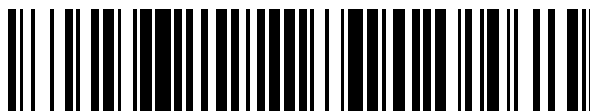


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 391**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/78** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2015 PCT/US2015/055613**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16061286**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2015 E 15797486 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3207130**

54 Título: **Composiciones de adenosina desaminasa 2 (ADA2), variantes de la misma y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**14.10.2014 US 201462063936 P**

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

**08.04.2020**

73 Titular/es:

**HALOZYME, INC. (100.0%)  
11388 Sorrento Valley Road  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**THANOS, CHRISTOPHER D.;  
WANG, LIN y  
SHEPARD, MICHAEL H.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 753 391 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

Composiciones de adenosina desaminasa 2 (ADA2), variantes de la misma y métodos de uso de las mismas

### 5 Campo de la invención

Se proporcionan proteínas variantes de adenosina desaminasa 2 (ADA2). También se proporcionan productos conjugados de ADA2 y composiciones que contienen una proteína ADA2 o producto conjugado de ADA2. También se proporcionan métodos y usos de las proteínas o productos conjugados de ADA2 para tratar enfermedades y afecciones, tales como un tumor o cáncer, y en particular cualquier enfermedad o afección asociada con adenosina u otro marcador asociado elevados.

### Antecedentes

15 La adenosina es un conocido efector de la función inmunitaria. En las células T, la adenosina disminuye la activación inducida por el receptor de células T de NF-KB, e inhibe IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . La adenosina disminuye la citotoxicidad de las células T, aumenta la anergia de las células T y aumenta la diferenciación de las células T a células T reguladoras (T-reg) Fop3+ o Lag-3+. En las células NK, se sabe que la adenosina disminuye la producción de IFN- $\gamma$  y suprime la citotoxicidad de las células NK. Se sabe que la adenosina bloquea la adhesión y la extravasación de neutrófilos, disminuye la fagocitosis y atenúa los niveles de superóxido y óxido nítrico. La adenosina también disminuye la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12 y MIP-1 $\alpha$  en macrófagos, atenúa la expresión del MHC Clase II y aumenta los niveles de IL-10 e IL-6. Además, la adenosina disminuye los niveles de fagocitosis y superóxido y óxido nítrico en los macrófagos. A través de estas actividades relacionadas con el sistema inmunitario y otras, los niveles aberrantes o acumulados de adenosina se asocian con una serie de enfermedades y afecciones, incluidas aquellas en las que los efectos inmunosupresores mediados por la adenosina desempeñan un papel. Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos para tales enfermedades y afecciones.

El documento WO 98/35039 describe un polipéptido del factor de crecimiento derivado de células dendríticas que tiene una identidad de 99,6% con la secuencia de aminoácidos de la proteína ADA2 no modificada como se expone en SEQ ID NO: 5 de la presente solicitud, y describe el uso del polipéptido en el tratamiento de defectos del sistema inmunitario debido a que las células dendríticas no producen cantidades suficientes.

El documento WO 2008/131208 describe las variantes de adenosina desaminasa de ADA1 que muestran una estabilidad mejorada contra la degradación oxidativa.

El documento WO 2005/000099 describe un gen inmunomodulador, conocido como 'candidato 1 de la región cromosómica del síndrome del ojo de gato (CECR1)', que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la proteína ADA2 no modificada como se expone en SEQ ID NO: 5 de la presente solicitud, y propone el uso de esta secuencia génica para provocar respuestas citolíticas, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer.

### Compendio

En la presente memoria se proporcionan proteínas variantes de adenosina desaminasa 2 (ADA2) o porciones catalíticamente activas de las mismas que contienen una o varias modificaciones en la secuencia de aminoácidos de una proteína ADA2 no modificada o una porción catalíticamente activa de la misma, en donde la proteína ADA2 no modificada se selecciona entre una proteína ADA que comprende: la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; o es una porción catalíticamente activa de la secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; o comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383 o es una porción catalíticamente activa de la misma; la proteína ADA2 modificada tiene hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con la proteína ADA2 no modificada; la modificación o las modificaciones de aminoácidos se seleccionan entre uno o varios remplazos, deleciones e inserciones de aminoácidos; la proteína ADA2 variante comprende un reemplazo de aminoácidos en una o ambas posiciones correspondientes al residuo de aminoácido 219 y 262 con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5; y la ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, exhibe una mayor actividad adenosina desaminasa o una mayor actividad adenosina desaminasa y una reducción de la unión a heparina en comparación con la forma de dímero de la proteína ADA2 no modificada de SEQ ID NO: 5 o forma de dímero de la porción catalíticamente activa de la misma; y la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, exhibe actividad adenosina desaminasa para convertir la adenosina en inosina.

También se describe en la presente memoria una proteína ADA2 variante que, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una o más propiedades seleccionadas de entre la mayor actividad adenosina desaminasa, la reducción de la unión a heparina, la semivida en suero más larga, el óptimo de pH alterado, el aumento de la

estabilidad térmica, la alteración de la unión al receptor e hiperglicosilación en comparación con la forma de dímero correspondiente de la proteína ADA2 no modificada. Se proporcionan una variedad de modificaciones de aminoácidos, que incluyen reemplazos, deleciones e inserciones. Se entiende que las modificaciones discretas que confieren una actividad o propiedad particular se pueden combinar; como en las proteínas, los efectos de la mutación o las modificaciones generalmente son aditivos. Cualquiera de la ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma proporcionada en la presente memoria que contiene modificaciones, incluyendo reemplazos, deleciones e inserciones, y los ácidos nucleicos que codifican la ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma, se pueden emplear en cualquiera de los métodos, composiciones, productos conjugados, formas modificadas, vectores, células, combinaciones, usos y composiciones para su uso, y combinaciones para su uso, proporcionadas en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la proteína ADA2 no modificada es un homodímero, y la forma de monómero comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la ADA2 variante es una porción catalíticamente activa de la proteína ADA2 variante como se proporciona en la presente memoria, en donde la proteína ADA2 no modificada es un homodímero de las porciones catalíticamente activas correspondientes del polipéptido cuya secuencia se expone en SEQ ID NO: 5, en donde las porciones correspondientes se determinan mediante alineamiento.

En alguna realización, la proteína ADA2 o su porción catalíticamente activa no contiene una modificación seleccionada entre un reemplazo de aminoácidos correspondiente a H7R, G18A, G18R, G18V, I64T, A80D, H83Q, V90A, C108G, A120V, H121R, W133G, R125C, R140Q, K141R, R142W, P164L, P222L, W235S, H306R, E330G, W333G, V365L, Y424C, F464S o una deleción correspondiente a R8-K14del → -, con numeración con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, la proteína ADA2 no modificada puede incluir una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o es una porción catalíticamente activa de la misma. Por ejemplo, la proteína ADA2 no modificada tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o con la correspondiente porción catalíticamente activa de la misma. Por ejemplo, la proteína ADA2 no modificada incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383 o es una porción catalíticamente activa de la misma, o la proteína ADA2 no modificada tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 5, 326-334, 340, 375 y 380-383 o es una porción catalíticamente activa de la misma. En realizaciones particulares, la proteína ADA2 no modificada incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o es una porción catalíticamente activa de la misma.

En algunas realizaciones, la porción catalíticamente activa de la proteína ADA2 puede ser una proteína ADA2 que carece de todo o una parte del supuesto dominio de unión al receptor (PRB). Por ejemplo, la porción catalíticamente activa de la proteína ADA2 puede incluir la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 548-550. En algunas realizaciones, la porción catalíticamente activa de la proteína ADA2 no modificada tiene la secuencia expuesta como residuos 77-473 de la proteína expuesta en SEQ ID NO: 5.

La proteína ADA2 variante incluye hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante no contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 1, 5, 68, 286-302, 326-342 o 374-383 o un fragmento catalíticamente activo de la misma. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína ADA2 variante no es la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 1, 5, 68, 286-302, 326-342 o 374-383.

La proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, exhibe actividad adenosina desaminasa para convertir la adenosina en inosina. En algunas realizaciones de la presente memoria, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una eficacia catalítica ( $K_{cat}/K_M$ ) que es al menos o al menos aproximadamente  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o mayor.

En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una estabilidad térmica con una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de al menos 58°C. Por ejemplo, la  $T_m$  de la proteína ADA2 es al menos 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C o mayor.

Las proteínas ADA2 variantes de acuerdo con las presentes reivindicaciones pueden contener una o varias modificaciones que son uno o varios reemplazos de aminoácidos; y la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 11, 13, 20, 22, 26, 86, 179, 217, 219, 221, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 o 470, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, los reemplazos de aminoácidos son posiciones correspondientes al residuo de

aminoácido 11, 20, 219, 221, 262, 264, 366, 371, 372 o 452, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5) La proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179X, E179Y, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219J, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219X, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221X, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262X, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H264S, H264T, H264V, H264W, H264X, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266X, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267X, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296X, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D, K470E, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante puede contener uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre los reemplazos correspondientes a H264A; H264Q; H264N; H264G; R219K; R219Q; R219N; R219A; L221A; L221V; L221G; E179D; E179A; E179S; E179T; E179V; E179G; S262A; S262V; S262M; S262N; D86A; D86C; D86E; D86F; D86G; D86H; D86I; D86K; D86L; D86M; D86N; D86P; D86Q; D86R; D86S; D86T; D86V; D86W; D86Y; E179C; E179F; E179H; E179I; E179K; E179L; E179M; E179N; E179P; E179Q; E179R; E179W; E179X; E179Y; R219C; R219D; R219E; R219F; R219G; R219H; R219I; R219J; R219K; R219L; R219M; R219N; R219P; R219S; R219T; R219V; R219W; R219X; R219Y; L221C; L221D; L221E; L221F; L221H; L221I; L221K; L221M; L221N; L221P; L221Q; L221R; L221S; L221T; L221W; L221X; S262C; S262D; S262E; S262F; S262G; S262H; S262I; S262K; S262L; S262M; S262N; S262P; S262Q; S262R; S262T; S262V; S262W; S262X; S262Y; H264C; H264D; H264E; H264F; H264I; H264K; H264L; H264M; H264P; H264R; H264S; H264T; H264V; H264W; H264X; S266A; S266C; S266D; S266E; S266F; S266G; S266H; S266I; S266K; S266L; S266M; S266N; S266P; S266Q; S266R; S266T; S266V; S266W; S266X; S266Y; K267A; K267C; K267D; K267E; K267F; K267G; K267H; K267I; K267L; K267M; K267N; K267P; K267Q; K267R; K267S; K267T; K267V; K267W; K267X; K267Y; V296A; V296C; V296D; V296E; V296F; V296G; V296H; V296I; V296K; V296L; V296M; V296N; V296P; V296Q; V296R; V296S; V296T; V296W; y V296X.

La proteína ADA2 variante contiene un reemplazo de aminoácidos en una o ambas posiciones correspondientes a los residuos de aminoácido 219 y 262, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma contiene el reemplazo correspondiente a S262N o S262Q. En algunas realizaciones, la ADA2 variante contiene el reemplazo correspondiente a S262N. En algunas realizaciones, la ADA2 variante contiene el reemplazo correspondiente a R219K, R219Q, R219N o R219A. En otras realizaciones, la ADA2 variante contiene el reemplazo correspondiente a R219Q o los reemplazos R219Q/R20E. En otras realizaciones, la ADA2 variante contiene el reemplazo correspondiente a R219Q/S262N. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma contiene modificaciones seleccionadas entre cualquiera de R219Q/S262N/ins(NAS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/R20N/V22S, R219Q/S262N/K371N/D373S, R219Q/S262N/K372N/I374S, R219Q/S262N/T403N/H405S, R219Q/S262N/G404N/P406S, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/R125N/P126A, R219Q/S262N/S127N/K129S, R219Q/S262N/P126N/E128T, R219Q/S262N/R112N/I114T, R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T, R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T, R219Q/S262N/R142N/Q144S, R219Q/S262N/E137N/Y139T, R219Q/S262N/P111N/G113S, R219Q/S262N/F119S, R219Q/S262N/F119K, R219Q/S262N/Y224R, R219Q/S262N/Y224N, R219Q/S262N/Y191S, R219Q/S262N/Y191D, R219Q/S262N/F183K, R219Q/S262N/Y191D/Y224R, R219Q/S262N/F109S, R219Q/S262N/F109A, R219Q/S262N/R118D, R219Q/S262N/R118A, R219Q/S262N/Y139T, R219Q/S262N/Y139A, R219Q/S262N/W133S, R219Q/S262N/W133T, R219Q/S262N/P124A, R219Q/S262N/P124S, R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>, R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/K11A, R219Q/S262N/K11D, R219Q/S262N/K11E, R219Q/S262N/K13A, R219Q/S262N/K13D, R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, R219Q/S262N/N98\_N156del, R219Q/S262N/C105\_E148del, R219Q/S262N/C105\_T147del

R219Q/S262N/V99\_Q144del, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>,  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>,  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>,  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>,  
 5 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, R219Q/S262N/K371D/N98\_N156del,  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_E148del, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147del, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144del,  
 R219Q/S262N/K13E, R219Q/S262N/K371A, R219Q/S262N/K372A, R219Q/S262N/K372D, R219Q/S262N/K372E,  
 R219Q/S262N/K452A, R219Q/S262N/K452D, R219Q/S262N/K452E, R219Q/S262N/R20A, R219Q/S262N/R20D,  
 10 R219Q/S262N/R366A, R219Q/S262N/R366D, R219Q/S262N/R366E, R219Q/S262N/H264A, R219Q/S262N/H264Q,  
 R219Q/S262N/H264N, R219Q/S262N/H264G, R219K/S262N, R219N/S262N, R219A/S262N, R219Q/S262N/L221A,  
 R219Q/S262N/L221V, R219Q/S262N/L221G, R219Q/S262N/E179D, R219Q/S262N/E179A, R219Q/S262N/E179S,  
 R219Q/S262N/E179T, R219Q/S262N/E179V, R219Q/S262N/E179G, R219Q/S262A, R219Q/S262V,  
 R219Q/S262M, R219Q/S262N/K11A/R20A, R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A, R219Q/S262N/R20A/K371A,  
 R219Q/S262N/K11A/K371A, R219Q/S262N/K26A, R219Q/S262N/K26D, R219Q/S262N/K26E,  
 15 R219Q/S262N/R217A, R219Q/S262N/R217D, R219Q/S262N/R217E, R219Q/S262N/K258A, R219Q/S262N/K258D,  
 R219Q/S262N/K258E, R219Q/S262N/R277A, R219Q/S262N/R277D, R219Q/S262N/R277E, R219Q/S262N/R283A,  
 R219Q/S262N/R283D, R219Q/S262N/R283E, R219Q/S262N/K309A, R219Q/S262N/K309D, R219Q/S262N/K309E,  
 R219Q/S262N/K317A, R219Q/S262N/K317D, R219Q/S262N/K317E, R219Q/S262N/K321A, R219Q/S262N/K321D,  
 20 R219Q/S262N/K321E, R219Q/S262N/R352A, R219Q/S262N/R352D, R219Q/S262N/R352E, R219Q/S262N/R441A,  
 R219Q/S262N/R441D, R219Q/S262N/R441E, R219Q/S262N/K444A, R219Q/S262N/K444D, R219Q/S262N/K444E,  
 R219Q/S262N/K461A, R219Q/S262N/K461D, R219Q/S262N/K461E, R219Q/S262N/K469A, R219Q/S262N/K469D,  
 R219Q/S262N/K469E, R219Q/S262N/K470A, R219Q/S262N/K470D, R219Q/S262N/K470E, R219Q/S262N/D86A,  
 R219Q/S262N/D86C, R219Q/S262N/D86E, R219Q/S262N/D86F, R219Q/S262N/D86G, R219Q/S262N/D86H,  
 25 R219Q/S262N/D86I, R219Q/S262N/D86K, R219Q/S262N/D86L, R219Q/S262N/D86M, R219Q/S262N/D86N,  
 R219Q/S262N/D86P, R219Q/S262N/D86Q, R219Q/S262N/D86R, R219Q/S262N/D86S, R219Q/S262N/D86T,  
 R219Q/S262N/D86V, R219Q/S262N/D86W, R219Q/S262N/D86Y, R219Q/S262N/E179C, R219Q/S262N/E179F,  
 R219Q/S262N/E179H, R219Q/S262N/E179I, R219Q/S262N/E179K, R219Q/S262N/E179L, R219Q/S262N/E179M,  
 R219Q/S262N/E179N, R219Q/S262N/E179P, R219Q/S262N/E179Q, R219Q/S262N/E179R,  
 30 R219Q/S262N/E179W, R219Q/S262N/E179Y, R219C/S262N, R219D/S262N, R219E/S262N, R219F/S262N,  
 R219G/S262N, R219H/S262N, R219I/S262N, R219L/S262N, R219M/S262N, R219P/S262N, R219S/S262N,  
 R219T/S262N, R219V/S262N, R219W/S262N, R219Y/S262N, R219Q/S262N/L221C, R219Q/S262N/L221D,  
 R219Q/S262N/L221E, R219Q/S262N/L221F, R219Q/S262N/L221H, R219Q/S262N/L221I, R219Q/S262N/L221K,  
 R219Q/S262N/L221M, R219Q/S262N/L221N, R219Q/S262N/L221P, R219Q/S262N/L221Q, R219Q/S262N/L221R,  
 R219Q/S262N/L221S, R219Q/S262N/L221T, R219Q/S262N/L221W, R219Q/S262N/L221Y, R219Q/S262C,  
 35 R219Q/S262D, R219Q/S262E, R219Q/S262F, R219Q/S262G, R219Q/S262H, R219Q/S262I, R219Q/S262K,  
 R219Q/S262L, R219Q/S262P, R219Q/S262Q, R219Q/S262R, R219Q/S262T, R219Q/S262W, R219Q/S262Y,  
 R219Q/S262N/H264C, R219Q/S262N/H264D, R219Q/S262N/H264E, R219Q/S262N/H264F, R219Q/S262N/H264I,  
 R219Q/S262N/H264K, R219Q/S262N/H264L, R219Q/S262N/H264M, R219Q/S262N/H264P, R219Q/S262N/H264R,  
 R219Q/S262N/H264S, R219Q/S262N/H264T, R219Q/S262N/H264V, R219Q/S262N/H264W, R219Q/S262N/H264Y,  
 40 R219Q/S262N/S266A, R219Q/S262N/S266C, R219Q/S262N/S266D, R219Q/S262N/S266E, R219Q/S262N/S266F,  
 R219Q/S262N/S266G, R219Q/S262N/S266H, R219Q/S262N/S266I, R219Q/S262N/S266K, R219Q/S262N/S266L,  
 R219Q/S262N/S266M, R219Q/S262N/S266N, R219Q/S262N/S266P, R219Q/S262N/S266Q, R219Q/S262N/S266R,  
 R219Q/S262N/S266T, R219Q/S262N/S266V, R219Q/S262N/S266W, R219Q/S262N/S266Y, R219Q/S262N/K267A,  
 R219Q/S262N/K267C, R219Q/S262N/K267D, R219Q/S262N/K267E, R219Q/S262N/K267F, R219Q/S262N/K267G,  
 45 R219Q/S262N/K267H, R219Q/S262N/K267I, R219Q/S262N/K267L, R219Q/S262N/K267M, R219Q/S262N/K267N,  
 R219Q/S262N/K267P, R219Q/S262N/K267Q, R219Q/S262N/K267R, R219Q/S262N/K267S, R219Q/S262N/K267T,  
 R219Q/S262N/K267V, R219Q/S262N/K267W, R219Q/S262N/K267Y, R219Q/S262N/V296A, R219Q/S262N/V296C,  
 R219Q/S262N/V296D, R219Q/S262N/V296E, R219Q/S262N/V296F, R219Q/S262N/V296G, R219Q/S262N/V296H,  
 R219Q/S262N/V296I, R219Q/S262N/V296K, R219Q/S262N/V296L, R219Q/S262N/V296M, R219Q/S262N/V296N,  
 50 R219Q/S262N/V296P, R219Q/S262N/V296Q, R219Q/S262N/V296R, R219Q/S262N/V296S, R219Q/S262N/V296T,  
 R219Q/S262N/V296W and R219Q/S262N/V296Y. En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante comprende  
 las modificaciones seleccionadas entre R219Q/K11A/R20A, R219Q/K11A/R20A/K371A, R219Q/R20A/K371A,  
 R219Q/K11A/K371A, S262N/K11A/R20A, S262N/K11A/R20A/K371A, S262N/R20A/K371A, S262N/K11A/K371A,  
 R219Q/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, R219Q/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, R219Q/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>,  
 55 R219Q/N98\_N156del, R219Q/C105\_E148del, R219Q/C105\_T147del, R219Q/V99\_Q144del,  
 S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>,  
 S262N/N98\_N156del, S262N/C105\_E148del, S262N/C105\_T147del and S262N/V99\_Q144del.

La proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, exhibe una mayor actividad adenosina desaminasa.  
 60 Por ejemplo, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir al menos 110%, 120%,  
 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%,  
 700%, 800% o más actividad de la forma de dímero correspondiente de la proteína ADA2 no modificada, en donde  
 la actividad adenosina desaminasa se evalúa en las mismas condiciones. En algunas realizaciones, la proteína  
 ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que es al menos o al

5 menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10,0 veces o mayor en comparación con la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de la forma de dímero correspondiente de la proteína ADA2 no modificada, en donde la eficacia catalítica de la actividad adenosina desaminasa se evalúa en las mismas condiciones. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que es al menos o al menos aproximadamente  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o mayor.

10 Entre dichas proteínas ADA2 variantes de acuerdo con las presentes reivindicaciones se encuentran las que incluyen uno o más reemplazos de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 11, 20, 219, 221, 262, 264, 366, 371, 372 o 452, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A, K11E, R20A, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366E, K371A, K371D, K371E, K372D, K372E, K452D y K452E, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. La proteína ADA2 variante puede incluir reemplazos de aminoácidos seleccionados entre S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D, S262N/R20E/K371E, R219Q/K371E, R219Q/K371D, R219Q/R20E, R219Q/K371E/R20E, R219Q/K371D/R20E, R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E, R219Q/S262N/K371E/R20E, R219Q/S262N/K371D/R20E y R219Q/S262N, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

25 En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una reducción de la unión a heparina. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir no más de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de la unión a heparina de la forma de dímero correspondiente de la proteína ADA2 no modificada, en donde la unión a heparina se evalúa en las mismas condiciones.

30 En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una semivida en suero más larga ( $t_{1/2}$ ). Por ejemplo, la ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una semivida que es al menos o al menos aproximadamente 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800% o más que la semivida de la forma de dímero correspondiente de la proteína ADA2 no modificada, en donde la semivida se evalúa en las mismas condiciones.

35 En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una mayor estabilidad térmica. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una estabilidad térmica con una temperatura de fusión ( $T_m$ ) que se incrementa al menos o al menos aproximadamente 0,5°C, 1,0°C, 2,0°C, 3,0°C, 4,0°C, 5,0°C, 6,0°C, 7,0°C, 8,0°C, 9,0°C, 10,0°C o más en comparación con la  $T_m$  de la forma de dímero correspondiente de la proteína ADA2 no modificada, en donde  $T_m$  se evalúa bajo las mismas condiciones. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante puede tener una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de al menos o al menos aproximadamente 67,6°C, 67,8°C, 68,0°C, 68,2°C, 68,4°C, 68,6°C, 68,8°C, 69,0°C, 69,2°C, 69,4°C, 69,6°C, 69,8°C, 70,0°C, 70,2°C, 70,4°C, 70,6°C, 70,8°C, 71,0°C, 71,2°C, 71,4°C, 71,6°C, 71,8°C o más.

45 En ejemplos de cualquiera de las proteínas ADA2 variantes proporcionadas en la presente memoria, la actividad adenosina desaminasa de la proteína ADA2 variante se puede evaluar o exhibir a pH  $6,5 \pm 0,2$  o aproximadamente. En algunos ejemplos, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir un óptimo de pH alterado para la actividad adenosina desaminasa. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir un óptimo de pH para la actividad adenosina desaminasa que está a un pH más alto en comparación con el óptimo de pH de la forma de dímero correspondiente de la proteína ADA2 no modificada. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede tener un óptimo de pH con un pH que es al menos o al menos aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o mayor. En otros ejemplos, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir un óptimo de pH para la actividad adenosina desaminasa que está a un pH más bajo en comparación con el óptimo de pH de la forma de dímero correspondiente de la proteína ADA2 no modificada. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede tener un óptimo de pH con un pH que es menor o menor que aproximadamente 6,5, 6,4, 6,3, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0 o menor.

60 En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante puede incluir una modificación de uno o más aminoácidos en la supuesta unión al receptor (PRB), en donde la modificación es una delección, inserción o reemplazo de aminoácidos. En cualquiera de dichos ejemplos, la proteína ADA2 variante no contiene una modificación que sea un reemplazo de aminoácidos correspondiente al reemplazo de aminoácidos C108G, A120V, H121R, R125C, R140Q, K141R o R142W, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma carece de todo o

una parte del supuesto dominio de unión al receptor (PRB) o tiene una modificación de PRB, por lo que cualquier actividad de unión al receptor o factor de crecimiento se reduce o elimina u otra actividad de ADA2 que no sea la actividad desaminasa se reduce o elimina o la interacción con el dominio ADA se reduce o elimina y el dominio PRB corresponde a los residuos 98 a 156 expuestos en SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la ADA2 variante carece de los residuos 105-148 o 105 a 147 o 99 a 144, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En algunos ejemplos, la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 548-550 y 579. En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma contiene una delección de todo o una parte del dominio PRB y, opcionalmente, una inserción del conector peptídico.

En algunos ejemplos, la proteína ADA2 variante puede tener una delección de uno o más residuos de aminoácido contiguos correspondientes a uno o más residuos de aminoácido contiguos entre o entre aproximadamente los residuos de aminoácido 98 y 156 o los residuos de aminoácido 105 y 148, inclusive, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En cualquiera de dichos ejemplos, la variante del polipéptido de ADA2 puede incluir adicionalmente la sustitución de la región suprimida con un conector peptídico. Por ejemplo, el conector peptídico se puede seleccionar entre (Gly)<sub>n</sub> (SEC ID NO: 368), donde n es de 2 a 20; (GGGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 343), donde n es de 1 a 6; (SSSSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 344), donde n es de 1 a 6; (AlaAlaProAla)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 350), donde n es de 1 a 6; GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 345); GGSTSGSGKSSEGGK (SEQ ID NO: 346); GSTSGSGKSSSEGGSGSTKG (SEQ ID NO: 347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 348); y EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 349). Por ejemplo, el conector peptídico se puede seleccionar entre GGG (SEQ ID NO: 369); GGGGG (SEQ ID NO: 360); GGGGGGG (SEQ ID NO: 370); GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 371); y GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 372).

En algunas realizaciones, la ADA2 variante puede contener el polipéptido de ADA2 variante que puede incluir una modificación en el dominio PRB que corresponde a C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n es de 2 a 20, tal como C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>5</sub> o C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la ADA2 variante puede incluir una modificación en el dominio PRB que corresponde a C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>; N98\_N156del; C105\_E148del; C105\_T147del; V99\_Q144del; V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>; C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; y C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma contiene reemplazos de aminoácidos seleccionados entre los reemplazos correspondientes a R219Q/S262N/F119S; R219Q/S262N/F119K; R219Q/S262N/Y224R; R219Q/S262N/Y224N; R219Q/S262N/Y191S; R219Q/S262N/Y191D; R219Q/S262N/F183K; R219Q/S262N/Y191D/Y224R; R219Q/S262N/F109S; R219Q/S262N/F109A; R219Q/S262N/R118D; R219Q/S262N/R118A; R219Q/S262N/Y139T; R219Q/S262N/Y139A; R219Q/S262N/W133S; R219Q/S262N/W133T; R219Q/S262N/P124A; y R219Q/S262N/P124S. En algunas realizaciones, la ADA2 variante contiene modificaciones seleccionadas entre R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/N98\_N156del; R219Q/S262N/C105\_E148del; R219Q/S262N/C105\_T147del; R219Q/S262N/V99\_Q144del; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144del; R219Q/S262N/K371D/C105\_E148del; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147del; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144del; R219Q/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/N98\_N156del; R219Q/C105\_E148del; R219Q/C105\_T147del; R219Q/V99\_Q144del; S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; S262N/N98\_N156del; and S262N/C105\_E148del; S262N/C105\_T147del; and S262N/V99\_Q144del.

5 En algunas realizaciones de una proteína ADA2 variante, que incluye ejemplos que contienen un dominio PRB modificado, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una reducción de la unión a uno o más receptores de adenosina (ADR) seleccionados entre A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> en comparación con la unión de la proteína ADA2 no modificada al mismo receptor cuando se evalúa en las mismas condiciones. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante tiene una unión que se reduce al menos o al menos aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más.

10 En algunas realizaciones de la ADA2 variante proporcionada en la presente memoria, la ADA2 variante se puede glicosilar, por ejemplo, en un sitio de glicosilación nativo o no nativo. En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante puede incluir una o varias modificaciones que alteran la glicosilación mediante la introducción de un sitio de glicosilación no nativo, por lo que, cuando se expresa en una célula susceptible de glicosilación, la proteína ADA2 variante se hiperglicosila en comparación con el polipéptido de ADA2 no modificado. Por ejemplo, el sitio de glicosilación no nativo se introduce mediante uno o varios reemplazos de aminoácidos o inserción de uno, dos o tres aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones se seleccionan entre las modificaciones correspondientes a las ins(NAS)I1, R20N/V22S, K371N/D373S, K372N/I374S, T403N/H405S y G404N/P406S, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la ADA2 variante o la porción catalíticamente activa de la misma contienen modificaciones correspondientes a R219Q/S262N/ins(NAS)I1; R219Q/S262N/R20N/V22S; R219Q/S262N/K371N/D373S; R219Q/S262N/K372N/I374S; R219Q/S262N/T403N/H405S; o R219Q/S262N/G404N/P406S. En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante o su porción catalíticamente activa contiene una modificación en el supuesto dominio de unión al receptor (PRB) correspondiente a una o más de las modificaciones seleccionadas entre: R125N/P126A; S127N/K129S; P126N/E128T; R112N/I114T; I134N/L135C/L136T; I134N/L135S/L136T; R142N/Q144S; E137N/Y139T; y P111N/G113S. En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma contiene reemplazos de aminoácidos correspondientes a R219Q/S262N/R125N/P126A; R219Q/S262N/S127N/K129S; R219Q/S262N/P126N/E128T; R219Q/S262N/R112N/I114T; R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T; R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T; R219Q/S262N/R142N/Q144S; R219Q/S262N/E137N/Y139T; o R219Q/S262N/P111N/G113S.

30 En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante puede ser una ADA2 humana. En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante se puede aislar o purificar.

35 En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante puede contener un polipéptido que exhibe al menos 65% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 o una porción catalíticamente activa del mismo. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante puede contener un polipéptido que exhibe al menos 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 más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 o una porción catalíticamente activa del mismo. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante contiene un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 13-63 o 71-285 o una porción catalíticamente activa de la misma. En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 551-579 o 581-993 o una porción catalíticamente activa de la misma.

45 En algunas realizaciones, la proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma puede contener reemplazos de aminoácidos seleccionados entre los reemplazos correspondientes a S262N/K371D; S262N/K371E; S262N/R20E; S262N/R20E/K371D; S262N/R20E/K371E; R219Q/K371E; R219Q/K371D; R219Q/R20E; R219Q/K371E/R20E; R219Q/K371D/R20E; R219Q/S262N/K371E; R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E; R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; R219Q/S262N; R219Q/S262N/K11A; R219Q/S262N/K11D; R219Q/S262N/K11E; R219Q/S262N/K13A; R219Q/S262N/K13D; R219Q/S262N/K13E; R219Q/S262N/K371A; R219Q/S262N/K372A; R219Q/S262N/K372D; R219Q/S262N/K372E; R219Q/S262N/K452A; R219Q/S262N/K452D; R219Q/S262N/K452E; R219Q/S262N/R20A; R219Q/S262N/R20D; R219Q/S262N/R366A; R219Q/S262N/R366D; R219Q/S262N/R366E; R219Q/S262N/H264A; R219Q/S262N/H264Q; R219Q/S262N/H264N; R219Q/S262N/H264G; R219Q/S262N; R219N/S262N; R219A/S262N; R219Q/S262N/L221A; R219Q/S262N/L221V; R219Q/S262N/L221G; R219Q/S262N/E179D; R219Q/S262N/E179A; R219Q/S262N/E179S; R219Q/S262N/E179T; R219Q/S262N/E179V; R219Q/S262N/E179G; R219Q/S262A; R219Q/S262V; R219Q/S262M; R219Q/S262N/K11A/R20A; R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A; R219Q/S262N/R20A/K371A; R219Q/S262N/K11A/K371A; R219Q/S262N/K26A; R219Q/S262N/K26D; R219Q/S262N/K26E; R219Q/S262N/R217A; R219Q/S262N/R217D; R219Q/S262N/R217E; R219Q/S262N/K258A; R219Q/S262N/K258D; R219Q/S262N/K258E; R219Q/S262N/R277A; R219Q/S262N/R277D; R219Q/S262N/R277E; R219Q/S262N/R283A; R219Q/S262N/R283D; R219Q/S262N/R283E; R219Q/S262N/K309A; R219Q/S262N/K309D; R219Q/S262N/K309E; R219Q/S262N/K317A; R219Q/S262N/K317D; R219Q/S262N/K317E; R219Q/S262N/K321A; R219Q/S262N/K321D; R219Q/S262N/K321E; R219Q/S262N/R352A; R219Q/S262N/R352D; R219Q/S262N/R352E; R219Q/S262N/R441A; R219Q/S262N/R441D; R219Q/S262N/R441E; R219Q/S262N/K444A; R219Q/S262N/K444D; R219Q/S262N/K444E; R219Q/S262N/K461A; R219Q/S262N/K461D; R219Q/S262N/K461E; R219Q/S262N/K469A; R219Q/S262N/K469D; R219Q/S262N/K469E; R219Q/S262N/K470A; R219Q/S262N/K470D; R219Q/S262N/K470E; R219Q/S262N/D86A; R219Q/S262N/D86C; R219Q/S262N/D86E; R219Q/S262N/D86F; R219Q/S262N/D86G; R219Q/S262N/D86H;



5 R219Q/S262N/D86I; R219Q/S262N/D86K; R219Q/S262N/D86L; R219Q/S262N/D86M; R219Q/S262N/D86N;  
 R219Q/S262N/D86P; R219Q/S262N/D86Q; R219Q/S262N/D86R; R219Q/S262N/D86S; R219Q/S262N/D86T;  
 R219Q/S262N/D86V; R219Q/S262N/D86W; R219Q/S262N/D86Y; R219Q/S262N/E179C; R219Q/S262N/E179F;  
 R219Q/S262N/E179H; R219Q/S262N/E179I; R219Q/S262N/E179K; R219Q/S262N/E179L; R219Q/S262N/E179M;  
 R219Q/S262N/E179N; R219Q/S262N/E179P; R219Q/S262N/E179Q; R219Q/S262N/E179R; R219Q/S262N/E179W;  
 R219Q/S262N/E179Y; R219C/S262N; R219D/S262N; R219E/S262N; R219F/S262N; R219G/S262N;  
 R219H/S262N; R219I/S262N; R219L/S262N; R219M/S262N; R219P/S262N; R219S/S262N; R219T/S262N;  
 R219V/S262N; R219W/S262N; R219Y/S262N; R219Q/S262N/L221C; R219Q/S262N/L221D; R219Q/S262N/L221E;  
 R219Q/S262N/L221F; R219Q/S262N/L221H; R219Q/S262N/L221I; R219Q/S262N/L221K; R219Q/S262N/L221M;  
 10 R219Q/S262N/L221N; R219Q/S262N/L221P; R219Q/S262N/L221Q; R219Q/S262N/L221R; R219Q/S262N/L221S;  
 R219Q/S262N/L221T; R219Q/S262N/L221W; R219Q/S262N/L221Y; R219Q/S262C; R219Q/S262D; R219Q/S262E;  
 R219Q/S262F; R219Q/S262G; R219Q/S262H; R219Q/S262I; R219Q/S262K; R219Q/S262L; R219Q/S262P;  
 R219Q/S262Q; R219Q/S262R; R219Q/S262T; R219Q/S262W; R219Q/S262Y; R219Q/S262N/H264C;  
 R219Q/S262N/H264D; R219Q/S262N/H264E; R219Q/S262N/H264F; R219Q/S262N/H264I; R219Q/S262N/H264K;  
 15 R219Q/S262N/H264L; R219Q/S262N/H264M; R219Q/S262N/H264P; R219Q/S262N/H264R; R219Q/S262N/H264S;  
 R219Q/S262N/H264T; R219Q/S262N/H264V; R219Q/S262N/H264W; R219Q/S262N/H264Y; R219Q/S262N/S266A;  
 R219Q/S262N/S266C; R219Q/S262N/S266D; R219Q/S262N/S266E; R219Q/S262N/S266F; R219Q/S262N/S266G;  
 R219Q/S262N/S266H; R219Q/S262N/S266I; R219Q/S262N/S266K; R219Q/S262N/S266L; R219Q/S262N/S266M;  
 R219Q/S262N/S266N; R219Q/S262N/S266P; R219Q/S262N/S266Q; R219Q/S262N/S266R; R219Q/S262N/S266T;  
 20 R219Q/S262N/S266V; R219Q/S262N/S266W; R219Q/S262N/S266Y; R219Q/S262N/K267A; R219Q/S262N/K267C;  
 R219Q/S262N/K267D; R219Q/S262N/K267E; R219Q/S262N/K267F; R219Q/S262N/K267G; R219Q/S262N/K267H;  
 R219Q/S262N/K267I; R219Q/S262N/K267L; R219Q/S262N/K267M; R219Q/S262N/K267N; R219Q/S262N/K267P;  
 R219Q/S262N/K267Q; R219Q/S262N/K267R; R219Q/S262N/K267S; R219Q/S262N/K267T; R219Q/S262N/K267V;  
 R219Q/S262N/K267W; R219Q/S262N/K267Y; R219Q/S262N/V296A; R219Q/S262N/V296C; R219Q/S262N/V296D;  
 25 R219Q/S262N/V296E; R219Q/S262N/V296F; R219Q/S262N/V296G; R219Q/S262N/V296H; R219Q/S262N/V296I;  
 R219Q/S262N/V296K; R219Q/S262N/V296L; R219Q/S262N/V296M; R219Q/S262N/V296N; R219Q/S262N/V296P;  
 R219Q/S262N/V296Q; R219Q/S262N/V296R; R219Q/S262N/V296S; R219Q/S262N/V296T; R219Q/S262N/V296W;  
 R219Q/S262N/V296Y; R219Q/K11A/R20A; R219Q/K11A/R20A/K371A; R219Q/R20A/K371A; R219Q/K11A/K371A;  
 S262N/K11A/R20A; S262N/K11A/R20A/K371A; S262N/R20A/K371A; y S262N/K11A/K371A, con referencia a SEQ  
 30 ID NO: 5.

La proteína ADA2 variante puede ser un monómero o un dímero. En particular, entre las proteínas ADA2 variantes proporcionadas en la presente memoria se encuentran dímeros de una proteína ADA2 variante, que pueden incluir cualquiera de las proteínas ADA2 variantes proporcionadas. En algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria. En algunos ejemplos, el dímero puede ser un homodímero. En otros ejemplos, el dímero puede ser un heterodímero.

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas ADA2 variantes proporcionadas en la presente memoria. También se proporciona en la presente memoria un vector que incluye el ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas ADA2 variantes proporcionadas en la presente memoria. El vector puede ser eucariota o un vector procariota, tal como un vector de mamífero o un vector viral. Por ejemplo, el vector es un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado, un vector de retrovirus, un vector de virus herpes, un vector de lentivirus, un vector de poxvirus o un vector de citomegalovirus. En algunas realizaciones, el vector es un vector oncolítico. En algunas realizaciones, el vector también puede codificar una hialuronidasa soluble. También se proporcionan en la presente memoria células que contienen cualquiera de los vectores proporcionados en la presente memoria. La célula puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero. Si fuera humana, las células se aíslan o se proporcionan como un cultivo celular. Por ejemplo, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunas realizaciones, la célula puede expresar la proteína ADA2 variante, tal como un dímero. También se proporcionan en la presente memoria proteínas ADA2 variantes, tales como dímeros de ADA2 variantes, que son producidas por la célula proporcionada en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula es una célula aislada o un cultivo celular, tal como una célula eucariota, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula que no es una célula madre humana. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como una célula T, un linfocito infiltrante de tumor (TIL), un linfocito T citotóxico (CTL), una célula asesina natural (NK) o una célula asesina activada por linfocina (LAK). En algunas realizaciones, la célula es una célula T que codifica y expresa el receptor de antígeno quimérico (CAR) y la variante de proteína o dímero de ADA2. En algunos ejemplos, el CAR es específico para un antígeno de células tumorales, y el antígeno tumoral se selecciona entre HER2, CD19, HERV-K, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR y GD2 y combinaciones de los mismos.

En la presente memoria, los productos conjugados incluyen una proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de cualquier proteína ADA2 proporcionada en la presente memoria, tal como un dímero de ADA2 variante proporcionado en cualquiera de los ejemplos en la presente memoria, conectado directa o indirectamente a través de un conector a un radical heterólogo, como una toxina o fármaco terapéutico.

También se proporcionan en la presente memoria productos conjugados que incluyen una proteína ADA2 conectada directa o indirectamente a través de un conector a un radical heterólogo. En cualquiera de los productos conjugados, la proteína ADA2 puede ser un monómero o un dímero. En algunos ejemplos, el dímero es un homodímero; en otros es un heterodímero. En cualquiera de los productos conjugados en los ejemplos de la presente memoria, el radical heterólogo se conjuga con una o ambas subunidades en el dímero. El radical heterólogo, por ejemplo, se puede seleccionar entre un péptido, molécula pequeña, ácido nucleico, carbohidrato y polímero.

En algunas realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, el radical heterólogo es un radical que prolonga la semivida. Por ejemplo, el radical que prolonga la semivida se selecciona entre ácidos grasos biocompatibles y derivados de los mismos, hidroxialquilalmidón (HAS), polietilenglicol (PEG), Poli(Gly)<sub>x</sub>-Ser<sub>y</sub>)<sub>n</sub>, polímeros de homo-aminoácidos (HAP), ácido hialurónico (HA), polímeros de heparosano (HEP), polímeros a base de fosforilcolina (polímero de PC), flexímeros, dextrano, ácidos polisialícos (PSA), dominio Fc, transferrina, albúmina, péptidos de tipo elastina, secuencias XTEN, péptidos de unión a albúmina, un péptido CTP y cualquier combinación de los mismos.

