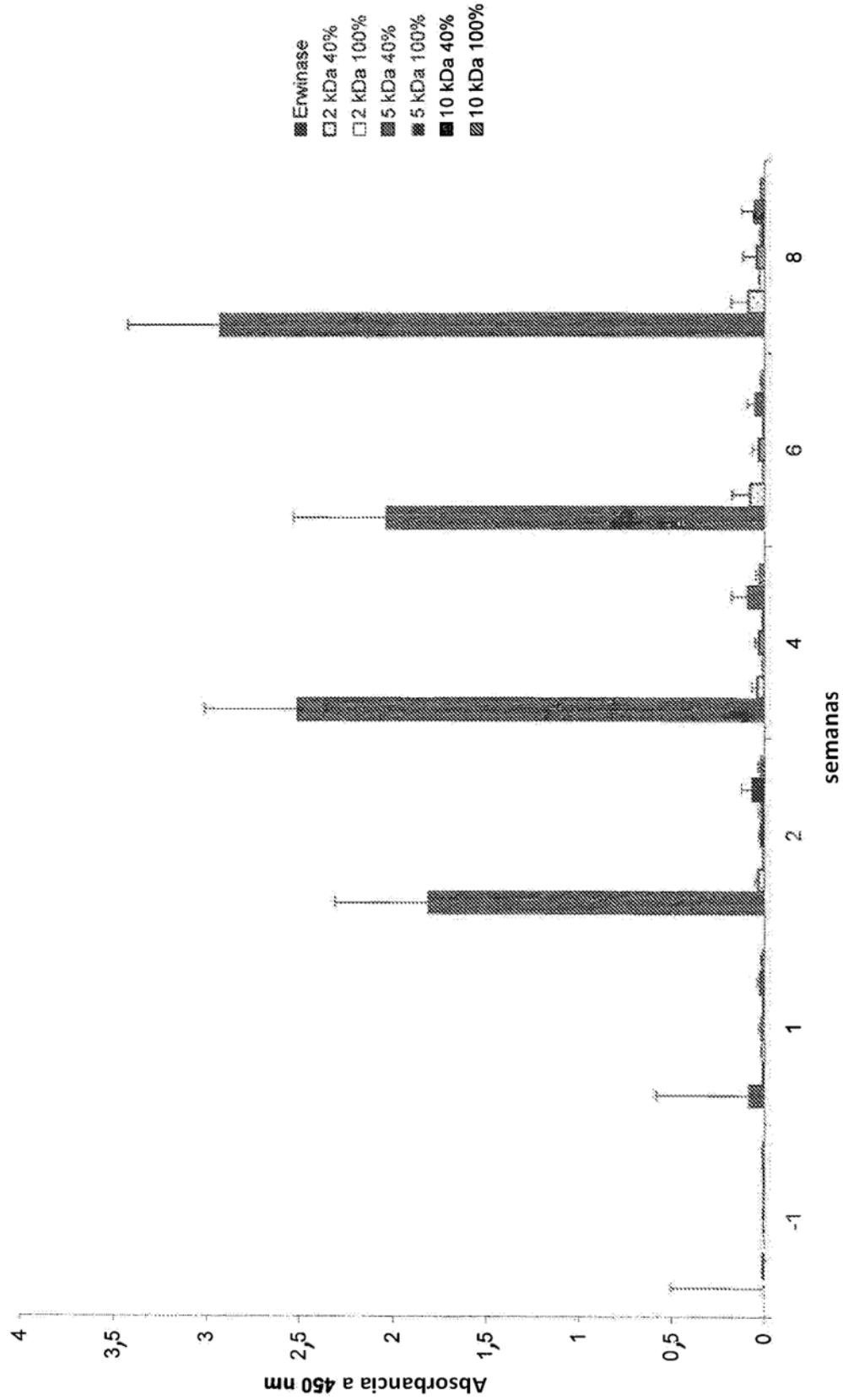
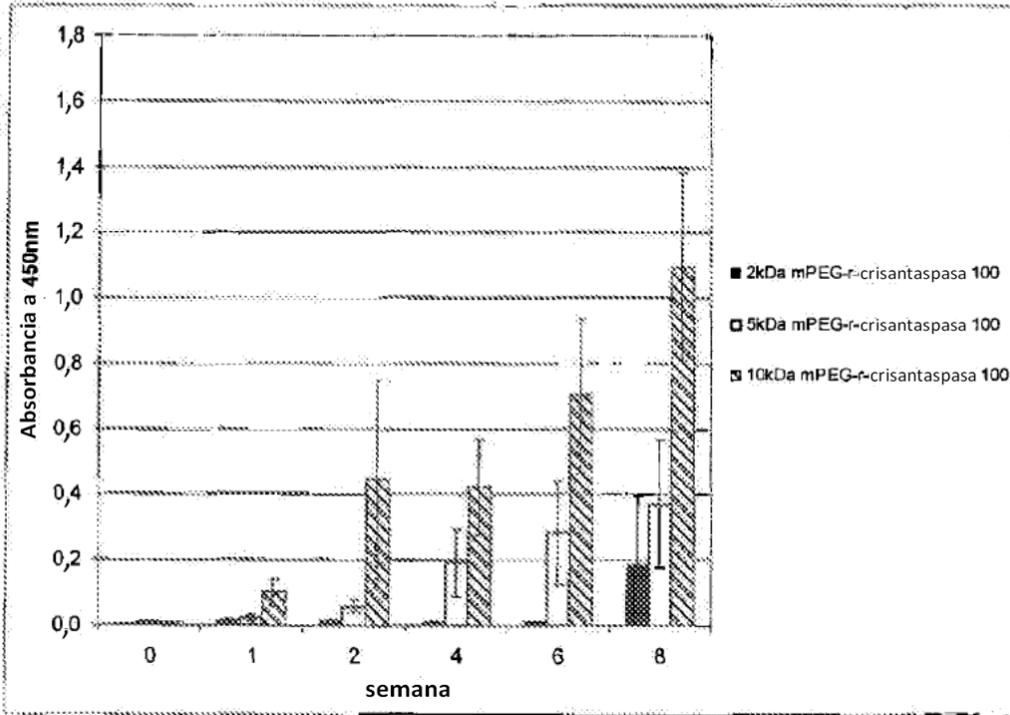


Figura 11

11A



11B