En algunos ejemplos, el radical que prolonga la semivida es un PEG y la proteína ADA2 está PEGilada. Por ejemplo, el PEG se puede seleccionar de entre metoxipolietilenglicoles (mPEG), PEG-glicidil éteres (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y óxido de polietileno (PEO). En algunos ejemplos, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa. El PEG puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, los radicales de PEG resultan de la reacción con un reactivo de PEG seleccionado entre mPEG-Propionatos de Succinimidilo (mPEG-SPA), mPEG-Éster de Succinimidil Carboximetil Éster (mPEG-SCM), mPEG-Butanoatos de Succinimidilo (mPEG-SBA), mPEG2-N-Hidroxisuccinimida, mPEG-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA), mPEG- $\alpha$ -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB), mPEG-butiraldehído, PEG-carbonato de p-nitrofenilo y PEG-propionaldehído. Por ejemplo, los radicales de PEG resultan de la reacción con un reactivo de PEG seleccionado entre mPEG-SCM (20kDa), mPEG-SCM (30kDa), mPEG-SBA (5kDa), mPEG-SBA (20kDa), mPEG-SBA (30kDa), mPEG-SMB (20kDa), mPEG-SMB (30kDa), mPEG-butiraldehído (30kDa), mPEG-SPA (20kDa), mPEG-SPA (30kDa), mPEG2-NHS (ramificado de 10kDa), mPEG2-NHS (ramificado de 20kDa), mPEG2-NHS (ramificado de 40kDa), mPEG2-NHS (ramificado de 60kDa), PEG-NHS-biotina (biotinilado de 5kDa), PEG-carbonato de p-nitrofenilo (30kDa) and PEG-propionaldehído (30kDa).

En los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, la proteína ADA2 es una proteína ADA2 variante de acuerdo con las presentes reivindicaciones que contiene una secuencia de aminoácidos que incluye una o varias modificaciones en la secuencia de aminoácidos de una proteína ADA2 no modificada o una porción catalíticamente activa de la misma, donde la proteína ADA2 no modificada contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o es una porción catalíticamente activa de la misma. En cualquiera de tales ejemplos, la modificación o las modificaciones de aminoácidos se seleccionan entre uno o varios reemplazos de aminoácidos, una o varias deleciones y una o varias inserciones; y la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir actividad adenosina desaminasa para convertir la adenosina en inosina. En cualquiera de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, la proteína ADA2, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que es al menos o al menos aproximadamente  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o mayor.

En cualquiera de las realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, la modificación o las modificaciones de la proteína ADA2 pueden ser uno o varios reemplazos de aminoácidos; y la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 11, 13, 20, 22, 26, 86, 179, 217, 219, 221, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 o 470, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, en algunas realizaciones de los productos conjugados de acuerdo con las presentes reivindicaciones, la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179X, E179Y, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221X, L221Y, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H264S, H264T, H264V, H264W, H264X, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W,

S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D, K470E, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A, K11E, R20A, R20D, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E, K452D y K452E, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En algunos ejemplos, la proteína ADA2 variante puede incluir reemplazos de aminoácidos seleccionados entre S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D, S262N/R20E/K371E, R219Q/K371E, R219Q/K371D, R219Q/R20E, R219Q/K371E/R20E, R219Q/K371D/R20E, R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E, R219Q/S262N/K371E/R20E, R219Q/S262N/K371D/R20E y R219Q/S262N, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, la proteína ADA2 variante puede incluir una modificación de uno o más aminoácidos en el supuesto dominio de unión al receptor (PRB) que es una delección, inserción o reemplazo de aminoácidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, la proteína ADA2 variante puede incluir la delección de uno o más residuos de aminoácido contiguos correspondientes a uno o más residuos de aminoácido contiguos entre o entre aproximadamente los residuos de aminoácido 98 y 156 o los residuos de aminoácido 105 y 148, inclusive, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En algunos ejemplos, la proteína ADA2 variante en el producto conjugado puede incluir adicionalmente la sustitución de la región suprimida con un conector peptídico. Por ejemplo, el conector peptídico se puede seleccionar entre (Gly)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 368), donde n es de 2 a 20; (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 343), donde n es de 1 a 6; (SSSSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 344), donde n es de 1 a 6; (AlaAlaProAla)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 350), donde n es de 1 a 6; GKSSGSGSESKE (SEQ ID NO: 345); GGSTSGSGKSSSEGKG (SEQ ID NO: 346); GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO: 347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 348); y EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 349). En algunos ejemplos, el conector peptídico se selecciona entre GGG (SEQ ID NO: 369); GGGGG (SEQ ID NO: 360); GGGGGGG (SEQ ID NO: 370); GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 371); y GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 372). Por ejemplo, la modificación en el dominio PRB puede corresponder a C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n es de 2 a 20, tal como C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>, C105\_T148delins(G)<sub>10</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>5</sub> o C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, la proteína ADA2 en el producto conjugado se puede glicosilar en uno o más sitios de glicosilación nativos o no nativos. Por ejemplo, en algunas realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria que contienen una proteína ADA2 variante, la proteína ADA2 variante en el producto conjugado puede incluir una o varias modificaciones que alteran la glicosilación mediante la introducción de un sitio de glicosilación no nativo. El sitio de glicosilación no nativo se puede introducir creando la secuencia de glicosilación canónica (NXT/S, donde X no es Pro para carbohidratos ligados a N, S/T para unidos a O) mediante la introducción de uno o varios reemplazos, inserciones o delecciones de aminoácidos de uno, dos o tres aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones que alteran la glicosilación se seleccionan entre las modificaciones correspondientes a ins(NAS)I1, R20N/V22S, K371N/D373S, K372N/I374S, T403N/H405S y G404N/P406S, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, la proteína ADA2 variante en el producto conjugado puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 13-63 o 71-285 o una porción catalíticamente activa de la misma.

En algunas realizaciones de los productos conjugados que contienen una proteína ADA2 o una proteína ADA2 variante proporcionada en la presente memoria, el producto conjugado conserva la actividad adenosina desaminasa en comparación con la proteína ADA2 que no está conjugada. Por ejemplo, el producto conjugado puede exhibir de aproximadamente 50% a 500%, 50% a 200%, 50% a 100%, 50% a 80%, 80% a 500%, 80% a 200%, 80% a 100%, 100% a 500% o 100% a 200%, cada uno incluido, de la actividad adenosina desaminasa de la proteína ADA2 que no está conjugada, tal como al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 300%, 400%, 500% o más de la actividad adenosina desaminasa de la proteína ADA2 que no está conjugada. En algunas realizaciones de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria, la ADA2 en el producto conjugado puede exhibir una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que es al menos o al menos aproximadamente  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o mayor.

En la presente memoria se describen combinaciones que contienen cualquiera de las proteínas ADA2 variantes o una porción catalíticamente activa de las mismas proporcionadas en la presente memoria, cualquier dímero de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria o cualquier producto conjugado de cualquiera de los ejemplos proporcionados en la presente memoria, y un agente terapéutico. También se proporcionan en la presente memoria combinaciones que contienen cualquier proteína ADA2; y un agente terapéutico. En cualquier ejemplo de la combinación proporcionada en la presente memoria, la proteína ADA2 puede ser un monómero o un dímero. Por ejemplo, la proteína ADA2 puede ser un dímero, tal como un homodímero.

En algunos ejemplos de combinaciones proporcionadas en la presente memoria, el agente terapéutico se puede seleccionar entre un anticuerpo, agente citotóxico, agentes quimioterapéuticos, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, inhibidor de quinasa, agente antiangiogénico, cardioprotector, agente inmunoestimulador, agente inmunosupresor, inhibidor del punto de control inmunitario, antibiótico e inhibidor de la angiogénesis. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un agente anticanceroso. En algunas realizaciones de combinaciones proporcionadas en la presente memoria, el agente anticanceroso puede ser un anticuerpo anticanceroso, un agente quimioterapéutico, un agente radioinmunoterapéutico, un agente antiangiogénico o un inhibidor del punto de control inmunitario.

Por ejemplo, el agente anticanceroso puede ser un inhibidor del punto de control inmunitario; y la diana del inhibidor del punto de control inmunitario se puede seleccionar entre CTLA4, PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones de combinaciones proporcionadas en la presente memoria, el inhibidor del punto de control inmunitario puede ser un anticuerpo, una proteína de fusión, un aptámero o un fragmento de unión a proteína de punto de control inmunitario del mismo. Por ejemplo, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-proteína de punto de control inmunitario o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ejemplos concretos, el inhibidor de punto de control inmunitario se selecciona entre: un anticuerpo anti-CTLA4, derivado del mismo, o fragmento de unión a antígeno del mismo; un anticuerpo anti-PD-L1, derivado del mismo, o fragmento de unión a antígeno del mismo; y un anticuerpo anti-PD-1, derivado del mismo, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, el inhibidor del punto de control inmunitario se puede seleccionar entre: Ipilimumab, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; Tremelimumab, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; Nivolumab, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y Pidilizumab, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos ejemplos de combinaciones proporcionadas en la presente memoria, el agente terapéutico puede ser un agente anti-hialuronano. Por ejemplo, el agente anti-hialuronano puede ser una hialuronidasa soluble. En algunas realizaciones de combinaciones proporcionadas en la presente memoria, la hialuronidasa soluble puede exhibir actividad de hialuronidasa a pH neutro. En particular, la hialuronidasa soluble se puede seleccionar entre PH20 bovina, ovina o humana truncada en el C-terminal que carece de toda o una parte de la secuencia de fijación del ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Por ejemplo, la hialuronidasa soluble es una PH20 humana truncada C-terminalmente que carece de toda o una parte de la secuencia de fijación del ancla de GPI, tales como las expuestas en cualquiera de SEC ID NO: 481-488, 493-514 o 526-532, o que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 481-488, 493-514 o 526-532 y es soluble y conserva la actividad de hialuronidasa. En algunas realizaciones de combinaciones proporcionadas en la presente memoria, el agente anti-hialuronano o la hialuronidasa soluble se puede conjugar con un polímero, tal como un radical PEG.

En algunos ejemplos de combinaciones proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2 puede incluir un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383, una secuencia que puede exhibir una identidad de secuencia de al menos 85% con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383 o una forma catalíticamente activa de la misma. Por ejemplo, la proteína ADA2 puede incluir una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que puede exhibir al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383 o una porción catalíticamente activa de la misma. En ejemplos concretos, la proteína ADA2 puede contener una secuencia de aminoácidos que puede exhibir al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la proteína ADA2 puede contener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

En algunos ejemplos de combinaciones descritas en la presente memoria, la proteína ADA2 es una proteína ADA2 variante que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una o varias modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ADA2 no modificado o una porción catalíticamente activa del mismo. En cualquiera de dichos ejemplos, la proteína ADA2 no modificada puede incluir la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos que puede exhibir al menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o es una porción catalíticamente activa de la misma; la modificación o modificaciones de aminoácidos se seleccionan entre uno o varios reemplazos, deleciones e

inserciones de aminoácidos; y la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir actividad adenosina desaminasa para convertir la adenosina en inosina.

- 5 En algunos ejemplos de combinaciones descritas en la presente memoria, la proteína ADA2, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que es al menos o al menos aproximadamente  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o mayor.
- 10 En algunos ejemplos de combinaciones descritas en la presente memoria, la modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos de una proteína ADA2 no modificada pueden incluir uno varios reemplazos de aminoácidos; y la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 11, 13, 20, 22, 26, 86, 179, 217, 219, 221, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 o 470,
- 15 con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179Y,
- 20 R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221Y, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I,
- 25 H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H264S, H264T, H264V, H264W, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q,
- 30 V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D, K470E, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En ejemplos concretos, la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A, K11E, R20A, R20D, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264G, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E, K452D y K452E, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En algunos ejemplos de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2 variante puede incluir reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A, K11A/K371A, S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D, S262N/R20E/K371E, R219Q/K371E, R219Q/K371D, R219Q/R20E, R219Q/K371E/R20E, R219Q/K371D/R20E, R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E, R219Q/S262N/K371E/R20E, R219Q/S262N/K371D/R20E y R219Q/S262N, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.
- 40
- 45 En algunos ejemplos de combinaciones descritas en la presente memoria, la proteína ADA2 variante puede incluir una modificación de uno o más aminoácidos en el supuesto dominio de unión al receptor (PRB), en donde la modificación es una eliminación, inserción o reemplazo de aminoácidos. Por ejemplo, la ADA2 variante puede incluir la eliminación de uno o más residuos de aminoácido contiguos correspondientes a uno o más residuos de aminoácido contiguos entre o entre aproximadamente los residuos de aminoácido 98 y 156 o los residuos de aminoácido 105 y 148, inclusive, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la variante del polipéptido de ADA2 puede incluir adicionalmente la sustitución de la región suprimida con un conector peptídico. Por ejemplo, el conector peptídico se puede seleccionar entre (Gly)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 368), donde n es de 2 a 20; (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 343), donde n es de 1 a 6; (SSSSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 344), donde n es de 1 a 6; (AlaAlaProAla)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 350), donde n es de 1 a 6; GKSSSGSGSESKE (SEQ ID NO: 345); GGSTSGSGKSSEGGK (SEQ ID NO: 346); GSTSGSGKSSEGGSGSTKG (SEQ ID NO: 347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 348); y EGKSSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 349). En ejemplos concretos, el conector peptídico se selecciona entre GGG (SEQ ID NO: 369); GGGGG (SEQ ID NO: 360); GGGGGGG (SEQ ID NO: 370); GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 371); y GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 372). En algunas realizaciones de combinaciones proporcionadas en la presente memoria, la modificación en el dominio PRB del polipéptido de ADA2 variante corresponde a C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n es de 2 a 20, tal como C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>5</sub> o C105\_T147delins(G)<sub>3</sub> con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.
- 60

En algunos ejemplos de combinaciones descritas en la presente memoria, la proteína ADA2 en la combinación se

- 5 puede glicosilar en uno o más sitios de glicosilación nativos o no nativos. Por ejemplo, en algunas realizaciones de combinaciones proporcionadas en la presente memoria que contienen una proteína ADA2 variante, la proteína ADA2 variante en la combinación incluye una o varias modificaciones que alteran la glicosilación mediante la introducción de un sitio de glicosilación no nativo. El sitio de glicosilación no nativo se introduce mediante reemplazo (s) de aminoácidos o inserción de uno, dos o tres aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones que alteran la hiperglicosilación se pueden seleccionar entre las modificaciones correspondientes a ins(NAS)I1, R20N/V22S, K371N/D373S, K372N/I374S, T403N/H405S y G404N/P406S, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.
- 10 En algunos ejemplos de combinaciones descritas en la presente memoria, el polipéptido de ADA2 variante tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 13-63 o 71-285 o una porción catalíticamente activa de la misma.
- 15 En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas que pueden incluir cualquiera de las proteínas ADA2 variantes o una porción catalíticamente activa de las mismas proporcionadas en la presente memoria, cualquier dímero de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria o cualquier producto conjugado proporcionado en la presente memoria, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se puede formular para administración local o sistémica. Por ejemplo, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa.
- 20 Se proporcionan usos médicos o composiciones farmacéuticas de cualquiera de las proteínas ADA2 variantes o una porción catalíticamente activa de las mismas proporcionadas en la presente memoria, cualquier dímero de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria o cualquier producto conjugado proporcionado en la presente memoria para su uso en el tratamiento de un tumor o un cáncer en un sujeto. También se proporcionan combinaciones de cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria para su uso en el tratamiento de un tumor o cáncer.
- 25 Se proporcionan usos médicos de una proteína ADA2 o composición farmacéutica que contiene una proteína ADA2 para su uso en el tratamiento de un tumor o un cáncer. También se describen combinaciones que contienen una proteína ADA2 y un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de un tumor o cáncer.
- 30 En algunas realizaciones de composiciones farmacéuticas para el uso o los usos proporcionados en la presente memoria, el tumor puede ser un tumor sólido o un tumor metastásico. En ejemplos concretos, el tumor puede ser un carcinoma, gliomas, sarcoma, adenocarcinoma, adenosarcoma o adenoma. En algunas realizaciones, el tumor puede ser un tumor de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, cuello uterino o hígado.
- 35 En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el sujeto se puede seleccionar para el tratamiento basado en niveles elevados de adenosina en plasma, expresión asociada a tumor del receptor de adenosina (ADR) o expresión asociada a tumor de una nucleotidasa. En ejemplos concretos, el ADR es A2A o A2B. En ejemplos concretos, la nucleotidasa es CD39 o CD73. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el nivel elevado es al menos 0,5 veces, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 150- veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces o más, en comparación con el nivel predeterminado o la cantidad predeterminada o muestra de control.
- 40 En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el método para tratar un tumor o cáncer en un sujeto puede incluir adicionalmente la administración de uno o más agentes o tratamientos contra el cáncer. Por ejemplo, el agente anticanceroso se puede seleccionar entre un anticuerpo anticanceroso, un agente quimioterapéutico, un agente radioinmunoterapéutico, un agente antiangiogénico y un inhibidor del punto de control inmunitario.
- 45 Se proporcionan usos médicos o composiciones farmacéuticas de cualquiera de las proteínas ADA2 variantes o una porción catalíticamente activa de las mismas proporcionadas en la presente memoria, cualquier dímero de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria o cualquier producto conjugado proporcionado en la presente memoria para su uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa no cancerosa, una enfermedad fibrótica, una enfermedad infecciosa, una vasculopatía o inmunodeficiencia combinada severa (SCID) en un sujeto. También se describen combinaciones de cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria para su uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa no cancerosa, una enfermedad fibrótica, una enfermedad infecciosa, una vasculopatía o inmunodeficiencia combinada grave (SCID). También se describen en la presente memoria métodos para tratar una enfermedad o afección en un sujeto, que pueden incluir administrar al sujeto cualquier proteína ADA2, para tratar una enfermedad o afección que es una enfermedad hiperproliferativa no cancerosa, una enfermedad fibrótica, una enfermedad infecciosa, una vasculopatía o inmunodeficiencia combinada severa (SCID). También se proporcionan usos médicos de una proteína ADA2 o composiciones farmacéuticas que
- 50
- 55
- 60

contienen una proteína ADA2 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que no es una enfermedad hiperproliferativa no cancerosa, una enfermedad fibrótica, una enfermedad infecciosa, una vasculopatía o una inmunodeficiencia combinada grave (SCID). También se describen combinaciones que contienen una proteína ADA2 y un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que no es una enfermedad hiperproliferativa no cancerosa, una enfermedad fibrótica, una enfermedad infecciosa, una vasculopatía o una inmunodeficiencia combinada severa (SCID)

En algunas realizaciones de los métodos, usos, composiciones farmacéuticas para el uso o los usos proporcionados en la presente memoria, la proteína ADA2 puede ser un monómero o un dímero. Por ejemplo, la proteína ADA2 puede ser un dímero, en particular, un homodímero. En algunas realizaciones de los métodos, usos, composiciones farmacéuticas para su uso o combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2 puede contener la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383, una secuencia que puede exhibir al menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383 o una forma catalíticamente activa de la misma. Por ejemplo, la proteína ADA2 puede contener una secuencia de aminoácidos que puede exhibir al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383 o una porción catalíticamente activa de la misma. En ejemplos concretos, la proteína ADA2 puede contener una secuencia de aminoácidos que puede exhibir al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o una porción catalíticamente activa de la misma. Por ejemplo, la proteína ADA2 puede contener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones de composiciones farmacéuticas para su uso proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2 es una proteína ADA2 variante que incluye una o varias modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ADA2 no modificado o una porción catalíticamente activa del mismo. En cualquiera de dichos ejemplos, la proteína ADA2 no modificada puede incluir la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos que puede exhibir al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o es una porción catalíticamente activa de la misma; la modificación o las modificaciones de aminoácidos se seleccionan entre uno o varios reemplazos, deleciones e inserciones de aminoácidos; y la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, puede exhibir actividad adenosina desaminasa para convertir la adenosina en inosina.

En algunas realizaciones de métodos, usos, composiciones farmacéuticas para su uso o combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2, cuando está en forma de dímero, puede exhibir una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que es al menos o al menos aproximadamente  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o mayor.

En algunos métodos, usos, composiciones farmacéuticas para uso, o combinaciones para su uso descritas en la presente memoria, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ADA2 no modificado pueden incluir un reemplazo de aminoácidos; y la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 11, 13, 20, 22, 26, 86, 179, 217, 219, 221, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 o 470, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179Y, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221Y, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264J, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H654S, H264T, H264V, H264W, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D, K470E, con

referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

5 En ejemplos concretos, la proteína ADA2 variante puede incluir uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A, K11E, R20A, R20D, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E, K452D y K452E, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones de métodos, usos, composiciones farmacéuticas para su uso o combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2 variante puede incluir reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A, K11A/K371A, S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D, S262N/R20E/K371E, R219Q/K371E, R219Q/K371D, R219Q/R20E, R219Q/K371E/R20E, R219Q/K371D/R20E, R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E, R219Q/S262N/K371E/R20E, R219Q/S262N/K371D/R20E y R219Q/S262N, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

15 En algunas realizaciones de métodos, usos, composiciones farmacéuticas para su uso o combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2 variante puede incluir una modificación de uno o más aminoácidos en el supuesto dominio de unión al receptor (PRB), tal como una delección, inserción o reemplazo de aminoácidos. Por ejemplo, la ADA2 variante puede incluir la eliminación de uno o más residuos de aminoácido contiguos correspondientes a uno o más residuos de aminoácido contiguos entre o entre aproximadamente los  
20 residuos de aminoácido 98 y 156 o los residuos de aminoácido 105 y 148, inclusive, con referencia a posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. En cualquiera de tales ejemplos de los métodos, usos, composiciones farmacéuticas para su uso o combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2 variante puede incluir adicionalmente la sustitución de la región suprimida con un conector peptídico. Por ejemplo, el conector peptídico se selecciona entre (Gly)<sub>n</sub> (SEC ID NO: 368), donde n es de 2 a 20; (GGGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 343), donde n es de 1 a 6; (SSSSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 344), donde n es de 1 a 6; (AlaAlaProAla)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 350), donde n es de 1 a 6; GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 345); GGSTSGSGKSSEGGK (SEQ ID NO: 346); GSTSGSGKSSSEGGSGSTKG (SEQ ID NO: 347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 348); y EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 349). En ejemplos concretos, el conector peptídico se selecciona entre GGG (SEQ ID NO: 369); GGGGG (SEQ ID NO: 360); GGGGGGG (SEQ ID NO: 370); GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 371); y GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 372).

30 Por ejemplo, la modificación en el dominio PRB de la proteína ADA2 corresponde a C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n es de 2 a 20, tal como C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>, C105\_T147delins(G)<sub>5</sub> o C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

35 En algunas realizaciones de métodos, usos, composiciones farmacéuticas para su uso o combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria, la proteína ADA2 se puede glicosilar en uno o más sitios de glicosilación nativos o no nativos. Por ejemplo, en algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria que contienen una proteína ADA2 variante, la proteína ADA2 variante incluye una o varias modificaciones que alteran la glicosilación mediante la introducción de un sitio de glicosilación no nativo. Por ejemplo, el sitio de glicosilación no nativo se introduce mediante uno o varios reemplazos de aminoácidos o inserción de uno, dos o tres aminoácidos. En ejemplos concretos, las modificaciones que alteran la glicosilación se seleccionan entre las modificaciones correspondientes a  $\text{---} \rightarrow \text{N1} / \text{---} \rightarrow \text{A2} / \text{---} \rightarrow \text{S3}$ , R20N/V22S, K371N/D373S, K372N/I374S, T403N/H405S y G404N/P406S, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.

45 En algunas realizaciones de métodos, usos, composiciones farmacéuticas para su uso o combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria, la ADA2 variante puede incluir un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 13-63 o 71-285 o una porción catalíticamente activa del mismo.

50 En algunas realizaciones de métodos, usos, composiciones farmacéuticas para su uso o usos proporcionados en la presente memoria, el sujeto puede ser un mamífero, en particular un ser humano. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, la composición farmacéutica puede administrarse por vía parenteral, local o sistémica. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse por vía intranasal, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral o mediante administración pulmonar.

55 En algunas realizaciones, en la proteína ADA2 variante o la porción catalíticamente activa de la misma proporcionada en la presente memoria, la proteína ADA2 variante en los métodos, composiciones, productos conjugados, formas modificadas, vectores, células, combinaciones, usos y composiciones para uso, y los ácidos nucleicos que codifican la ADA2 variante proporcionada en la presente memoria y los vectores que incluyen los ácidos nucleicos, las modificaciones pueden ser de uno o más de los siguientes reemplazos, inserciones, delecciones  
60 de aminoácidos y cualquier combinación de los mismos. La modificación o modificaciones enumeradas a continuación son con referencia a la numeración madura, tal como se expone en las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5. Los ejemplos de las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria son las siguientes; se entiende que los diferentes tipos de mutantes (modificaciones de aminoácidos) se pueden combinar para explotar las propiedades de cada tipo de mutación. Los expertos en la técnica entienden que, en general, los



efectos de las mutaciones en las proteínas son al menos aditivos y pueden ser sinérgicos.

### 1. Mutantes de unión a heparina

5 Las siguientes modificaciones pueden conferir una reducción de la unión a heparina. La unión a la heparina puede agotar los niveles circulantes de ADA2 administrada. Por lo tanto, las siguientes variantes de ADA2 pueden

10 aumentar la biodisponibilidad y la farmacocinética de la ADA2 administrada:  
K11A; K11D; K11E; K13A; K13D; K13E; K371A; K371D; K371E; K372A; K372D; K372E; K452A; K452D; K452E;  
R20A; R20D; R20E; R366A; R366D; R366E; K26A; K26D; K26E; R217A; R217D; R217E; K258A; K258D; K258E;  
R277A; R277D; R277E; R283A; R283D; R283E; K309A; K309D; K309E; K317A; K317D; K317E; K321A; K321D;  
K321E; R352A; R352D; R352E; R441A; R441D; R441E; K444A; K444D; K444E; K461A; K461D; K461E; K469A;  
K469D; K469E; K470A; K470D; y K470E.

#### Ejemplos de mutantes de unión a heparina que contienen estos reemplazos.

15 K11A (SEQ ID NO:13); K11D (SEQ ID NO:14); K11E (SEQ ID NO:15); K13A (SEQ ID NO:16); K13D (SEQ ID NO:17); K13E (SEQ ID NO:18); K371A (SEQ ID NO:19); K371D (SEQ ID NO:20); K371E (SEQ ID NO:21); K372A (SEQ ID NO:22); K372D (SEQ ID NO:23); K372E (SEQ ID NO:24); K452A (SEQ ID NO:25); K452D (SEQ ID NO:26); K452E (SEQ ID NO:27); R20A (SEQ ID NO:28); R20D (SEQ ID NO:29); R20E (SEQ ID NO:30); R366A (SEQ ID NO:31); R366D (SEQ ID NO:32); R366E (SEQ ID NO:33); K26A (SEQ ID NO:71); K26D (SEQ ID NO:72); K26E (SEQ ID NO:73); R217A (SEQ ID NO:74); R217D (SEQ ID NO:75); R217E (SEQ ID NO:76); K258A (SEQ ID NO:77); K258D (SEQ ID NO:78); K258E (SEQ ID NO:79); R277A (SEQ ID NO:80); R277D (SEQ ID NO:81); R277E (SEQ ID NO:82); R283A (SEQ ID NO:83); R283D (SEQ ID NO:84); R283E (SEQ ID NO:85); K309A (SEQ ID NO:86); K309D (SEQ ID NO:87); K309E (SEQ ID NO:88); K317A (SEQ ID NO:89); K317D (SEQ ID NO:90); K317E (SEQ ID NO:91); K321A (SEQ ID NO:92); K321D (SEQ ID NO:93); K321E (SEQ ID NO:94); R352A (SEQ ID NO:95); R352D (SEQ ID NO:96); R352E (SEQ ID NO:97); R441A (SEQ ID NO:98); R441D (SEQ ID NO:99); R441E (SEQ ID NO:100); K444A (SEQ ID NO:101); K444D (SEQ ID NO:102); K444E (SEQ ID NO:103); K461A (SEQ ID NO:104); K461D (SEQ ID NO:105); K461E (SEQ ID NO:106); K469A (SEQ ID NO:107); K469D (SEQ ID NO:108); K469E (SEQ ID NO:109); K470A (SEQ ID NO:110); K470D (SEQ ID NO:111); y K470E (SEQ ID NO:112).

### 2. Mutantes de sitio activo

Las siguientes modificaciones pueden conferir una mayor eficacia catalítica. Las modificaciones están en residuos seleccionados del sitio activo y pueden afectar a la mejora de la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) para adenosina. La unión a la heparina puede agotar los niveles circulantes de ADA2 administrada. Por lo tanto, las siguientes variantes de ADA2 pueden conferir una mayor actividad adenosina desaminasa:

35 H264A; H264Q; H264N; H264G; R219K; R219Q; R219N; R219A; L221A; L221V; L221G; E179D; E179A; E179S; E179T; E179V; E179G; S262A; S262V; S262M; S262N; D86A; D86C; D86E; D86F; D86G; D86H; D86I; D86K; D86L; D86M; D86N; D86P; D86Q; D86R; D86S; D86T; D86V; D86W; D86Y; E179C; E179F; E179H; E179I; E179K; E179L; E179M; E179N; E179P; E179Q; E179R; E179W; E179Y; R219C; R219D; R219E; R219F; R219G; R219H; R219I; R219L; R219M; R219P; R219S; R219T; R219V; R219W; R219Y; L221C; L221D; L221E; L221F; L221H; L221I; L221K; L221M; L221N; L221P; L221Q; L221R; L221S; L221T; L221W; L221Y; S262C; S262D; S262E; S262F; S262G; S262H; S262I; S262J; S262K; S262L; S262P; S262Q; S262R; S262T; S262W; S262X; S262Y; H264C; H264D; H264E; H264F; H264I; H264J; H264K; H264L; H264M; H264P; H264R; H264S; H264T; H264V; H264W; H264X; S266A; S266C; S266D; S266E; S266F; S266G; S266H; S266I; S266K; S266L; S266M; S266N; S266P; S266Q; S266R; S266T; S266V; S266W; S266Y; K267A; K267C; K267D; K267E; K267F; K267G; K267H; K267I; K267L; K267M; K267N; K267P; K267Q; K267R; K267S; K267T; K267V; K267W; K267Y; V296A; V296C; V296D; V296E; V296F; V296G; V296H; V296I; V296K; V296L; V296M; V296N; V296P; V296Q; V296R; V296S; V296T; V296W; y V296Y.

#### Ejemplos de mutantes de sitio activo que contienen estos reemplazos:

50 H264A (SEQ ID NO:34); H264Q (SEQ ID NO:35); H264N (SEQ ID NO:36); H264G (SEQ ID NO:37); R219K (SEQ ID NO:38); R219Q (SEQ ID NO:39); R219N (SEQ ID NO:40); R219A (SEQ ID NO:41); L221A (SEQ ID NO:42); L221V (SEQ ID NO:43); L221G (SEQ ID NO:44); E179D (SEQ ID NO:45); E179A (SEQ ID NO:46); E179S (SEQ ID NO:47); E179T (SEQ ID NO:48); E179V (SEQ ID NO:49); E179G (SEQ ID NO:50); S262A (SEQ ID NO:51); S262V (SEQ ID NO:52); S262M (SEQ ID NO:53); S262N (SEQ ID NO:54); D86A (SEQ ID NO:113); D86C (SEQ ID NO:114); D86E (SEQ ID NO:115); D86F (SEQ ID NO:116); D86G (SEQ ID NO:117); D86H (SEQ ID NO:118); D86I (SEQ ID NO:119); D86K (SEQ ID NO:120); D86L (SEQ ID NO:121); D86M (SEQ ID NO:122); D86N (SEQ ID NO:123); D86P (SEQ ID NO:124); D86Q (SEQ ID NO:125); D86R (SEQ ID NO:126); D86S (SEQ ID NO:127); D86T (SEQ ID NO:128); D86V (SEQ ID NO:129); D86W (SEQ ID NO:130); D86Y (SEQ ID NO:131); E179C (SEQ ID NO:132); E179F (SEQ ID NO:133); E179H (SEQ ID NO:134); E179I (SEQ ID NO:135); E179K (SEQ ID NO:136); E179L (SEQ ID NO:137); E179M (SEQ ID NO:138); E179N (SEQ ID NO:139); E179P (SEQ ID NO:140); E179Q (SEQ ID NO:141); E179R (SEQ ID NO:142); E179W (SEQ ID NO:143); E179Y (SEQ ID NO:144); R219C (SEQ ID NO:145); R219D (SEQ ID NO:146); R219E (SEQ ID NO:147); R219F (SEQ ID NO:148); R219G (SEQ ID NO:149); R219H

(SEQ ID NO:150); R219I (SEQ ID NO:151); R219L (SEQ ID NO:152); R219M (SEQ ID NO:153); R219P (SEQ ID NO:154); R219S (SEQ ID NO:155); R219T (SEQ ID NO:156); R219V (SEQ ID NO:157); R219W (SEQ ID NO:158); R219Y (SEQ ID NO:159); L221C (SEQ ID NO:160); L221D (SEQ ID NO:161); L221E (SEQ ID NO:162); L221F (SEQ ID NO:163); L221H (SEQ ID NO:164); L221I (SEQ ID NO:165); L221K (SEQ ID NO:166); L221M (SEQ ID NO:167); L221N (SEQ ID NO:168); L221P (SEQ ID NO:169); L221Q (SEQ ID NO:170); L221R (SEQ ID NO:171); L221S (SEQ ID NO:172); L221T (SEQ ID NO:173); L221W (SEQ ID NO:174); L221Y (SEQ ID NO:175); S262C (SEQ ID NO:176); S262D (SEQ ID NO:177); S262E (SEQ ID NO:178); S262F (SEQ ID NO:179); S262G (SEQ ID NO:180); S262H (SEQ ID NO:181); S262I (SEQ ID NO:182); S262K (SEQ ID NO:183); S262L (SEQ ID NO:184); S262P (SEQ ID NO:185); S262Q (SEQ ID NO:186); S262R (SEQ ID NO:187); S262T (SEQ ID NO:188); S262W (SEQ ID NO:189); S262Y (SEQ ID NO:190); H264C (SEQ ID NO:191); H264D (SEQ ID NO:192); H264E (SEQ ID NO:193); H264F (SEQ ID NO:194); H264I (SEQ ID NO:195); H264K (SEQ ID NO:196); H264L (SEQ ID NO:197); H264M (SEQ ID NO:198); H264P (SEQ ID NO:199); H264R (SEQ ID NO:200); H264S (SEQ ID NO:201); H264T (SEQ ID NO:202); H264V (SEQ ID NO:203); H264W (SEQ ID NO:204); H264Y (SEQ ID NO:205); S266A (SEQ ID NO:206); S266C (SEQ ID NO:207); S266D (SEQ ID NO:208); S266E (SEQ ID NO:209); S266F (SEQ ID NO:210); S266G (SEQ ID NO:211); S266H (SEQ ID NO:212); S266I (SEQ ID NO:213); S266K (SEQ ID NO:214); S266L (SEQ ID NO:215); S266M (SEQ ID NO:216); S266N (SEQ ID NO:217); S266P (SEQ ID NO:218); S266Q (SEQ ID NO:219); S266R (SEQ ID NO:220); S266T (SEQ ID NO:221); S266V (SEQ ID NO:222); S266W (SEQ ID NO:223); S266Y (SEQ ID NO:224); K267A (SEQ ID NO:225); K267C (SEQ ID NO:226); K267D (SEQ ID NO:227); K267E (SEQ ID NO:228); K267F (SEQ ID NO:229); K267G (SEQ ID NO:230); K267H (SEQ ID NO:231); K267I (SEQ ID NO:232); K267L (SEQ ID NO:233); K267M (SEQ ID NO:234); K267N (SEQ ID NO:235); K267P (SEQ ID NO:236); K267Q (SEQ ID NO:237); K267R (SEQ ID NO:238); K267S (SEQ ID NO:239); K267T (SEQ ID NO:240); K267V (SEQ ID NO:241); K267W (SEQ ID NO:242); K267Y (SEQ ID NO:243); V296A (SEQ ID NO:244); V296C (SEQ ID NO:245); V296D (SEQ ID NO:246); V296E (SEQ ID NO:247); V296F (SEQ ID NO:248); V296G (SEQ ID NO:249); V296H (SEQ ID NO:250); V296I (SEQ ID NO:251); V296K (SEQ ID NO:252); V296L (SEQ ID NO:253); V296M (SEQ ID NO:254); V296N (SEQ ID NO:255); V296P (SEQ ID NO:256); V296Q (SEQ ID NO:257); V296R (SEQ ID NO:258); V296S (SEQ ID NO:259); V296T (SEQ ID NO:260); V296W (SEQ ID NO:261); y V296Y (SEQ ID NO:262).

### 3. Mutantes de hiperglicosilación

Las siguientes modificaciones introducen un sitio de glicosilación no nativo en ADA2. La introducción de sitios de glicosilación no nativos, tales como los sitios de glicosilación ligados a N, puede conferir un aumento en la estabilidad y los perfiles farmacocinéticos. Por lo tanto, las siguientes variantes de ADA2 pueden afectar a la hiperglicosilación de ADA2 y aumentar la estabilidad y los perfiles farmacocinéticos de la ADA2 administrado:  
 ---->N1/---->A2/---->S3; R20N/V22S; K371N/D373S; K372N/I374S; T403N/H405S; y G404N/P406S.

#### Ejemplos de mutantes de hiperglicosilación que contienen estos reemplazos:

---->N1/---->A2/---->S3 (SEQ ID NO: 274); R20N/V22S (SEQ ID NO: 275); K371N/D373S (SEQ ID NO: 276); K372N/I374S (SEQ ID NO: 277); T403N/H405S (SEQ ID NO: 278); y G404N/P406S (SEQ ID NO: 279).

### 4. Deleción de PRB y mutantes de reemplazo

Las siguientes variantes contienen un dominio PRB modificado. Las modificaciones del dominio PRB pueden incluir la deleción de todo o una parte del dominio PRB (es decir, deleción de uno o más residuos del dominio PRB), la inserción de uno o más residuos de aminoácido en el dominio PRB, el reemplazo de aminoácidos de uno o más residuos del dominio PRB o una combinación de los mismos. La deleción y/o sustitución del dominio PRB puede conferir actividad alterada, por ejemplo, reducción en la unión a un receptor y/o la actividad mediada por el receptor.

C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>; N98\_N156del; C105\_E148del; C105\_T147del; V99\_Q144del; V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>; C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; y C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>.

#### Ejemplos de deleción de PRB y mutantes de reemplazo que contienen estos reemplazos:

C105\_T147delins(G)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:280); C105\_T147delins(G)<sub>15</sub> (SEQ ID NO:281); C105\_T147delins(G)<sub>10</sub> (SEQ ID NO:282); C105\_T147delins(G)<sub>7</sub> (SEQ ID NO:283); C105\_T147delins(G)<sub>5</sub> (SEQ ID NO:284); C105\_T147delins(Gly)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:285); N98\_N156del (SEQ ID NO:548); C105\_E148del (SEQ ID NO:549); C105\_T147del (SEQ ID NO:550); V99\_Q144del (SEQ ID NO:579); V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5 (SEQ ID NO:581); C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5 (SEQ ID NO:582); V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub> (SEQ ID NO:583); V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:584); V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:585); C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub> (SEQ ID NO:586); C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:587); y C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:588).

## 5. Mutantes de hiperglicosilación de PRB

Las siguientes modificaciones pueden introducir un sitio de glicosilación no nativo en el dominio PRB. La introducción de sitios de glicosilación no nativos, tales como los sitios de glicosilación ligados a N, en el dominio PRB puede conferir un aumento de estabilidad y perfiles farmacocinéticos y/u otras actividades, p. ej., reducción de la unión a un receptor. Por lo tanto, las siguientes variantes de ADA2 pueden afectar la hiperglicosilación de ADA2 en el dominio PRB, reducir la unión al receptor y aumentar la estabilidad y los perfiles farmacocinéticos de ADA2 administrada:

R125N/P126A; S127N/K129S; P126N/E128T; R112N/I114T; I134N/L135C/L136T; I134N/L135S/L136T; R142N/Q144S; E137N/Y139T; y P111N/G113S.

### Ejemplos de mutantes de hiperglicosilación de PRB que contienen estos reemplazos:

R125N/P126A (SEQ ID NO: 552); S127N/K129S (SEQ ID NO: 553); P126N/E128T (SEQ ID NO: 554); R112N/I114T (SEQ ID NO: 555); I134N/L135C/L136T (SEQ ID NO: 556); I134N/L135S/L136T (SEQ ID NO: 557); R142N/Q144S (SEQ ID NO: 558); E137N/Y139T (SEQ ID NO: 559); y P111N/G113S (SEQ ID NO: 560).

## 6. Mutantes de interacción del dominio PRB-ADA

Las siguientes modificaciones pueden conferir una alteración de la interacción entre el dominio PRB y el resto de ADA2 (p. ej., el dominio adenosina desaminasa (ADA)). La alteración de la interacción entre el dominio PRB y el resto de ADA2, tal como el dominio ADA, puede conferir una actividad, p. ej., un aumento en la actividad adenosina desaminasa y una reducción de la unión al receptor:

F119S; F119K; Y224R; Y224N; Y191S; Y191D; F183K; Y191D/Y224R; F109S; F109A; R118D; R118A; Y139T; Y139A; W133S; W133T; P124A; y P124S.

### Ejemplos de mutantes de interacción del dominio PRB-ADA que contienen estos reemplazos:

F119S (SEQ ID NO:561); F119K (SEQ ID NO:562); Y224R (SEQ ID NO:563); Y224N (SEQ ID NO:564); Y191S (SEQ ID NO:565); Y191D (SEQ ID NO:566); F183K (SEQ ID NO:567); Y191D/Y224R (SEQ ID NO:568); F109S (SEQ ID NO:569); F109A (SEQ ID NO:570); R118D (SEQ ID NO:571); R118A (SEQ ID NO:572); Y139T (SEQ ID NO:573); Y139A (SEQ ID NO:574); W133S (SEQ ID NO:575); W133T (SEQ ID NO:576); P124A (SEQ ID NO:577); y P124S (SEQ ID NO:578).

### 1. Combinaciones de mutaciones con mutantes de hiperglicosilación

Las siguientes variantes combinan modificaciones que afectan la mejora de la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) para adenosina, tales como R219Q y/o S262N, con modificaciones que introducen sitios de glicosilación no nativos:

R219Q/S262N/ins(NAS)I1; R219Q/S262N/R20N/V22S; R219Q/S262N/K371N/D373S; R219Q/S262N/K372N/I374S; R219Q/S262N/T403N/H405S; y R219Q/S262N/G404N/P406S.

### Combinación con mutantes de hiperglicosilación que contienen estos reemplazos:

R219Q/S262N/ins(NAS)I1 (SEQ ID NO: 596); R219Q/S262N/R20N/V22S (SEQ ID NO: 597); R219Q/S262N/K371N/D373S (SEQ ID NO: 598); R219Q/S262N/K372N/I374S (SEQ ID NO: 599); R219Q/S262N/T403N/H405S (SEQ ID NO: 600); y R219Q/S262N/G404N/P406S (SEQ ID NO: 601).

### 2. Combinaciones de mutaciones con mutantes de hiperglicosilación de PRB

Las siguientes variantes combinan modificaciones que afectan a la mejora de la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) para adenosina, tales como R219Q y/o S262N, con modificaciones que introducen sitios de glicosilación no nativos en el dominio PRB:

R219Q/S262N/R125N/P126A; R219Q/S262N/S127N/K129S; R219Q/S262N/P126N/E128T;  
R219Q/S262N/R112N/I114T; R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T; R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T;  
R219Q/S262N/R142N/Q144S; R219Q/S262N/E137N/Y139T; y R219Q/S262N/P111N/G113S.

### Ejemplos de combinaciones con mutantes de hiperglicosilación PRB que contienen estos reemplazos:

R219Q/S262N/R125N/P126A (SEQ ID NO: 607); R219Q/S262N/S127N/K129S (SEQ ID NO: 608); R219Q/S262N/P126N/E128T (SEQ ID NO: 609); R219Q/S262N/R112N/I114T (SEQ ID NO: 610); R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T (SEQ ID NO: 611); R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T (SEQ ID NO: 612); R219Q/S262N/R142N/Q144S (SEQ ID NO: 613); R219Q/S262N/E137N/Y139T (SEQ ID NO: 614); y R219Q/S262N/P111N/G113S (SEQ ID NO: 615).

### 3. Combinaciones con mutantes de interacción de dominio PRB-ADA

Las siguientes variantes combinan modificaciones que afectan a la mejora de la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) para adenosina, tales como R219Q y/o S262N, con modificaciones que alteran la interacción entre el dominio PRB y el resto de ADA2 (p. ej., el dominio adenosina desaminasa (ADA)):

R219Q/S262N/F119S; R219Q/S262N/F119K; R219Q/S262N/Y224R; R219Q/S262N/Y224N; R219Q/S262N/Y191S; R219Q/S262N/Y191D; R219Q/S262N/F183K; R219Q/S262N/Y191D/Y224R; R219Q/S262N/F109S; R219Q/S262N/F109A; R219Q/S262N/R118D; R219Q/S262N/R118A; R219Q/S262N/Y139T; R219Q/S262N/Y139A; R219Q/S262N/W133S; R219Q/S262N/W133T; R219Q/S262N/P124A; y R219Q/S262N/P124S.

#### Combinaciones con mutantes de interacción de dominio PRB-ADA que contienen estos reemplazos:

R219Q/S262N/F119S (SEQ ID NO:616); R219Q/S262N/F119K (SEQ ID NO:617); R219Q/S262N/Y224R (SEQ ID NO:618); R219Q/S262N/Y224N (SEQ ID NO:619); R219Q/S262N/Y191S (SEQ ID NO:620); R219Q/S262N/Y191D (SEQ ID NO:621); R219Q/S262N/F183K (SEQ ID NO:622); R219Q/S262N/Y191D/Y224R (SEQ ID NO:623); R219Q/S262N/F109S (SEQ ID NO:624); R219Q/S262N/F109A (SEQ ID NO:625); R219Q/S262N/R118D (SEQ ID NO:626); R219Q/S262N/R118A (SEQ ID NO:627); R219Q/S262N/Y139T (SEQ ID NO:628); R219Q/S262N/Y139A (SEQ ID NO:629); R219Q/S262N/W133S (SEQ ID NO:630); R219Q/S262N/W133T (SEQ ID NO:631); R219Q/S262N/P124A (SEQ ID NO:632); y R219Q/S262N/P124S (SEQ ID NO:633).

### 4. Combinaciones con mutantes de delección de PRB

Las siguientes variantes combinan modificaciones que afectan a la mejora de la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) para adenosina, tales como R219Q y/o S262N, y/o modificaciones que confieren una reducción de la unión a heparina, tales como K371D, con modificaciones, p. ej., delecciones, inserciones, sustituciones y/o reemplazos, en el dominio PRB:

K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>; K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>; K371D/C105\_T147delins→(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>; K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; K371D/N98\_N156del; K371D/C105\_E148del; K371D/C105\_T147del; K371D/V99\_Q144del; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/N98\_N156del; R219Q/S262N/C105\_E148del; R219Q/S262N/C105\_T147del; R219Q/S262N/V99\_Q144del; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/K371D/N98\_N156del; R219Q/S262N/K371D/C105\_E148del; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147del; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144del; R219Q/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/N98-N156del; R219Q/C105\_E148del; R219Q/C105\_T147del; R219Q/V99\_Q144del; S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; S262N/V99-Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; S262N/N98\_N156del; y S262N/C105\_E148del; S262N/C105\_T147del; y S262N/V99\_Q144del.

#### Ejemplos de combinación con mutantes de delección de PRB que contienen estos reemplazos:

K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>; K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>;

R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>;  
 5 K371D/C105\_T147delins→(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>;  
 K371D/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; K371D/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>;  
 K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5;  
 K371D/N98\_N156del; K371D/C105\_E148del; K371D/C105\_T147del; K371D/V99\_Q144del;  
 R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5;  
 10 R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/N98\_N156del;  
 R219Q/S262N/C105\_E148del; R219Q/S262N/C105\_T147del; R219Q/S262N/V99\_Q144del;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>;  
 15 R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/S262N/K371D/N98\_N156del;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_E148del; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147del; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144del;  
 R219Q/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; R219Q/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5;  
 R219Q/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; R219Q/N98-N156del; R219Q/C105\_E148del;  
 20 R219Q/C105\_T147del; R219Q/V99\_Q144del; S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub>, donde n = 2 a 20; S262N/V99-  
 Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5; S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub>, donde n = 1 a 5;  
 S262N/N98\_N156del; y S262N/C105\_E148del; S262N/C105\_T147del; y S262N/V99\_Q144del.

## 5. Otros mutantes combinados

25 Las siguientes variantes combinan varias modificaciones, tales como modificaciones que afectan a la mejora de la  
 eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) para adenosina, tales como K371D, y otras modificaciones:  
 K11A/R20A; K11A/R20A/K371A; R20A/K371A; K11A/K371A; S262N/K371D; S262N/K371E; S262N/R20E;  
 30 S262N/R20E/K371D; S262N/R20E/K371E; R219Q/K371E; R219Q/K371D; R219Q/R20E; R219Q/K371E/R20E;  
 R219Q/K371D/R20E; R219Q/S262N/K371E; R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E;  
 R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; R219Q/S262N; R219Q/S262N/K11A;  
 R219Q/S262N/K11D; R219Q/S262N/K11E; R219Q/S262N/K13A; R219Q/S262N/K13D; R219Q/S262N/K13E;  
 R219Q/S262N/K371A; R219Q/S262N/K372A; R219Q/S262N/K372D; R219Q/S262N/K372E; R219Q/S262N/K452A;  
 35 R219Q/S262N/K452D; R219Q/S262N/K452E; R219Q/S262N/R20A; R219Q/S262N/R20D; R219Q/S262N/R366A;  
 R219Q/S262N/R366D; R219Q/S262N/R366E; R219Q/S262N/H264A; R219Q/S262N/H264Q; R219Q/S262N/H264N;  
 R219Q/S262N/H264G; R219Q/S262N; R219N/S262N; R219A/S262N; R219Q/S262N/L221A; R219Q/S262N/L221V;  
 R219Q/S262N/L221G; R219Q/S262N/E179D; R219Q/S262N/E179A; R219Q/S262N/E179S; R219Q/S262N/E179T;  
 R219Q/S262N/E179V; R219Q/S262N/E179G; R219Q/S262A; R219Q/S262V; R219Q/S262M;  
 40 R219Q/S262N/K11A/R20A; R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A; R219Q/S262N/R20A/K371A;  
 R219Q/S262N/K11A/K371A; R219Q/S262N/K26A; R219Q/S262N/K26D; R219Q/S262N/K26E;  
 R219Q/S262N/R217A; R219Q/S262N/R217D; R219Q/S262N/R217E; R219Q/S262N/K258A; R219Q/S262N/K258D;  
 R219Q/S262N/K258E; R219Q/S262N/R277A; R219Q/S262N/R277D; R219Q/S262N/R277E; R219Q/S262N/R283A;  
 R219Q/S262N/R283D; R219Q/S262N/R283E; R219Q/S262N/K309A; R219Q/S262N/K309D; R219Q/S262N/K309E;  
 45 R219Q/S262N/K317A; R219Q/S262N/K317D; R219Q/S262N/K317E; R219Q/S262N/K321A; R219Q/S262N/K321D;  
 R219Q/S262N/K321E; R219Q/S262N/R352A; R219Q/S262N/R352D; R219Q/S262N/R352E; R219Q/S262N/R441A;  
 R219Q/S262N/R441D; R219Q/S262N/R441E; R219Q/S262N/K444A; R219Q/S262N/K444D; R219Q/S262N/K444E;  
 R219Q/S262N/K461A; R219Q/S262N/K461D; R219Q/S262N/K461E; R219Q/S262N/K469A; R219Q/S262N/K469D;  
 R219Q/S262N/K469E; R219Q/S262N/K470A; R219Q/S262N/K470D; R219Q/S262N/K470E; R219Q/S262N/D86A;  
 50 R219Q/S262N/D86C; R219Q/S262N/D86E; R219Q/S262N/D86F; R219Q/S262N/D86G; R219Q/S262N/D86H;  
 R219Q/S262N/D86I; R219Q/S262N/D86K; R219Q/S262N/D86L; R219Q/S262N/D86M; R219Q/S262N/D86N;  
 R219Q/S262N/D86P; R219Q/S262N/D86Q; R219Q/S262N/D86R; R219Q/S262N/D86S; R219Q/S262N/D86T;  
 R219Q/S262N/D86V; R219Q/S262N/D86W; R219Q/S262N/D86Y; R219Q/S262N/E179C; R219Q/S262N/E179F;  
 R219Q/S262N/E179H; R219Q/S262N/E179I; R219Q/S262N/E179K; R219Q/S262N/E179L; R219Q/S262N/E179M;  
 55 R219Q/S262N/E179N; R219Q/S262N/E179P; R219Q/S262N/E179Q; R219Q/S262N/E179R; R219Q/S262N/E179W;  
 R219Q/S262N/E179Y; R219C/S262N; R219D/S262N; R219E/S262N; R219F/S262N; R219G/S262N;  
 R219H/S262N; R219I/S262N; R219L/S262N; R219M/S262N; R219P/S262N; R219S/S262N; R219T/S262N;  
 R219V/S262N; R219W/S262N; R219Y/S262N; R219Q/S262N/L221C; R219Q/S262N/L221D; R219Q/S262N/L221E;  
 R219Q/S262N/L221F; R219Q/S262N/L221H; R219Q/S262N/L221I; R219Q/S262N/L221K; R219Q/S262N/L221M;  
 60 R219Q/S262N/L221N; R219Q/S262N/L221P; R219Q/S262N/L221Q; R219Q/S262N/L221R; R219Q/S262N/L221S;  
 R219Q/S262N/L221T; R219Q/S262N/L221W; R219Q/S262N/L221Y; R219Q/S262C; R219Q/S262D; R219Q/S262E;  
 R219Q/S262F; R219Q/S262G; R219Q/S262H; R219Q/S262I; R219Q/S262J; R219Q/S262K; R219Q/S262L; R219Q/S262P;  
 R219Q/S262Q; R219Q/S262R; R219Q/S262T; R219Q/S262W; R219Q/S262Y; R219Q/S262N/H264C;  
 R219Q/S262N/H264D; R219Q/S262N/H264E; R219Q/S262N/H264F; R219Q/S262N/H264I; R219Q/S262N/H264K;

R219Q/S262N/H264L; R219Q/S262N/H264M; R219Q/S262N/H264P; R219Q/S262N/H264R; R219Q/S262N/H264S;  
 R219Q/S262N/H264T; R219Q/S262N/H264V; R219Q/S262N/H264W; R219Q/S262N/H264Y; R219Q/S262N/S266A;  
 R219Q/S262N/S266C; R219Q/S262N/S266D; R219Q/S262N/S266E; R219Q/S262N/S266F; R219Q/S262N/S266G;  
 R219Q/S262N/S266H; R219Q/S262N/S266I; R219Q/S262N/S266K; R219Q/S262N/S266L; R219Q/S262N/S266M;  
 5 R219Q/S262N/S266N; R219Q/S262N/S266P; R219Q/S262N/S266Q; R219Q/S262N/S266R; R219Q/S262N/S266T;  
 R219Q/S262N/S266V; R219Q/S262N/S266W; R219Q/S262N/S266Y; R219Q/S262N/K267A; R219Q/S262N/K267C;  
 R219Q/S262N/K267D; R219Q/S262N/K267E; R219Q/S262N/K267F; R219Q/S262N/K267G; R219Q/S262N/K267H;  
 R219Q/S262N/K267I; R219Q/S262N/K267L; R219Q/S262N/K267M; R219Q/S262N/K267N; R219Q/S262N/K267P;  
 10 R219Q/S262N/K267Q; R219Q/S262N/K267R; R219Q/S262N/K267S; R219Q/S262N/K267T; R219Q/S262N/K267V;  
 R219Q/S262N/K267W; R219Q/S262N/K267Y; R219Q/S262N/V296A; R219Q/S262N/V296C; R219Q/S262N/V296D;  
 R219Q/S262N/V296E; R219Q/S262N/V296F; R219Q/S262N/V296G; R219Q/S262N/V296H; R219Q/S262N/V296I;  
 R219Q/S262N/V296K; R219Q/S262N/V296L; R219Q/S262N/V296M; R219Q/S262N/V296N; R219Q/S262N/V296P;  
 R219Q/S262N/V296Q; R219Q/S262N/V296R; R219Q/S262N/V296S; R219Q/S262N/V296T; R219Q/S262N/V296W;  
 15 R219Q/S262N/V296Y; R219Q/K11A/R20A; R219Q/K11A/R20A/K371A; R219Q/R20A/K371A; R219Q/K11A/K371A;  
 S262N/K11A/R20A; S262N/K11A/R20A/K371A; S262N/R20A/K371A; y S262N/K11A/K371A.

**Ejemplos de estos mutantes combinados que contienen estos reemplazos:**

K11A/R20A (SEQ ID NO:55); K11A/R20A/K371A (SEQ ID NO:56); R20A/K371A (SEQ ID NO:57); K11A/K371A  
 20 (SEQ ID NO:58); S262N/K371D (SEQ ID NO:59); S262N/K371E (SEQ ID NO:60); S262N/R20E (SEQ ID NO:61);  
 S262N/R20E/K371D (SEQ ID NO:62); S262N/R20E/K371E (SEQ ID NO:63); R219Q/K371E (SEQ ID NO:263);  
 R219Q/K371D (SEQ ID NO:264); R219Q/R20E (SEQ ID NO:265); R219Q/K371E/R20E (SEQ ID NO:266);  
 R219Q/K371D/R20E (SEQ ID NO:267); R219Q/S262N/K371E (SEQ ID NO:268); R219Q/S262N/K371D (SEQ ID  
 NO:269); R219Q/S262N/R20E (SEQ ID NO:270); R219Q/S262N/K371E/R20E (SEQ ID NO:271);  
 25 R219Q/S262N/K371D/R20E (SEQ ID NO:272); R219Q/S262N (SEQ ID NO:273); R219Q/S262N/K11A (SEQ ID  
 NO:659); R219Q/S262N/K11D (SEQ ID NO:660); R219Q/S262N/K11E (SEQ ID NO:661); R219Q/S262N/K13A  
 (SEQ ID NO:662); R219Q/S262N/K13D (SEQ ID NO:663); R219Q/S262N/K13E (SEQ ID NO:682);  
 R219Q/S262N/K371A (SEQ ID NO:683); R219Q/S262N/K372A (SEQ ID NO:684); R219Q/S262N/K372D (SEQ ID  
 NO:685); R219Q/S262N/K372E (SEQ ID NO:686); R219Q/S262N/K452A (SEQ ID NO:687); R219Q/S262N/K452D  
 30 (SEQ ID NO:688); R219Q/S262N/K452E (SEQ ID NO:689); R219Q/S262N/R20A (SEQ ID NO:690);  
 R219Q/S262N/R20D (SEQ ID NO:691); R219Q/S262N/R366A (SEQ ID NO:692); R219Q/S262N/R366D (SEQ ID  
 NO:693); R219Q/S262N/R366E (SEQ ID NO:694); R219Q/S262N/H264A (SEQ ID NO:695); R219Q/S262N/H264Q  
 (SEQ ID NO:696); R219Q/S262N/H264N (SEQ ID NO:697); R219Q/S262N/H264G (SEQ ID NO:698); R219Q/S262N  
 (SEQ ID NO:699); R219N/S262N (SEQ ID NO:700); R219A/S262N (SEQ ID NO:701); R219Q/S262N/L221A (SEQ  
 35 ID NO:702); R219Q/S262N/L221V (SEQ ID NO:703); R219Q/S262N/L221G (SEQ ID NO:704);  
 R219Q/S262N/E179D (SEQ ID NO:705); R219Q/S262N/E179A (SEQ ID NO:706); R219Q/S262N/E179S (SEQ ID  
 NO:707); R219Q/S262N/E179T (SEQ ID NO:708); R219Q/S262N/E179V (SEQ ID NO:709); R219Q/S262N/E179G  
 (SEQ ID NO:710); R219Q/S262A (SEQ ID NO:711); R219Q/S262V (SEQ ID NO:712); R219Q/S262M (SEQ ID  
 NO:713); R219Q/S262N/K11A/R20A (SEQ ID NO:714); R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A (SEQ ID NO:715);  
 40 R219Q/S262N/R20A/K371A (SEQ ID NO:716); R219Q/S262N/K11A/K371A (SEQ ID NO:717); R219Q/S262N/K26A  
 (SEQ ID NO:718); R219Q/S262N/K26D (SEQ ID NO:719); R219Q/S262N/K26E (SEQ ID NO:720);  
 R219Q/S262N/R217A (SEQ ID NO:721); R219Q/S262N/R217D (SEQ ID NO:722); R219Q/S262N/R217E (SEQ ID  
 NO:723); R219Q/S262N/K258A (SEQ ID NO:724); R219Q/S262N/K258D (SEQ ID NO:725); R219Q/S262N/K258E  
 (SEQ ID NO:726); R219Q/S262N/R277A (SEQ ID NO:727); R219Q/S262N/R277D (SEQ ID NO:728);  
 45 R219Q/S262N/R277E (SEQ ID NO:729); R219Q/S262N/R283A (SEQ ID NO:730); R219Q/S262N/R283D (SEQ ID  
 NO:731); R219Q/S262N/R283E (SEQ ID NO:732); R219Q/S262N/K309A (SEQ ID NO:733); R219Q/S262N/K309D  
 (SEQ ID NO:734); R219Q/S262N/K309E (SEQ ID NO:735); R219Q/S262N/K317A (SEQ ID NO:736);  
 R219Q/S262N/K317D (SEQ ID NO:737); R219Q/S262N/K317E (SEQ ID NO:738); R219Q/S262N/K321A (SEQ ID  
 NO:739); R219Q/S262N/K321D (SEQ ID NO:740); R219Q/S262N/K321E (SEQ ID NO:741); R219Q/S262N/R352A  
 50 (SEQ ID NO:742); R219Q/S262N/R352D (SEQ ID NO:743); R219Q/S262N/R352E (SEQ ID NO:744);  
 R219Q/S262N/R441A (SEQ ID NO:745); R219Q/S262N/R441D (SEQ ID NO:746); R219Q/S262N/R441E (SEQ ID  
 NO:747); R219Q/S262N/K444A (SEQ ID NO:748); R219Q/S262N/K444D (SEQ ID NO:749); R219Q/S262N/K444E  
 (SEQ ID NO:750); R219Q/S262N/K461A (SEQ ID NO:751); R219Q/S262N/K461D (SEQ ID NO:752);  
 R219Q/S262N/K461E (SEQ ID NO:753); R219Q/S262N/K469A (SEQ ID NO:754); R219Q/S262N/K469D (SEQ ID  
 NO:755); R219Q/S262N/K469E (SEQ ID NO:756); R219Q/S262N/K470A (SEQ ID NO:757); R219Q/S262N/K470D  
 55 (SEQ ID NO:758); R219Q/S262N/K470E (SEQ ID NO:759); R219Q/S262N/D86A (SEQ ID NO:760);  
 R219Q/S262N/D86C (SEQ ID NO:761); R219Q/S262N/D86E (SEQ ID NO:762); R219Q/S262N/D86F (SEQ ID  
 NO:763); R219Q/S262N/D86G (SEQ ID NO:764); R219Q/S262N/D86H (SEQ ID NO:765); R219Q/S262N/D86I (SEQ  
 ID NO:766); R219Q/S262N/D86K (SEQ ID NO:767); R219Q/S262N/D86L (SEQ ID NO:768); R219Q/S262N/D86M  
 60 (SEQ ID NO:769); R219Q/S262N/D86N (SEQ ID NO:770); R219Q/S262N/D86P (SEQ ID NO:771);  
 R219Q/S262N/D86Q (SEQ ID NO:772); R219Q/S262N/D86R (SEQ ID NO:773); R219Q/S262N/D86S (SEQ ID  
 NO:774); R219Q/S262N/D86T (SEQ ID NO:775); R219Q/S262N/D86V (SEQ ID NO:776); R219Q/S262N/D86W  
 (SEQ ID NO:777); R219Q/S262N/D86Y (SEQ ID NO:778); R219Q/S262N/E179C (SEQ ID NO:779);  
 R219Q/S262N/E179F (SEQ ID NO:780); R219Q/S262N/E179H (SEQ ID NO:781); R219Q/S262N/E179I (SEQ ID

NO:782); R219Q/S262N/E179K (SEQ ID NO:783); R219Q/S262N/E179L (SEQ ID NO:784); R219Q/S262N/E179M (SEQ ID NO:785); R219Q/S262N/E179N (SEQ ID NO:786); R219Q/S262N/E179P (SEQ ID NO:787); R219Q/S262N/E179Q (SEQ ID NO:788); R219Q/S262N/E179R (SEQ ID NO:789); R219Q/S262N/E179W (SEQ ID NO:790); R219Q/S262N/E179Y (SEQ ID NO:791); R219C/S262N (SEQ ID NO:792); R219D/S262N (SEQ ID NO:793); R219E/S262N (SEQ ID NO:794); R219F/S262N (SEQ ID NO:795); R219G/S262N (SEQ ID NO:796); R219H/S262N (SEQ ID NO:797); R219I/S262N (SEQ ID NO:798); R219L/S262N (SEQ ID NO:799); R219M/S262N (SEQ ID NO:800); R219P/S262N (SEQ ID NO:801); R219S/S262N (SEQ ID NO:802); R219T/S262N (SEQ ID NO:803); R219V/S262N (SEQ ID NO:804); R219W/S262N (SEQ ID NO:805); R219Y/S262N (SEQ ID NO:806); R219Q/S262N/L221C (SEQ ID NO:807); R219Q/S262N/L221D (SEQ ID NO:808); R219Q/S262N/L221E (SEQ ID NO:809); R219Q/S262N/L221F (SEQ ID NO:810); R219Q/S262N/L221H (SEQ ID NO:811); R219Q/S262N/L221I (SEQ ID NO:812); R219Q/S262N/L221K (SEQ ID NO:813); R219Q/S262N/L221M (SEQ ID NO:814); R219Q/S262N/L221N (SEQ ID NO:815); R219Q/S262N/L221P (SEQ ID NO:816); R219Q/S262N/L221Q (SEQ ID NO:817); R219Q/S262N/L221R (SEQ ID NO:818); R219Q/S262N/L221S (SEQ ID NO:819); R219Q/S262N/L221T (SEQ ID NO:820); R219Q/S262N/L221W (SEQ ID NO:821); R219Q/S262N/L221Y (SEQ ID NO:822); R219Q/S262C (SEQ ID NO:823); R219Q/S262D (SEQ ID NO:824); R219Q/S262E (SEQ ID NO:825); R219Q/S262F (SEQ ID NO:826); R219Q/S262G (SEQ ID NO:827); R219Q/S262H (SEQ ID NO:828); R219Q/S262I (SEQ ID NO:829); R219Q/S262K (SEQ ID NO:830); R219Q/S262L (SEQ ID NO:831); R219Q/S262P (SEQ ID NO:832); R219Q/S262Q (SEQ ID NO:833); R219Q/S262R (SEQ ID NO:834); R219Q/S262T (SEQ ID NO:835); R219Q/S262W (SEQ ID NO:836); R219Q/S262Y (SEQ ID NO:837); R219Q/S262N/H264C (SEQ ID NO:838); R219Q/S262N/H264D (SEQ ID NO:839); R219Q/S262N/H264E (SEQ ID NO:840); R219Q/S262N/H264F (SEQ ID NO:841); R219Q/S262N/H264I (SEQ ID NO:842); R219Q/S262N/H264K (SEQ ID NO:843); R219Q/S262N/H264L (SEQ ID NO:844); R219Q/S262N/H264M (SEQ ID NO:845); R219Q/S262N/H264P (SEQ ID NO:846); R219Q/S262N/H264R (SEQ ID NO:847); R219Q/S262N/H264S (SEQ ID NO:848); R219Q/S262N/H264T (SEQ ID NO:849); R219Q/S262N/H264V (SEQ ID NO:850); R219Q/S262N/H264W (SEQ ID NO:851); R219Q/S262N/H264Y (SEQ ID NO:852); R219Q/S262N/S266A (SEQ ID NO:853); R219Q/S262N/S266C (SEQ ID NO:854); R219Q/S262N/S266D (SEQ ID NO:855); R219Q/S262N/S266E (SEQ ID NO:856); R219Q/S262N/S266F (SEQ ID NO:857); R219Q/S262N/S266G (SEQ ID NO:858); R219Q/S262N/S266H (SEQ ID NO:859); R219Q/S262N/S266I (SEQ ID NO:860); R219Q/S262N/S266K (SEQ ID NO:861); R219Q/S262N/S266L (SEQ ID NO:862); R219Q/S262N/S266M (SEQ ID NO:863); R219Q/S262N/S266N (SEQ ID NO:864); R219Q/S262N/S266P (SEQ ID NO:865); R219Q/S262N/S266Q (SEQ ID NO:866); R219Q/S262N/S266R (SEQ ID NO:867); R219Q/S262N/S266T (SEQ ID NO:868); R219Q/S262N/S266V (SEQ ID NO:869); R219Q/S262N/S266W (SEQ ID NO:870); R219Q/S262N/S266Y (SEQ ID NO:871); R219Q/S262N/K267A (SEQ ID NO:872); R219Q/S262N/K267C (SEQ ID NO:873); R219Q/S262N/K267D (SEQ ID NO:874); R219Q/S262N/K267E (SEQ ID NO:875); R219Q/S262N/K267F (SEQ ID NO:876); R219Q/S262N/K267G (SEQ ID NO:877); R219Q/S262N/K267H (SEQ ID NO:878); R219Q/S262N/K267I (SEQ ID NO:879); R219Q/S262N/K267L (SEQ ID NO:880); R219Q/S262N/K267M (SEQ ID NO:881); R219Q/S262N/K267N (SEQ ID NO:882); R219Q/S262N/K267P (SEQ ID NO:883); R219Q/S262N/K267Q (SEQ ID NO:884); R219Q/S262N/K267R (SEQ ID NO:885); R219Q/S262N/K267S (SEQ ID NO:886); R219Q/S262N/K267T (SEQ ID NO:887); R219Q/S262N/K267V (SEQ ID NO:888); R219Q/S262N/K267W (SEQ ID NO:889); R219Q/S262N/K267Y (SEQ ID NO:890); R219Q/S262N/V296A (SEQ ID NO:891); R219Q/S262N/V296C (SEQ ID NO:892); R219Q/S262N/V296D (SEQ ID NO:893); R219Q/S262N/V296E (SEQ ID NO:894); R219Q/S262N/V296F (SEQ ID NO:895); R219Q/S262N/V296G (SEQ ID NO:896); R219Q/S262N/V296H (SEQ ID NO:897); R219Q/S262N/V296I (SEQ ID NO:898); R219Q/S262N/V296K (SEQ ID NO:899); R219Q/S262N/V296L (SEQ ID NO:900); R219Q/S262N/V296M (SEQ ID NO:901); R219Q/S262N/V296N (SEQ ID NO:902); R219Q/S262N/V296P (SEQ ID NO:903); R219Q/S262N/V296Q (SEQ ID NO:904); R219Q/S262N/V296R (SEQ ID NO:905); R219Q/S262N/V296S (SEQ ID NO:906); R219Q/S262N/V296T (SEQ ID NO:907); R219Q/S262N/V296W (SEQ ID NO:908); R219Q/S262N/V296Y (SEQ ID NO:909); R219Q/K11A/R20A (SEQ ID NO:910); R219Q/K11A/R20A/K371A (SEQ ID NO:911); R219Q/R20A/K371A (SEQ ID NO:912); R219Q/K11A/K371A (SEQ ID NO:913); S262N/K11A/R20A (SEQ ID NO:914); S262N/K11A/R20A/K371A (SEQ ID NO:915); S262N/R20A/K371A (SEQ ID NO:916); y S262N/K11A/K371A (SEQ ID NO:917).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las **Figuras 1A-1F** representan alineamientos ilustrativos de precursores de adenosina desaminasa humana 2 (ADA2) expuestos en SEQ ID NO: 2 (residuos 30-511 correspondientes a ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) con otras proteínas ADA2. Un "\*" significa que los residuos alineados son idénticos, un "." significa que los residuos alineados no son idénticos, pero son similares y contienen residuos de aminoácido conservativos en la posición alineada, y un "-" significa que los residuos alineados son similares y contienen residuos de aminoácido semiconservativos en la posición alineada. Los residuos correspondientes al supuesto dominio de unión al receptor (PRB) están subrayados. Las posiciones correspondientes, no limitantes, ilustrativas para los reemplazos de aminoácidos se indican resaltando. Por ejemplo, la **Figura 1A** representa el alineamiento de ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 2 con ADA2 de chimpancé expuesta en SEQ ID NO: 286. La **Figura 1B** representa el alineamiento de una ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 2 con ADA2 de gorila expuesta en SEQ ID NO: 287. La **Figura 1C** representa el alineamiento de una ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 2 con la de chimpancé pigmeo expuesta en SEQ ID NO: 288. La **Figura 1D** representa el

alineamiento de ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 2 con ADA2 de orangután de Sumatra expuesta en SEQ ID NO: 289. La **Figura 1E** representa el alineamiento de ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 2 con ADA2 de gibón de mejillas blancas septentrional expuesta en SEQ ID NO: 290. La **Figura 1F** representa el alineamiento de ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 2 con ADA2 de macaco comedor de cangrejos expuesta en SEQ ID NO: 291. La **Figura 2** representa la biosíntesis y el catabolismo de la adenosina extracelular y la señalización del receptor de adenosina (adaptado de Antonioli et al. (2013) Nat Rev Can 13:842-857). Las condiciones fisiológicas tales como hipoxia, isquemia, inflamación, entorno tumoral o trauma pueden promover la acumulación extracelular de ATP, que es metabolizado a AMP por la enzima CD39 de la superficie celular. El AMP es metabolizada a su vez a adenosina por CD73. La adenosina extracelular se puede unir a cuatro receptores de adenosina acoplados a la proteína G diferentes (ADR; es decir, A1, A2A, A2B y A3), expresados en la superficie celular de células inmunitarias, tumorales u otras células cercanas, para mediar diversas señales mediadas por adenosina y actividades, tales como inmunosupresión, proliferación de células cancerosas, migración y/o metástasis de células cancerosas, angiogénesis y otros efectos. Los transportadores de nucleósidos (NT) facilitan la absorción de adenosina extracelular al interior de las células. La adenosina desaminasa 2 (ADA2), que incluye ADA2 exógena o variantes como se proporciona en la presente memoria, puede descomponer la adenosina extracelular catalizando la conversión de adenosina en inosina.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### Esquema

#### A. Definiciones

#### B. Adenosina Desaminasa 2 (ADA2) y Modulación de la Inmunosupresión Tumoral Mediada por Adenosina

1. Inmunidad Tumoral y Evasión Inmunitaria
2. Inmunomodulación por Adenosina en Cáncer y Microentorno Tumoral (MET)
3. Adenosina Desaminasa y Elección como Diana de la Adenosina en el Tratamiento del Cáncer

#### C. Adenosina Desaminasa 2 (ADA2) y Variantes de la Misma

##### 1. Estructura y Actividad de ADA2

- a. Estructura de ADA2
- b. Actividades de ADA2

##### 2. Variantes de ADA2

- a. Modificaciones ilustrativas
  - i. Reemplazos de Aminoácidos
  - ii. Modificaciones del Dominio PRB
  - iii. Hiperglicosilación
- b. Moléculas de Ácido Nucleico
- c. Producción de Proteínas ADA2 Variantes

#### D. Productos Conjugados y Proteínas de Fusión de ADA2

##### 1. Radicales Prolongadores de la Semivida

- a. Polipéptidos de Baja Complejidad
- b. Péptido C-terminal (CTP) de la Subunidad  $\beta$  de la Gonadotropina Coriónica Humana
- c. Región Constante de Inmunoglobulina (Fc) o Porciones de la Misma
- d. Albúmina o Fragmento, o Variante de la Misma
- e. Radical de Unión a Albúmina
- f. Secuencias PAS
- g. Secuencias HAP
- h. Secuencias XTEN
- i. Transferrina o Fragmento de la Misma
- j. Conjugación de Polímeros



- i. Polietilenglicol (PEG)
- ii. Hidroxietilalmidón (HES)
- iii. Ácidos Polisiálicos (PSA)
- iv. Otros polímeros

5

**2. Métodos de Producción de Productos Conjugados o Conectores de Proteínas de Fusión**

- i. Conectores Peptídicos
- ii. Agentes de conexión heterobifuncionales

10

**E. Métodos para Producir Ácidos Nucleicos que Codifican ADA2 y Polipéptidos de los Mismos.**

- 1. Aislamiento o Preparación de Ácidos Nucleicos que Codifican Polipéptidos ADA2
- 2. Generación de Ácido Nucleico Mutante o Modificado y Polipéptidos Codificantes
- 3. Vectores y Células  
Células Inmunitarias que Codifican y Expresan las Variantes de ADA2 Proporcionadas en la Presente Memoria
- 4. Expresión

15

20

- a. Células Procariotas
- b. Células de Levadura
- c. Células de Insecto
- d. Células de mamífero
- e. Plantas

25

**5. Técnicas de Purificación**

**F. Métodos para Evaluar la Actividad y las Propiedades Físicas de ADA2**

30

- 1. Ensayo de Adenosina Desaminasa
- 2. Métodos para Evaluar la Unión a Heparina

35

- a. Ensayo de afinidad
- b. Ensayo ELISA
- c. Transferencia Puntual y Otros Ensayos de Unión a Heparina Radiomarcados

**3. Métodos para Evaluar la Estabilidad**

40

- a. Condiciones
  - i. Estabilidad en Plasma
  - ii. Estabilidad Térmica
  - iii. Estabilidad frente al pH u Óptimos de pH
  - iv. Otras condiciones

45

**b. Determinación de las Propiedades Físicas**

50

- i. Actividad Enzimática
- ii. Análisis Cromatográfico de la Pureza de las Proteínas.
- iii. Calorimetría Diferencial de Barrido
- iv. Fluorimetría Diferencial de Barrido
- v. Espectroscopía de Fluorescencia Intrínseca
- vi. Dicroísmo Circular
- vii. Dispersión Dinámica de Luz
- viii. Dispersión Estática de Luz
- ix. Mediciones de Turbidez
- x. Otros Métodos para Determinar la Estabilidad

55

60

**4. Ensayo para la Actividad Terapéutica**

- a. Pruebas *In vitro*
- b. Modelos Animales *in vivo*

- i. Actividad Metabólica Tumoral

**ii. Tamaño y Volumen Tumoral**

**c. Seguimiento Clínico**

5 **5. Farmacodinamia/Farmacocinética y Tolerabilidad**

**G. Composiciones y Formulaciones Farmacéuticas**

- 10 **1. Formulaciones - Líquidos, Inyectables, Emulsiones Polvos Liofilizados**  
**2. Composiciones para Otras Vías de Administración**  
**3. Dosis y Administración**  
**4. Envasado y Artículos de Fabricación**

15 **H. Métodos de Tratamiento con una Adenosina Desaminasa 2 (ADA2)**

**1. Enfermedades y Afecciones Ilustrativas**

- 20 **a. Cánceres y Tumores**  
**b. Enfermedades Hiperproliferativas no Cancerosas**  
**c. Enfermedades Fibróticas**  
**d. Enfermedades Infecciosas**  
**e. Otras Enfermedades y Afecciones**

25 **2. Métodos de Selección de Pacientes**

**a. Biomarcadores Asociados a Adenosina**

- 30 **i. Niveles de Adenosina en Plasma**  
**ii. Receptores de Adenosina (ADR)**  
**iii. Ectonucleotidasas CD39 y CD73**

**b. Selección de Pacientes**

35 **3. Dosis y Administración**

**4. Terapias Combinadas**

**a. Agentes Anticancerosos**

- 40 **i. Anticuerpos Anticancerosos**  
**ii. Agentes Quimioterapéuticos**  
**iii. Terapia de Radiación**  
**iv. Agentes Antiangiogénicos**  
**v. Inhibidores del Punto de Control Inmunitario**

- 45 **(a) Terapias Anti-CTLA4**  
**(b) Terapias Anti-PD-1 y Anti-PD-L1**

**b. Otros Agentes Inmunomoduladores**

- 50 **c. Enzima de Degradación de Hialuronano**  
**Enzimas que Degradan Hialuronano Soluble (p. ej., PH20 soluble)**  
**d. Anticuerpos para Tratar Enfermedades Infecciosas**  
**e. Antibióticos y Antifúngicos**

55 **I. Ejemplos**

**A. DEFINICIONES**

60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenecen las invenciones. En caso de que haya una pluralidad de definiciones de términos en la presente memoria, prevalecerán las de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y que la información particular en Internet puede aparecer y desaparecer, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a la misma evidencia la disponibilidad y difusión pública de tal información.

Como se emplea en la presente memoria, "adenosina" se refiere a un nucleósido de purina que está compuesto por una molécula de adenina unida a un radical de molécula de azúcar ribosa (ribofuranosa) a través de un enlace  $\beta$ -N<sub>9</sub>-glicosídico. La adenosina puede modular una variedad de procesos fisiológicos a través de su interacción con los receptores de adenosina.

Como se emplea en la presente memoria, "constante de Michaelis" o  $K_m$  es una medida de la concentración de sustrato requerida para que se produzca una catálisis eficaz. Por ejemplo, una enzima con una alta  $K_m$  puede requerir una mayor concentración de sustrato para lograr una velocidad de reacción dada que una enzima con una  $K_m$  más baja para el sustrato.  $K_m$  puede representar la afinidad de la enzima por un sustrato.

Como se emplea en la presente memoria, "eficacia catalítica" es la eficacia con la que una enzima reacciona con un sustrato para formar un producto. Está representada por  $k_{cat}/K_m$  ( $M^{-1}s^{-1}$  o 1/Ms). Los métodos para evaluar los parámetros cinéticos de la actividad catalítica, incluidos  $k_{cat}/K_m$ , son bien conocidos por un artesano experto. Generalmente,  $k_{cat}/K_m$  se mide en condiciones de estado estacionario.

Como se emplea en la presente memoria, "adenosina desaminasa" o "ADA" se refiere a una enzima que cataliza la desaminación hidrolítica de adenosina para formar inosina. Un ADA también puede desaminar 2'desoxiadenosina a 2'desoxiinosina y, por lo tanto, incluir enzimas que tienen actividad 2'desoxiadenosina desaminasa. En los seres humanos hay dos isoenzimas ADA, designadas ADA1 y ADA2, que difieren en su peso molecular, parámetros catalíticos y otras propiedades.

Como se emplea en la presente memoria, "adenosina desaminasa 1" o ADA1 se refiere a una ADA que carece de un péptido señal y se expresa ubicuamente dentro de las células. Se produce como un monómero. Un ejemplo de ADA1 es ADA1 humana que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 11 y que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12. En los seres humanos, ADA1 de tipo salvaje se caracteriza por una  $K_m$  de, o de aproximadamente,  $5,2 \times 10^{-5}$  M, tiene un óptimo de pH de aproximadamente 7 a 7,5, y exhibe una afinidad similar tanto por adenosina como por 2'desoxiadenosina. Por ejemplo, ADA1 tiene una razón 2'desoxiadenosina/adenosina desaminasa de al menos o al menos aproximadamente 0,70, tal como al menos, o al menos aproximadamente, 0,75. La referencia a ADA1 incluye ADA1 de tipo salvaje o nativa presente en mamíferos, incluidos sujetos humanos y no humanos. Por ejemplo, la referencia a ADA1 incluye ADA1 humana que contiene un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12. La referencia a ADA1 también incluye variantes de las mismas, tales como variantes alélicas, variantes de especie, variantes de empalme y otras variantes que incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12, y que exhiben actividad adenosina desaminasa.

Como se emplea en la presente memoria, "adenosina desaminasa 2" o "ADA2" se refiere a una ADA que está presente en entornos extracelulares, incluyendo el plasma. La ADA2 se produce a partir de un polipéptido precursor que contiene un péptido señal (p. ej., ADA2 expuesto en SEQ ID NO: 2), que se elimina para producir una proteína madura que carece del péptido señal (p. ej., ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 5). La ADA2 secretada es un homodímero que contiene dos cadenas de polipéptidos idénticas que interactúan a través de interacciones no polares entre los residuos de cada subunidad. En los seres humanos, la ADA2 de tipo salvaje se caracteriza con una  $K_m$  que es, o es aproximadamente,  $200 \times 10^{-5}$  M, tiene un óptimo de pH de, o de aproximadamente,  $6,5 \pm 0,2$ , y exhibe una afinidad débil por 2'desoxiadenosina. Por ejemplo, ADA2 tiene una relación 2'desoxiadenosina/adenosina desaminasa de menos de 0,40, tal como menos de, o aproximadamente, 0,30 o menos de, o aproximadamente, 0,25. La referencia a ADA2 incluye ADA2 de tipo salvaje o nativa presente en mamíferos, incluidos sujetos humanos y no humanos. Por ejemplo, la referencia a ADA2 incluye ADA2 humana que contiene un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, la forma madura expuesta en SEQ ID NO: 5, porciones catalíticamente activas de SEQ ID NO: 5, y formas diméricas de la misma. La referencia a ADA2 también incluye formas precursoras, maduras, catalíticamente activas y formas diméricas que son variantes de las mismas, tales como variantes alélicas, variantes de especie, variantes de empalme y otras variantes que incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con el polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 2 o la forma madura del mismo expuesto en SEQ ID NO: 5, y que, cuando está en forma activa, exhiben actividad adenosina desaminasa. Tales variantes, cuando están en forma activa, exhiben al menos 40%, 50%, 70%, 90%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más de actividad que la actividad de un polipéptido de ADA2 nativo o de tipo salvaje. Como se emplea en la presente memoria, "de tipo salvaje" o "nativa" con referencia a ADA2 se refiere a una proteína ADA2 que contiene un polipéptido codificado por un gen ADA2 nativo o de origen natural, que incluye variantes alélicas, que está presente en un organismo, incluido un ser humano y otros animales, en la naturaleza. Se pretende que la referencia a ADA2 de tipo salvaje sin referencia a una especie abarque cualquier especie de ADA2 de tipo salvaje. Entre los polipéptidos de ADA2 de tipo salvaje se incluyen el polipéptido precursor codificado, sus fragmentos y sus formas procesadas, tales como una forma madura que carece del péptido señal, así como cualquier forma procesada o

modificada pre- o post-traduccionalmente del mismo. También se incluyen entre las proteínas ADA2 nativas las que se modifican post-traduccionalmente, incluidas, entre otras, la modificación por glicosilación, carboxilación e hidroxilación. Las proteínas ADA2 nativas también incluyen el monómero polipeptídico así como las formas diméricas. Por ejemplo, los seres humanos expresan ADA2 nativa. La ADA2 humana de tipo salvaje se expone en SEQ ID NO: 2 (precursor) y SEQ ID NO: 5 (madura), e incluye sus formas catalíticamente activas como se describe en la presente memoria, y las variantes alélicas (precursoras o maduras) expuestas en cualquiera de SEQ ID NO: 376-383, o isoformas de una ADA2 tal como ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 68. La ADA2 de tipo salvaje o nativa de especies no humanas incluye, pero no se limita a, ADA2 de *Pan troglodytes* (chimpancé; forma precursora SEQ ID NO: 286, forma madura SEQ ID NO: 326; Núm. Acc. NCBI XP\_003317127.1); *Gorilla gorilla* (gorila; forma precursora SEQ ID NO: 287, forma madura SEQ ID NO: 327; Núm. Acc. NCBI XP\_004063024.1); *Pan paniscus* (chimpancé pigmeo; forma precursora SEQ ID NO: 288, forma madura SEQ ID NO: 328; Núm. Acc. NCBI XP\_003828345.1); *Pongo abelii* (Orangután de Sumatra; forma precursora SEQ ID NO: 289, forma madura SEQ ID NO: 329; Núm. Acc. NCBI NP\_001125360.1); *Nomascus leucogenys* (Gibón de mejillas blancas septentrional; forma precursora SEQ ID NO: 290, forma madura SEQ ID NO: 330; Núm. Acc. NCBI XP\_004088517.1); *Macaca fascicularis* (macaco comedor de cangrejos; forma precursora SEQ ID NO: 291, forma madura SEQ ID NO: 331; Núm. Acc. NCBI XP\_005568111.1); *Chlorocebus sabaues* (mono verde; forma precursora SEQ ID NO: 292, forma madura SEQ ID NO: 332; Núm. Acc. NCBI XP\_007972990.1); *Macaca mulatta* (Macaco rhesus; forma precursora SEQ ID NO: 293, 337, forma madura SEQ ID NO: 333, 340; Núm. Acc. GenBank AFH32795.1, EHH20002.1); *Callithrix jacchus* (tití; forma precursora SEQ ID NO: 294, 374, forma madura SEQ ID NO: 334, 375; Núm. Acc. NCBI XP\_009004591.1, XP\_009004586.1); *Xenopus laevis* (Rana africana de uñas; forma precursora SEQ ID NO: 295, forma madura SEQ ID NO: 335; Núm. Acc. NCBI NP\_001090531.1); *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta; forma precursora SEQ ID NO: 296-300, forma madura SEQ ID NO: 336, 338, 339; AAL40913.1, AAL40920.1, AAL40911.1, AAL40912.1 y AAL40910.1); *Bombyx mori* (polilla de la seda; forma precursora SEQ ID NO: 301, forma madura SEQ ID NO: 341; Núm. Acc. NCBI NP\_001098698.1); y *Sarcophaga peregrina* (mosca de la carne; forma precursora SEQ ID NO: 302, forma madura SEQ ID NO: 342; GenBank Acc. Núm. BAA11812.1).

Como se emplea en la presente memoria, un precursor ADA2 se refiere a una forma no secretada de una ADA2 que contiene un péptido señal N-terminal que se dirige a la proteína para la secreción. El péptido señal se escinde en el retículo endoplásmico. Un ejemplo de un polipéptido precursor de ADA2 es el polipéptido expuesto en SEC ID NO: 2, o una variante alélica o de especie u otra variante del mismo como las expuestas en cualquiera de SEC ID NO: 286-302, 337 o 376-379.

Como se emplea en la presente memoria, un "ADA2 madura" se refiere a una ADA2 que carece de una secuencia de señal. Un ejemplo de la ADA2 madura se expone en SEQ ID NO: 5, y también incluye variantes de las mismas, tales como especies y variantes alélicas y otras variantes, tales como las expuestas en cualquiera de SEQ ID NO: 326-336, 338-342, 375 y 380-383. La referencia a ADA2 madura incluye formas diméricas de la misma.

Como se emplea en la presente memoria, las variantes de especie se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluidas diferentes especies de mamíferos, tales como ratones y seres humanos.

Como se emplea en la presente memoria, las variantes alélicas se refieren a variaciones en proteínas entre miembros de la misma especie.

Como se emplea en la presente memoria, el dominio (típicamente una secuencia de tres o más, generalmente 5 o 7 o más aminoácidos) se refiere a una porción de una molécula, tal como proteínas o los ácidos nucleicos codificantes, que es estructural y/o funcionalmente distinta de otras porciones de la molécula y es identificable. Por ejemplo, los dominios incluyen aquellas porciones de una cadena de polipéptidos que pueden formar una estructura plegada independientemente dentro de una proteína compuesta por uno o más motivos estructurales y/o que se reconoce en virtud de una actividad funcional, tal como la actividad proteolítica. Una proteína puede tener un dominio, o más de un dominio distintos. Por ejemplo, un dominio se puede identificar, definir o distinguir mediante su homología de secuencia con miembros de la familia relacionados, tal como homología con motivos que definen un dominio de proteasa. En otro ejemplo, un dominio se puede distinguir por su función, tal como por la actividad proteolítica, o la capacidad de interactuar con una biomolécula, tal como la unión al ADN, la unión al ligando y la dimerización. Un dominio independientemente puede exhibir una función o actividad biológica de manera que el dominio independientemente o fusionado a otra molécula pueda realizar una actividad, tal como, por ejemplo, actividad proteolítica o unión a ligandos. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos. Muchos polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Tales dominios son conocidos y pueden ser identificados por los expertos en la técnica. Para la ejemplificación en la presente memoria, se proporcionan definiciones, pero se entiende que está dentro del conocimiento práctico de la técnica reconocer dominios particulares mediante el nombre. Si fuera necesario, se puede emplear el soporte lógico apropiado para identificar dominios.

Como se emplea en la presente memoria, "dominio catalítico" o "dominio ADA" se refiere al dominio que confiere actividad adenosina desaminasa. El dominio catalítico de una enzima contiene todas las propiedades requisito de

esa proteína requeridas para su enzima, tal como la actividad adenosina desaminasa. El dominio ADA se compone estructuralmente de una lámina  $\beta$  paralela de ocho hebras que se cierra en un barril y está rodeada por hélices clásicas con motivos de barril  $\alpha/\beta$ -TIM y cinco adicionales, ubicadas entre  $\beta_1$  y  $\alpha_1$  (H1, H2 y H3) y en el extremo C terminal (H4 y H5) (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377). Los bucles entre las cadenas  $\beta$  y las hélices  $\alpha$  contienen muchos de los residuos del sitio activo necesarios para la actividad. Los residuos del sitio activo incluyen residuos que coordinan la unión al zinc, los residuos del donador y aceptor de protones del sitio activo y los residuos de unión al sustrato. Los ejemplos de tales residuos en ADA2 humano se exponen en la Tabla 4. En referencia a ADA2 humano, el dominio ADA está contenido en la región correspondiente a los residuos 106-502 de la secuencia precursora de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 (correspondiente a los residuos 77-473 de la proteína madura expuesta en SEQ ID NO: 5), excepto que los residuos correspondientes al supuesto dominio de unión al receptor (PRB) contenido en el mismo no son necesarios para la actividad catalítica.

Como se emplea en la presente memoria, "una porción catalíticamente activa de la misma" o "un fragmento catalíticamente activo de la misma" se refiere a un polipéptido de ADA2 que contiene menos que la secuencia completa de un polipéptido de ADA2 maduro, pero contiene una porción contigua de aminoácidos de una ADA2, incluyendo todo o parte del dominio catalítico, suficiente para la actividad adenosina desaminasa. Por ejemplo, una porción catalíticamente activa de ADA2 es aquella que incluye un polipéptido que contiene una secuencia contigua de aminoácidos de la secuencia madura de un polipéptido de ADA2 que incluye residuos de aminoácido correspondientes a los residuos 83, 85, 327, 330, 355, 412 con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5, pero no incluye la secuencia de aminoácidos completa del polipéptido de ADA2 maduro. Por ejemplo, una porción catalíticamente activa es aquella que incluye un polipéptido que contiene una secuencia contigua de aminoácidos de la secuencia madura de ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 5 que incluye los residuos de aminoácido 83, 85, 327, 330, 355, 412, pero eso no incluye la secuencia de aminoácidos completa expuesta en SEQ ID NO: 5. Una ADA2 que contiene una porción catalíticamente activa de un polipéptido de ADA2, cuando está en forma activa, exhibe al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la actividad, como al menos 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más de la actividad, en comparación con la ADA2 que contiene un polipéptido de ADA2 maduro completo. En un ejemplo, una porción catalíticamente activa de un polipéptido de ADA2 incluye un polipéptido que carece de todo o una parte del supuesto dominio de unión al receptor (PRB). En otro ejemplo, una porción catalíticamente activa de un polipéptido de ADA2 incluye un polipéptido que carece de uno o más aminoácidos C-terminales del polipéptido maduro, es decir, está truncado en el extremo C, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 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, 69, 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, 100 o más residuos de aminoácido C-terminales contiguos en comparación con el polipéptido de ADA2 maduro. Se entiende que la referencia en la presente memoria a una ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma significa que la porción catalíticamente activa contiene la modificación o modificaciones (p. ej., uno o varios reemplazos de aminoácidos).

Como se emplea en la presente memoria, "supuesto dominio de unión al receptor" o "dominio PRB" se refiere a una porción de ADA2 que forma una estructura plegada independientemente compuesta de un pliegue  $\alpha$  y  $\beta$  que contiene una lámina  $\beta$  antiparalela de tres hebras denominadas SR1-SR2-SR3, rodeada por las hélices  $\alpha$  HR y parcialmente H2 en un lado y el bucle SR2-SR3 rico en prolina en el otro lado (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377). El dominio PRB contiene residuos de cisteína conservados que forman un enlace disulfuro entre C137 y C159 de ADA2 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2 (posiciones C108 y C130 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5). Se informa que el dominio PRB está implicado en la unión de ADA2 a sus receptores. Se entiende que los residuos concretos que forman el dominio pueden variar (p. ej., más largos o más cortos), por ejemplo, dependiendo de los métodos utilizados para identificar el dominio. En referencia a ADA2 humana, se informa que el dominio PRB corresponde a los residuos 127-185 o 134-177 de ADA2 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2 (residuos 98-156 o 105-148, respectivamente, de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5).

Como se emplea en la presente memoria, una proteína que carece de todo o una parte de un dominio, tal como todo o una parte del dominio PRB, se refiere a un polipéptido que tiene una delección de uno o más aminoácidos o todos los aminoácidos del dominio, tal como como el dominio PRB, en comparación con una proteína de referencia o sin modificar. Los aminoácidos suprimidos en un polipéptido que carece de todo o parte de un dominio pueden ser contiguos, pero no se necesita que sean aminoácidos contiguos dentro del dominio del polipéptido cognado. Los polipéptidos que carecen de todo o parte de un dominio pueden incluir la pérdida o reducción de una actividad del polipéptido en comparación con la actividad de una proteína de referencia o no modificada.

Como se emplea en la presente memoria, "forma activa" se refiere a cualquier enzima ADA2 que exhibe actividad adenosina desaminasa. Una forma activa de una enzima puede contener una secuencia de aminoácidos completa o puede ser una porción catalíticamente activa de la misma. Una forma activa de una enzima puede ser un monómero o un dímero. Típicamente, una enzima activa es un dímero. Una enzima activa es cualquier forma que exhibe una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que es al menos, o al menos aproximadamente,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

$1, 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  o mayor.

5 Como se emplea en la presente memoria, un "multímero" se refiere a una molécula compuesta por varias subunidades idénticas o diferentes mantenidas juntas o asociadas, por ejemplo, mediante interacciones no covalentes.

10 Como se emplea en la presente memoria, un "dímero" se refiere a una molécula que contiene dos polipéptidos unidos entre sí. Típicamente, los polipéptidos están unidos no covalentemente. Por ejemplo, un dímero de ADA2 está formado por interacciones entre subunidades no polares, incluida la interacción hidrófoba, entre residuos de dos polipéptidos.

15 Como se emplea en la presente memoria, un "homodímero" se refiere a un dímero que está formado por dos polipéptidos idénticos.

Como se emplea en la presente memoria, un "heterodímero" se refiere a un dímero que está formado por dos polipéptidos diferentes.

20 Como se emplea en la presente memoria, un "monómero" se refiere a una única unidad de proteína o polipéptido. Un monómero tiene un peso molecular relativamente bajo en comparación con los dímeros u otros multímeros. Un monómero puede existir independientemente, o se puede asociar con otras moléculas para formar un dímero u otro multímero.

25 Como se emplea en la presente memoria, una "forma correspondiente" con referencia a una proteína ADA2 significa que cuando se compara una propiedad o actividad de dos proteínas ADA2, la propiedad se compara empleando la misma forma estructural de la proteína. Por ejemplo, si se afirma que una proteína ADA2 tiene menos actividad en comparación con la actividad de la forma correspondiente de una primera proteína ADA2, eso significa que una forma concreta, tal como un dímero, tiene menos actividad en comparación con el dímero de la primera proteína ADA2.

30 Como se emplea en la presente memoria, un "polipéptido" se refiere a un polímero orgánico lineal que contiene una gran cantidad de residuos de aminoácido unidos entre sí en una cadena, formando parte o la totalidad de una molécula de proteína.

35 Como se emplea en la presente memoria, una "proteína" o "molécula de proteína" o variaciones de la misma se refieren a una molécula grande compuesta por una o más cadenas de polipéptidos formadas por una secuencia lineal de aminoácidos. Por lo tanto, una proteína puede ser un monómero, o puede ser un dímero u otro multímero. Una proteína puede exhibir actividades estructurales, mecánicas, bioquímicas o de señalización.

40 Como se emplea en la presente memoria, una "subunidad de polipéptido" o "subunidad de proteína" se refiere a un único polipéptido o monómero que es capaz de ensamblarse con otros polipéptidos o monómeros para formar una molécula de proteína que es un complejo multimérico. Una subunidad está formada por una cadena de polipéptidos.

45 Como se emplea en la presente memoria, "proteína ADA2 variante" se refiere a una proteína ADA2, que incluye cualquier forma de la misma, tal como una porción, monómero o dímero catalíticamente activos, completos que tienen una o más diferencias de aminoácidos en comparación con una proteína ADA2 no modificada. Las una o más diferencias de aminoácidos pueden ser mutaciones de aminoácidos, tales como uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones o deleciones, o pueden ser inserciones o deleciones de dominios completos, y cualquier combinación de los mismos. Típicamente, una proteína ADA2 variante tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con una proteína ADA2 no modificada. Por ejemplo, una ADA2 variante proporcionada en la presente memoria puede tener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o más diferencias de aminoácidos en comparación con una proteína ADA2 no modificada. Se contempla cualquier modificación siempre que la proteína resultante muestre actividad adenosina desaminasa.

55 Como se emplea en la presente memoria, la modificación se refiere a la modificación de una secuencia de residuos de aminoácido de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones post-traduccionales u otros cambios en la molécula que se pueden producir debido a la conjugación o unión, directa o indirectamente, a otro radical. Los métodos de modificación de un polipéptido son rutinarios para los expertos en la técnica, tal como el uso de metodologías de ADN recombinante.

60 Como se emplea en la presente memoria, "delección", cuando se refiere a la modificación de una secuencia de ácido

nucleico o polipéptido, se refiere a la eliminación de uno o más nucleótidos o aminoácidos en comparación con una secuencia, tal como un polinucleótido o polipéptido diana o una secuencia de tipo nativa o salvaje. Por lo tanto, una secuencia de aminoácidos o una molécula de ácido nucleico que contiene una o más deleciones en comparación con una secuencia de tipo salvaje, contiene uno o más nucleótidos de aminoácidos menos dentro de la longitud lineal de la secuencia.

Como se emplea en la presente memoria, "inserción" cuando se refiere a la modificación de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos, describe la inclusión de uno o más nucleótidos o aminoácidos adicionales, dentro de una secuencia diana, nativa, de tipo salvaje u otra secuencia relacionada. Por lo tanto, una molécula de aminoácido o ácido nucleico que contiene una o más inserciones en comparación con una secuencia de tipo salvaje, contiene uno o más aminoácidos o nucleótidos adicionales dentro de la longitud lineal de la secuencia.

Como se emplea en la presente memoria, las "adiciones" a secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos describen la adición de nucleótidos o aminoácidos en cualquiera de los extremos en comparación con otra secuencia.

Como se emplea en la presente memoria, "sustitución" o "reemplazo" con respecto a una modificación se refiere a la sustitución de uno o más nucleótidos o aminoácidos en una secuencia de ácido nucleico o polipéptido nativo, diana, de tipo salvaje u otro con un nucleótido o aminoácido alternativo, sin cambiar la longitud (como se describe en números de residuos) de la molécula. Por lo tanto, una o más sustituciones en una molécula no cambian el número de residuos de aminoácido o nucleótidos de la molécula. Los reemplazos de aminoácidos en comparación con un polipéptido concreto se pueden expresar en términos del número de residuos de aminoácido a lo largo de la secuencia de polipéptidos o una secuencia de polipéptidos de referencia. Por ejemplo, un polipéptido modificado que tiene una modificación en el aminoácido en la posición 19ª de la secuencia de aminoácidos que es una sustitución de isoleucina (Ile; I) por cisteína (Cys; C) se puede expresar como "reemplazo con Cys o C en una posición correspondiente a la posición 19", I19C, Ile19Cys, o simplemente C19, para indicar que el aminoácido en la posición 19ª modificada es una cisteína. En este ejemplo, la molécula que tiene la sustitución tiene una modificación en Ile 19 del polipéptido no modificado.

Como se emplea en la presente memoria, "polipéptido no modificado" o "ADA2 no modificada" y sus variaciones gramaticales se refieren a un polipéptido de partida que se selecciona para su modificación como se proporciona en la presente memoria. El polipéptido de partida puede ser una forma de tipo salvaje de un polipéptido de origen natural. Un ejemplo de un polipéptido de ADA2 no modificado es ADA2 humano expuesto en SEC ID NO: 5, o una porción catalíticamente activa del mismo. Además, el polipéptido de partida se puede alterar o mutar, de modo que difiere de una isoforma de tipo salvaje nativa, pero sin embargo referida en la presente memoria como un polipéptido de partida no modificado con respecto a los polipéptidos posteriormente modificados producidos en la presente memoria. Por lo tanto, las proteínas existentes conocidas en la técnica que se han modificado para tener un aumento o disminución deseados en una actividad o propiedad concreta en comparación con una proteína de referencia no modificada se pueden seleccionar y utilizar como polipéptido de partida no modificado. Por ejemplo, una proteína que ha sido modificada a partir de su forma nativa por uno o más cambios de aminoácidos individuales y posee un aumento o disminución de una propiedad deseada, tal como un cambio en uno o varios residuos de aminoácido para alterar la glicosilación, puede ser una proteína diana, denominada en la presente memoria no modificada, para una modificación adicional de la misma propiedad o de una diferente.

Como se emplea en la presente memoria, "residuos correspondientes" se refiere a residuos que se producen en loci alineados. Para los fines de la presente memoria, la secuencia de aminoácidos de una proteína está alineada con la ADA2 precursora expuesta en SEC ID NO: 2 o su forma madura expuesta en SEC ID NO: 5 (véase la Figura 1) o con la secuencia ADA2 utilizada para la numeración de Zavialov, la numeración de los residuos utilizados en Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377 y en los números de acceso PDB 3LGG y 3LGD, expuestos en SEC ID NO: 4. Los polipéptidos relacionados o variantes se alinean mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Tales métodos típicamente maximizan los emparejamientos e incluyen métodos tales como el uso de alineamientos manuales y el uso de los numerosos programas de alineamiento disponibles (p. ej., BLASTP) y otros conocidos por los expertos en la técnica. Al alinear las secuencias de polipéptidos ADA2, un experto en la técnica puede identificar los residuos correspondientes, utilizando residuos de aminoácido conservados e idénticos como guías. En general, la recitación de que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a aminoácidos en una secuencia descrita se refiere a aminoácidos identificados al alinear el polipéptido con la secuencia descrita para maximizar la identidad u homología (donde los aminoácidos conservados están alineados) empleando un algoritmo de alineamiento convencional, tal como el algoritmo GAP.

Como se emplea en la presente memoria, una "propiedad" de una ADA2 se refiere a una propiedad física o estructural, tal como estructura tridimensional, pl, semivida, conformación y otras características físicas similares.

Como se emplea en la presente memoria, una "actividad" de una ADA2 o "actividad ADA2" se refiere a cualquier actividad exhibida por la forma activa de una proteína ADA2, típicamente la forma de dímero. Tales actividades

pueden ser probadas *in vitro* y/o *in vivo* e incluyen, pero no se limitan a, actividad adenosina desaminasa, actividad de factor de crecimiento, capacidad de unirse a heparina y/o capacidad de unirse a un receptor de adenosina (ADR). La actividad puede ser evaluada *in vitro* o *in vivo* utilizando ensayos reconocidos, por ejemplo, midiendo la actividad adenosina desaminasa *in vitro* o *in vivo*. Los resultados de tales ensayos indican que un polipéptido exhibe una actividad que puede correlacionarse con la actividad del polipéptido *in vivo*, en el cual la actividad *in vivo* se puede denominar actividad biológica. Los expertos en la técnica conocen los ensayos para determinar la funcionalidad o la actividad de las formas modificadas de ADA2, y en la presente memoria se describen ensayos ilustrativos.

Como se emplea en la presente memoria, "actividad adenosina desaminasa" se refiere a la capacidad de una enzima para catalizar la desaminación hidrolítica de adenosina para formar inosina. La actividad ADA2 se puede evaluar, directa o indirectamente, midiendo la velocidad de producción de un producto de la reacción enzimática. Por ejemplo, la producción de inosina o amoníaco se puede medir directa o indirectamente. En otros ejemplos, se mide la disminución del sustrato de la enzima, por ejemplo, adenosina o 2-desoxiadenosina. Los expertos en la técnica conocen los ensayos para evaluar la actividad adenosina desaminasa e incluyen, entre otros, ensayos en los que la disminución del sustrato o el aumento del producto se miden directamente mediante espectrofotometría, o indirectamente, mediante reacciones enzimáticas o de oxidación-reducción posteriores que emplean sustratos cromogénicos o cambian los espectros de absorbancia de la reacción.

Como se emplea en la presente memoria, "aumento de la actividad adenosina desaminasa" se refiere a una mejora de la capacidad de una proteína ADA2, por ejemplo, una proteína ADA2 variante, para exhibir actividad adenosina desaminasa en comparación con una proteína de referencia. Por ejemplo, la capacidad de una proteína ADA2 variante que exhibe actividad adenosina desaminasa puede ser mayor que la actividad adenosina desaminasa de la proteína ADA2 no modificada. La actividad adenosina desaminasa se puede aumentar al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más en comparación con la actividad adenosina desaminasa de referencia o una proteína no modificada.

Como se emplea en la presente memoria, un sitio de glicosilación se refiere a una posición amínica en un polipéptido a la que se puede anclar un radical carbohidrato. Típicamente, una proteína glicosilada contiene uno o más residuos de aminoácido, tales como asparragina o serina, para el anclaje de los radicales carbohidrato.

Como se emplea en la presente memoria, un sitio de glicosilación nativo se refiere a una posición amínica a la que se ancla un radical carbohidrato en un polipéptido de tipo salvaje. Existen cuatro sitios de glicosilación nativos ligados a N en ADA2 correspondientes a los residuos N98, N145, N156 y N349 con referencia a SEQ ID NO: 5.

Como se emplea en la presente memoria, un sitio de glicosilación no nativo se refiere a una posición amínica a la que se une un radical carbohidrato en un polipéptido modificado que no está presente en un polipéptido de tipo salvaje. Los sitios de glicosilación no nativos se pueden introducir en un polipéptido de ADA2 mediante reemplazo de aminoácidos. Los sitios de O-glicosilación se pueden crear, por ejemplo, mediante el reemplazo de aminoácidos de un residuo nativo con una serina o treonina. Se pueden crear sitios de N-glicosilación, por ejemplo, estableciendo el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia consenso mediante modificación de aminoácidos puede implicar, por ejemplo, un reemplazo de un solo aminoácido de un residuo de aminoácido nativo con una asparragina, un reemplazo de un solo aminoácido de un residuo de aminoácido nativo con una serina, treonina o cisteína, o un reemplazo doble de aminoácidos que implica un primer reemplazo de aminoácidos de un residuo nativo con una asparragina y un segundo reemplazo de aminoácidos del residuo nativo con una serina, treonina o cisteína, o una inserción de un motivo de N-glicosilación no nativo, tal como el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina.

Como se emplea en la presente memoria, "nivel de glicosilación" se refiere al número de sitios de glicosilación susceptibles de ser ocupados por un glicano, por ejemplo, tras la expresión en una célula anfitriona susceptible de glicosilación.

Como se emplea en la presente memoria, el aumento con referencia al nivel de glicosilación significa que existe un mayor número de sitios de glicosilación susceptibles de ser ocupados por un glicano con referencia a una ADA2 no modificada o de tipo salvaje. Una ADA2 variante que exhibe un mayor nivel de glicosilación puede hiperglicosilarse si hay un mayor número de sitios de glicosilación ocupados por un glicano en comparación con la ADA2 no modificada o de tipo salvaje.

Como se emplea en la presente memoria, "estabilidad de la proteína" se refiere a una medida del mantenimiento de una o más propiedades físicas de una proteína en respuesta a una condición ambiental (p. ej. una temperatura elevada). En una realización, la propiedad física consiste en el mantenimiento de la estructura covalente de la proteína (p. ej. la ausencia de escisión proteolítica, oxidación no deseada o desamidación). En otra realización, la propiedad física es la presencia de la proteína en un estado plegado adecuadamente (p. ej. la ausencia de agregados solubles o insolubles o precipitados). En una realización, la estabilidad de una proteína se mide



analizando una propiedad biofísica de la proteína, por ejemplo, la estabilidad térmica, el perfil de desplegamiento relacionado con el pH, la eliminación estable de la glicosilación, la solubilidad, la función bioquímica (p. ej., capacidad de unirse a una proteína tal como un receptor o actividad enzimática) y/o combinaciones de los mismos. En otra realización, la función bioquímica se demuestra por la afinidad de unión de una interacción. La estabilidad se puede medir empleando métodos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria.

Como se emplea en la presente memoria, "semivida" se refiere al tiempo que requiere un organismo vivo para eliminar la mitad de la cantidad de una sustancia administrada a través de sus canales normales de eliminación. Los canales normales de eliminación generalmente incluyen los riñones y el hígado, pero pueden incluir otras vías de excreción. Una semivida se puede describir como el tiempo que tarda la concentración de una sustancia en reducir a la mitad su concentración desde el estado estacionario o desde un cierto punto en la curva de eliminación. Por lo general, la semivida se mide en el plasma y se puede determinar administrando una dosis única del medicamento y midiendo a continuación la concentración del medicamento en el plasma a veces para determinar la relación entre el tiempo y la disminución de la concentración a medida que se elimina la sustancia.

Como se emplea en la presente memoria, "aumento de la semivida" se refiere a una semivida más larga de una molécula de proteína en comparación con una proteína de referencia. Por lo tanto, significa que el tiempo que tarda la concentración de una sustancia en reducir a la mitad su concentración es mayor que el tiempo que tarda la concentración de una proteína de referencia en reducirse a la mitad. La semivida se puede aumentar en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50 %, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%, 1600%, 1700%, 1800%, 1900%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 6000%, 7000%, 8000%, 9000%, 10000% o más en comparación con la semivida de un polipéptido no modificado. Los ensayos para evaluar la semivida son conocidos y convencionales en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, "estabilidad térmica" se refiere a la medida de la resistencia a la desnaturalización de una proteína que se produce tras la exposición a temperaturas altas o elevadas, y por lo tanto es la capacidad de una proteína para funcionar a una temperatura concreta. Un polipéptido es térmicamente estable a una temperatura si retiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de una actividad o propiedad del polipéptido a la temperatura. La estabilidad térmica se puede medir por procedimientos conocidos o por los métodos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, la estabilidad térmica se evalúa midiendo la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de una proteína o mediante un ensayo de exposición térmica ( $T_c$ ).

Como se emplea en la presente memoria, "aumento de la estabilidad térmica" se refiere a un mayor grado de resistencia a la desnaturalización de una proteína. Por ejemplo, puede significar que una proteína es térmicamente estable a una temperatura más alta que una proteína de referencia. También puede significar que una proteína exhibe una mayor retención de la actividad a una temperatura concreta en comparación con la actividad de una proteína de referencia a la misma temperatura. En algunos casos, una mayor estabilidad térmica significa que una proteína tiene una temperatura de fusión  $T_m$  mayor en comparación con una proteína de referencia. Por ejemplo, la estabilidad térmica aumenta si la  $T_m$  de una proteína es al menos 0,1°C, 0,2°C, 0,3°C, 0,4°C, 0,5°C, 0,6°C, 0,7°C, 0,8°C, 0,9°C, 1,0°C, 1,5°C, 2,0°C, 2,5°C, 3,0°C, 4,0°C, 5,0°C o más que una proteína de referencia o sin modificar.

Como se emplea en la presente memoria, la temperatura de fusión ( $T_m$ ; también llamada temperatura de transición) es la temperatura en el punto medio de una curva de transición térmica donde 50% de las moléculas de una composición están en estado plegado. Por lo tanto, es la temperatura a la que 50% de una macromolécula se desnaturaliza, y es un parámetro convencional para describir la estabilidad térmica de una proteína. Los métodos para determinar la  $T_m$  son bien conocidos por un experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, métodos de espectroscopia analítica tales como, entre otros, calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia de dicroísmo circular (CD), espectroscopia de emisión de fluorescencia o espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

Como se emplea en la presente memoria, "óptimos de pH" o "óptimo de pH" se refiere al pH al cual cualquier reacción enzimática, tal como la actividad adenosina desaminasa, es más eficaz bajo un conjunto dado de condiciones. Con respecto a su actividad adenosina desaminasa, ADA2 exhibe un óptimo de pH que es, o es aproximadamente, 6,5.

Como se emplea en la presente memoria, "óptimos de pH alterados" u "óptimo de pH alterado" se refiere a un cambio (aumento o disminución) en el pH que es el pH óptimo para la actividad adenosina desaminasa. Se produce un aumento del óptimo de pH si el óptimo de pH es mayor que 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,0, 2,5 o más en comparación con óptimo de pH de una proteína de referencia o no modificada. Se produce una disminución del óptimo de pH si el óptimo de pH es menor o menor que 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,0, 2,5 o más menos al óptimo de pH de una proteína de referencia o no modificada.

Como se emplea en la presente memoria, "unir", "unido" o variaciones gramaticales de las mismas se refieren a la participación de una molécula en cualquier interacción atrayente con otra molécula, lo que da como resultado una asociación estable en la que las dos moléculas están muy próximas entre sí. La unión incluye, entre otros, enlaces no covalentes, enlaces covalentes (tales como enlaces covalentes reversibles e irreversibles) e incluye interacciones entre moléculas tales como, pero sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas, tales como compuestos químicos, incluidos fármacos. Típicamente, la unión implica la asociación de dos o más moléculas por medio de uno o más enlaces no covalentes. La unión se puede evaluar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, diálisis de equilibrio, antígeno diana radiomarcado con radioinmunoensayo, inmunoensayos (p. ej., ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), resonancia de plasmón superficial (SPR), calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y otros métodos bien conocidos por un experto en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, la actividad de unión se refiere a las características de una molécula, p. ej. un polipéptido, que tienen que ver con si se une o no, y cómo se une a uno o más compañeros de unión. Las actividades de unión incluyen la capacidad de unirse al compañero o compañeros de unión, la afinidad con la que se une al compañero de unión (p. ej., alta afinidad), la avidez con la que se une al compañero de unión, la fuerza del enlace con el compañero de unión y/o especificidad para la unión con el compañero de unión.

Como se emplea en la presente memoria, "unión a heparina" se refiere a la capacidad de ADA2 para unirse a heparina, que es un glicosaminoglicano altamente sulfatado constituido por unidades disacáridas repetidas sulfatadas de forma variable. Comúnmente, una unidad disacárida de heparina está compuesta por un ácido idurónico 2-O-sulfatado y glucosamina 6-O-sulfatada, N-sulfatada, IdoA(2S)-GlcNS(6S).

Como se emplea en la presente memoria, "reducción de la unión a heparina" o "atenuación de la unión a heparina" se refiere a una disminución o atenuación de la actividad de unión para la heparina. Por ejemplo, puede significar que el nivel o grado de unión de una proteína ADA2, tal como una ADA2 variante, es menor que una proteína de referencia. Por ejemplo, la unión a heparina se reduce si el nivel o grado de unión de una proteína ADA2 a la heparina no es superior a 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9 %, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de la unión de una proteína ADA2 de referencia o no modificada a la heparina. En algunos casos, la unión a heparina se reduce al menos o al menos aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o mayor en comparación con la unión a heparina de una proteína ADA2 de referencia o no modificada.

Como se emplea en la presente memoria, "receptor de adenosina" o ADR se refiere a una clase de receptores acoplados a proteína G que se unen a adenosina. Los receptores de adenosina también se pueden unirse a ADA2. Existen cuatro tipos de receptores de adenosina. Por ejemplo, en seres humanos, los ADR se designan A<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 533), A<sub>2A</sub> (SEQ ID NO: 534), A<sub>2B</sub> (SEQ ID NO: 535) y A<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 536-538).

Como se emplea en la presente memoria, "unión al receptor" se refiere a la capacidad de ADA2 para unirse a un receptor de adenosina.

Como se emplea en la presente memoria, "reducción de la unión al receptor" se refiere a una disminución o reducción de la actividad de unión para un receptor de adenosina. Por ejemplo, puede significar que el nivel o grado de unión de una proteína ADA2, tal como una ADA2 variante, es menor que la unión de una proteína de referencia para el mismo receptor de adenosina. Por ejemplo, la unión al receptor se reduce si el nivel o grado de una proteína ADA2 para un receptor de adenosina no es superior a 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90 %, 95% de la unión de una proteína ADA2 de referencia o no modificada para el mismo receptor de adenosina. En algunos casos, la unión al receptor se reduce al menos o al menos aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más en comparación con la unión al receptor de una proteína ADA2 de referencia o no modificada para el mismo receptor de adenosina.

Como se emplea en la presente memoria, la recitación de que las proteínas se "comparan en las mismas condiciones" significa que las diferentes proteínas se tratan de forma idéntica o sustancialmente idéntica, de modo que una o más condiciones que pueden influir en la actividad o propiedades de una proteína o agente no varían o no varían sustancialmente entre los agentes de prueba. Por ejemplo, cuando la actividad adenosina desaminasa de una ADA2 se compara con una proteína ADA2 no modificada, una cualquiera o más condiciones tales como la cantidad o concentración de la proteína; presencia, incluida la cantidad, de excipientes, portadores u otros componentes en una formulación distinta del agente activo; temperatura; pH y/u otras condiciones son idénticas o sustancialmente idénticas entre los polipéptidos comparados.

Como se emplea en la presente memoria, los "puntos de control inmunitario" se refieren a rutas inhibitorias del sistema inmunitario que son responsables de mantener la auto-tolerancia y modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas en los tejidos periféricos para minimizar el daño colateral del tejido. Los puntos

de control inmunitario están regulados por proteínas de punto de control inmunitario.

Una "proteína de punto de control inmunitario" es una proteína, típicamente un receptor (p. ej., CTLA4 o PD-1) o un ligando (p. ej., PD-L1) que regula o modula el alcance de una respuesta inmunitaria. Las proteínas del punto de control inmunitario pueden ser inhibidoras o estimuladoras. En particular, las proteínas del punto de control inmunitario inhiben la activación de la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, la inhibición de una proteína inhibidora del punto de control inmunitario actúa estimulando o activando una respuesta inmunitaria, tal como la activación y proliferación de células T.

Como se emplea en la presente memoria, un "inhibidor del punto de control inmunitario" o "agente inhibidor del punto de control inmunitario" o "agente de bloqueo del punto de control inmunitario" se refiere a un agente que se une a una proteína inhibidora del punto de control inmunitario y bloquea su actividad. La inhibición puede ser inhibición competitiva o no competitiva que puede ser estérica o alostérica. En los casos en que una proteína de punto de control inmunitario es una proteína estimuladora del sistema inmunitario, un inhibidor del punto de control inmunitario actúa promoviendo la actividad de la proteína estimuladora del sistema inmunitario, por ejemplo, al unir y activar la proteína del punto de control inmunitario estimuladora o al inhibir interfiriendo, por ejemplo, mediante la unión o desactivando, inhibidores de la proteína estimuladora del punto de control inmunitario. Un ejemplo de un inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-punto de control inmunitario.

Una "diana" de un inhibidor del punto de control inmunitario es la proteína del punto de control inmunitario a la que se une el inhibidor del punto de control inmunitario o el agente inhibidor del punto de control inmunitario para bloquear la actividad. Por lo general, el inhibidor del punto de control inmunitario se une específicamente a la diana. Por ejemplo, la diana del anticuerpo anti-CTLA4 ilustrativo denominado ipilimumab es CTLA4.

Como se emplea en la presente memoria, un anticuerpo anti-proteína de punto de control inmunitario se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a una proteína de punto de control inmunitario o un fragmento soluble de la misma y realiza el bloqueo. Un anticuerpo anti-proteína de punto de control inmunitario típicamente se une a una proteína ligando de punto de control inmunitario o una proteína receptora de punto de control inmunitario y bloquea la unión de un receptor a la proteína ligando de punto de control inmunitario diana o un ligando a la proteína del receptor de punto de control inmunitario diana, evitando así la transducción de la señal inhibidora que suprime una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, los anticuerpos anti-proteína de punto de control inmunitario son inhibidores del punto de control inmunitario. La referencia a anticuerpos anti-proteína de punto de control inmunitario en la presente memoria incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a un ligando de punto de control inmunitario o proteína receptora. Los anticuerpos anti-proteína de punto de control inmunitario ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) y anticuerpos anti-proteína celular de muerte programada 1 (PD-1).

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de proteína de punto de control antiinmunitario se refiere a un anticuerpo derivado de un anticuerpo contra la proteína de punto de control antiinmunitario pero que es menor que la secuencia completa del anticuerpo contra la proteína de punto de control antiinmunitario pero contiene al menos una porción de las regiones variables (pesadas y ligeras) del anticuerpo suficiente para formar un sitio de unión a antígeno (p. ej., una o más CDR, y generalmente todas las CDR) y, por lo tanto, conserva la especificidad y/o actividad de unión del anticuerpo anti-proteína de punto de control.

Como se emplea en la presente memoria, el anticuerpo anti-CTLA4 se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) o un fragmento soluble de la misma y bloquea la unión de los ligandos a CTLA4, lo que da como resultado una inhibición competitiva de CTLA4 y la inhibición de la inhibición mediada por CTLA4 de la activación de células T. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CTLA4 son inhibidores de CTLA4. La referencia a anticuerpos anti-CTLA4 en la presente memoria incluye un anticuerpo completo y derivados del mismo, tales como fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a CTLA4. Los anticuerpos anti-CTLA4 ilustrativos incluyen, entre otros, ipilimumab o tremelimumab, o un derivado o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Como se emplea en la presente memoria, el anticuerpo anti-PD-1 se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) o un fragmento soluble de la misma y bloquea la unión de ligandos a PD-1, lo que da como resultado una inhibición competitiva de PD-1 e inhibición de la inhibición mediada por PD-1 de la activación de células T. Por lo tanto, los anticuerpos anti-PD-1 son inhibidores de PD-1. La referencia a anticuerpos anti-PD-1 en la presente memoria incluye un anticuerpo completo y derivados del mismo, tales como fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PD-1. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 incluyen, entre otros, Nivolumab, MK-3475, Pidilizumab, o un derivado o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Como se emplea en la presente memoria, el anticuerpo anti-PD-L1 se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al ligando 1 de muerte programada (PD-L1) o un fragmento soluble del mismo y bloquea la unión

del ligando a PD-1, lo que da como resultado una inhibición competitiva de PD-1 e inhibición de la inhibición de la actividad de células T mediada por PD-1. Por lo tanto, los anticuerpos anti-PD-L1 son inhibidores de PD-1. La referencia a anticuerpos anti-PD-L1 en la presente memoria incluye un anticuerpo completo y derivados del mismo, tales como fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PD-L1. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no se limitan a, BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 o un derivado o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Como se emplea en la presente memoria, "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulinas, ya sean naturales o parcial o totalmente sintéticas, por ejemplo, producidas recombinantemente, incluyendo cualquiera de sus fragmentos que contenga al menos una porción de la cadena pesada variable y la región ligera de la molécula de inmunoglobulina que sea suficiente para formar un sitio de unión al antígeno y, cuando se ensamble, un antígeno unido específicamente. Por lo tanto, un anticuerpo incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o sustancialmente homólogo a un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina (sitio de combinación de anticuerpos). Por ejemplo, un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que contiene dos cadenas pesadas (que pueden denotarse H y H') y dos cadenas ligeras (que pueden denotarse L y L'), donde cada cadena pesada puede ser una cadena pesada completa de inmunoglobulina o una porción de la misma suficiente para formar un sitio de unión a antígeno (p. ej., las cadenas pesadas incluyen, pero no se limitan a, cadenas VH, cadenas VH-CH1 y cadenas VH-CH1-CH2-CH3), y cada cadena ligera puede ser una cadena ligera completa o una porción de la misma suficiente para formar un sitio de unión a antígeno (p.ej., las cadenas ligeras incluyen, pero no se limitan a, cadenas VL y cadenas VL-CL). Cada cadena pesada (H y H') se empareja con una cadena ligera (L y L', respectivamente). Típicamente, los anticuerpos incluyen mínimamente toda o al menos una porción de la cadena pesada variable (VH) y/o la cadena ligera variable (VL). El anticuerpo también puede incluir toda o una porción de la región constante.

Para los fines de la presente memoria, el término anticuerpo incluye anticuerpos completas y porciones de los mismos que incluyen fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, Fv conectados por disulfuro (dsFv), fragmentos Fd, fragmentos Fd', Fv de cadena sencilla (scFv), Fab de cadena sencilla (scFab), diacuerpos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) o fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo también incluye anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos no humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos e intracuerpos. Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen miembros de cualquier tipo de inmunoglobulina (p. ej., IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY), cualquier clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase (p. ej., IgG2a e IgG2b).

Como se emplea en la presente memoria, la frase "derivado de" o "derivado" cuando se refiere a fragmentos de anticuerpos derivados de otro anticuerpo, tales como un anticuerpo monoclonal, se refiere a la modificación genética de fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv monocaténario (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, fragmentos Fd y Fd') que conservan la especificidad de unión del anticuerpo original o parental. Tales fragmentos se pueden obtener mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, escisión enzimática, entrecruzamiento químico, medios recombinantes o combinaciones de los mismos. Generalmente, el fragmento de anticuerpo derivado comparte la región variable de cadena pesada idéntica o sustancialmente idéntica (V<sub>H</sub>) y la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) del anticuerpo parental, de modo que el fragmento de anticuerpo y el anticuerpo parental se unan al mismo epítopo.

Como se emplea en la presente memoria, un agente anti-hialuronano se refiere a cualquier agente que modula la síntesis o degradación de hialuronano (HA), alterando así los niveles de hialuronano en un tejido o célula. Para los fines de la presente memoria, los agentes anti-hialuronano reducen los niveles de hialuronano en un tejido o célula en comparación con la ausencia del agente. Tales agentes incluyen compuestos que modulan la expresión de material genético que codifica HA sintasa (HAS) y otras enzimas o receptores implicados en el metabolismo del hialuronano, o que modulan las proteínas que sintetizan o degradan el hialuronano, incluida la función o actividad de HAS. Los agentes incluyen moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas u otros compuestos. Por ejemplo, los agentes anti-hialuronano incluyen, pero no se limitan a, moléculas antisentido o efectoras, anticuerpos, enzimas, inhibidores de molécula pequeña y análogos de sustrato de HAS.

Como se emplea en la presente memoria, una enzima que degrada el hialuronano se refiere a una enzima que cataliza la escisión de un polímero de hialuronano (también denominado ácido hialurónico o HA) en fragmentos de peso molecular más pequeños. Las enzimas que degradan hialuronano ilustrativas son las hialuronidasas, y condroitinasas y liasas particulares que tienen la capacidad de despolimerizar el hialuronano. Las condroitinasas ilustrativas que son enzimas que degradan el hialuronano incluyen, entre otras, condroitina ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitina AC liasa (también conocida como condroitina sulfato liasa o condroitina sulfato eliminasa) y condroitina C liasa.

Como se emplea en la presente memoria, hialuronidasa se refiere a una clase de enzimas que degradan

hialuronano. Las hialuronidasas incluyen hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) y hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas incluyen cualquiera de origen no humano, incluidas, entre otras, murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, de peces, de rana, bacteriano y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Por ejemplo, las hialuronidasas incluyen las de origen humano. Las hialuronidasas humanas ilustrativas incluyen HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y PH20 (SEQ ID NO: 480 y 551). También se incluyen entre las hialuronidasas solubles, que incluyen el PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble. Los ejemplos de hialuronidasas solubles bovinas u ovinas disponibles comercialmente incluyen Vitrase® (hialuronidasa ovina), Amphadase® (hialuronidasa bovina) e Hydase™ (hialuronidasa bovina).

La referencia a enzimas que degradan hialuronano o hialuronidasa incluye polipéptidos precursores de enzimas que degradan hialuronano y polipéptidos maduros de enzimas que degradan hialuronano (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de empalme y otras variantes, incluidos polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con los polipéptidos precursores, o las formas maduras de los mismos. Las enzimas que degradan hialuronano y la hialuronidasa también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, PEGilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica. Una hialuronidasa de PH20 truncada es cualquier forma acortada en el extremo C-terminal de la misma, particularmente formas que son truncadas y activas neutras cuando se N-glicosilan.

Como se emplea en la presente memoria, "PH20 bovina" se refiere a una hialuronidasa bovina purificada a partir de extractos testiculares bovinos (véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565, 2.806.815, 2.808.362, 2.676.139, 2.795.529, 5.747.027 y 5.827.721). Los ejemplos de hialuronidasas testiculares bovinas purificadas disponibles comercialmente incluyen Amphadase® y Hydase™, e hialuronidasas bovinas, que incluyen, entre otras, las disponibles de Sigma Aldrich, Abnova, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Raybiotech, Inc. y Calzyme. También se incluyen hialuronidasas bovinas producidas de forma recombinante.

Como se emplea en la presente memoria, "PH20 ovina" se refiere a una hialuronidasa ovina purificada de extractos testiculares ovinos (véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565 y 2.806.815 y la publicación internacional PCT Núm. WO2005/118799). Los ejemplos de extracto testicular ovino purificado disponible en el mercado incluyen Vitrase® e hialuronidasas ovinas, incluidas, entre otras, las disponibles de Sigma Aldrich, Cell Sciences, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Mybiosource.com y Raybiotech, Inc. También se incluyen hialuronidasas ovinas producidas recombinantemente.

Como se emplea en la presente memoria, "PH20" se refiere a un tipo de hialuronidasa que se produce en los espermatozoides y es activa a pH neutro. La PH-20 se produce en la superficie del espermatozoide y en el acrosoma derivado del lisosoma, donde está unido a la membrana acrosómica interna. La PH20 incluye aquellas de cualquier origen, incluidas, entre otras, de seres humanos, chimpancés, monos *Cynomolgus*, monos Rhesus, murinas, bovinas, ovinas, de cobayas, conejos y ratas. Los polipéptidos PH20 ilustrativos incluyen los de seres humanos (precursor expuesto en SEQ ID NO: 551 y maduro expuesto en SEQ ID NO: 480).

Como se emplea en la presente memoria, una "PH20 soluble" se refiere a cualquier forma de PH20 que es soluble en condiciones fisiológicas. Se puede identificar una PH20 soluble, por ejemplo, mediante su reparto en la fase acuosa de una solución de Triton® X-114 a 37°C (Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7). La PH20 anclada a la membrana, tal como PH20 anclada a los lípidos, incluida PH20 anclada a GPI, se repartirá en la fase rica en detergente, pero se repartirá en la fase pobre en detergente o acuosa después del tratamiento con fosfolipasa-C. Entre la PH20 soluble se incluye PH20 anclada a la membrana en la que una o más regiones asociadas con el anclaje de PH20 a la membrana se han eliminado o modificado, donde la forma soluble conserva la actividad hialuronidasa. La PH20 soluble también incluye PH20 soluble recombinante y aquellas contenidas o purificadas a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículos de ovejas o vacas. Un ejemplo de tal PH20 soluble es PH20 humana soluble. Los polipéptidos PH20 humanas solubles ilustrativos se exponen en cualquiera de SEC ID NO: 481-488, 493-514 o 526-532, o tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 481-488, 493-514 o 526-532 y es soluble y conserva la actividad hialuronidasa.

Como se emplea en la presente memoria, "PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20)" se refiere a una composición que contiene la forma soluble de PH20 humana expresada y secretada de forma recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO). La rHuPH20 soluble está codificada por una molécula de ácido nucleico que incluye la secuencia señal y codifica el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 481. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Puesto que se produce en el

medio de cultivo, existe una heterogeneidad en el extremo C terminal de modo que el producto incluye una mezcla de especies que pueden incluir uno o más de SEQ ID NO: 481-486 en varias cantidades.

5 Como se emplea en la presente memoria, "actividad de hialuronidasa" se refiere a la capacidad de catalizar  
enzimáticamente la escisión del ácido hialurónico. El ensayo XXII de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)  
para la hialuronidasa determina indirectamente la actividad hialuronidasa midiendo la cantidad de ácido hialurónico,  
o hialuronano, (HA) sustrato de mayor peso molecular que queda después de que la enzima reaccione con el HA  
durante 30 minutos a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 Convención de Farmacopea de los Estados Unidos,  
10 Inc., Rockville, MD). Se puede emplear una solución patrón de referencia en un ensayo para determinar la actividad  
relativa, en unidades, de cualquier hialuronidasa. Los ensayos *in vitro* para determinar la actividad hialuronidasa de  
las hialuronidasas, tales como PH20, que incluyen PH20 soluble y esPH20, son conocidos en la técnica y se  
describen en la presente memoria. Los ensayos ilustrativos incluyen el ensayo de microturbidez que mide la escisión  
del ácido hialurónico por la hialuronidasa indirectamente mediante la detección del precipitado insoluble formado  
15 cuando el ácido hialurónico sin escindir se une a la albúmina sérica y el ensayo de ácido hialurónico biotinilado que  
mide la escisión del ácido hialurónico indirectamente detectando el ácido hialurónico biotinilado restante unido de  
forma no covalente a los pocillos de la placa de microtitulación con un producto conjugado de estreptavidina-  
peroxidasa de rábano picante y un sustrato cromogénico. Se pueden emplear patrones de referencia, por ejemplo,  
para generar una curva patrón para determinar la actividad en Unidades de la hialuronidasa que se está probando.

20 Como se emplea en la presente memoria, "activo neutro" se refiere a la capacidad de un polipéptido PH20 para  
catalizar enzimáticamente la escisión del ácido hialurónico a pH neutro (p. ej., a pH 7,0 o aproximadamente).

25 Como se emplea en la presente memoria, un agente anticanceroso o agente quimioterapéutico se refiere a un  
agente que es capaz de destruir células que se dividen rápidamente, tales como las células cancerosas. Un experto  
en la técnica está familiarizado con los agentes anticancerosos, incluidos los agentes quimioterapéuticos. Los  
agentes ilustrativos se describen en la presente memoria.

30 Como se emplea en la presente memoria, "actividad biológica" se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o  
respuestas fisiológicas que resultan después de la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra  
mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de tales  
compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas se pueden observar en sistemas *in vitro*  
diseñados para probar o emplear tales actividades. Por lo tanto, para los fines de la presente memoria, una actividad  
biológica de una ADA2 abarca la actividad adenosina desaminasa.

35 Como se emplea en la presente memoria, se pretende que el término "evaluar", y sus variaciones gramaticales,  
incluya la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de un  
polipéptido, y también de obtener un índice, razón, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de la  
actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la detección de la escisión de un sustrato por un  
polipéptido puede ser por medición directa del producto, o se puede medir indirectamente determinando la actividad  
40 resultante del sustrato escindido.

45 Como se emplea en la presente memoria, "numeración madura" o "numeración convencional" se refiere a la  
numeración de residuos en orden basada en un polipéptido de ADA2 maduro. Para los fines de la presente  
memoria, la numeración madura se basa en la numeración de los residuos de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID  
NO: 5.

50 Como se emplea en la presente memoria, "numeración de Zavialov" se refiere a la numeración de residuos utilizados  
por Zavialov et al. (2010) en J. Biol. Chem 285:12367-12377 y en los Núm. de acceso de PDB 3LGG y 3LGD. La  
numeración de Zavialov se basa en la numeración de residuos de ADA2 como se expone en SEQ ID NO: 4. Por lo  
tanto, la numeración de Zavialov se puede determinar mediante el alineamiento con SEQ ID NO: 4. La Tabla 1 a  
continuación establece los números de posición correspondientes entre la numeración madura y la numeración de  
Zavialov. La Tabla 1 proporciona la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 (secuencia de referencia  
para la numeración de Zavialov), sus números de posición y los números de posición correspondientes para SEQ ID  
NO: 5 (secuencia de referencia para la numeración madura como se emplea en la presente memoria).  
55

**Tabla 1. Números de Posición Correspondientes para la Numeración Madura (SEQ ID NO: 5) y la Numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4)**

SEQ ID NO:5 (madura)				1	2	3	4	5	6	7
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Secuencia (SEQ ID NO:4)	G	G	S	I	D	E	T	R	A	H

**Tabla 1. Números de Posición Correspondientes para la Numeración Madura (SEQ ID NO: 5) y la Numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4)**

SEQ ID NO:5 (madura)	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Secuencia (SEQ ID NO:4)	L	L	L	K	E	K	M	M	R	L
SEQ ID NO:5 (madura)	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Secuencia (SEQ ID NO:4)	G	G	R	L	V	L	N	T	K	E
SEQ ID NO:5 (madura)	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Secuencia (SEQ ID NO:4)	E	L	A	N	E	R	L	M	T	L
SEQ ID NO:5 (madura)	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Secuencia (SEQ ID NO:4)	K	I	A	E	M	K	E	A	M	R
SEQ ID NO:5 (madura)	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Secuencia (SEQ ID NO:4)	T	L	I	F	P	P	S	M	H	F
SEQ ID NO:5 (madura)	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Secuencia (SEQ ID NO:4)	F	Q	A	K	H	L	I	E	R	S
SEQ ID NO:5 (madura)	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Secuencia (SEQ ID NO:4)	Q	V	F	N	I	L	R	M	M	P
SEQ ID NO:5 (madura)	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Secuencia (SEQ ID NO:4)	K	G	A	A	L	H	L	H	D	I
SEQ ID NO:5 (madura)	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Secuencia (SEQ ID NO:4)	G	I	V	T	M	D	w	L	V	R
SEQ ID NO:5 (madura)	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110

**Tabla 1. Números de Posición Correspondientes para la Numeración Madura (SEQ ID NO: 5) y la Numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4)**

Secuencia (SEQ ID NO:4)	N	V	T	Y	R	P	H	C	H	I
SEQ ID NO:5 (madura)	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Secuencia (SEQ ID NO:4)	C	F	T	P	R	G	I	M	Q	F
SEQ ID NO:5 (madura)	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
Secuencia (SEQ ID NO:4)	R	F	A	H	P	T	P	R	P	S
SEQ ID NO:5 (madura)	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Secuencia (SEQ ID NO:4)	E	K	C	S	K	W	I	L	L	E
SEQ ID NO:5 (madura)	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
Secuencia (SEQ ID NO:4)	D	Y	R	K	R	V	Q	N	V	T
SEQ ID NO:5 (madura)	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
Secuencia (SEQ ID NO:4)	E	F	D	D	S	L	L	R	N	F
SEQ ID NO:5 (madura)	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
Secuencia (SEQ ID NO:4)	T	L	V	T	Q	H	P	E	V	I
SEQ ID NO:5 (madura)	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Secuencia (SEQ ID NO:4)	Y	T	N	Q	N	V	V	W	S	K
SEQ ID NO:5 (madura)	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
Secuencia (SEQ ID NO:4)	F	E	T	I	F	F	T	I	S	G
SEQ ID NO:5 (madura)	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
Secuencia (SEQ ID NO:4)	L	I	H	Y	A	P	V	F	R	D
SEQ ID NO:5 (madura)	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207



**Tabla 1. Números de Posición Correspondientes para la Numeración Madura (SEQ ID NO: 5) y la Numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4)**

SEQ ID NO:4 (Zavialov)	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
Secuencia (SEQ ID NO:4)	Y	V	F	R	S	M	Q	E	F	Y
SEQ ID NO:5 (madura)	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
Secuencia (SEQ ID NO:4)	E	D	N	V	L	Y	M	E	I	R
SEQ ID NO:5 (madura)	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
Secuencia (SEQ ID NO:4)	A	R	L	L	P	V	Y	E	L	S
SEQ ID NO:5 (madura)	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
Secuencia (SEQ ID NO:4)	G	E	H	H	D	E	E	W	S	V
SEQ ID NO:5 (madura)	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
Secuencia (SEQ ID NO:4)	K	T	Y	Q	E	V	A	Q	K	F
SEQ ID NO:5 (madura)	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
Secuencia (SEQ ID NO:4)	V	E	T	H	P	E	F	I	G	I
SEQ ID NO:5 (madura)	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
Secuencia (SEQ ID NO:4)	K	I	I	Y	S	D	H	R	S	K
SEQ ID NO:5 (madura)	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
Secuencia (SEQ ID NO:4)	D	V	A	V	I	A	E	S	I	R
SEQ ID NO:5 (madura)	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
Secuencia (SEQ ID NO:4)	M	A	M	G	L	R	I	K	F	P
SEQ ID NO:5 (madura)	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
Secuencia (SEQ ID NO:4)	T	V	V	A	G	F	D	L	V	G

ES 2 753 391 T3

**Tabla 1. Números de Posición Correspondientes para la Numeración Madura (SEQ ID NO: 5) y la Numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4)**

SEQ ID NO:5 (madura)	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
Secuencia (SEQ ID NO:4)	H	E	D	T	G	H	S	L	H	D
SEQ ID NO:5 (madura)	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
Secuencia (SEQ ID NO:4)	Y	K	E	A	L	M	I	P	A	K
SEQ ID NO:5 (madura)	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
Secuencia (SEQ ID NO:4)	D	G	V	K	L	P	Y	F	F	H
SEQ ID NO:5 (madura)	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
Secuencia (SEQ ID NO:4)	A	G	E	T	D	W	Q	G	T	S
SEQ ID NO:5 (madura)	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
Secuencia (SEQ ID NO:4)	I	D	R	N	I	L	D	A	L	M
SEQ ID NO:5 (madura)	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
Secuencia (SEQ ID NO:4)	L	N	T	T	R	I	G	H	G	F
SEQ ID NO:5 (madura)	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
Secuencia (SEQ ID NO:4)	A	L	S	K	H	P	A	V	R	T
SEQ ID NO:5 (madura)	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
Secuencia (SEQ ID NO:4)	Y	S	W	K	K	D	I	P	I	E
SEQ ID NO:5 (madura)	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
Secuencia (SEQ ID NO:4)	V	C	P	I	S	N	Q	V	L	K
SEQ ID NO:5 (madura)	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400

**Tabla 1. Números de Posición Correspondientes para la Numeración Madura (SEQ ID NO: 5) y la Numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4)**

Secuencia (SEQ ID NO:4)	L	V	S	D	L	R	N	H	P	V
SEQ ID NO:5 (madura)	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
Secuencia (SEQ ID NO:4)	A	T	L	M	A	T	G	H	P	M
SEQ ID NO:5 (madura)	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
Secuencia (SEQ ID NO:4)	V	I	S	S	D	D	P	A	M	F
SEQ ID NO:5 (madura)	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
Secuencia (SEQ ID NO:4)	G	A	K	G	L	S	Y	D	F	Y
SEQ ID NO:5 (madura)	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
Secuencia (SEQ ID NO:4)	E	V	F	M	G	I	G	G	M	K
SEQ ID NO:5 (madura)	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
Secuencia (SEQ ID NO:4)	A	D	L	R	T	L	K	Q	L	A
SEQ ID NO:5 (madura)	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
Secuencia (SEQ ID NO:4)	M	N	S	I	K	Y	S	T	L	L
SEQ ID NO:5 (madura)	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
Secuencia (SEQ ID NO:4)	E	S	E	K	N	T	F	M	E	I
SEQ ID NO:5 (madura)	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
Secuencia (SEQ ID NO:4)	W	K	K	R	W	D	K	F	I	A
SEQ ID NO:5 (madura)	478	479	480	481	482					
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	481	482	483	484	485					
Secuencia (SEQ ID NO:4)	D	V	A	T	K					

Como se emplea en la presente memoria, un "producto conjugado" se refiere a un polipéptido conectado directa o

indirectamente a uno o más polipéptidos o radicales químicos. Tales productos incluyen proteínas de fusión, las producidas mediante productos conjugados químicos y las producidas mediante cualquier otro método. Por ejemplo, un producto conjugado se refiere a una proteína ADA2 conectada directa o indirectamente a uno o más polipéptidos o radicales químicos, por lo que al menos una subunidad de polipéptido de ADA2 está conectada, directa o indirectamente a otro polipéptido o radical químico siempre que el producto conjugado conserve la actividad adenosina desaminasa

Como se emplea en la presente memoria, "acoplado" o "conjugado" significa anclado mediante una interacción covalente o no covalente.

Como se emplea en la presente memoria, un polipéptido quimérico se refiere a un polipéptido que contiene porciones de al menos dos polipéptidos diferentes o de dos porciones no contiguas de un solo polipéptido. Por lo tanto, un polipéptido quimérico generalmente incluye una secuencia de residuos de aminoácido de todo o parte de un polipéptido y una secuencia de aminoácidos de todo o parte de otro polipéptido diferente. Las dos porciones se pueden conectar directa o indirectamente y se pueden conectar mediante enlaces peptídicos, otros enlaces covalentes e interacciones covalentes de fuerza suficiente para mantener la integridad de una porción sustancial del polipéptido quimérico en condiciones de equilibrio y condiciones fisiológicas, tal como solución salina tamponada a pH 7 isotónico.

Como se emplea en la presente memoria, una proteína de fusión es un polipéptido diseñado para contener secuencias de aminoácidos que corresponden a dos polipéptidos distintos, que se unen, tal como mediante la expresión de la proteína de fusión de un vector que contiene dos ácidos nucleicos, que codifica los dos polipéptidos, en íntima proximidad, por ejemplo, adyacentes entre sí a lo largo de la longitud del vector. Por consiguiente, una proteína de fusión se refiere a una proteína quimérica que contiene dos, o porciones de dos, o más proteínas o péptidos que están conectados directa o indirectamente a través de enlaces peptídicos. Las dos moléculas pueden ser adyacentes en la construcción o estar separadas por un conector o un polipéptido espaciador.

Como se emplea en la presente memoria, el péptido "conector" o "espaciador" se refiere a secuencias cortas de aminoácidos que se unen a dos secuencias de polipéptidos (o ácido nucleico que codifica dicha secuencia de aminoácidos). "Conector peptídico" se refiere a la secuencia corta de aminoácidos que une las dos secuencias polipeptídicas. Los conectores polipeptídicos son conectores que unen un dominio de transducción de péptidos a un anticuerpo o conectores que unen dos cadenas de anticuerpos en un fragmento de anticuerpo sintético tal como un fragmento scFv. Los conectores son bien conocidos y se puede emplear cualquier conector conocido en los métodos proporcionados. Los conectores polipeptídicos son secuencias de aminoácidos (Gly-Ser)<sub>n</sub>, con algunos residuos de Glu o Lys dispersos por todas partes para aumentar la solubilidad. Otros conectores ilustrativos se describen en la presente memoria; se pueden emplear cualquiera de estos y otros conectores conocidos con las composiciones y métodos proporcionados.

Como se emplea en la presente memoria, un dominio de multimerización se refiere a una secuencia de aminoácidos que promueve la interacción estable de una molécula de polipéptido con una o más moléculas de polipéptidos adicionales, cada una de las cuales contiene un dominio de multimerización complementario, que puede ser el mismo o un dominio de multimerización diferente para formar un multímero estable con el primer dominio. Generalmente, un polipéptido se une directa o indirectamente al dominio de multimerización. Los dominios de multimerización ilustrativos incluyen las secuencias de inmunoglobulina o porciones de las mismas, cremalleras de leucina, regiones hidrófobas, regiones hidrófilas y dominios de interacción proteína-proteína compatibles. El dominio de multimerización, por ejemplo, puede ser una región o dominio constante de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, el dominio Fc o porciones del mismo de IgG, incluidos los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD e IgM y formas modificadas de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, un "radical" o "radical heterólogo" se refiere a una molécula que es capaz de asociarse con otra molécula, directa o indirectamente mediante una interacción covalente o no covalente. Típicamente, la molécula se obtiene a partir de una entidad distinta de la de la entidad a la que está asociada. En una realización, un radical heterólogo puede ser un polipéptido fusionado con otro polipéptido para producir un polipéptido o proteína de fusión. En otra realización, un radical heterólogo puede ser un no polipéptido tal como un polímero, tal como un PEG conjugado con un polipéptido o proteína.

Como se emplea en la presente memoria, un "radical que prolonga la semivida" es un radical heterólogo que facilita el aumento de la semivida de la molécula con la que se conjuga.

Como se emplea en la presente memoria, "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc" se refiere a un polipéptido que contiene la región constante de una cadena pesada de anticuerpo, excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgE, o los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM. Opcionalmente, un dominio Fc puede incluir todo o parte de la bisagra flexible N-terminal para estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede

5 incluir la cadena J. Para un dominio Fc ilustrativo de IgG, Fc contiene dominios de inmunoglobulina C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3, y opcionalmente, todo o parte de la bisagra entre C $\gamma$ 1 y C $\gamma$ 2. Los límites de la región Fc pueden variar, pero típicamente incluyen al menos parte de la región bisagra. Además, Fc también incluye cualquier variante alélica o de especie o cualquier variante o forma modificada, tal como cualquier variante o forma modificada que altere la unión a un FcR o altere una función efectora mediada por Fc.

10 Como se emplea en la presente memoria, "quimera de Fc" se refiere a un polipéptido quimérico en el que uno o más polipéptidos están unidos, directa o indirectamente, a una región Fc o un derivado de la misma. Típicamente, una quimera Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con otro polipéptido. Los expertos en la técnica conocen derivados de polipéptidos de Fc o polipéptidos de Fc modificados.

15 Como se emplea en la presente memoria, un "polímero" se refiere a cualquier radical natural o sintético de alto peso molecular que se conjuga con, es decir se conecta de manera estable directa o indirectamente a través de un conector, a un polipéptido. Tales polímeros, típicamente aumentan la semivida en suero, e incluyen, pero no se limitan a, radicales siálicos, radicales de PEGilación, dextrano y azúcar y otros radicales, por ejemplo, para la glicosilación. Por ejemplo, las proteínas ADA2, tales como una ADA2 variante, se pueden conjugar con un polímero.

20 Como se emplea en la presente memoria, "PEGilado" se refiere a la unión covalente u otra unión estable de moléculas poliméricas, tales como polietilenglicol (radical de PEGilación PEG) a proteínas, incluyendo una ADA2, tal como una ADA2 variante. La PEGilación puede aumentar la semivida de ADA2.

25 Como se emplea en la presente memoria, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluidos los ácidos peptidonucleicos (PNA) y sus mezclas. Los ácidos nucleicos pueden ser de hebra sencilla o de doble hebra. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, por ejemplo, con un marcador detectable, como un marcador fluorescente o radiomarcado, se contemplan moléculas de hebra sencilla. Tales moléculas son típicamente de una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. Generalmente una sonda o cebador contienen al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y los cebadores pueden tener 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

30 Como se emplea en la presente memoria, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene de 2 a 40 aminoácidos de longitud.

35 Como se emplea en la presente memoria, los aminoácidos que se producen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o una letra (Tabla 2). Los nucleótidos que se producen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones convencionales de una letra utilizadas habitualmente en la técnica.

40 Como se emplea en la presente memoria, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los fines de la presente memoria, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los que el carbono  $\alpha$  tiene una cadena lateral).

45 De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243:3557-3559 (1968), y 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822 adoptada, las abreviaturas para los residuos de aminoácido se muestran en la Tabla 2:

<b>Tabla 2. Tabla de correspondencia</b>		
<b>SÍMBOLO</b>		
<b>1 Letra</b>	<b>3 Letras</b>	<b>AMINOÁCIDOS</b>
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina

Tabla 2. Tabla de correspondencia		
SÍMBOLO		
1 Letra	3 Letras	AMINOÁCIDOS
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparragina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

- Se debe observar que todas las secuencias de residuos de aminoácido representadas en la presente memoria mediante fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de extremo amino a extremo carboxilo. Además, la frase "residuo de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 2) y aminoácidos modificados e inusuales, tales como los mencionados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822. Además, se debe tener en cuenta que un guion al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido, a un grupo amino terminal tal como NH<sub>2</sub> o a un grupo carboxilo terminal tal como COOH.
- 5 Como se emplea en la presente memoria, un "aminoácido hidrófobo" incluye uno cualquiera de los aminoácidos determinados como hidrófobos empleando la escala de consenso de carácter hidrófobo de Eisenberg. Son ilustrativos los aminoácidos hidrófobos de origen natural, tales como isoleucina, fenilalanina, valina, leucina, triptófano, metionina, alanina, glicina, cisteína y tirosina (Eisenberg et al., (1982) Faraday Symp. Chem Soc. 17:109-120). También se incluyen aminoácidos hidrófobos no naturales.
- 10
- 15 Como se emplea en la presente memoria, un "aminoácido ácido" incluye entre los aminoácidos de origen natural residuos de ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen aminoácidos ácidos de origen no naturales.
- 20 Como se emplea en la presente memoria, un "aminoácido polar" se refiere a un aminoácido que es hidrófilo, de modo que las cadenas laterales prefieren residir en un entorno acuoso (es decir agua). Tales aminoácidos generalmente se encuentran en la superficie de una proteína. Tales aminoácidos generalmente se clasifican si incluyen aquellos con cadenas laterales polares que tienen un grupo funcional tal como un ácido, amida, alcohol o amina que contienen oxígenos o nitrógenos que pueden participar en enlaces de hidrógeno con agua. Son ilustrativos de tales aminoácidos Arg (R), Asn (N), Asp (D), Glu (E), Gln (Q), His (H), Lys (K), Ser (S), Thr (T) y Tyr (Y). Cys (C) y Trp (W) también se consideran débilmente polares.
- 25
- 30 Como se emplea en la presente memoria, un aminoácido polar y neutro es un aminoácido polar que contiene una cadena lateral neutra. Son ilustrativos de tales residuos de aminoácido para el reemplazo Asn (N), Gln (Q), Ser (S), Thr (T), Cys (C) o Tyr (Y).
- Como se emplea en la presente memoria, los "aminoácidos naturales" se refieren a los 20 L-aminoácidos que se encuentran en los polipéptidos.
- Como se emplea en la presente memoria, "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que contiene

5 un grupo amino y un grupo ácido carboxílico que no es uno de los aminoácidos de origen natural enumerados en la Tabla 2. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, por lo tanto, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos naturales e incluyen, entre otros, el estereoisómero D de los aminoácidos. Los expertos en la técnica conocen aminoácidos no naturales ilustrativos y se pueden incluir en un polipéptido de factor VII modificado.

10 Como se emplea en la presente memoria, los expertos en la técnica conocen sustituciones conservativas adecuadas de aminoácidos y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., pág. 224). Tales sustituciones se pueden realizar de acuerdo con las expuestas en la Tabla 3 de la siguiente manera:

Tabla 3	
Residuo original	Sustitución conservativa ilustrativa
Ala (A)	Gly Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

15 Otras sustituciones también son permisibles y se pueden determinar empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservativas conocidas.

20 Como se emplea en la presente memoria, una construcción de ADN es una molécula de ADN lineal o circular de cadena sencilla o doble que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera que no se encuentra en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

25 Como se emplea en la presente memoria, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido específico es una porción de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee desde la dirección 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

30 Como se emplea en la presente memoria, el término polinucleótido significa un polímero de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas de hebra sencilla o de doble hebra leído desde el extremo 5' hasta el 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizar *in vitro* o preparar a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en la presente memoria en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o pares de bases (abreviado "pb").

El término nucleótidos se emplea para moléculas monocatenarias y bicatenarias donde el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se emplea para denotar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la técnica reconocerán que la longitud de las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario puede diferir ligeramente y que sus extremos se pueden escalar; por lo tanto, es posible que no todos los nucleótidos dentro de una molécula polinucleotídica bicatenaria estén emparejados. Tales extremos no emparejados, en general, no excederán 20 nucleótidos de longitud.

Como se emplea en la presente memoria, "secuencia primaria" se refiere a la secuencia de residuos de aminoácido en un polipéptido.

Como se emplea en la presente memoria, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/u homología de las secuencias de residuos y de los residuos contenidos en ellas. Los expertos en la técnica conocen métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se alinean de una manera que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere al grado en que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariables. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos, y en cierta medida de las secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta las diferencias conservativas y/o las sustituciones frecuentes de aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que preservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas en toda la longitud de las secuencias e incluyendo todos los residuos) o locales (el alineamiento de una porción de las secuencias que incluye solo la región o regiones más similares).

Como se emplea en la presente memoria, los términos "homología" e "identidad" se emplean indistintamente, pero la homología para las proteínas puede incluir cambios conservativos de aminoácidos. En general, para identificar las posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de modo que se obtenga el emparejamiento de orden más alto (véanse, p. ej.: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073).

Como se emplea en la presente memoria, "identidad de secuencia" se refiere al número de aminoácidos idénticos (o bases de nucleótidos) en una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y de referencia. Los polipéptidos homólogos se refieren a un número predeterminado de residuos de aminoácido idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones conservativas de aminoácidos, así como residuos idénticos. La identidad de secuencia se puede determinar mediante programas de algoritmos de alineamiento convencionales utilizados con penalizaciones de hueco predeterminadas expuestas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico homólogas se refieren a un número predeterminado de nucleótidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones que no cambian el aminoácido codificado (es decir, "sustituciones silenciosas") así como residuos idénticos. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridan típicamente a una restricción moderada o alta a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico o al menos aproximadamente 70%, 80% o 90% de la molécula de ácido nucleico completa de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico hibridante. (Para la determinación de la homología de las proteínas, se pueden alinear aminoácidos conservativos y aminoácidos idénticos; en este caso, el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología varían). Que dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias de nucleótidos (o dos polipéptidos tienen secuencias de aminoácidos) que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" puede ser determinar utilizando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FAST A", utilizando, por ejemplo, los parámetros predeterminados como en Pearson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul, S.F., et al., J. Molec. Biol. 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994) y Carrillo et al. SIAM J Applied Math 48: 1073 (1988)). Por ejemplo, se puede utilizar la función BLAST de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercial o públicamente incluyen el programa "MegAlign" de DNASTar (Madison, WI) y el programa "Gap" (Madison WI) del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin (UWG). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico se puede determinar, por ejemplo, comparando la información de secuencia empleando un programa informático GAP (p. ej., Needleman et al. J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), revisado por Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)). Brevemente, un programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, divididos por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros predeterminados para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y



0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. Nucl. Acid Res. 14:6745 (1986), según lo descrito por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización por huecos finales.

5 Por lo tanto, como se emplea en la presente memoria, el término "identidad" representa una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. En un ejemplo no limitante, "al menos 90% idéntico a" se refiere a identidades porcentuales de 90 a 100% con respecto a los polipéptidos de referencia. La identidad a un nivel del 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo que se compara con fines ilustrativos una longitud de polinucleótido de prueba y de referencia de 100 aminoácidos, no más de 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difieren de los de los polipéptidos de referencia. Se pueden realizar comparaciones similares entre polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente a lo largo de toda la longitud de una secuencia de aminoácidos o pueden agruparse en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permitido, por ejemplo, diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente 90% identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. En el nivel de homologías o identidades superiores al 85-90%, el resultado debe ser independiente del programa y de los parámetros de hueco expuestos; tales altos niveles de identidad se pueden evaluar fácilmente, a menudo sin depender del soporte lógico.

20 Como se emplea en la presente memoria, también se entiende que los términos "sustancialmente idénticas" o "similares" varían con el contexto tal como lo entienden los expertos en la técnica relevante, pero que los expertos pueden valorar.

25 Como se emplea en la presente memoria, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, dos o más secuencias que están relacionadas en 50% o más de identidad están alineadas. Un conjunto de secuencias alineadas se refiere a 2 o más secuencias que están alineadas en las posiciones correspondientes y pueden incluir secuencias de alineamiento derivadas de ARN, tales como EST y otros ADNc, alineados con la secuencia de ADN genómico.

30 Como se emplea en la presente memoria, "hibrida específicamente" se refiere a reasociación, mediante emparejamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (p. ej., un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica están familiarizados con parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan a la hibridación específica, tales como la longitud y la composición de la molécula concreta. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación *in vitro* incluyen adicionalmente la temperatura de recocido y lavado, la composición de tampón y la concentración de sal. Las condiciones de lavado ilustrativas para eliminar moléculas de ácido nucleico unidas de forma no específica a alta rigurosidad son 0,1 x SSPE, SDS al 0,1%, 65°C, y a rigurosidad media son 0,2 x SSPE, SDS al 0,1%, 50°C. Se conocen condiciones de rigurosidad equivalentes en la técnica. El experto en la técnica puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación concreta.

45 Como se emplea en la presente memoria, el polipéptido o proteína aislados o purificados o la porción biológicamente activa de los mismos está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido de los que deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Se puede determinar que las preparaciones son sustancialmente libres si parecen estar libres de impurezas fácilmente detectables según lo determinado por los métodos convencionales de análisis, tales como la cromatografía en capa fina (TLC), la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizados por los expertos en la técnica para evaluar dicha pureza, o lo suficientemente pura como para que una purificación adicional no altere de manera detectable las propiedades físicas y químicas, tales como las actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros. Sin embargo, un compuesto sustancialmente químicamente puro puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

55 Por lo tanto, la referencia a una proteína aislada o purificada o una proteína catalíticamente activa de la misma significa que está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula del tejido del que se obtiene la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Se puede determinar que las preparaciones son sustancialmente libres si parecen estar libres de impurezas fácilmente detectables según lo determinado por los métodos convencionales de análisis, tales como la cromatografía en capa fina (TLC), la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizados por los expertos en la técnica para evaluar dicha pureza, o lo suficientemente pura como para que una purificación adicional no altere de manera detectable las propiedades físicas y químicas, tales como las actividades proteolíticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de las proteínas para producir polipéptidos sustancialmente puros.

5 El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se  
separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. En una  
realización, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas proteasas que  
10 tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteínas no proteasas (también denominadas en la  
presente memoria proteínas contaminantes), generalmente menos de aproximadamente 20% de proteínas no  
proteasas o 10% de proteínas no proteasas o menos de aproximadamente 5% de proteínas no proteasas. Cuando la  
proteína proteasa o la porción activa de la misma se produce de forma recombinante, también está sustancialmente  
libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos, aproximadamente o igual al 20%, 10% o  
5% del volumen de la preparación de proteína proteasa.

15 Como se emplea en la presente memoria, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros  
productos químicos incluye preparaciones de proteínas proteasas en las que la proteína se separa de los  
precursores químicos u otros productos químicos que participan en la síntesis de la proteína. El término incluye  
preparaciones de proteínas proteasas que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o  
menos de precursores químicos o componentes o sustancias químicas no proteasas.

20 Como se emplea en la presente memoria, la producción por métodos recombinantes empleando métodos de ADN  
recombinante se refiere al uso de los métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas  
codificadas por ADN clonado.

25 Como se emplea en la presente memoria, el vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se emplean  
para introducir ácido nucleico heterólogo en las células para su expresión o replicación. Los vectores típicamente  
permanecen episomales, pero se pueden diseñar para efectuar la integración de un gen o una porción del mismo en  
un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como  
cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamífero. La  
selección y el uso de tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

30 Como se emplea en la presente memoria, la expresión se refiere al procedimiento por el cual el ácido nucleico se  
transcribe a ARNm y se traduce a péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el ácido nucleico se obtiene a partir del ADN  
genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula u organismo anfitrión eucariota apropiado, incluir el  
procesamiento, tal como el corte y empalme del ARNm.

35 Como se emplea en la presente memoria, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que  
está conectado operativamente a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de  
efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias  
promotoras y terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más  
40 marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión  
generalmente se obtienen a partir de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto,  
un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago,  
un virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula anfitriona apropiada, da como resultado la  
expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica  
e incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen  
episomales o aquellos que se integran en el genoma de la célula anfitriona.

45 Como se emplea en la presente memoria, el vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales". Los  
vectores virales son virus modificados genéticamente que están conectados operativamente a genes exógenos para  
transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos a las células.

50 Como se emplea en la presente memoria, "operativamente" o "conectado operativamente" cuando se refieren a  
segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen en concierto para los fines  
previstos, p. ej., la transcripción se inicia aguas abajo del promotor y aguas arriba de cualquier secuencia transcrita.  
El promotor suele ser el dominio al que se une la maquinaria de transcripción para iniciar la transcripción y continúa  
a través del segmento codificante hasta el terminador.

55 Como se emplea en la presente memoria, una proteína humana es una codificada por una molécula de ácido  
nucleico, tal como ADN, presente en el genoma de un ser humano, incluidas todas las variantes alélicas y  
variaciones conservativas de la misma. Una variante o modificación de una proteína es una proteína humana si la  
modificación se basa en el tipo salvaje o secuencia prominente de una proteína humana.

60 Como se emplea en la presente memoria, una "composición" se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o  
compuestos. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosos, no acuosos, o cualquier  
combinación de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, "una combinación" se refiere a cualquier asociación entre dos o entre más ítems o elementos, por ejemplo, dos o más elementos que se pueden utilizar juntos. Por ejemplo, una combinación puede incluir una proteína ADA2 y otro agente terapéutico. Tales combinaciones se pueden empaquetar como kits.

- 5 Como se emplea en la presente memoria, un kit es una combinación envasada, opcionalmente, que incluye instrucciones para el uso de la combinación y/u otras reacciones y componentes para dicho uso.

10 Como se emplea en la presente memoria, un "artículo de fabricación" es un producto que se fabrica y se comercializa. Como se emplea a lo largo de esta solicitud, se pretende que el término abarque proteínas ADA2, por ejemplo, proteínas ADA2 variantes contenidas en artículos de envasado.

Como se emplea en la presente memoria, la administración directa se refiere a una composición que se administra sin dilución.

- 15 Como se emplea en la presente memoria, una formulación de dosificación única se refiere a una formulación para usar solo una vez. Típicamente, una formulación de dosificación única es para administración directa.

Como se emplea en la presente memoria, una formulación de dosificación múltiple se refiere a una formulación para su uso en administraciones repetidas.

20 Como se emplea en la presente memoria, cuando se hace referencia a una dosis basada en mg/kg del sujeto, se considera que un sujeto humano promedio tiene una masa de aproximadamente 70 kg-75 kg, tal como 70 kg y un área de superficie corporal (ASC) de 1,73 m<sup>2</sup>.

- 25 Como se emplea en la presente memoria, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de una causa o afección que incluye, pero no se limita a, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas y caracterizada por síntomas identificables. Enfermedades y trastornos de interés en la presente memoria asociados con niveles aberrantes o altos de adenosina.

30 Como se emplea en la presente memoria, un tumor, también conocido como neoplasia, es una masa anormal de tejido que se produce cuando las células proliferan a una velocidad anormalmente alta. Los tumores pueden mostrar una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Los tumores pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Como se emplea en la presente memoria, se pretende que un tumor abarque tumores hematopoyéticos, así como tumores sólidos.

35 Los tumores malignos se pueden clasificar en términos generales en tres tipos principales. Los carcinomas son tumores malignos que surgen de estructuras epiteliales (p. ej. mama, próstata, pulmón, colon, páncreas). Los sarcomas son tumores malignos que se originan a partir de tejidos conectivos o células mesenquimales, como los músculos, los cartílagos, las grasas o los huesos. Las leucemias y los linfomas son tumores malignos que afectan a las estructuras hematopoyéticas (estructuras relacionadas con la formación de células sanguíneas), incluidos los componentes del sistema inmunitario. Otros tumores malignos incluyen, entre otros, tumores del sistema nervioso (p. ej. neurofibromatosis), tumores de células germinales y tumores blásticos.

45 Como se emplea en la presente memoria, la enfermedad neoplásica se refiere a cualquier trastorno que implique cáncer, incluido el desarrollo, el crecimiento, la metástasis y la progresión tumoral.

50 Como se emplea en la presente memoria, cáncer es un término para enfermedades causadas por o caracterizadas por cualquier tipo de tumor maligno, incluidos cánceres metastásicos, tumores linfáticos y cánceres de la sangre. Los cánceres ilustrativos incluyen, entre otros, cánceres de vejiga, cerebro, mama, médula ósea, cuello uterino, colon/recto, riñón, hígado, pulmón/bronquio, ovario, páncreas, próstata, piel, estómago, tiroides o útero.

Como se emplea en la presente memoria, "administración intravenosa" se refiere a la administración de un agente terapéutico directamente en una vena.

- 55 Como se emplea en la presente memoria, un control se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de prueba, excepto que no se trata con un parámetro de prueba o, si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado con la afección de interés. Un control también puede ser un control interno.

60 Como se emplea en la presente memoria, los niveles o valores normales se pueden definir de varias formas conocidas por un experto en la técnica. Típicamente, los niveles normales se refieren a los niveles de expresión de un marcador (p. ej., adenosina, ADR o nucleosidasa) en una población sana. Los niveles normales (o niveles de referencia) se basan en mediciones de sujetos sanos, por ejemplo, de una fuente específica (es decir, sangre, suero, tejido u otra fuente). A menudo, un nivel normal se especificará como un "intervalo normal", que generalmente se refiere al intervalo de valores de la mediana de 95% de la población sana. El valor de referencia se emplea

indistintamente en la presente memoria con un nivel normal, pero puede ser diferente de los niveles normales dependiendo de los sujetos o la fuente. Los niveles de referencia generalmente dependen de los niveles normales de un segmento concreto de la población. Por lo tanto, para los fines de la presente memoria, un nivel normal o de referencia es un patrón o control predeterminado mediante el cual se puede comparar un paciente de prueba.

5 Como se emplea en la presente memoria, nivel elevado se refiere a cualquier nivel de cantidad o expresión de un marcador por encima de un umbral recitado o normal.

10 Como se emplea en la presente memoria, muestra biológica se refiere a cualquier muestra obtenida a partir de una fuente viva o viral u otra fuente de macromoléculas y biomoléculas, e incluye cualquier tipo de célula o tejido de un sujeto del que se pueda obtener ácido nucleico o proteína u otra macromolécula. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos aislados que se amplifican constituyen una muestra biológica. Las muestras biológicas incluyen, entre  
15 otras, fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos de animales, incluidas muestras de tumores biopsiados.

20 Como se emplea en la presente memoria, la detección incluye métodos que permiten la visualización (a simple vista o mediante equipo) de una proteína o marcador. Se puede visualizar una proteína empleando un anticuerpo específico para la proteína. La detección de una proteína también se puede facilitar mediante la fusión de una proteína con una etiqueta que incluye una etiqueta o marca de epítipo.

25 Como se emplea en la presente memoria, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se alivian parcial o totalmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. La profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o la prevención del empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad.

30 Como se emplea en la presente memoria, un agente farmacéuticamente eficaz incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluidos fármacos de molécula pequeña y proteínas terapéuticas.

Como se emplea en la presente memoria, tratamiento significa cualquier manera en que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación se mejoran o se alteran de manera beneficiosa.

35 Como se emplea en la presente memoria, efecto terapéutico significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente mejora o alivia los síntomas de una enfermedad o afección o que cura una enfermedad o afección. Una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que produce un efecto terapéutico después de la administración a un sujeto.

40 Como se emplea en la presente memoria, la mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno en particular mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otra terapéutica, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas o efectos adversos de una afección, tal como, por ejemplo, la reducción de los efectos adversos asociados o que se producen tras la administración de una ADA2, tal como una ADA2 variante.  
45

Como se emplea en la presente memoria, la prevención o profilaxis se refiere a la reducción en el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección.

50 Como se emplea en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por lo tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

55 Como se emplea en la presente memoria, la forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.

60 Como se emplea en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un animal, incluido un mamífero, tal como un ser humano. El sujeto puede incluir cualquier animal, tal como, pero sin limitarse a, primates, incluidos seres humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, venados, ovejas; cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los seres humanos como animal contemplado.

Como se emplea en la presente memoria, un paciente se refiere a un sujeto humano que presenta síntomas de una enfermedad o trastorno.

Como se emplea en la presente memoria, aproximadamente la misma significa dentro de una cantidad que un experto en la técnica consideraría igual o dentro de un intervalo aceptable de error. Por ejemplo, típicamente, para las composiciones farmacéuticas, dentro de al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5% o 10% se considera aproximadamente igual. Tal cantidad puede variar dependiendo de la tolerancia a la variación en la composición particular por los sujetos.

Como se emplea en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un compuesto que comprende o que contiene "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

Como se emplea en la presente memoria, los intervalos y las cantidades se pueden expresar como "aproximadamente" un valor o intervalo concretos. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

Como se emplea en la presente memoria, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia que se describe posteriormente ocurre o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no ocurre. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

Como se emplea en la presente memoria, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácidos y otros compuestos son, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas o la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (véase, (1972) *Biochem.* 11:1726).

## **B. ADENOSINA DESAMINASA 2 (ADA2) Y MODULACIÓN DE LA INMUNOSUPRESIÓN DE TUMORES MEDIADA POR ADENOSINA**

En la presente memoria se proporcionan proteínas Adenosina Desaminasa 2 (ADA2), incluidas variantes o productos conjugados de las mismas para su uso en métodos de tratamiento de enfermedades o afecciones tales como un cáncer o un tumor mediante la administración de cualquier proteína adenosina desaminasa 2 (ADA2), incluidas variantes o productos conjugados de las mismas, a un sujeto. La adenosina extracelular es responsable de la regulación de procesos biológicos críticos, tales como la inmunomodulación (Blay, J. (2012) *Encyclopedia of Cancer* pág. 49-52). En condiciones fisiopatológicas tales como el microentorno tumoral (MET), la concentración de adenosina extracelular aumenta rápidamente en ciertas partes del MET, generando un nicho inmunosupresor que promueve el crecimiento tumoral. ADA2 modula los niveles de adenosina en el entorno extracelular, lo que afecta la señalización de adenosina y la inmunosupresión dependiente de adenosina. ADA2 puede disminuir los niveles de adenosina extracelular al convertir la adenosina en inosina, para superar los efectos inmunosupresores en el MET. Por ejemplo, como se muestra en la presente memoria, la administración de ADA2 puede revertir la inmunosupresión dependiente de adenosina y puede reducir el crecimiento tumoral *in vivo*.

### **1. Inmunidad Tumoral y Evasión Inmunitaria**

Las células cancerosas contienen antígenos específicos de tumor que son reconocidos por el sistema inmunitario. En la inmunidad tumoral, el objetivo del sistema inmunitario es atacar y erradicar estas células cancerosas a través de las acciones de las células inmunitarias, incluidas las células T citotóxicas, las células asesinas naturales (NK) y los macrófagos. Por ejemplo, las células T CD4+ y CD8+ se pueden activar tras el reconocimiento de péptidos antigénicos presentados en las células presentadoras de antígeno en las moléculas de clase I o clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), respectivamente. Las células CD8+ activadas, o las células T citotóxicas, pueden destruir las células tumorales que expresan el antígeno, lo que puede ser ayudado por la presencia de células T CD4+. Además de los efectos de destrucción directa de las células T citotóxicas, las células T también producen diversas citocinas y quimiocinas que pueden reclutar otras células inmunitarias efectoras, tales como neutrófilos, macrófagos o células NK al microentorno tumoral. Las células NK también pueden destruir directamente las células cancerosas.

Los estudios han demostrado que el sistema inmunitario puede prevenir el crecimiento tumoral. Por ejemplo, los ratones inmunodeficientes desarrollan más cánceres que los ratones de tipo salvaje (Dunn et al. (2004) *Immunity*, 21:137-48) Se ha demostrado que los linfocitos y el IFN-gamma colaboran para prevenir la formación de sarcoma inducido por carcinógenos y carcinomas epiteliales espontáneos (Shankaran et al. (2001) *Nature*, 410:1107-1111). Adicionalmente, los ratones con genes elegidos como diana y con empobrecimiento de subgrupos de linfocitos han demostrado un papel para las células NK en el rechazo de tumores. Por ejemplo, se observó que los ratones con empobrecimiento de células T NK y NK1.1+ tenían una mayor susceptibilidad a la formación de tumores que los ratones control, y se observó un resultado similar con el tratamiento de ratones con antisialo-GM1, que elimina selectivamente las células NK (Smyth et al. (2001) *Int Immunol.*, 13; 459-63). Además, el número, tipo y ubicación de los productos infiltrados inmunitarios tumorales en tumores primarios son factores de pronóstico para la

supervivencia del cáncer en pacientes humanos (Pages et al. (2005) N Engl J Med, 353:2654-2666).

Sin embargo, la mayoría de los tumores pueden evadir el sistema inmunitario. El microentorno tumoral es complejo e incluye una variedad de mecanismos inmunosupresores que pueden ser intrínsecos a las células tumorales o estar mediados por otras células o moléculas. A través de estos mecanismos, solos o combinados, el sistema inmunitario puede promover la progresión tumoral. Estos mecanismos incluyen, entre otros, la eliminación de antígenos de células tumorales que provocan la respuesta inmunitaria; la prevención o regulación por disminución de la expresión de los ligandos requeridos para la activación inmunitaria, tales como el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I); producción de mediadores inmunosupresores, tales como interleucina-10 (IL-10), factor de crecimiento transformante- $\beta$  o adenosina; reclutamiento de subconjuntos de células inmunitarias que suprimen la función de las células inmunitarias efectoras, tales como las células T reguladoras (Tregs) o células supresoras derivadas de la serie mieloide (MDSC); o la regulación por incremento de los inhibidores del punto de control, tales como el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4), que pueden atenuar la función de las células T efectoras. Por ejemplo, la adenosina es un agente inmunosupresor prominente en el microentorno tumoral.

## 2. Inmunomodulación por Adenosina en Cancer y Microentorno Tumoral (MET)

La adenosina (adenina-9- $\beta$ -D-ribofuranósido; Ado) es un nucleósido que existe como parte de los nucleótidos de adenina (AMP, ADP y ATP) que participan ampliamente en el metabolismo de la energía celular y actúan como moléculas precursoras en muchos procesos. La adenosina puede existir en forma libre tanto dentro como fuera de las células.

La adenosina es una importante molécula de señalización *in vivo*, especialmente para el sistema inmunitario. En particular, la adenosina es un efector bien conocido de la función inmunitaria. En las células T, la adenosina disminuye la activación inducida por el receptor de células T de NF- $\kappa$ B, inhibe IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . La adenosina disminuye la citotoxicidad de las células T, aumenta la anergia de las células T y aumenta la diferenciación de las células T a células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> o Lag-3<sup>+</sup>. La adenosina disminuye la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK y suprime la citotoxicidad de las células NK. La adenosina bloquea la adhesión y la extravasación de neutrófilos, disminuye la fagocitosis y atenúa los niveles de superóxido y óxido nítrico. La adenosina también disminuye la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12 y MIP-1 $\alpha$  en macrófagos, atenúa la expresión de MHC Clase II y aumenta los niveles de IL-10 e IL-6. Además, la adenosina disminuye los niveles de fagocitosis y superóxido y óxido nítrico en los macrófagos (Stagg y Smyth (2010) Oncogene 29:5346-5358).

La Figura 2 expone la biosíntesis y el catabolismo de la adenosina. La adenosina extracelular se produce por las actividades secuenciales de las ectoenzimas asociadas a la membrana, CD39 y CD73, que juntas producen adenosina mediante fosfohidrólisis de ATP o ADP producido a partir de células muertas o moribundas. CD39 (también denominado ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa; SEQ ID NO: 378) convierte el ATP extracelular (o ADP) en 5'AMP. A continuación, CD73 (también denominado 5'nucleotidasa; SEQ ID NO: 379) convierte 5'AMP en adenosina. La actividad de CD39 es reversible por las acciones de NDP quinasa y adenilato quinasa, mientras que la actividad de CD73 es irreversible. CD39 y CD73 se expresan en las células del estroma tumoral, incluidas las células endoteliales y Treg, y también en muchas células cancerosas. Por ejemplo, la expresión de CD39 y CD73 en las células endoteliales aumenta bajo las condiciones hipóxicas del microentorno tumoral. La hipoxia tumoral puede ser el resultado de un suministro de sangre inadecuado y una vasculatura tumoral desorganizada, lo que dificulta el suministro de oxígeno (Carroll y Ashcroft (2005), Expert. Rev. Mol. Med. 7(6):1-16). La hipoxia también inhibe la adenilato quinasa (AK), que convierte la adenosina en AMP, lo que lleva a una concentración extracelular muy alta de adenosina. Por lo tanto, la adenosina se libera a altas concentraciones en respuesta a la hipoxia, que es una condición que con frecuencia ocurre en el microentorno tumoral (MET), dentro o alrededor de tumores sólidos.

Por lo tanto, si bien la concentración de adenosina es típicamente baja en los tejidos y la sangre, la concentración local de adenosina puede aumentar significativamente como resultado de daño o estrés, por ejemplo, inflamación, isquemia e hipoxia. Por ejemplo, la concentración extracelular de adenosina en el microentorno del tumor hipóxico puede ser de hasta 10  $\mu$ M de adenosina, que es hasta aproximadamente 100 veces mayor que la concentración de adenosina extracelular típica de aproximadamente 0,1  $\mu$ M (Antonioli et al. (2013) Nat Rev Can 13:842-857). Dado que las regiones hipóxicas en los tumores se centran alrededor de los microvasos, la concentración local de adenosina en las regiones del tumor puede ser mayor.

La actividad de inmunomodulación de la adenosina ocurre después de su liberación al espacio extracelular del tumor y la activación de los receptores de adenosina (ADR) en la superficie de las células inmunitarias, células cancerosas o células endoteliales diana. Existen cuatro tipos de ADR, A<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 533), A<sub>2A</sub> (SEQ ID NO: 534), A<sub>2B</sub> (SEQ ID NO: 535) y A<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 536-538), que son receptores acoplados a proteínas G con diferente afinidad por la adenosina y diferentes vías de señalización aguas abajo. La activación de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> disminuyen los niveles de AMP cíclico intracelular (AMPC) y la activación de los receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> aumenta los niveles de AMPC mediante la activación de adenilil ciclasa. Cada uno de A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> y A<sub>3</sub> se puede activar a concentraciones fisiológicas de adenosina (p. ej., 30-300 nM), pero A<sub>2B</sub> tiene una menor afinidad por la adenosina y requiere niveles más altos de

adenosina para la activación (Stagg et al. (2010) *Oncogene*, 29:5346-5358). El resultado de la activación de los ADR varía según el tipo de célula y el tipo de receptor: puede conducir a la activación o supresión de la función celular y la muerte celular (Antonioli et al. (2013) *Nat Rev Can* 13:842-857). Los cuatro tipos de receptores pueden existir en las células del microentorno tumoral, incluidas las células cancerosas, las células del estroma, las células endoteliales y las células inflamatorias e inmunitarias, y todos pueden activarse a las concentraciones de adenosina presentes en el microentorno tumoral.

Los altos niveles de adenosina en el microentorno tumoral dan como resultado inmunosupresión local, lo que limita la capacidad del sistema inmunitario para eliminar las células cancerosas. Por ejemplo, la adenosina puede suprimir diversas funciones de linfocitos T, células asesinas naturales (NK), granulocitos polimorfonucleares y células fagocíticas tales como los macrófagos de los tejidos. En particular, se sabe que el receptor  $A_{2A}$  se expresa en monocitos, macrófagos, mastocitos, granulocitos, linfocitos, células dendríticas (DC), células NK y células endoteliales, y su expresión en muchos tipos de células es inducida por hipoxia (Stagg y Smyth (2010) *Oncogene*, 29:5346-5358). Se ha demostrado que la activación de  $A_{2A}$  suprime las funciones de las células NK, inhibe la proliferación de células T, inhibe la citotoxicidad de las células T y la producción de citocinas e inhibe la activación de los macrófagos (Stagg y Smyth (2010); Antonioli *et al.* (2013)). Se ha demostrado que la activación de  $A_{2B}$  suprime la diferenciación de DC limitando la activación de células T y promoviendo la expansión y acumulación de MSDC (Stagg y Smyth (2010); Antonioli *et al.* (2013)).

Además de los efectos directos para inhibir el sistema inmunitario, la adenosina también puede controlar el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas por los efectos sobre la proliferación, la apoptosis y la angiogénesis de las células cancerosas. Por ejemplo, la adenosina puede promover la angiogénesis, principalmente a través de la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ . La estimulación de los receptores en las células endoteliales puede regular la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la E-selectina en las células endoteliales, mantener la integridad vascular, promover el crecimiento de los vasos (Antonioli *et al.* (2013)). Además, la activación de uno o más de  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  o  $A_3$  en varias células por la adenosina puede estimular la producción de factores pro-angiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la interleucina-8 (IL-8) o la angiopoyetina 2 (Antonioli *et al.* (2013)).

La adenosina también puede regular directamente la proliferación de células tumorales, la apoptosis y la metástasis a través de la interacción con los receptores en las células cancerosas. Por ejemplo, los estudios han demostrado que la activación de los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  promueve la proliferación de células tumorales en algunas líneas celulares de cáncer de mama y la activación de los receptores  $A_{2B}$  tiene propiedades promotoras del crecimiento del cáncer en las células de carcinoma de colon (Antonioli *et al.* (2013)). La adenosina también puede desencadenar la apoptosis de las células cancerosas, y varios estudios han correlacionado esta actividad con la activación de la vía apoptótica extrínseca a través de  $A_3$  o la vía apoptótica intrínseca a través de  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  (Antonioli *et al.* (2013)). Además, la adenosina puede promover la migración y metástasis de las células tumorales, al aumentar la motilidad celular, la adhesión a la matriz extracelular y la expresión de proteínas y receptores de unión celular para promover la motilidad del movimiento celular.

### 3. Adenosina Desaminasa y Elección como Diana de la Adenosina en el Tratamiento del Cáncer

Los niveles de adenosina se pueden regular mediante las acciones de la adenosina desaminasa (ADA), que es una enzima que convierte la adenosina en inosina o la 2'-desoxiadenosina en 2'-desoxiinosina. En particular, ADA convierte la adenosina o la desoxiadenosina, en presencia o en agua, en inosina o desoxiinosina y amoníaco de la siguiente manera:  $\text{adenosina} + \text{H}_2\text{O} = \text{inosina} + \text{NH}_3$  o  $2\text{'-desoxiadenosina} + \text{H}_2\text{O} = 2\text{'-desoxiinosina} + \text{NH}_3$ . El aumento de amoníaco en el microentorno local del tumor puede aumentar el pH.

Existen dos tipos de ADA en humanos, ADA1 y ADA2. ADA1 está presente de manera ubicua dentro de las células, y exhibe una afinidad de unión similar por la adenosina y la 2'-desoxiadenosina con una  $K_m$  de aproximadamente  $5,2 \times 10^{-5}$  M. ADA1 funciona principalmente intracelularmente, para reducir los niveles de adenosina que pueden ser tóxicos para las células, tales como los linfocitos. Por ejemplo, la deficiencia de adenosina desaminasa 1 (ADA1) se asocia con inmunodeficiencia leve a inmunodeficiencia combinada severa (SCID), debido a la acumulación tóxica de adenosina en células linfoides inmaduras, lo que da como resultado la muerte apoptótica de linfocitos y un agotamiento profundo de células T, B y NK (Hershfield, M.S. (2005) *Eur. J. Immunol.* 35:25-30). Por el contrario, ADA2 contiene una secuencia señal de secreción y es la ADA extracelular predominante. La mayoría de la actividad de ADA en suero o plasma humano normal es de ADA2 (Neidzwicky y Aberneth (1991) *Biochemical Pharmacology* 41:1615-1624). ADA2 tiene una afinidad de unión mucho menor por la adenosina con una  $K_m$  de aproximadamente  $200 \times 10^{-5}$  M, y exhibe una afinidad aún más débil por la 2'-desoxiadenosina. Además, a diferencia de ADA1, ADA2 tiene un óptimo de pH ácido.

La disminución de la acumulación de adenosina específica del tumor en el MET es una opción terapéutica atractiva para tratar tumores y cánceres. En la presente memoria se encuentra que las formas recombinantes de ADA2 se pueden administrar a un sujeto para atacar selectivamente el MET, donde puede disminuir los niveles de adenosina

extracelular desaminando adenosina a inosina, revertiendo así el efecto inmunosupresor de la adenosina. En particular, ADA2 es una adenosina desaminasa extracelular adaptada para altas concentraciones de adenosina. Como se comentó anteriormente, la adenosina se produce activamente en el MET, y las regiones del MET pueden tener una concentración de adenosina hasta aproximadamente 100 veces mayor que otros entornos de tejido.

5 Debido al sub-bolsillo hidrófobo para la unión del sustrato, comentado más adelante, la  $K_m$  de ADA2 para la adenosina es aproximadamente 100 veces mayor que la de ADA1. La tasa de recambio ( $k_{cat}$ ), sin embargo, es similar a la de ADA1. Debido a que ADA2 tiene una tasa de recambio similar pero una afinidad más baja a la adenosina, puede ser específicamente activa en entornos con altas concentraciones de adenosina, tales como el MET o el sitio de inflamación, sin afectar el metabolismo de la adenosina en microentornos normales que tienen

10 concentraciones más bajas de adenosina.

Los resultados en la presente memoria demuestran que ADA2 recombinante se dirige selectivamente al entorno tumoral. Además, los resultados proporcionados en la presente memoria confirman que la adenosina media la inmunosupresión en las células T y las células NK, y que esta supresión puede revertirse mediante la administración de adenosina desaminasa 2 (ADA2). La actividad selectiva de ADA2 para disminuir los niveles de adenosina en el MET puede limitar los efectos secundarios no deseados o no deseados, que pueden ocurrir si la actividad de ADA2 fuera más ubicua. Por ejemplo, muchas terapias tumorales existentes son limitadas debido a que pueden provocar efectos secundarios adversos en el sujeto debido a la falta de especificidad o selectividad. El uso de ADA2, o variantes o productos conjugados de las mismas, en los métodos proporcionados en la presente memoria puede dar

15 como resultado menos efectos secundarios indeseables o de menor importancia y/o exhibir una mejora de la eficacia en virtud de la capacidad de una dosis mayor.

Por lo tanto, ADA2 ofrece ventajas en comparación con ADA1. Además de las diferencias en la afinidad de unión por adenosina que permite el uso de ADA2 como una molécula selectiva dirigida al tumor, ADA1 tampoco está adaptada para su uso en un entorno extracelular. Por ejemplo, ADA1 es principalmente intracelular *in vivo* y es sustancialmente menos estable en el entorno extracelular, por ejemplo, en el plasma, como se muestra en los resultados proporcionados en la presente memoria. Por el contrario, ADA2 muestra una mayor estabilidad en el entorno extracelular debido a la extensa glicosilación que protege la molécula de la proteólisis en el entorno extracelular y a los enlaces disulfuro conservados. ADA2 también es sustancialmente más estable a temperaturas más altas en comparación con ADA1 (Daddona y Kelley (1981) *Biochim. Biophys Acta* 658:280-290). En la presente memoria se encuentra que ADA2 tiene una mayor estabilidad térmica, y que ADA2 también es más estable que ADA1 en entornos extracelulares, tales como el plasma.

25

30

ADA2 también muestra una actividad óptima en entornos que se encuentran comúnmente en el MET, tales como los entornos que tienen un pH ácido. Por ejemplo, el pH óptimo de ADA2 de tipo salvaje es aproximadamente pH 6,5, mientras que es pH 7,5 para ADA1. El MET es un microentorno complejo dentro y alrededor del tumor que está formado por diversos tipos de células y condiciones extracelulares. El MET comúnmente tiene regiones donde el ambiente extracelular es ácido, causado por el ácido láctico y otros metabolitos ácidos producidos por la glucólisis anaerobia en condiciones hipóxicas del tumor (Kato et al. (2013) *Cancer Cell International* 13:89).

35

40

Además, ADA2 también supera otros problemas encontrados con los agentes terapéuticos existentes, incluidos los que se dirigen a la adenosina. Por ejemplo, dado que la adenosina tiene múltiples receptores, es difícil elegir como diana la adenosina empleando un anticuerpo anti-ADR, ya que los cuatro receptores de ADR están presentes en el MET y pueden ser activados por la adenosina. Por lo tanto, la elección como diana de un solo receptor no lograría la atenuación completa de la actividad de inmunomodulación de la adenosina.

45

Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan variantes y/o productos conjugados de las mismas para su uso en métodos de tratamiento que emplean cualquier ADA2, por ejemplo, ADA2 humana recombinante (rHuADA2) o variantes y/o productos conjugados de las mismas, para el tratamiento de enfermedades o afecciones, tales como un cáncer o un tumor y otras enfermedades o afecciones que implican la producción aberrante o acumulada de adenosina. También se proporcionan en la presente memoria variantes de ADA2 y formas modificadas que poseen propiedades alteradas, tales como disminución de la unión a heparina, mayor eficacia catalítica, mayor estabilidad, alteración del estado de glicosilación y/u óptimo de pH alterado. Cualquiera de las proteínas ADA2 se puede emplear en los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria. También se describen en la presente memoria métodos de terapia combinada que emplean cualquier ADA2 y otros agentes inmunomoduladores, agentes quimioterapéuticos, inhibidores del punto de control inmunitario o enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble o hialuronidasa soluble conjugada con polímero (p. ej. PEGPH20).

50

55

## 60 C. ADENOSINA DESAMINASA 2 (ADA2) Y VARIANTES DE LA MISMA

En la presente memoria se proporcionan variantes y/o productos conjugados de ADA2 u otras formas modificadas de la misma para su uso en métodos de tratamiento que emplean una adenosina desaminasa 2 (ADA2), incluidas variantes y/o productos conjugados de ADA2 u otras formas modificadas de la misma. También se proporcionan en



la presente memoria variantes de ADA2 con propiedades alteradas. ADA2 se puede emplear para regular los niveles de adenosina en entornos donde se necesita la regulación de la inmunomodulación dependiente de adenosina u otra actividad dependiente de adenosina, como en un microentorno tumoral o para la inflamación.

## 5 1. Estructura y actividad de ADA2

Las adenosinas desaminasas son enzimas que convierten la adenosina en inosina. Existen tres ADA conocidas: ADA1, ADA2 y ADA3, aunque no se conoce la actividad de ADA3. Con respecto a las proteínas con actividad adenosina desaminasa conocida, los seres humanos tienen ADA2 y ADA1, mientras que, en las moscas, los homólogos de ADA2 (conocidos como homólogos de ADGF) son las únicas enzimas adenosina desaminasa activas, y los roedores solo tienen ADA1, lo que indica que las dos proteínas tienen funciones coincidentes, pero también distintas. Las funciones distintas se relacionan con la diferencia en la expresión, la ubicación celular y las propiedades cinéticas de la actividad enzimática, la diferencia en otras características estructurales, así como el factor de crecimiento adicional y las propiedades de unión a heparina (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285: 12367-12377).

ADA1 y ADA2 son estructuralmente similares y exhiben un mecanismo catalítico compartido para convertir adenosina en inosina, pero exhiben poca similitud de secuencia. ADA2 tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, que codifica una proteína de 511 aminoácidos, expuesta en SEQ ID NO: 2, que contiene una secuencia señal (correspondiente a los residuos de aminoácido 1-29 de SEQ ID NO: 2). La ADA2 madura es una proteína secretada que carece de la secuencia señal y tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5. La ADA1 tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 11, que codifica una proteína de 363 aminoácidos que no contiene una secuencia señal, y tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12. El residuo de metionina N-terminal se escinde, dando como resultado la proteína madura de 362 aminoácidos, expuesta en SEC ID NO: 66.

Como se analiza con más detalle a continuación, en comparación con ADA1, ADA2 es considerablemente más larga e incluye una extensión de 80-100 aminoácidos en el extremo N que está implicado en la dimerización y la unión a glicosaminoglicano (p. ej. heparina) (Maier et al. (2005) Mol Evol 61:776-794). La ADA2 también tiene un supuesto dominio de unión al receptor (PRB) adicional que se informa que media la unión a los receptores de la superficie celular y/o contribuye a su factor de crecimiento u otras funciones de señalización. Asimismo, a diferencia de ADA1, ADA2 es dimerica y secretada, mientras que ADA1 es monomérica y en gran parte intracelular. La ADA2 también está ampliamente glicosilada y tiene un enlace disulfuro conservado. Las características estructurales y funcionales de ADA2 ofrecen ventajas como molécula terapéutica, que incluyen, entre otras, mayor estabilidad y mayor selectividad tumoral.

### a. Estructura de ADA2

La ADA2, también conocido como factor de crecimiento derivado de células dendríticas (DCDGF) o factor de crecimiento de adenosina desaminasa (ADGF), es un miembro de la familia de proteínas ADGF de adenosina. La ADA2 se encuentra solo en eucariotas, y principalmente en organismos multicelulares. En contraste, ADA1 se encuentra tanto en procariotas como en eucariotas. En particular, los homólogos ADA2/ADGF han sido caracterizado en insectos y otros vertebrados tales como *Xenopus laevis*, así como en seres humanos. Las proteínas de la familia ADGF en insectos se identificaron inicialmente como proteínas que tienen actividad de factor de crecimiento, y después se descubrió que también poseen actividad adenosina desaminasa.

En seres humanos, ADA2 está codificada por el gen del gen 1 de la región crítica del síndrome del ojo de gato (CECR1) (Riaz et al. (2000) Genomics 64:277-285). El gen CECR1 humano (secuencia de nucleótidos de la región codificante expuesta en SEQ ID NO: 1) codifica una proteína precursora de 511 aminoácidos (secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2; Núm. de Acceso Uniprot Q9NZK5). La ADA2 tiene una secuencia de señal de 29 residuos N-terminal (posiciones 1-29 de residuos de aminoácido de SEQ ID NO: 2) que se escinde después del transporte al RE para formar la proteína madura de 482 aminoácidos (secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5). La proteína ADA2 madura existe como un homodímero debido a interacciones no polares entre dos cadenas de polipéptidos. También se ha informado sobre otras secuencias de ADA2 humana, véase p. ej. Patente de Estados Unidos Núm. 5.968.780 (forma precursora SEQ ID NO: 376 y forma madura SEQ ID NO: 380), Núm. de Acc. NCBI BAG369969.1 (forma precursora SEQ ID NO: 377 y forma madura SEQ ID NO: 381); Núm. Acc. NCBI AAF65941 (forma precursora SEQ ID NO: 378 y forma madura SEQ ID NO: 382); y Núm. Acc. NCBI AAH51755 (forma precursora SEQ ID NO: 379 y forma madura SEQ ID NO: 383). Una segunda isoforma no canónica, formada por un empalme alternativo del ARNm, codifica una proteína más corta de 270 aminoácidos (secuencia expuesta en SEQ ID NO: 68; Núm. de Acceso Uniprot Q9NZK5-2), sin los 241 aminoácidos N terminales y que contiene una secuencia de 10 aminoácidos en el extremo N termina que es diferente de la isoforma canónica.

Los ejemplos de homólogos de ADA2 en otras especies incluyen, entre otros, ADA2 de *Pan troglodytes* (chimpancé; forma precursora SEQ ID NO: 286, forma madura SEQ ID NO: 326; Núm. Acc. NCBI XP\_003317127.1); *Gorilla*

5 *gorilla* (gorila; forma precursora SEQ ID NO: 287, forma madura SEQ ID NO: 327; Núm. Acc. NCBI XP\_004063024.1); *Pan paniscus* (chimpancé pigmeo; forma precursora SEQ ID NO: 288, forma madura SEQ ID NO: 328; Núm. Acc. NCBI XP\_003828345.1); *Pongo abelii* (Orangután de Sumatra; forma precursora SEQ ID NO: 289, forma madura de SEQ ID NO: 329; Núm. Acc. NCBI NP\_001125360.1); *Nomascus leucogenys* (Gibón de mejillas blancas septentrional; forma precursora SEQ ID NO: 290, forma madura SEQ ID NO: 330; Núm. Acc. NCBI XP\_004088517.1); *Macaca fascicularis* (macaco comedor de cangrejos; forma precursora SEQ ID NO: 291, forma madura SEQ ID NO: 331; Núm. Acc. NCBI XP\_005568111.1); *Chlorocebus sabaeus* (mono verde; forma precursora SEQ ID NO: 292, forma madura SEQ ID NO: 332; Núm. Acc. NCBI XP\_007972990.1); *Macaca mulatta* (Macaco rhesus; forma precursora SEQ ID NO: 293, 337, forma madura SEQ ID NO: 333, 340; Núm. Acc. GenBank AFH32795.1, EHH20002.1); *Callithrix jacchus* (tití; forma precursora SEQ ID NO: 294, 374, forma madura SEQ ID NO: 334, 375; Núm. Acc. NCBI XP\_009004591.1, XP\_009004586.1); *Xenopus laevis* (rana africana de uñas; forma precursora SEQ ID NO: 295, forma madura SEQ ID NO: 335; Núm. Acc. NCBI NP\_001090531.1); *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta; forma precursora SEQ ID NO: 296-300, forma madura SEQ ID NO: 336, 338, 339; AAL40913.1, AAL40920.1, AAL40911.1, AAL40912.1 y AAL40910.1); *Bombyx mori* (polilla de la seda; forma precursora SEQ ID NO: 301, forma madura SEQ ID NO: 341; Núm. Acc. NCBI NP\_001098698.1); y *Sarcophaga perigrina* (mosca de la carne; forma precursora SEQ ID NO: 302, forma madura SEQ ID NO: 342; GenBank Acc. Núm. BAA11812.1).

20 La organización del dominio de ADA2 es descrita por Zavialov et al. (2010) en J. Biol. Chem 285:12367-12377. La ADA2 contiene un dominio ADA central o dominio catalítico que constituye más de 70% de la secuencia de aminoácidos, y es estructuralmente similar al dominio ADA en ADA1. En el monómero, el dominio ADA se pliega en ocho cadenas de barriles paralelos  $\alpha/\beta$ , que rodean un bolsillo central profundo que es el sitio activo. Además, el dominio ADA también contiene tres hélices adicionales ubicadas entre la cadena  $\beta$ 1 y la hélice  $\alpha$ 1 (designadas H1, H2 y H3) y dos hélices adicionales en el extremo C terminal (designadas H4 y H5). El dominio ADA está contenido en la región correspondiente a los residuos 106-502 de la ADA2 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2 (correspondiente a los residuos 77-473 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5). En la región ADA, ADA2 contiene inserciones de residuos de aminoácido en comparación con ADA1, incluidos los residuos que conforman el supuesto dominio de unión al receptor (PRB) (que se analiza a continuación) y que no están implicados en la función catalítica de ADA2. El dominio ADA no tiene una alta homología de secuencia con la de ADA1 (18-21% de residuos idénticos), pero los dos dominios ADA tienen una alta similitud estructural. La Tabla 4 resume los residuos en el sitio activo implicados en la unión al sustrato y la catálisis.

Tabla 4	
Residuo (la numeración del precursor se expone en SEQ ID NO: 2)	Sitio activo
112	coordinación con $Zn^{2+}$ , catalítico
114	coordinación con $Zn^{2+}$ , catalítico
115	unión al sustrato
116	unión al sustrato
204	unión al sustrato
207	unión al sustrato
208	unión al sustrato
211	unión al sustrato
293	unión al sustrato
325	unión al sustrato
326	unión al sustrato
356	coordinación con $Zn^{2+}$ , catalítico
359	donador de protones del sitio activo, unión al sustrato
384	aceptor de protones del sitio activo, unión al sustrato
415	unión al sustrato
441	coordinación con $Zn^{2+}$ , catalítico, unión al

Tabla 4	
Residuo (la numeración del precursor se expone en SEQ ID NO: 2)	Sitio activo
	sustrato
442	unión al sustrato

Basándose en la estructura cristalina como informan Zavialov et al. (2010) en J. Biol. Chem 285:12367-12377 de ADA2 con coformicina (CF), un inhibidor del estado de transición que imita el intermedio tetraédrico en la posición C6 de adenina, se han identificado residuos implicados en la unión al sustrato. Estos incluyen los residuos D115, I116, W204, F207, E208, F211, H293, V325, G326, E359, H384, L415, D441 y D442 de la ADA2 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2 (correspondientes a los residuos D86, 187, W175, F178, E179, F182, H254, V296, G297, E330, H355, L386, D412 y D413 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5). Aunque las características estructurales del sitio catalítico son similares entre ADA2 y ADA1, el sub-bolsillo hidrófobo que se une al sustrato en el dominio ADA de ADA2 es más abierto y contiene menos residuos hidrófobos. Estas diferencias podrían explicar la menor afinidad de ADA2 por la adenosina.

ADA2 es una hidrolasa dependiente de zinc que requiere coordinación con un zinc unido para la actividad, que actúa como un potente electrófilo que activa el agua atacante a un ion hidróxido. Los residuos de aminoácido H112, H114, H356 y D441 de la ADA2 precursora expuestas en SEQ ID NO: 2 (correspondientes a H83, H85, H327, D412 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) están implicados en la coordinación del centro activo de zinc. Durante la catálisis, el Zn<sup>++</sup> promueve el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico por el átomo de oxígeno de una molécula de agua en el sitio activo. La combinación de E359, H384 y D441 de la ADA2 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2 (correspondiente a E330, H355 y D412 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) participa como ligandos de zinc. H384 y D441 sitúan el agua de ataque, E359 es el residuo donador de protones catalítico del sitio activo que facilita la reacción extrayendo un protón de la molécula de agua de ataque, y H384 sirve como aceptor de protones. Los residuos del sitio activo catalítico reflejan estructuralmente los residuos del sitio activo correspondientes de ADA1, lo que indica que el mecanismo catalítico es similar entre las dos adenosina desaminasas (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377).

La ADA2 activa existe como un homodímero. La dimerización de ADA2 está mediada por residuos en las hélices  $\alpha$  N-terminales de ADA2 designadas HN1, HN2, HN3 y HN4 (correspondientes a los residuos 29-105 de la ADA2 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2, o los residuos 1-76 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5), así como residuos en la hélice  $\alpha$  C-terminal designada H5 (correspondiente a los residuos 503-511 de la ADA2 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2 o los residuos 474-482 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5). Debido a que estas regiones son responsables de más de 70% de la interacción no polar entre subunidades, se denominan dominio de dimerización. La primera hélice N-terminal, HN1, forma un ancla de hélice debido a las interacciones iónicas entre los residuos R34 y E41 (residuos R5 y E12 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) con D373 y H391 (residuos D344 y H362 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) de la subunidad vecina, e interacciones hidrófobas entre los residuos 130, T33, L37, L38, K40 y M44 (residuos I1, T4, L8, L9, K11 y M15 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) con los residuos en la subunidad vecina. Se forma un bolsillo de unión hidrófoba con los residuos M71, A74, M75, L78 y F80, que acomoda el residuo W336 (residuos M42, A45, M46, L49 y F51 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) de la subunidad vecina.

La ADA1, que no forma un dímero, no contiene los residuos que conforman el "dominio de dimerización". Asimismo, en comparación con ADA1, el residuo W336 en ADA2 se inserta en una región del sitio activo entre  $\beta$ 5 y  $\alpha$ 5, donde contribuye indirectamente a la actividad catalítica debido a su participación en la dimerización. La sustitución W336G da como resultado una molécula ADA2 que se disocia parcialmente en monómeros, y que exhibe una alteración de la actividad catalítica (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285: 12367-12377). Además de afectar a la actividad enzimática completa, la dimerización también está implicada en la secreción de ADA2. La supresión de los aminoácidos T33 y E41 (correspondientes a T4 y E12 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) anula la secreción de ADA2 al medio de cultivo (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285: 12367-12377).

La ADA2 se une a los glicosaminoglicanos (GAG), incluida la heparina y sus análogos, tales como el heparán sulfato y el condroitín sulfato. La dimerización de proteínas da como resultado una gran superficie altamente cargada positivamente en la interfaz del dímero, que forma el sitio de unión a GAG (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377). En particular, el sitio de unión a GAG implica residuos de aminoácido cerca de las posiciones I30-R45, S389-T396 y R422-T428 de la ADA2 precursora (correspondiente a I1-R16, S360-T367 y R393-T399 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5). La interacción con los GAG parece desempeñar un papel en la estabilización del dímero de ADA2.

La ADA2 tiene una secuencia de inserción dentro del dominio catalítico, designado supuesto dominio de unión al receptor (PRB), que se informa que corresponde a los residuos 127-185 o 134-177 de la ADA2 precursora expuesta

en SEQ ID NO: 2 (posiciones 98-156 o 105-148, respectivamente, de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5). El dominio PRB se pliega en un dominio similar a la quimiocina formado por un pliegue  $\alpha$  y  $\beta$  compuesto de una lámina  $\beta$  antiparalela de tres hebras rodeada de hélices  $\alpha$  en un lado y un bucle rico en prolina en el otro lado. Un enlace disulfuro entre las posiciones 137 y 159 de la ADA2 precursora (posiciones 108 y 130 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5) está presente en el dominio PRB, que se requiere para la secreción de ADA2 y la estabilidad estructural. La estructura cristalina de ADA2 muestra que el PRB, aunque no está implicado en la función catalítica de ADA2, se encuentra en la parte superior del dominio adenosina desaminasa (ADA) en el borde del sitio activo. Cuando ADA2 se dimeriza, los dos dominios PRB en el dímero están presentes en el mismo lado del dímero, y podrían unirse a los receptores diméricos o inducir la dimerización del receptor (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377; Zavialov et al. (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290). La ADA2 se une a los receptores de adenosina (ADR) que son receptores diméricos. El dominio PRB está implicado en su actividad del factor de crecimiento a través de la actividad de unión al receptor (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377; Zavialov et al. (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290). Por lo tanto, la eliminación o modificación de este dominio puede reducir, atenuar o eliminar esta actividad.

La ADA2 tiene cuatro (4) sitios de glicosilación ligados a N nativos, en N127, N174, N185 y N378 de la ADA2 precursora (correspondiente a N98, N145, N156 y N349 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5). Tres sitios de N-glicosilación están presentes en el dominio PRB, en N127, N174 y N185, y uno está presente en el lado opuesto de la molécula, en N378. Las cadenas de oligosacáridos ubicadas en tres caras diferentes de la molécula ADA2 protegen la enzima contra la proteólisis en el entorno extracelular, proporcionando una mayor estabilidad (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377).

#### b. Actividades de ADA2

La ADA2 tiene varias actividades. ADA2 tiene actividad adenosina desaminasa (ADA), que cataliza las reacciones de adenosina a inosina (adenosina +  $H_2O$  = inosina +  $NH_3$ ) y 2'-desoxiadenosina a 2'-desoxiinosina (2'-desoxiadenosina +  $H_2O$  = 2'-desoxiinosina +  $NH_3$ ). La coformicina y la 2'-desoxicoformicina son inhibidores potentes de ADA1 y ADA2. Sin embargo, debido a las diferencias en el bolsillo de unión al sustrato, el inhibidor (+)-eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) inhibe selectivamente ADA1, pero no inhibe ADA2. Además, las diferencias en el bolsillo de unión del sustrato explican las diferencias en la afinidad de unión al sustrato entre ADA1 y ADA2. Por ejemplo, mientras que los valores de  $k_{cat}$  de la adenosina son similares debido a la alta similitud estructural de los residuos catalíticos en ADA2 y ADA1, la  $K_m$  para adenosina son diferentes. La  $K_m$  de ADA2 para la adenosina es aproximadamente 2,25 mM. Debido a que la ADA2 tiene un sub-bolsillo hidrófobo para la unión del sustrato, la afinidad de ADA2 por los sustratos es diferente de la de ADA1. La  $K_m$  de ADA2 para adenosina es aproximadamente 100 veces mayor que la de ADA1, que es aproximadamente 0,1 mM.

El pH óptimo para la actividad de ADA2 es un pH de alrededor de 6,5, y su actividad disminuye a un pH superior a 7,0. Por el contrario, el pH óptimo para ADA1 es un pH de alrededor de 7,5. Las diferentes afinidades por el sustrato y el óptimo de pH indican que ADA2 está adaptada a microentornos específicos y cumple funciones coincidentes pero diferentes en la regulación de la concentración y señalización de adenosina (Zavialov et al. (2005) Biochem. J. 391:51-57). El óptimo de pH ácido para ADA2 y el requerimiento de una alta concentración de adenosina indican que ADA2 puede ser un entorno activo específico, tal como sitios de inflamación o tumores, donde la concentración de adenosina es elevada y el pH es más bajo. En el microentorno tumoral, las células tumorales pueden sufrir una glucólisis extensa debido al ambiente hipóxico, y el microentorno extracelular se vuelve ácido (pH 6,5-6,9) en ciertas regiones.

En seres humanos, la ADA2 se expresa ampliamente, con expresión más abundante en corazón, pulmón, linfoblastos y placenta de adulto, así como en pulmón, hígado y riñón fetales. ADA2 también se detecta en el plasma sanguíneo a nivel de proteína. La mayoría de la actividad de ADA en suero o plasma humano normal es de ADA2 (Neidzwicki y Aberneth (1991) Biochemical Pharmacology 41:1615-1624). La ADA2 es secretada por las células activadas, incluidos los monocitos activados y otras células inmunitarias, y en un grado más limitado, por los linfocitos no estimulados (Iwaki-Egawa et al. (2006) Biol. Chem 387:319-321). Las células inmunitarias, tales como los monocitos, se activan en sitios inflamatorios y tumores, donde se acumula la adenosina desaminasa extracelular (Sitkovsky et al. (2004) Annu. Rev. Immunol. 22:657-682). La ADA2 podría estar implicada en la regulación de los niveles de adenosina en estos entornos específicos (Zavialov et al. (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290). Por ejemplo, ADA2 podría funcionar para reducir el nivel de adenosina en entornos con altas concentraciones de adenosina, tales como sitios de inflamación o microentorno tumoral con afección hipóxica.

La actividad de ADA2 es elevada en el plasma de pacientes que padecen enfermedades hepáticas, tales como hepatitis crónica y cirrosis, SIDA, leucemia de células T en adultos, leucemia linfoblástica aguda, tuberculosis y diabetes mellitus. (Zavialov et al. (2005) Biochem. J. 391:51-57). Además, los niveles de ADA2 son elevados en el derrame pleural de tuberculosis en infecciones por *Tuberculosis micobacteriana* (MTB) recientes (Valdez) o en leishmaniasis visceral (Tripathi et al., Clinica Chimica Acta 388 (2008) 135-138). El derrame pleural de la infección por MTB contiene una gran cantidad de macrófagos y células CD4+, lo que indica que la secreción de ADA2 por los

macrófagos podría modular la respuesta inmunitaria durante la infección por MTB (Zavialov et al. (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290).

La ADA2 se une a la superficie celular a través de proteoglicanos GAG (p. ej., heparina) y ADR. Los análogos de heparina tales como el proteoglicano heparán sulfato (HSPG) y los proteoglicanos que contienen condroitin sulfato (CS) están presentes en la superficie celular y están implicados en la localización de proteínas y la señalización celular. La ADA2 se puede unir a varios tipos de células a través de estos análogos de heparina, y la unión es más estrecha con un sulfato de heparina más sulfatado que con heparina menos sulfatada, lo que indica que la unión implica una interacción iónica profunda. A diferencia de ADA2, ADA1 no se une a la heparina (Zavialov et al. (2005) Biochem. J. 391:51-57, Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377).

Además de los análogos de heparina que contienen proteoglicanos, el dímero de ADA2 se une a los receptores de adenosina (ADR), que funcionan como dímeros (Zavialov et al. (2005) Biochem. J. 391:51-57, Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377). Se informa de que ADA2 interactúa con las células para mediar en la actividad del factor de crecimiento. La ADA2 también se puede unir directamente a algunos receptores de adenosina diméricos, estimular la proliferación de células T CD4 activadas por monocitos independientemente de su actividad catalítica, inducir la diferenciación de monocitos dependiente de células T en macrófagos y estimular la proliferación de macrófagos. Por ejemplo, ADA2 aumenta la tasa de proliferación de células T CD4 activadas por monocitos independientemente de su actividad catalítica, e induce la diferenciación de monocitos dependiente de células T en macrófagos y estimula la proliferación de macrófagos (Zavialov et al. (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290).

Los defectos o deficiencias en ADA2 se han asociado con un aumento de la inflamación vascular y la vasculopatía, en particular asociadas con la poliarteritis nodosa o el síndrome de Sneddon (Zhou et al. (2014) N. Engl. J. Med 370:911-920; Navon Elkan et al. (2014) N. Engl. J. Med 370:921-931; Garg et al. (2014) Eur. J. Pediatr 173: 827-830; Bras et al. (2014) New Ing. J. Med., 371:479-48; Belot et al. (2014) Pediatric Rheumatology 12:44). Por ejemplo, la vasculitis está asociada con mutaciones recesivas en el gen que codifica ADA2 caracterizado por mutaciones G47A, G47R, G47V, A109D, H112Q, V119A, G142S, R169Q, P193L, P251L, W264S, Y453C con referencia a la ADA2 precursora expuesta en SEQ ID NO: 2 (Navon Elkan et al. (2014) N. Engl. J. Med 370:921-931; Zhou et al. (2014) N. Engl. J. Med 370:911-920; Bras et al. (2014) New Ing. J. Med., 371:479-480).

## 2. Variantes de ADA2

En la presente memoria se proporcionan variantes o mutantes de ADA2, de acuerdo con las presentes reivindicaciones, que contienen un polipéptido que contiene una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, cambios en la secuencia de aminoácidos) en comparación con una ADA2 de referencia o no modificada. Las modificaciones pueden estar en cualquier polipéptido de ADA2 de referencia o no modificado, siempre que la ADA2 de referencia no contenga el cambio de aminoácido en la posición o posiciones modificadas. Por ejemplo, la modificación o las modificaciones pueden estar en un polipéptido de ADA2 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 5 o 326-336, 338-342, 375 o 380-383, un fragmento catalíticamente activo de la misma o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con cualquiera de SEC ID NO: 5 o 326-336, 338-342, 375 o 380-383 o un fragmento catalíticamente activo de la misma, pero no contiene la modificación o las modificaciones.

En ejemplos concretos, las modificaciones están en un polipéptido de ADA2 expuesto en SEC ID NO: 5, un fragmento catalíticamente activo del mismo o en una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEC ID NO: 5 o un fragmento catalíticamente activo de la misma pero que no contiene las modificaciones. Por ejemplo, las modificaciones pueden estar en una ADA2 que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383. Las modificaciones también pueden estar en una porción catalíticamente activa de SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, una ADA2 catalíticamente activa puede ser una que carece de todo o una parte del dominio PRB, tales como las expuestas en cualquiera de SEQ ID NO: 548-550 o 579. En ejemplos concretos, las modificaciones están en una ADA2 humana que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

En los ejemplos de un polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria, la ADA2 variante no tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en ninguno de SEC ID NO: 1, 5, 68, 286-302, 326-342 o 374-383. Además, en los ejemplos de la presente memoria, el polipéptido de ADA2 variante no contiene modificaciones que son delección R8-K14del→-- o que son un reemplazo de aminoácidos H7R, G18A, G18R, G18V, I64T, A80D, H83Q, V90A, C108G, H121R, W133G, R140Q, K141R, P164L, P222L, W235S, H306R, E330G, W333G, V365L, Y424C, F464S, con numeración con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

La ADA2 variante puede ser un monómero o un dímero, tal como un heterodímero o un homodímero. Los polipéptidos ADA2 variantes proporcionados en la presente memoria exhiben actividad adenosina desaminasa para

catalizar la conversión de adenosina en inosina. Se entiende que dicha actividad se exhibe cuando el polipéptido de ADA2 variante está en forma activa, como cuando está presente como un dímero. Típicamente, dicha actividad está presente cuando la ADA2 está en forma de dímero. Por lo tanto, cualquiera de las variantes proporcionadas en la presente memoria se puede emplear para regular los niveles de adenosina en entornos donde se necesita la regulación de la inmunomodulación dependiente de adenosina u otra actividad dependiente de adenosina, por ejemplo, en un microentorno tumoral o para inflamación. Por lo tanto, cualquiera de las variantes proporcionadas en la presente memoria se puede emplear en métodos de tratamiento de tumores o cáncer como se describe en la presente memoria.

5 Cuando está en forma activa, tal como cuando está en forma de dímero, la ADA2 variante que contiene el polipéptido de ADA2 variante puede exhibir de aproximadamente 50% a 500%, tal como aproximadamente 50% a 400%, 50% a 300%, 50% a 200%, 50% a 150%, 50% a 100%, 50% a 80%, 80% a 400%, 80% a 300%, 80% a 200%, 80% a 150%, 80% a 100%, 100% a 400%, 100% a 300%, 100% a 200% o 100% a 150% de la actividad adenosina desaminasa en comparación con la forma correspondiente del polipéptido de ADA2 que no contiene la modificación o las modificaciones (es decir, la ADA2 no modificada), tal como un homodímero de ADA2 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383 o un fragmento catalíticamente activo del mismo. Por ejemplo, cuando está en forma activa, como cuando está en forma de dímero, la ADA2 variante que contiene el polipéptido de ADA2 variante puede exhibir al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260 %, 270%, 280%, 290%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más de la actividad adenosina desaminasa en comparación con la forma correspondiente del polipéptido de ADA2 que no contiene la modificación o las modificaciones (es decir, la ADA2 no modificada), tal como un homodímero de ADA2 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383 o un fragmento catalíticamente activo del mismo. Típicamente, una ADA2 variante que contiene un polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria, cuando está en forma de dímero, retiene la actividad adenosina desaminasa de la forma correspondiente del homodímero de ADA2 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o un fragmento catalíticamente activo del mismo, de modo que la ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, exhibe al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300 %, 350%, 400%, 450%, 500% o más de la actividad adenosina desaminasa del homodímero de ADA2 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 de un fragmento catalíticamente activo del mismo.

Típicamente, la eficacia catalítica o  $k_{cat}/K_M$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) de la ADA2 variante que contiene un polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria es de al menos 5.000, generalmente es de, o es de aproximadamente,  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^3$  a  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^3$  a  $8 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  a  $8 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^4$  a  $8 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  a  $8 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  a  $5 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$   $M^{-1}s^{-1}$ . Por ejemplo, la ADA2 variante que contiene un polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria tiene una eficacia catalítica de  $k_{cat}/K_M$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) de al menos  $5 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ , o mayor, o  $6 \times 10^5$ ,  $7 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$   $m^{-1}s^{-1}$  o mayor.

El polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria puede contener reemplazos de aminoácidos (es decir, sustituciones), adiciones (es decir, inserciones), delecciones, truncamientos o combinaciones de los mismos. La ADA2 variante puede contener modificaciones en cualquier región o dominio de un polipéptido de ADA2, siempre que la ADA2 variante resultante, cuando esté en forma activa, por ejemplo, como un dímero, al menos conserve la actividad adenosina desaminasa. Para los fines de la presente memoria, la referencia a la modificación o las modificaciones en un polipéptido de ADA2 se refiere a los residuos del polipéptido de ADA2 maduro expuestos en SEQ ID NO: 5. Los reemplazos de aminoácidos se pueden realizar en los residuos correspondientes de cualquier polipéptido de ADA2 o fragmento catalíticamente activo del mismo, incluido en cualquier polipéptido de ADA2 o polipéptido de ADA2 variante conocido en la técnica. Los residuos correspondientes se pueden identificar mediante alineamiento con el polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 5 (véase, por ejemplo, la Figura 1, Tabla 1). También se hace referencia en toda la solicitud y en los ejemplos de numeración basados en Zavialov (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377), que se basa en la numeración de los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 4. Véase la Tabla 1, que establece los números de posición correspondientes de la numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4) y la numeración de ADA2 madura (SEQ ID NO: 5).

Para conservar la actividad adenosina desaminasa, las modificaciones generalmente no se encuentran en aquellas posiciones que son menos tolerantes al cambio. Tales posiciones pueden estar dentro de dominios o regiones que

se requieren para la actividad catalítica, la unión del sustrato y/o la dimerización. Por ejemplo, tales posiciones incluyen regiones que están altamente conservadas, tales como los residuos requeridos para la coordinación de zinc o los residuos del sitio activo. Un experto en la técnica conoce o puede identificar fácilmente los residuos de aminoácido que se requieren para la actividad y que no deben cambiarse. Además, en algunos casos, si hay una modificación en estas posiciones, generalmente es una sustitución conservativa de aminoácidos. Un experto en la técnica entiende que las sustituciones conservativas de aminoácidos, tales como las proporcionadas en la Tabla 3, se pueden emplear para reducir la probabilidad de una modificación que dé como resultado una reducción de la actividad.

Las proteínas ADA2 variantes proporcionadas en la presente memoria pueden contener una subunidad de polipéptido que exhibe al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptido del polipéptido de ADA2 no modificado o de referencia, tales como las expuestas en cualquiera de SEC ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383, o un fragmento catalíticamente activo de la misma. En particular, las proteínas ADA2 variantes proporcionadas en la presente memoria contienen una subunidad de polipéptido que exhibe al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptido expuesta en SEQ ID NO: 5 o un fragmento catalíticamente activo de la misma. Las proteínas ADA2 variantes descritas en la presente memoria pueden contener una subunidad de polipéptido que puede contener al menos o aproximadamente o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de polipéptidos del polipéptido de ADA2 no modificado o de referencia. Se entiende que cuando está presente como un dímero o multímero, la ADA2 variante puede contener al menos o aproximadamente o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 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, 69, 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, 100 o más modificaciones de aminoácidos.

Para los propósitos en la presente memoria, los reemplazos de aminoácidos se denotan por el aminoácido reemplazado, la posición del aminoácido y el aminoácido de reemplazo (p. ej. K11A mediante la numeración madura, que representa que el aminoácido en una posición correspondiente al residuo de aminoácido 11 en SEQ ID NO: 5, p. ej. lisina, se reemplaza por alanina). Para los fines de la presente memoria, los reemplazos de aminoácidos también pueden denotarse por el aminoácido reemplazado, la posición del aminoácido y el aminoácido de reemplazo. (p. ej. K14A mediante la numeración de Zavialov, que representa que el aminoácido en una posición correspondiente al residuo de aminoácido 14 en SEC ID NO: 4, p. ej. lisina, se reemplaza por alanina). Véase la Tabla 1, que establece los números de posición correspondientes de la numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4) y la numeración madura de ADA2 (SEQ ID NO: 5). La nomenclatura también se emplea en la presente memoria para representar la inserción (---> seguida de la posición de inserción) o la eliminación (p. ej., la posición de delección (del) seguida de -->) de un residuo de aminoácido en una posición correspondiente en SEQ ID NO: 5, mediante la numeración madura, y/o por SEQ ID NO: 4, mediante la numeración de Zavialov. Por ejemplo, ---> N1 mediante la numeración madura significa que el residuo en la posición 1 se inserta en comparación con la secuencia correspondiente de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, --> N4 mediante la numeración de Zavialov significa que el residuo en la posición 4 se inserta en comparación con la secuencia correspondiente de ADA2 expuesta en SEQ ID NO: 4. Se entiende que, en algunos casos, debido a delecciones o inserciones de residuos de aminoácido, la numeración de residuos en un polipéptido de ADA2 variante se altera en comparación con la numeración de residuos expuesta en SEQ ID NO: 5. En tales casos, está dentro del nivel de un experto en la técnica identificar los residuos en el polipéptido de ADA2 variante correspondiente que corresponden a los residuos en SEQ ID NO: 5, por ejemplo mediante alineamiento como se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, la numeración de los residuos en un polipéptido de ADA2 variante se puede numerar según Zavialov (Zavialov et al. (2010) J. Biol. Chem 285:12367-12377), que se basa en la numeración de los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 4. Véase la Tabla 1, que establece los números de posición correspondientes de la numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4) y la numeración madura de ADA2 (SEQ ID NO: 5).

Las modificaciones ilustrativas en un polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria se describen con más detalle a continuación. La ADA2 variante proporcionada en la presente memoria incluye aquellas que, cuando están en forma activa, exhiben actividades o propiedades alteradas o mejoradas en comparación con la forma correspondiente de la ADA2 de referencia o de tipo salvaje que no contiene las modificaciones (es decir, la ADA2 no modificada). Por ejemplo, la ADA2 variante proporcionada en la presente memoria incluye aquellas que, cuando están en forma activa, exhiben una alteración o mejora de las actividades o propiedades en comparación con la forma correspondiente de una ADA2 no modificada que contiene un polipéptido de ADA2 que tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85% de secuencia identidad con SEQ ID NO: 5 o un fragmento catalíticamente activo de la misma, tales como las expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383, o un fragmento catalíticamente activo de las mismas. En particular, las modificaciones proporcionadas en la presente memoria pueden afectar una o más actividades entre el aumento de la actividad adenosina desaminasa, la atenuación de la unión a la heparina, el aumento de la semivida, la alteración del óptimo de pH, el aumento de la

estabilidad térmica, la reducción de la unión al receptor o la hiperglicosilación en comparación con la forma correspondiente de la ADA2 que no contiene las modificaciones (es decir, la ADA2 no modificada).

5 En particular, la forma activa es la forma de dímero, tal como la forma de homodímero, que contiene el polipéptido de ADA2 variante. Por lo tanto, en los ejemplos de la presente memoria, las proteínas ADA2 variantes que contienen un polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria, cuando están en forma de dímero, muestran actividades o propiedades alteradas o mejoradas en comparación con la forma de dímero correspondiente de la ADA2 de referencia o de tipo salvaje que no contiene las modificaciones. Por ejemplo, la ADA2 variante proporcionada en la presente memoria incluye aquellas que, cuando están en forma de dímero, exhiben actividades o propiedades alteradas o mejoradas en comparación con la forma de dímero correspondiente de una ADA2 no modificada que contiene un polipéptido ADA1 que tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85% identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 o un fragmento catalíticamente activo de la misma, tales como las expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383, o una porción catalíticamente activa de la misma. Por ejemplo, se proporcionan ADA2 variantes que contienen un polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria que, cuando está en forma de dímero, exhibe actividades o propiedades alteradas o mejoradas en comparación con el homodímero de ADA2 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o un fragmento catalíticamente activo de la mismas. En particular, las modificaciones proporcionadas en la presente memoria pueden afectar una o más actividades entre el aumento de la actividad adenosina desaminasa, la atenuación de la unión a heparina, el aumento de la semivida, la alteración del óptimo de pH, el aumento de la estabilidad térmica, la reducción de la unión al receptor o la hiperglicosilación en comparación con la forma correspondiente de la ADA2 que no contiene las modificaciones (es decir, la ADA2 no modificada).

Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan proteínas ADA2 variantes que, cuando están en forma activa, tal como en forma de dímero, exhiben una mayor actividad adenosina desaminasa. Por ejemplo, la proteína ADA2 variante, cuando está en forma activa, tal como en forma de dímero, puede exhibir al menos 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más actividad que la forma correspondiente de la ADA2 no modificada, en donde la actividad adenosina desaminasa se evalúa en las mismas condiciones. La eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de una ADA2 variante que exhibe una mayor actividad adenosina desaminasa es al menos, o al menos aproximadamente, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10,0 veces mayor o más, o 11,0 veces, 12,0 veces, 13,0 veces, 14,0 veces, 15,0 veces mayor o más en comparación con la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de la forma correspondiente de la ADA2 no modificada, en la que la eficacia catalítica de la actividad adenosina desaminasa se evalúa en las mismas condiciones. Por ejemplo, cuando está en forma de dímero, la ADA2 variante proporcionada en la presente memoria exhibe una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que es al menos  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o mayor, o  $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o mayor.

40 En los ejemplos de la presente memoria, se proporcionan proteínas ADA2 variantes que, cuando están en forma activa, tal como en forma de dímero, exhiben una reducción de la unión a uno o más receptores de adenosina (ADR) seleccionados entre  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ , y típicamente uno o ambos de  $A_{2A}$  o  $A_{2B}$ . Sin desear estar limitados por la teoría, se contempla en la presente memoria que la actividad de la actividad adenosina desaminasa proporcionada en la presente memoria para convertir la adenosina en inosina es mayor o más eficaz si se reduce la unión de ADA2 a un ADR. Por ejemplo, en la presente memoria se proporciona la ADA2 variante, cuando está en forma activa, tal como forma de dímero, en la que la unión a uno o más ADR se reduce al menos o al menos aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o mayor en comparación con la forma correspondiente de la ADA2 no modificada.

50 En los ejemplos de la presente memoria, se proporcionan en la presente memoria proteínas ADA2 variantes que, cuando están en forma activa, tal como forma de dímero, exhiben una reducción o atenuación de la unión a heparina. La ADA2 se une a los glicosaminoglicanos (GAG), incluida la heparina y sus análogos, tales como el heparán sulfato y el condroitín sulfato. La unión de alta afinidad a heparina/GAG está mediada por una superficie grande, altamente cargada positivamente en la interfaz del dímero, y la dimerización de ADA2 forma el sitio de unión a heparina. Debido a que el glicosaminoglicano está ampliamente presente en todo el organismo, podría interactuar con la ADA2 administrada y actuar como un sumidero periférico. Por lo tanto, una ADA2 con reducción de la unión a heparina puede aumentar la biodisponibilidad y la farmacocinética de la ADA2 administrada. Por ejemplo, las variantes de ADA2 con atenuación de la unión a heparina que se proporcionan en la presente memoria, dan como resultado una biodisponibilidad y farmacocinética mejoradas, tal como un aumento de la semivida, cuando se administran, debido a que las moléculas de ADA2 administradas no serán secuestradas en el sumidero periférico mediante la unión a los GAG. En particular, en la presente memoria se proporcionan proteínas ADA2 variantes que, cuando están en forma activa, tal como en forma de dímero, no exhiben más de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90 %, 95% de la unión a heparina de la forma correspondiente de la ADA2 no modificada, en donde la unión a heparina se evalúa en



las mismas condiciones.

En los ejemplos de la presente memoria, se proporcionan proteínas ADA2 variantes que, cuando están en forma activa, tal como forma de dímero, exhiben un aumento o prolongación de la semivida ( $t_{1/2}$ ) en plasma o suero. Por ejemplo, la ADA2 variante proporcionada en la presente memoria, cuando está en forma activa, tal como en forma de dímero, exhibe una semivida que es al menos o al menos aproximadamente 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800% o más, o 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%, 1600%, 1700%, 1800%, 1900%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 6000%, 7000%, 8000%, 9000%, 10000% o más larga que la semivida de la forma correspondiente de la ADA2 no modificada, en donde la semivida se evalúa bajo las mismas condiciones.

En los ejemplos de la presente memoria, se proporcionan proteínas ADA2 variantes que, cuando están en forma activa, tal como en forma de dímero, exhiben un aumento de la estabilidad térmica. Por ejemplo, cuando está en forma activa, tal como en forma de dímero, la ADA2 variante proporcionada en la presente memoria exhibe estabilidad térmica con una temperatura de fusión ( $T_m$ ) que aumenta al menos, o al menos aproximadamente, 0,5°C, 1,0°C, 2,0°C, 3,0°C, 4,0°C, 5,0°C, 6,0°C, 7,0°C, 8,0°C, 9,0°C, 10,0°C o más en comparación con la  $T_m$  de la forma correspondiente de la ADA2 no modificada, en donde  $T_m$  se evalúa bajo las mismas condiciones. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la ADA2 variante, cuando está en forma activa, tal como en forma de dímero, proporcionada en la presente memoria puede ser al menos o al menos aproximadamente 67,6°C, 67,8°C, 68,0°C, 68,2°C, 68,4°C, 68,6°C, 68,8°C, 69,0°C, 69,2°C, 69,4°C, 69,6°C, 69,8°C, 70,0°C, 70,2°C, 70,4°C, 70,6°C, 70,8°C, 71,0°C, 71,2°C, 71,4°C, 71,6°C, 71,8°C o más.

En los ejemplos de la presente memoria, la actividad adenosina desaminasa de ADA2 o variantes se puede exhibir a un óptimo de pH de, o de aproximadamente, pH 6,0 a pH 7,6, tal como un pH de al menos pH 6, 6,25, 6,5, 6,75, 7, 7,25 o 7,5. Por ejemplo, la ADA2 tiene un óptimo de pH de, o de aproximadamente, pH 6,5 ± 0,2. Las proteínas ADA2 variantes proporcionadas en la presente memoria pueden exhibir un óptimo de pH para la actividad adenosina desaminasa de, o de aproximadamente pH 6,0 a 6,8, tal como un pH de, o de aproximadamente, 6,5 ± 0,2. En algunos casos, la ADA2 variante exhibe una alteración del óptimo de pH y la actividad catalítica puede exhibirse a un pH más alto que es de, o de aproximadamente, pH 6,8 a pH 7,6, tal como de, o de aproximadamente, pH 7,0 a pH 7,5 o pH 7,2 a pH 7,4, cada uno incluido. Dado que la proliferación de tejido cerca de los vasos sanguíneos en el MET puede tener un pH más neutro, tales variantes podrían ser más activas en entornos tumorales particulares. Por ejemplo, la ADA2 variante puede exhibir un óptimo de pH para la actividad adenosina desaminasa de al menos pH 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 o superior.

Basándose en esta descripción, está dentro del nivel de un experto en la técnica generar una ADA2 variante que contenga una o más de las modificaciones descritas, y probar cada actividad adenosina desaminasa y/o una o más propiedades entre la unión a heparina, la semivida, el óptimo de pH, la estabilidad térmica, la unión al receptor y/o la glicosilación como se describe en la presente memoria.

#### 40 a. Modificaciones Ilustrativas

##### i. Reemplazos de Aminoácidos

En un ejemplo, la modificación o las modificaciones pueden ser un reemplazo de aminoácidos. En la presente memoria se proporcionan polipéptidos ADA2 variantes de acuerdo con las reivindicaciones que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de ADA2 en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 11, 13, 20, 22, 26, 86, 109, 118, 119, 124, 133, 139, 179, 183, 191, 217, 219, 221, 224, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 o 470, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, el reemplazo de aminoácidos puede estar en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido K11, K13, R20, V22, K26, D86, F109, R118, F119, P124, W133, Y139, E179, F183, Y191, R217, R219, L221, Y224, K258, S262, H264, S266, K267, R277, R283, V296, K309, K317, K321, R352, R366, K371, K372, D373, 1374, T403, G404, H405, P406, R441, K444, K452, K461, K469 o K470, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos ADA2 variantes de acuerdo con las reivindicaciones que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de ADA2 que es uno o más de: K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, F109S, F109A, R118D, R118A, F119S, F119K, P124A, P124S, W133S, W133T, Y139T, Y139A, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179Y, F183K, Y191S, Y191D, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S,

5 L221T, L221V, L221W, L221Y, Y224R, Y224N, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H264S, H264T, H264V, H264W, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D, y K470E, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

15 En particular, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos ADA2 variantes de acuerdo con las reivindicaciones que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de ADA2 que son uno o más de: K11A, K11E, R20A, R20D, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E y K452E, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos ADA2 variantes de acuerdo con las reivindicaciones que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de ADA2 que son uno o más de: K11A, K11E, R20A, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366E, K371A, K371D, K371E, K372D, K372E, K452D y K452E, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5. En otro ejemplo, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos ADA2 variantes de acuerdo con las reivindicaciones que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de ADA2 que son uno o más de R20A, R20D, R20E, S262N, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E y K452E, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5. En los ejemplos, se proporcionan en la presente memoria polipéptidos ADA2 variantes de acuerdo con las reivindicaciones que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de ADA2 que son uno o más de K11A, R20A, R20E, R219Q, S262N, K371A, K371D o K371E, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

35 También se describen en la presente memoria polipéptidos ADA2 variantes que contienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reemplazos de aminoácidos en comparación al polipéptido de ADA2 de referencia que no contiene las modificaciones (es decir, la ADA2 no modificada). Los polipéptidos ADA2 variantes pueden contener dos o más reemplazos de aminoácidos proporcionados anteriormente, siempre que la ADA2 variante resultante muestre o conserve la actividad adenosina desaminasa. Los dos o más reemplazos de aminoácidos pueden conferir la misma alteración de la actividad o una alteración de la actividad diferente. Por ejemplo, un reemplazo de aminoácidos puede conferir una alteración de la unión a heparina y el otro puede conferir una mayor actividad adenosina desaminasa. Por lo tanto, las variantes de polipéptido de ADA2 resultantes exhiben alteración de dos o más actividades o propiedades.

45 Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos ADA2 variantes que contienen reemplazos de aminoácidos S262N/K371D; S262N/K371E; S262N/R20E; S262N/R20E/K371D; S262N/R20E/K371E; R219Q/K371E; R219Q/K371D; R219Q/R20E; R219Q/K371E/R20E; R219Q/K371D/R20E; R219Q/S262N/K371E; R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E; R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; o R219Q/S262N, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

50 Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos ADA2 variantes que contienen reemplazos de aminoácidos S262N/K371D; S262N/K371E; S262N/R20E; S262N/R20E/K371D; S262N/R20E/K371E; R219Q/K371E; R219Q/K371D; R219Q/R20E; R219Q/K371E/R20E; R219Q/K371D/R20E; R219Q/S262N/K371E; R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E; R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; o R219Q/S262N, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

Son ilustrativos de tales polipéptidos ADA2 variantes cualquiera de los expuestos en cualquiera de SEC ID NO: 13-63 o 71-273, o una porción catalíticamente activa de los mismos.

60 En otros ejemplos, también se proporcionan en la presente memoria polipéptidos ADA2 variantes que contienen reemplazos de aminoácidos R219Q/S262N/K11A; R219Q/S262N/K11D; R219Q/S262N/K11E; R219Q/S262N/K13A; R219Q/S262N/K13D; R219Q/S262N/K13E; R219Q/S262N/K371A; R219Q/S262N/K372A; R219Q/S262N/K372D; R219Q/S262N/K372E; R219Q/S262N/K452A; R219Q/S262N/K452D; R219Q/S262N/K452E; R219Q/S262N/R20A; R219Q/S262N/R20D; R219Q/S262N/R366A; R219Q/S262N/R366D; R219Q/S262N/R366E; R219Q/S262N/H264A;

R219Q/S262N/H264Q; R219Q/S262N/H264N; R219Q/S262N/H264G; R219K/S262N; R219N/S262N;  
 R219A/S262N; R219Q/S262N/L221A; R219Q/S262N/L221V; R219Q/S262N/L221G; R219Q/S262N/E179D;  
 R219Q/S262N/E179A; R219Q/S262N/E179S; R219Q/S262N/E179T; R219Q/S262N/E179V; R219Q/S262N/E179G;  
 R219Q/S262A; R219Q/S262V; R219Q/S262M; R219Q/S262N/K11A/R20A; R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A;  
 5 R219Q/S262N/R20A/K371A; R219Q/S262N/K11A/K371A; R219Q/S262N/K26A; R219Q/S262N/K26D;  
 R219Q/S262N/K26E; R219Q/S262N/R217A; R219Q/S262N/R217D; R219Q/S262N/R217E; R219Q/S262N/K258A;  
 R219Q/S262N/K258D; R219Q/S262N/K258E; R219Q/S262N/R277A; R219Q/S262N/R277D; R219Q/S262N/R277E;  
 R219Q/S262N/R283A; R219Q/S262N/R283D; R219Q/S262N/R283E; R219Q/S262N/K309A; R219Q/S262N/K309D;  
 R219Q/S262N/K309E; R219Q/S262N/K317A; R219Q/S262N/K317D; R219Q/S262N/K317E; R219Q/S262N/K321A;  
 10 R219Q/S262N/K321D; R219Q/S262N/K321E; R219Q/S262N/R352A; R219Q/S262N/R352D; R219Q/S262N/R352E;  
 R219Q/S262N/R441A; R219Q/S262N/R441D; R219Q/S262N/R441E; R219Q/S262N/K444A; R219Q/S262N/K444D;  
 R219Q/S262N/K444E; R219Q/S262N/K461A; R219Q/S262N/K461D; R219Q/S262N/K461E; R219Q/S262N/K469A;  
 R219Q/S262N/K469D; R219Q/S262N/K469E; R219Q/S262N/K470A; R219Q/S262N/K470D; R219Q/S262N/K470E;  
 15 R219Q/S262N/D86A; R219Q/S262N/D86C; R219Q/S262N/D86E; R219Q/S262N/D86F; R219Q/S262N/D86G;  
 R219Q/S262N/D86H; R219Q/S262N/D86I; R219Q/S262N/D86K; R219Q/S262N/D86L; R219Q/S262N/D86M;  
 R219Q/S262N/D86N; R219Q/S262N/D86P; R219Q/S262N/D86Q; R219Q/S262N/D86R; R219Q/S262N/D86S;  
 R219Q/S262N/D86T; R219Q/S262N/D86V; R219Q/S262N/D86W; R219Q/S262N/D86Y; R219Q/S262N/E179C;  
 R219Q/S262N/E179F; R219Q/S262N/E179H; R219Q/S262N/E179I; R219Q/S262N/E179K; R219Q/S262N/E179L;  
 R219Q/S262N/E179M; R219Q/S262N/E179N; R219Q/S262N/E179P; R219Q/S262N/E179Q; R219Q/S262N/E179R;  
 20 R219Q/S262N/E179W; R219Q/S262N/E179Y; R219C/S262N; R219D/S262N; R219E/S262N; R219F/S262N;  
 R219G/S262N; R219H/S262N; R219I/S262N; R219L/S262N; R219M/S262N; R219P/S262N; R219S/S262N;  
 R219T/S262N; R219V/S262N; R219W/S262N; R219Y/S262N; R219Q/S262N/L221C; R219Q/S262N/L221D;  
 R219Q/S262N/L221E; R219Q/S262N/L221F; R219Q/S262N/L221H; R219Q/S262N/L221I; R219Q/S262N/L221K;  
 R219Q/S262N/L221M; R219Q/S262N/L221N; R219Q/S262N/L221P; R219Q/S262N/L221Q; R219Q/S262N/L221R;  
 25 R219Q/S262N/L221S; R219Q/S262N/L221T; R219Q/S262N/L221W; R219Q/S262N/L221Y; R219Q/S262C;  
 R219Q/S262D; R219Q/S262E; R219Q/S262F; R219Q/S262G; R219Q/S262H; R219Q/S262I; R219Q/S262K;  
 R219Q/S262L; R219Q/S262P; R219Q/S262Q; R219Q/S262R; R219Q/S262T; R219Q/S262W; R219Q/S262Y;  
 R219Q/S262N/H264C; R219Q/S262N/H264D; R219Q/S262N/H264E; R219Q/S262N/H264F; R219Q/S262N/H264I;  
 R219Q/S262N/H264K; R219Q/S262N/H264L; R219Q/S262N/H264M; R219Q/S262N/H264P; R219Q/S262N/H264R;  
 30 R219Q/S262N/H264S; R219Q/S262N/H264T; R219Q/S262N/H264V; R219Q/S262N/H264W; R219Q/S262N/H264Y;  
 R219Q/S262N/S266A; R219Q/S262N/S266C; R219Q/S262N/S266D; R219Q/S262N/S266E; R219Q/S262N/S266F;  
 R219Q/S262N/S266G; R219Q/S262N/S266H; R219Q/S262N/S266I; R219Q/S262N/S266K; R219Q/S262N/S266L;  
 R219Q/S262N/S266M; R219Q/S262N/S266N; R219Q/S262N/S266P; R219Q/S262N/S266Q; R219Q/S262N/S266R;  
 R219Q/S262N/S266T; R219Q/S262N/S266V; R219Q/S262N/S266W; R219Q/S262N/S266Y; R219Q/S262N/K267A;  
 35 R219Q/S262N/K267C; R219Q/S262N/K267D; R219Q/S262N/K267E; R219Q/S262N/K267F; R219Q/S262N/K267G;  
 R219Q/S262N/K267H; R219Q/S262N/K267I; R219Q/S262N/K267L; R219Q/S262N/K267M; R219Q/S262N/K267N;  
 R219Q/S262N/K267P; R219Q/S262N/K267Q; R219Q/S262N/K267R; R219Q/S262N/K267S; R219Q/S262N/K267T;  
 R219Q/S262N/K267V; R219Q/S262N/K267W; R219Q/S262N/K267Y; R219Q/S262N/V296A; R219Q/S262N/V296C;  
 R219Q/S262N/V296D; R219Q/S262N/V296E; R219Q/S262N/V296F; R219Q/S262N/V296G; R219Q/S262N/V296H;  
 40 R219Q/S262N/V296I; R219Q/S262N/V296K; R219Q/S262N/V296L; R219Q/S262N/V296M; R219Q/S262N/V296N;  
 R219Q/S262N/V296P; R219Q/S262N/V296Q; R219Q/S262N/V296R; R219Q/S262N/V296S; R219Q/S262N/V296T;  
 R219Q/S262N/V296W; R219Q/S262N/V296Y; R219Q/K11A/R20A; R219Q/K11A/R20A/K371A;  
 R219Q/R20A/K371A; R219Q/K11A/K371A; S262N/K11A/R20A; S262N/K11A/R20A/K371A; S262N/R20A/K371A; o  
 S262N/K11A/K371A, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en  
 45 SEQ ID NO: 5.

Son ilustrativos de dichos polipéptidos ADA2 variantes cualquiera de los expuestos en cualquiera de SEC ID NO: 659-663 o 682-917, o una porción catalíticamente activa de los mismos.

## 50 ii) Modificaciones del dominio PRB

En otros ejemplos, también se proporcionan en la presente memoria polipéptidos ADA2 modificados que contienen  
 un dominio PRB modificado. El dominio PRB no es necesario para la actividad catalítica, y, por lo tanto, como se  
 muestra en la presente memoria, se puede eliminar de las proteínas variantes de ADA2 de manera que actividades  
 55 distintas de la actividad desaminasa se reduzcan o eliminen. De acuerdo con la organización de dominio referida de  
 ADA2, el dominio PRB corresponde a los residuos 98-156 o 105-148 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO:  
 5. Las modificaciones del dominio PRB pueden incluir la eliminación de todo o una parte del dominio PRB (es decir,  
 la delección de uno o más residuos del dominio PRB), la inserción de uno o más residuos de aminoácido en el  
 dominio PRB, el reemplazo de aminoácidos de uno o más residuos del dominio PRB o una combinación de los  
 60 mismos para de ese modo reducir o inhibir la unión del dominio a un receptor u otra actividad del mismo. Por  
 ejemplo, el dominio PRB puede contener hasta, o aproximadamente, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,  
 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46,  
 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 o 59 posiciones modificadas, tal como generalmente hasta 1, 2, 3, 4, 5,  
 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37,

38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44 posiciones modificadas.

En un ejemplo, como se describe con más detalle a continuación, se puede suprimir todo o una parte del dominio PRB, tal como mediante la delección de uno o más residuos de aminoácido contiguos del dominio PRB. Por ejemplo, en la presente memoria se proporciona la ADA2 variante en la que uno o más residuos de aminoácido contiguos entre, o aproximadamente entre, los residuos de aminoácido 98 y 156 o los residuos de aminoácido 105 y 148 o los residuos de aminoácido 105 y 147 o los residuos de aminoácido 99 y 144, inclusive, con referencia a los residuos expuestos en SEQ ID NO: 5, se suprimen. Un ejemplo de dichos polipéptidos ADA2 es la delección de residuos de aminoácido contiguos correspondientes a los residuos contiguos 98-156, 105-148, 105-147, 102-147 o 108-150, mediante la numeración madura, con referencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, los polipéptidos de ADA2 ilustrativos incluyen los polipéptidos ADA2\_del98-156 (98-156del; SEQ ID NO: 548); ADA2\_del105-148 (105-148del; SEQ ID NO: 549); ADA2\_del105-147 (105-147del; SEQ ID NO: 550); y ADA2\_del99-144 (99-144del; SEQ ID NO: 579), mediante la numeración madura, con referencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

En algunos ejemplos, la ADA2 variante que contiene una modificación en el dominio PRB, tal como una delección de residuos contiguos, también contiene una sustitución de la región modificada o suprimida con un conector peptídico. Como resultado, todo o una parte del dominio PRB se puede reemplazar por una secuencia conectora peptídica estéricamente aceptable. En tales ejemplos, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o todos los aminoácidos contiguos más del dominio PRB se pueden sustituir o reemplazar por aminoácidos de un conector peptídico que generalmente no supera los 60 aminoácidos ácidos, y generalmente no supera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos. Se puede seleccionar cualquier conector adecuado siempre que la ADA2 variante resultante exhiba actividad adenosina desaminasa.

Los ejemplos de conectores peptídicos incluyen, pero no se limitan a: (Gly)<sub>n</sub>, donde n es de 2 a 20 (SEQ ID NO:368); -Gly-Gly-; GGG (SEQ ID NO:369); GGGG (SEQ ID NO:362); GGGGG (SEQ ID NO:360); GGGGGG (SEQ ID NO:370); GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:371); GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:372); GGGGS o (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:343); GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:580); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:367); SSSSG o (SSSSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:344); GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:345); GGSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:346); GSTSGSGKSSSESGSTKG (SEQ ID NO:347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:348); EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:349); o AlaAlaProAla o (AlaAlaProAla)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:350), donde n es de 1 a 6, tal como 1, 2, 3, o 4. En ejemplos concretos, el conector peptídico es GGG (SEQ ID NO:369); GGGGG (SEQ ID NO:360); GGGGGGG (SEQ ID NO:370); GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:371); GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:372); GGGGS (SEQ ID NO:343); GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:580); o GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:367).

Son ilustrativas de tal modificación una ADA2 variante designada C105\_T147delins(G)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 280), donde n es de 2 a 20, por lo que el dominio PRB en la región correspondiente a los residuos 105-147 con referencia a la numeración en SEQ ID NO: 5 se reemplaza por un conector de glicina de 2 a 20 residuos aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la ADA2 variante puede ser C105\_T147delins(G)<sub>15</sub> (SEQ ID NO: 281); C105\_T147delins(G)<sub>10</sub> (SEQ ID NO: 282); C105\_T147delins(G)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 283); C105\_T147delins(G)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 284) o C105\_T147delins(G)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 285). Otros ejemplos de tal modificación es una ADA variante designada V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 581), donde n es 1 a 5, por lo que el dominio PRB en la región correspondiente a los residuos 99-144 con referencia a la numeración en SEQ ID NO: 5 se reemplaza por un conector (GGGGS)<sub>n</sub> donde la secuencia de aminoácidos en el conector se repite de 1 a 5 veces, de modo que el conector tiene una longitud de 5, 10, 15, 20 o 25 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, la ADA2 variante puede ser V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 583); V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 584); o V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 585). Otros ejemplos de tal modificación es una ADA variante designada C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 582), donde n es 1 a 5, por lo que el dominio PRB en la región correspondiente a los residuos 105-147 con referencia a la numeración en SEQ ID NO: 5 se reemplaza por un conector (GGGGS)<sub>n</sub> donde la secuencia de aminoácidos en el conector se repite de 1 a 5 veces, de modo que el conector tiene una longitud de 5, 10, 15, 20 o 25 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, la ADA2 variante puede ser C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 586); C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 587); o C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 588), mediante la numeración madura, con referencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5. Son ilustrativos de tales polipéptidos ADA2 cualquiera de los expuestos en cualquiera de SEC ID NO: 281-285 y 583-588, o una porción catalíticamente activa de los mismos.

También se proporcionan en la presente memoria polipéptidos ADA2 variantes que contienen delecciones, inserciones, sustituciones y/o reemplazos de aminoácidos en el dominio PRB, combinados con otras delecciones, inserciones, sustituciones y/o reemplazos de aminoácidos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, en la presente memoria se describen polipéptidos ADA2 variantes que contienen una delección de todo o una parte del dominio PRB, tal como mediante la eliminación de uno o más residuos de aminoácido contiguos del dominio PRB,

combinada con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reemplazos de aminoácidos adicionales en comparación con la ADA2 de referencia no modificada. También se describen en la presente memoria variantes de polipéptidos ADA2 que contienen una modificación en el dominio PRB, tal como una delección de residuos contiguos y también contienen una sustitución de la región modificada o suprimida por un conector peptídico, combinada con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reemplazos de aminoácidos adicionales en comparación con la ADA2 de referencia no modificada. Por ejemplo, los polipéptidos de ADA2 variante que contienen tanto una delección de todo o parte del dominio PRB tal como uno o más reemplazos de aminoácidos proporcionados anteriormente, siempre que la ADA2 variante resultante exhiba o conserve la actividad adenosina desaminasa. La delección y/o los reemplazos de aminoácidos pueden conferir la misma alteración de la actividad o una alteración de la actividad diferente. Por ejemplo, la delección y/o sustitución del dominio PRB puede conferir una alteración de la actividad, por ejemplo, la reducción en la unión a un receptor, y los reemplazos de aminoácidos pueden conferir una mayor actividad adenosina desaminasa. Por lo tanto, las variantes de polipéptido de ADA2 resultantes exhiben alteración de dos o más actividades o propiedades.

Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos de ADA2 variantes que contienen la siguiente combinación de delecciones y/o sustituciones y/o reemplazos de aminoácidos:  
 R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>;  
 R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>;  
 R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>;  
 R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>;  
 R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>;  
 R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub> (donde n es 2 a 20); R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub> (donde n es 1 a 5); R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub> (donde n es 1 a 5); R219Q/S262N/N98\_N156del; R219Q/S262N/C105\_E148del; R219Q/S262N/C105\_T147del; R219Q/S262N/V99\_Q144del;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins→(G)<sub>n</sub> (donde n es 2 a 20); R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>;  
 R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub> (donde n es 1 a 5);  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub> (donde n es 1 a 5); R219Q/S262N/K371D/N98\_N156del;  
 R219Q/S262N/K371D/C105\_E148del; R219Q/S262N/K371D/C105\_T147del; R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144del;  
 R219Q/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub> (donde n es 2 a 20); R219Q/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub> (donde n es 1 a 5);  
 R219Q/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub> (donde n es 1 a 5); R219Q/N98\_N156del; R219Q/C105\_E148del; R219Q/C105\_T147del; R219Q/V99\_Q144del;  
 S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub> (donde n es 2 a 20); S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub> (donde n es 1 a 5);  
 S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub> (donde n es 1 a 5); S262N/N98\_N156del; S262N/C105\_E148del;  
 S262N/C105\_T147del; y S262N/V99\_Q144del, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

Son ilustrativos de tales polipéptidos de ADA2 variantes cualquiera de los expuestos en cualquiera de SEC ID NO: 589-594, 602-606, 634-658, 664-681, 918-931, o una porción catalíticamente activa de los mismos.

### 45 **iii) Reemplazos de Aminoácidos con Alteración de la Interacción entre el Dominio PRB y Otras regiones de ADA2**

En otros ejemplos más, también se describen en la presente memoria polipéptidos de ADA2 modificados que contienen reemplazos de aminoácidos que confieren una alteración de la interacción entre el dominio PRB y el resto de ADA2 (p. ej., el dominio adenosina desaminasa (ADA)). Por ejemplo, de acuerdo con la organización del dominio referida de ADA2, el dominio PRB corresponde a los residuos 98-156 o 105-148 de la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5. En la presente memoria se describen polipéptidos de ADA2 variantes que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de ADA2 en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 109, 118, 119, 124, 133, 139, 183, 191 o 224, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, el reemplazo de aminoácidos puede estar en una posición de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido F109, R118, F119, P124, W133, Y139, F183, Y191 o Y224 con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5. Las modificaciones en cada posición, o combinación de ellas, pueden alterar la interacción entre el dominio PRB y otros dominios en ADA2, tal como el dominio ADA.

Por ejemplo, en la presente memoria se describen variantes de polipéptidos de ADA2 que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en un polipéptido de ADA2 que es uno cualquiera o más de: F109S, F109A, R118D, R118A, F119S, F119K, P124A, P124S, W133S, W133T, Y139T, Y139A, F183K, Y191S, Y191D, Y224R o Y224N, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

También se describen en la presente memoria polipéptidos de ADA2 variantes que contienen reemplazos de aminoácidos que confieren una alteración de la interacción entre el dominio PRB y el resto de ADA2, combinados con otras deleciones, inserciones, sustituciones y/o reemplazos de aminoácidos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, se proporcionan polipéptidos de ADA2 variantes que contienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reemplazos de aminoácidos en comparación con el polipéptido de ADA2 de referencia que no contiene las modificaciones (es decir, la ADA2 no modificada). Los polipéptidos de ADA2 variantes pueden contener dos o más reemplazos de aminoácidos proporcionados anteriormente, siempre que la ADA2 variante resultante muestre o conserve la actividad adenosina desaminasa. Los dos o más reemplazos de aminoácidos pueden conferir la misma actividad alterada o una actividad alterada diferente. Por ejemplo, un reemplazo de aminoácidos puede conferir una alteración de la interacción entre el dominio PRB y el dominio ADA, y el otro puede conferir una mayor actividad adenosina desaminasa. Por lo tanto, las variantes de polipéptido de ADA2 resultantes exhiben la alteración de dos o más actividades o propiedades.

Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos de ADA2 variantes que contienen los reemplazos de aminoácidos R219Q/S262N/F119S; R219Q/S262N/F119K; R219Q/S262N/Y224R; R219Q/S262N/Y224N; R219Q/S262N/Y191S; R219Q/S262N/Y191D; R219Q/S262N/F183K; R219Q/S262N/Y191D/Y224R; R219Q/S262N/F109S; R219Q/S262N/F109A; R219Q/S262N/R118D; R219Q/S262N/R118A; R219Q/S262N/Y139T; R219Q/S262N/Y139A; R219Q/S262N/W133S; R219Q/S262N/W133T; R219Q/S262N/P124A; o R219Q/S262N/P124S, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

Son ilustrativos de tales polipéptidos de ADA2 variantes cualquiera de los expuestos en cualquiera de SEC ID NO: 561-578 o 616-633, o una porción catalíticamente activa de los mismos.

#### iv. Hiperglicosilación

Se incluyen entre la ADA2 variante proporcionada en la presente memoria aquellas que se han modificado alterando el nivel y/o tipo de glicosilación en comparación con una ADA2 no modificada. La glicosilación se puede aumentar o disminuir en comparación con el polipéptido de ADA2 no modificado. En algunos casos, el nivel o la extensión de la glicosilación aumenta, lo que da como resultado un polipéptido o proteína ADA2 hiperglicosilado. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de al menos un sitio de glicosilación no nativo que no se encuentra en el polipéptido o proteína ADA2 no modificados a los que se conecta un carbohidrato. Los polipéptidos de ADA2 hiperglicosilados también pueden generarse mediante la conexión de un radical carbohidrato a al menos un sitio de glicosilación nativo encontrado, pero no glicosilado en el polipéptido de ADA2 no modificado.

Las proteínas ADA2 variantes proporcionadas en la presente memoria pueden contener alteraciones, tales como la nueva glicosilación ligada a O, la glicosilación ligada a N o la glicosilación ligada a O y ligada a N. En algunos ejemplos, una ADA2 variante incluye 1, 2, 3, 4, 5 o más radicales carbohidrato, cada uno conectado a diferentes sitios de glicosilación. El sitio o los sitios de glicosilación pueden ser uno o varios sitios de glicosilación nativos y/o uno o varios sitios de glicosilación no nativos. En algunos ejemplos, la ADA2 variante se glicosila en más de un sitio de glicosilación no nativo. Por ejemplo, una ADA2 variante se puede modificar para introducir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de glicosilación no nativos.

Los sitios de glicosilación no nativos se pueden introducir mediante reemplazo de aminoácidos. Los sitios de O-glicosilación se pueden crear, por ejemplo, mediante el reemplazo de aminoácidos de un residuo nativo por una serina o treonina. Los sitios de glicosilación ligados a N se pueden crear creando el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia consenso mediante modificación de aminoácidos puede implicar el reemplazo de un residuo de aminoácido nativo por una asparragina, el reemplazo de un residuo de aminoácido nativo por una serina, treonina o cisteína, o el reemplazo de un residuo de aminoácido nativo por una asparragina y reemplazo de un residuo de aminoácido nativo por una serina, treonina o cisteína. Los sitios de glicosilación no nativos se pueden crear en cualquier región en un polipéptido de ADA2. El nivel de glicosilación (p. ej., el número de sitios de glicosilación no nativos introducidos) se puede incrementar en al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con el nivel de glicosilación de la forma correspondiente de la ADA2 no modificada o de tipo salvaje.

Las modificaciones ilustrativas proporcionadas en la presente memoria incluyen la introducción de un sitio de glicosilación no nativo mediante modificación con uno o más reemplazos de aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a, reemplazo con: N en una posición correspondiente a la posición 20 y S en una posición correspondiente a la posición 22; N en una posición correspondiente a la posición 371 y S en una posición correspondiente a la posición 373; N en una posición correspondiente a la posición 372 y S en una posición correspondiente a la posición 374; N en una posición correspondiente a la posición 403 y S en una posición correspondiente a la posición 405; y N en una posición correspondiente a la posición 404 y S en una posición correspondiente a la posición 406, cada uno mediante la numeración madura, con referencia a las posiciones expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, los

reemplazos de aminoácidos para introducir un sitio de glicosilación no nativo pueden incluir: R20N/V22S; K371N/D373S; K372N/I374S; T403N/H405S; o G404N/P406S, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.

- 5 En otros ejemplos, las modificaciones proporcionadas en la presente memoria incluyen la introducción de un sitio de glicosilación no nativo mediante modificación con uno o más reemplazos de aminoácidos en o cerca del dominio PRB. Las modificaciones ilustrativas incluyen la introducción de un sitio de glicosilación no nativo mediante modificación con uno o más reemplazos de aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a, reemplazo con:
- 10 N en una posición correspondiente a la posición 125 y A en una posición correspondiente a la posición 126; N en una posición correspondiente a la posición 127 y S en una posición correspondiente a la posición 129; N en una posición correspondiente a la posición 126 y T en una posición correspondiente a la posición 128; N en una posición correspondiente a la posición 112 y T en una posición correspondiente a la posición 114; N en una posición correspondiente a la posición 134, C en una posición correspondiente a la posición 135 y T en una posición correspondiente a la posición 136; N en una posición correspondiente a la posición 134, S en una posición correspondiente a la posición 135 y T en una posición correspondiente a la posición 136; N en una posición correspondiente a la posición 142 y S en una posición correspondiente a la posición 144; N en una posición correspondiente a la posición 137 y T en una posición correspondiente a la posición 139; N en una posición correspondiente a la posición 111 y S en una posición correspondiente a la posición 113, cada uno mediante la numeración madura, con referencia a las posiciones expuestas en SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, los reemplazos de aminoácidos para introducir un sitio de glicosilación no nativo en o cerca del dominio PRB pueden incluir: R125N/P126A; S127N/K129S; P126N/E128T; R112N/I114T; I134N/L135C/L136T; I134N/L135S/L136T; R142N/Q144S; E137N/Y139T; o P111N/G113S, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.
- 20
- 25 En otros ejemplos, también se proporcionan en la presente memoria polipéptidos de ADA2 modificados que contienen la adición (es decir, inserción) de uno o más residuos contiguos en el extremo N o el extremo C. Tales reemplazos pueden introducir un sitio de glicosilación no nativo. Los polipéptidos de ADA2 modificados pueden contener inserción de hasta o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más residuos de aminoácido en uno o ambos del extremo N-terminal o extremo C-terminal. Por ejemplo, la adición o inserción de aminoácidos puede proporcionar sitios de glicosilación alterados en la proteína codificada. Un ejemplo de una modificación es la inserción  $\text{---} \rightarrow \text{N1} / \text{---} \rightarrow \text{A2} / \text{---} \rightarrow \text{S3}$  en el extremo N, mediante la numeración madura, con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5.
- 30

Ejemplos de tales polipéptidos de ADA2 variantes se exponen en cualquiera de SEC ID NO: 274-279 y 552-560.

- 35 También se proporcionan en la presente memoria polipéptidos de ADA2 variantes que contienen uno o más reemplazos de aminoácidos que introducen un sitio de glicosilación no nativo, combinado con otras deleciones, inserciones, sustituciones y/o reemplazos de aminoácidos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, en la presente memoria se describen variantes de polipéptidos de ADA2 que contienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reemplazos aminoácidos en comparación con el polipéptido de ADA2 de referencia que no contiene las modificaciones (es decir, la ADA2 no modificada). Los polipéptidos de ADA2 variantes pueden contener dos o más reemplazos de aminoácidos proporcionados anteriormente, siempre que la ADA2 variante resultante muestre o conserve la actividad adenosina desaminasa. Los dos o más reemplazos de aminoácidos pueden conferir la misma alteración de la actividad o una alteración de la actividad diferente. Por ejemplo, uno o más reemplazos de aminoácidos pueden introducir un sitio de glicosilación no nativo, y otro u otros reemplazos de aminoácidos pueden conferir una mayor actividad adenosina desaminasa. Por lo tanto, las variantes de polipéptido de ADA2 resultantes exhiben dos o más actividades o propiedades alteradas.
- 40
- 45

- 50 Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan polipéptidos de ADA2 variantes que contienen reemplazos de aminoácidos R219Q/S262N/ins(NAS) I1; R219Q/S262N/R20N/V22S; R219Q/S262N/K371N/D373S; R219Q/S262N/K372N/I374S; R219Q/S262N/T403N/H405S; R219Q/S262N/G404N/P406S; R219Q/S262N/R125N/P126A; R219Q/S262N/S127N/K129S; R219Q/S262N/P126N/E128T; R219Q/S262N/R112N/I114T; R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T; R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T; R219Q/S262N/R142N/Q144S; R219Q/S262N/E137N/Y139T; o R219Q/S262N/P111N/G113S, mediante la numeración madura, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5.
- 55

Ejemplos de tales polipéptidos de ADA2 variantes se exponen en cualquiera de SEC ID NO: 596-601 o 607-615, o una porción catalíticamente activa de los mismos.

## 60 b. Moléculas de ácido nucleico

También se proporcionan en la presente memoria moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos de ADA2 variantes proporcionados en la presente memoria. Una molécula de ácido nucleico modificada que codifica cualquiera de los polipéptidos de ADA2 variantes proporcionados en la presente memoria incluye los

cambios de codones correspondientes a las modificaciones proporcionadas en la presente memoria (p. ej. reemplazo o sustitución, inserción o adición, o delección de uno o más nucleótidos). Está dentro del nivel de un experto en la técnica, que está familiarizado con los codones que corresponden a varios aminoácidos, identificar tales cambios de codones basados en la ejemplificación de los aminoácidos modificados en la presente memoria. En ejemplos concretos, la secuencia de ácido nucleico puede tener codones optimizados, por ejemplo, para aumentar los niveles de expresión de la secuencia codificada. El uso del codón concreto depende del organismo anfitrión en el que se expresa el polipéptido modificado. Un experto en la técnica está familiarizado con los codones óptimos para la expresión en células de mamíferos o humanas, bacterias o levaduras que incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Por ejemplo, la información del uso de codones está disponible en la Base de Datos de Uso de Codones disponible en [kazusa.or.jp/codon](http://kazusa.or.jp/codon) (véase p. ej. Richmond (2000) *Genome Biology*, 1:241 para una descripción de la base de datos). Véanse también, Forsburg (2004) *Yeast*, 10:1045-1047; Brown et al. (1991) *Nucleic Acids Research*, 19:4298; Sharp et al. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 12:8207-8211; Sharp et al. (1991) *Yeast*, 657-78). Los vectores contienen las moléculas de ácido nucleico para la expresión y producción de los polipéptidos de ADA2.

### C. Producción de Proteínas ADA2 Variantes

Los polipéptidos de ADA2 variantes y las moléculas de ácido nucleico codificantes proporcionadas en la presente memoria se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante convencionales conocidas por un experto en la técnica. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para efectuar la mutación de uno o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria convencionales de moléculas de ácido nucleico codificantes, o métodos de síntesis de polipéptidos en fase sólida. En particular, se pueden emplear métodos de síntesis química total, incluida la síntesis de péptidos seguida de ligación de péptidos. Las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de ADA2 se pueden someter a mutagénesis, tal como mutagénesis aleatoria del ácido nucleico codificante, PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida al sitio (utilizando p. ej., un kit, tal como un kit como QuikChange disponible de Stratagene), superposición de PCR, combinación de genes u otros métodos recombinantes. El ácido nucleico que codifica los polipéptidos se puede introducir a continuación en una célula anfitriona para que se exprese de forma heteróloga. En algunos ejemplos, los polipéptidos de ADA2 variantes se producen sintéticamente, por ejemplo, como empleando síntesis química total, síntesis de péptidos en fase sólida o en fase de solución.

Los métodos ilustrativos para producir y expresar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de ADA2, incluyendo cualquier polipéptido de ADA2 variante, se describen en la Sección E. Dependiendo de cómo se produzca la molécula ADA2 variante, o la naturaleza concreta de la modificación o de las modificaciones, los polipéptidos de ADA2 variantes proporcionados en la presente memoria se pueden producir como un monómero, dímero u otro multímero. Por ejemplo, la ADA2 variante es un heterodímero u homodímero.

En particular, la ADA2 normalmente existe como un homodímero que está compuesto por dos cadenas de polipéptidos idénticas. Como se describió anteriormente, las interacciones no polares entre los residuos de dos subunidades polipeptídicas idénticas median la formación del homodímero tras la secreción de ADA2 de las células. Dado que la ADA2 de tipo salvaje es un homodímero, se entiende que la mención de una secuencia de aminoácidos del polipéptido ADA2 de referencia o no modificado se refiere a la secuencia de aminoácidos de una única subunidad del polipéptido de ADA2. La ADA2 variante puede contener una o más subunidades de polipéptido de ADA2, que son iguales (es decir, homodímero) o diferentes (es decir, heterodímero). Por ejemplo, un homodímero de ADA2 variante es producido y secretado fácilmente por células transformadas con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de ADA2 variante, tal como ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 13-63, 71-285 o 552-931, o un fragmento catalíticamente activo del mismo. Si las células codifican dos o más moléculas de ácido nucleico diferentes, cada una de las cuales codifica un polipéptido de ADA2 diferente, se puede producir un heterodímero.

En un ejemplo, el polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria es un dímero. Por ejemplo, el polipéptido de ADA2 variante resultante es un homodímero que contiene una primera y segunda subunidad de polipéptidos que son iguales, es decir, cada una tiene la misma secuencia de aminoácidos que contiene la modificación o las modificaciones idénticas con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ADA2 de referencia o no modificado. El homodímero se puede formar transformando una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido variante en una célula, que, tras la secreción, da como resultado una interacción no polar entre los residuos de dos subunidades de polipéptido variante para mediar la formación del dímero.

En otro ejemplo, el polipéptido de ADA2 resultante es un heterodímero que contiene una primera y segunda subunidad de polipéptidos que son diferentes. En tal ejemplo, una o ambas de la primera o segunda subunidades de polipéptido contienen una secuencia de aminoácidos que contiene una o varias modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ADA2 de referencia o no modificado. En algunos casos, tanto la primera como la segunda subunidad de polipéptidos pueden contener una secuencia de aminoácidos que contiene una o varias modificaciones en comparación con el polipéptido de ADA2 de referencia o no modificado, pero la



naturaleza de la modificación o modificaciones es diferente. El heterodímero se puede formar transformando en una célula tanto una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera subunidad de polipéptido variante como una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda subunidad de polipéptido diferente. La segunda molécula de ácido nucleico puede codificar una subunidad de polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de ADA2 de referencia o de tipo salvaje, o puede codificar una subunidad de polipéptido variante que contiene una secuencia de aminoácidos que contiene modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos de ADA2 de referencia o no modificada. El heterodímero se produce tras la expresión y secreción de una célula como resultado de la interacción no polar entre los residuos de las dos subunidades polipeptídicas para mediar la formación del dímero. En tales procedimientos, generalmente se forma una mezcla de moléculas diméricas, que incluyen homodímeros y heterodímeros. Para la generación de heterodímeros, pueden ser necesarias etapas adicionales para la purificación. Por ejemplo, el primer y segundo polipéptidos se pueden diseñar para incluir una etiqueta con quelatos metálicos u otro epítipo, donde las etiquetas son diferentes. Los dominios marcados se pueden emplear para la purificación rápida mediante cromatografía de quelato metálico y/o mediante anticuerpos, para permitir la detección de transferencias Western, inmunoprecipitación o agotamiento/bloqueo de la actividad en bioensayos.

En otros ejemplos, el polipéptido de ADA2 variante es un monómero. Se puede producir un monómero por mutación de uno o más residuos que están implicados en la dimerización de proteínas, siempre que se mantenga la actividad adenosina desaminasa. Los ejemplos de residuos que pueden ser elegidos como diana para mutagénesis incluyen, pero no se limitan a, los residuos de aminoácido 1, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 15, 344, 362 o 366, con referencia a los residuos de aminoácido expuestos en SEQ ID NO: 5. Los residuos se pueden reemplazar por uno de los otros diecinueve residuos de aminoácido en la posición. Está dentro del nivel de un experto en la técnica generar y evaluar la formación de monómeros de un polipéptido. Por ejemplo, la formación de monómeros se puede evaluar y los monómeros se pueden purificar mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La actividad adenosina desaminasa también se puede evaluar, por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

En algunos ejemplos, las moléculas diméricas u otras moléculas multiméricas de una ADA2 variante se pueden formar mediante conjugación o fusión del polipéptido de ADA2 variante codificado con cualquier radical u otro polipéptido que puedan interactuar para formar una estructura estable. Por ejemplo, los polipéptidos de ADA2 codificados por separado, donde al menos uno es un polipéptido de ADA2 variante, se pueden unir mediante multimerización, por lo que la multimerización de los polipéptidos está mediada por un dominio de multimerización. La variante de dímeros o multímeros de ADA2 se puede formar mediante la generación de una molécula química donde una ADA2 variante se conecta, directa o indirectamente, a un dominio de multimerización. Una molécula de ácido nucleico que codifica una ADA2 variante se puede unir (directa o indirectamente) con un ácido nucleico que codifica un dominio de multimerización. Por ejemplo, un dímero de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria puede contener una primera subunidad de polipéptido de ADA2 conectada directa o indirectamente a través de un conector a un dominio de multimerización y una segunda subunidad de polipéptido de ADA2 conectada directa o indirectamente a través de un conector a un dominio de multimerización, en donde uno o ambos del primer y segundo polipéptidos son un polipéptido de ADA2 variante. El primer y segundo polipéptido de ADA2 pueden ser iguales o diferentes. Un ejemplo de dominio de multimerización es un dominio Fc, que se describe adicionalmente más adelante.

Los polipéptidos homo- o heteromultiméricos se pueden generar a partir de la expresión conjunta de moléculas de ácido nucleico separadas que codifican los polipéptidos de ADA2. Los polipéptidos de ADA2 quiméricos pueden ser fácilmente producidos y secretados por las células, tales como células de mamífero, transformadas con la molécula de ácido nucleico apropiada. Por ejemplo, una célula se puede transformar con una primera molécula de ácido nucleico que codifica una ADA2 variante y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica la misma o diferente ADA2. La segunda molécula de ácido nucleico puede codificar una subunidad de polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de ADA2 de referencia o de tipo salvaje, o puede codificar una subunidad de polipéptido variante que contiene una secuencia de aminoácidos que contiene modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ADA2 de referencia o no modificada. Las formas secretadas del polipéptido de ADA2 incluyen aquellas en las que la ADA2 variante es un homodímero del primer polipéptido de ADA2 variante codificado, un homodímero del segundo polipéptido de ADA2 codificado, tal como el polipéptido de ADA2 variante de tipo salvaje o segundo, y los heterodímeros de ADA2 que contienen dos subunidades polipeptídicas que son diferentes. En algunos casos, se pueden formar multímeros de orden superior.

Los dominios de multimerización son bien conocidos por un experto en la técnica. Generalmente, un dominio de multimerización incluye cualquiera capaz de formar una interacción proteína-proteína estable. Los dominios de multimerización pueden interactuar a través de una secuencia de inmunoglobulina (p. ej. dominio Fc; véanse p. ej., Pub. Internacional de Patente Núm. WO 93/10151 y WO 2005/063816; Pub. de Estados Unidos Núm. 2006/0024298; Patente de Estados Unidos Núm. 5.457.035), cremallera de leucina (p. ej. de las proteínas de transformación nuclear fos y jun o del protooncogen c-myc o del Control General de Nitrógeno (GCN4), una región hidrófoba, una región hidrófila o un tiol libre que forma un enlace disulfuro intermolecular entre las moléculas

quiméricas de un homo- o heteromultímero. Además, un dominio de multimerización puede incluir una secuencia de aminoácidos que contiene una protuberancia complementaria a una secuencia de aminoácidos que comprende una cavidad, como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 5. 731.168; la Pub Internacional de Patente. Núm. WO 98/50431 y WO 2005/063816; Ridgway et al. (1996) *Protein Engineering*, 9:617-621. Tal región de multimerización se puede diseñar de manera que las interacciones estéricas no solo promuevan una interacción estable, sino que también promuevan la formación de heterodímeros sobre homodímeros a partir de una mezcla de monómeros quiméricos. En general, las protuberancias se construyen reemplazando pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (p. ej., tirosina o triptófano). Las cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean opcionalmente en la interfaz del segundo polipéptido reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (p. ej., alanina o treonina).

Un polipéptido de ADA2, tal como cualquier polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria, se puede unir en cualquier lugar, pero típicamente a través de su extremo N o C terminal, al extremo N o C terminal de un dominio de multimerización para formar un polipéptido quimérico. El enlace puede ser directo o indirecto a través de un conector. Además, el polipéptido quimérico puede ser una proteína de fusión o se puede formar mediante enlace químico, tal como a través de interacciones covalentes o no covalentes. Por ejemplo, cuando se prepara un polipéptido quimérico que contiene un dominio de multimerización, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de ADA2 se puede conectar operativamente al ácido nucleico que codifica la secuencia del dominio de multimerización, directa o indirectamente u opcionalmente a través de un dominio conector. La construcción puede codificar una proteína quimérica donde el extremo C del polipéptido de ADA2 se une al extremo N terminal del dominio de multimerización. En algunos casos, una construcción puede codificar una proteína quimérica donde el extremo N terminal del polipéptido de ADA2 se une al extremo N o C terminal del dominio de multimerización.

En los ejemplos en los que el dominio de multimerización es un polipéptido, se inserta una fusión génica que codifica el polipéptido quimérico del dominio de multimerización de ADA2 en un vector de expresión apropiado. Las proteínas quiméricas del dominio de multimerización de ADA2 resultantes se pueden expresar en células anfitrionas transformadas con el vector de expresión recombinante, y se permite que se ensamblen en multímeros, donde los dominios de multimerización interactúan para formar polipéptidos multivalentes. El enlace químico de los dominios de multimerización a los polipéptidos de ADA2 también se puede efectuar empleando conectores heterobifuncionales.

Los polipéptidos quiméricos resultantes, y los multímeros formados a partir de los mismos, se pueden purificar mediante cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de proteína A o proteína G. Cuando dos moléculas de ácido nucleico que codifican diferentes polipéptidos quiméricos ADA2 se transforman en células, se producirá la formación de homo y heterodímeros. Las condiciones para la expresión se pueden ajustar de modo que la formación de heterodímeros se favorezca sobre la formación de homodímeros. Por ejemplo, para los multímeros formados por la interacción del enlace disulfuro de un dominio de multimerización de Fc, los homodímeros se pueden reducir en condiciones que favorecen la rotura de los disulfuros intercatenarios, pero no afectan a los disulfuros intracatenarios. Alternativamente, la formación de este tipo de heterodímero puede estar sesgada mediante modificación genética y expresión de moléculas de fusión de ADA2 utilizando un dominio de multimerización que promueve la formación de heterodímeros, por ejemplo, utilizando una combinación de cremallera de leucina *c-jun* y *c-fos*. Debido a que las cremalleras de leucina forman predominantemente heterodímeros, se pueden emplear para impulsar la formación de los heterodímeros cuando se desee. Los polipéptidos de ADA2 contienen una región Fc u otro dominio de multimerización que también se puede modificar para incluir una etiqueta que permita la purificación de los heterodímeros deseados. Los productos de los oncogenes nucleares *fos* y *jun* contienen dominios de cremallera de leucina que preferentemente forman un heterodímero (O'Shea et al. (1989) *Science*, 245:646; Turner y Tijian (1989) *Science*, 243:1689). Por ejemplo, se ha demostrado que los dominios de cremallera de leucina de los factores de transcripción humana *c-jun* y *c-fos* forman heterodímeros estables con una estequiometría 1:1 (véanse p. ej., Busch y Sassone-Corsi (1990) *Trends Genetics*, 6:36-40; Gentz et al. (1989) *Science*, 243:1695-1699). A pesar de que también se ha demostrado que se forman homodímeros *jun-jun*, estos son aproximadamente 1000 veces menos estables que los heterodímeros *jun-fos*.

#### D. PRODUCTOS CONJUGADOS DE ADA2 Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Cualquier molécula ADA2, incluida cualquiera de las proporcionadas en la presente memoria, se puede conjugar, directa o indirectamente, con uno o más radicales heterólogos. La ADA2 puede ser una ADA2 de tipo salvaje, que incluye variantes alélicas y de especie, o puede ser cualquier variante descrita en la presente memoria en la Sección C.2. anterior. La molécula de ADA2 en el producto conjugado puede ser un monómero o un dímero, por ejemplo, un heterodímero o un homodímero. Típicamente, la ADA2 en el producto conjugado es un homodímero. El radical heterólogo se puede conjugar con una o ambas subunidades polipeptídicas del dímero.

Por ejemplo, la ADA2 puede ser cualquiera que contenga un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 5 o 326-336, 338-342, 375 o 380-383, o una secuencia de aminoácidos que

exhibe al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 5 o 326-336, 338-342, 375 o 380-383, o un fragmento catalíticamente activo del mismo. En un ejemplo, la ADA2 en el producto conjugado proporcionado en la presente memoria puede contener un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 5 o 326-336, 338-342, 375 o 380-383 o un fragmento catalíticamente activo del mismo, como cualquiera de SEC ID NO: 5, 326-334, 340, 375 o 380-383, o un fragmento catalíticamente activo del mismo. Por ejemplo, la ADA2 en el producto conjugado proporcionado en la presente memoria puede contener un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o una porción catalíticamente activa del mismo. La porción catalíticamente activa puede ser una que carece de todo o una porción del dominio PRB, tales como las expuestas en cualquiera de SEQ ID NO: 548-550 o 579.

En otros ejemplos de productos conjugados proporcionados en la presente memoria, el producto conjugado contiene un polipéptido de ADA2 variante, tal como cualquiera de los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los productos conjugados proporcionados en la presente memoria pueden ser una ADA2 que contiene el polipéptido variante puesto en cualquiera de SEC ID NO: 13-63, 71-285 o 552-931.

El radical heterólogo puede incluir radicales de proteínas o polipéptidos o radicales no polipeptídicos. Por ejemplo, el radical heterólogo puede ser, pero no está limitado a, un péptido, molécula pequeña, ácido nucleico, carbohidrato y polímero. El radical heterólogo se puede conectar, directa o indirectamente, a la molécula de proteína ADA2. Por ejemplo, el radical heterólogo puede ser un radical de proteína o polipéptido, que se puede conjugar directa o indirectamente con el polipéptido de ADA2, o producir como proteínas de fusión que se fusionan directa o indirectamente. En otros casos, el radical heterólogo es un radical no peptídico que se conjuga con las moléculas de ADA2.

La proteína ADA2 se puede conjugar con uno o más radicales heterólogos, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más radicales heterólogos. Un radical heterólogo puede ser un radical polipeptídico heterólogo, o un radical no polipeptídico heterólogo, o ambos. En otros ejemplos, los radicales heterólogos pueden incluir una combinación de un polipéptido heterólogo y un radical no polipeptídico. En algunos ejemplos, todos los radicales heterólogos son idénticos. En algunos ejemplos, al menos un radical heterólogo es diferente de los otros radicales heterólogos. En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede conjugar a dos, tres o más de tres radicales heterólogos en tándem. En otros ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede conjugar con dos, tres o más radicales heterólogos donde al menos un radical adicional se interpone entre dos radicales heterólogos (p. ej., un polipéptido de ADA2, un conector, un sustrato escindible por proteasa, un espaciador autoinmolativo, o combinaciones de los mismos).

La conjugación con radicales heterólogos puede conferir propiedades beneficiosas en comparación con una molécula de ADA2 que no esté conjugada con el radical heterólogo. Los radicales heterólogos ilustrativos son radicales que aumentan la semivida *in vivo* de la molécula. Otras propiedades beneficiosas ilustrativas proporcionadas por un radical heterólogo incluyen, pero no están limitadas a, aumento de la expresión de proteínas en sistemas de expresión de mamíferos, mejora de las propiedades biofísicas tales como la estabilidad y la solubilidad, mejora de la purificación y detección, visualización y localización de proteínas y/o mejora de la actividad enzimática. Por ejemplo, un radical heterólogo puede ser uno que facilite la detección, visualización o localización de una molécula de proteína ADA2 o un fragmento de la misma que contenga el radical heterólogo. La detección, visualización y/o localización de cualquiera de sus fragmentos ADA2 puede ser *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, o combinaciones de los mismos.

En algunos casos, cuando se conjuga con una ADA2 o fragmento de la misma, el radical heterólogo aumenta la estabilidad de la ADA2 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, la presencia del radical heterólogo puede mantener una o más propiedades físicas de una ADA2 en respuesta a una condición ambiental (p. ej., una temperatura elevada o condiciones de pH bajo o alto) en comparación con la propiedad física en ausencia del radical heterólogo. En algunos ejemplos, la propiedad física puede incluir el mantenimiento de la estructura covalente de una ADA2 (p. ej., la ausencia de escisión proteolítica, oxidación o desamidación no deseadas). En otros ejemplos, la propiedad física puede ser el mantenimiento de un estado plegado correctamente (p. ej., la ausencia de agregados o precipitados solubles o insolubles). La estabilidad de cualquier ADA2 o producto conjugado de ADA2 se puede medir analizando una propiedad biofísica de la proteína, por ejemplo, la estabilidad térmica, el perfil de desplegamiento relacionado con el pH, la eliminación estable de glicosilación, la solubilidad, la función bioquímica (p. ej., actividad adenosina desaminasa o actividad de unión a heparina) y/o combinaciones de las mismas. La estabilidad se puede medir empleando métodos conocidos en la técnica, tales como HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), SEC (cromatografía de exclusión por tamaño), DLS (dispersión dinámica de luz). Los métodos para medir la estabilidad térmica incluyen, entre otros, calorimetría de barrido diferencial (DSC), fluorimetría de barrido diferencial (DSF), dicroísmo circular (CD) y ensayo de cambio térmico. Los métodos ilustrativos para evaluar la estabilidad de cualquier ADA2 o producto conjugado se describen a continuación en la Sección F.

En algunos ejemplos, cuando se conjuga con una ADA2 o fragmento de la misma, la presencia del radical

heterólogo reduce o atenúa la unión de ADA2 a la heparina y otros glicosaminoglicanos (GAG) en comparación con la proteína ADA2 que no contiene el radical heterólogo (es decir, la ADA2 libre o no conjugada). Por ejemplo, los productos conjugados de ADA2 proporcionados en la presente memoria incluyen aquellos que exhiben no más de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de la unión a heparina de la proteína ADA2 que no contiene el radical heterólogo (es decir, la ADA2 libre o no conjugada). Por ejemplo, se muestra en la presente memoria que ADA2 PEGilada exhibe una reducción de la unión a heparina en comparación con la ADA2 no PEGilada correspondiente (véase, por ejemplo, el Ejemplo 8). Típicamente, la unión a heparina se exhibe cuando la ADA2 está en forma de dímero, y el producto conjugado de ADA2 es un dímero. También se entiende que la comparación de la unión entre la forma conjugada y no conjugada se evalúa bajo las mismas o sustancialmente las mismas condiciones. En particular, la reducción de la unión en presencia del radical heterólogo en el producto conjugado puede deberse al bloqueo estérico y/o la alteración de las cargas electrostáticas en la superficie.

En los ejemplos de productos conjugados proporcionados en la presente memoria, el radical heterólogo mejora una o más propiedades de ADA2 (p. ej. la semivida) sin afectar sustancialmente a la actividad biológica o la función de la proteína ADA2 (p. ej., actividad adenosina desaminasa). Por ejemplo, los productos conjugados de ADA2 proporcionados en la presente memoria exhiben aproximadamente de 50% a 500%, tal como aproximadamente de 50% a 400%, 50% a 300%, 50% a 200%, 50% a 150%, 50% a 100%, 50% a 80%, 80% a 400%, 80% a 300%, 80% a 200%, 80% a 150%, 80% a 100%, 100% a 400%, 100% a 300%, 100% a 200% o 100% a 150% de la actividad adenosina desaminasa en comparación con la proteína ADA2 que no contiene el radical heterólogo (es decir, la ADA2 libre o no conjugada). Por ejemplo, el producto conjugado de ADA2 puede exhibir al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% o más de la actividad adenosina desaminasa en comparación con el polipéptido de ADA2 que no contiene el radical heterólogo (es decir, la ADA2 libre o no conjugada). En algunos casos, los productos conjugados de ADA2 proporcionados en la presente memoria exhiben un aumento o mejora de la actividad adenosina desaminasa en comparación con el polipéptido de ADA2 que no contiene el radical heterólogo (es decir, la ADA2 libre o no conjugada), tal como más de 100% o más de actividad adenosina desaminasa. Típicamente, la actividad adenosina desaminasa se exhibe cuando la ADA2 está en forma de dímero, y el producto conjugado de ADA2 es un dímero. También se entiende que la comparación de la unión de adenosina entre la forma conjugada y la no conjugada se evalúa bajo las mismas o sustancialmente las mismas condiciones.

### 1. Radicales prolongadores de la semivida

Los ejemplos no limitantes de radicales heterólogos incluyen cualquiera que, cuando se conjuga o se conecta (directa o indirectamente) a la molécula ADA2, confiere un aumento de la semivida *in vivo* y/o *in vitro* en comparación con la ADA2 libre o no conjugada. La semivida de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede determinar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica y/o descrito en la presente memoria, p. ej., ensayos de actividad adenosina desaminasa. Tales radicales que prolongan la semivida ilustrativos se describen en las subsecciones siguientes.

Por ejemplo, los radicales heterólogos son péptidos y polipéptidos con características no estructuradas o estructuradas que están asociadas con la prolongación de la semivida *in vivo* cuando se conjugan con una ADA2. Los ejemplos no limitantes incluyen albúmina, fragmentos de albúmina, fragmentos Fc de inmunoglobulinas, la subunidad  $\beta$  del péptido C-terminal (CTP) de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana, secuencias HAP, secuencias XTEN, una transferrina o un fragmento de la misma, un polipéptido PAS, conectores de poliglicina, conectores de poliserina, radicales de unión a albúmina, conjugación o prolongación de la semivida basados de aminoácidos no naturales, o cualquier fragmento, derivado, variante o combinación de estos polipéptidos.

El radical heterólogo puede ser un radical prolongador de la semivida, es decir, un radical heterólogo que aumenta la semivida *in vivo* de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria en comparación con la semivida *in vivo* de la ADA2 que carece de tal radical heterólogo. La semivida *in vivo* de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede determinar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica y/o descrito en la presente memoria, p. ej., ensayos de actividad adenosina desaminasa.

Los ejemplos de radicales que prolongan la semivida que se pueden conjugar, directa o indirectamente, con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria incluyen: ácidos grasos biocompatibles y derivados de los mismos, hidroxialquil almidón (HAS) (p. ej. hidroxietil almidón (HES)), polietilenglicol (PEG), poli(Glyx-Ser<sub>y</sub>)<sub>n</sub>, polímeros de homo-aminoácidos (HAP), ácido hialurónico (HA), polímeros de heparosano (HEP), polímeros basados en fosforilcolina (polímero de PC), flexímeros, dextrano, ácidos polisálicos (PSA), dominio Fc, transferrina, albúmina, péptidos similares a elastina, secuencias XTEN, péptidos de unión a albúmina, un péptido CTP, un aminoácido no natural o un producto conjugado de aminoácidos no naturales, y cualquier combinación de los mismos.

En algún ejemplo, cuando se conjuga con una ADA2 o fragmento de la misma, la presencia de uno o más radicales

que prolongan la semivida da como resultado que la semivida de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se incrementa en comparación con la semivida de la ADA2 que carece de tales uno o más radicales que prolongan la semivida (es decir, la ADA2 libre o no conjugada). Por ejemplo, los productos conjugados de ADA2 proporcionados en la presente memoria exhiben una semivida que es al menos aproximadamente 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800% o más larga que la semivida del polipéptido de ADA2 que no contiene el radical heterólogo (es decir, la ADA2 libre o no conjugada), o 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%, 1600%, 1700%, 1800%, 1900%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 6000 %, 7000%, 8000%, 9000%, 10000% o más de la semivida del polipéptido de ADA2 que no contiene el radical heterólogo (es decir, la ADA2 libre o no conjugada). En algunos ejemplos, la semivida de cualquier producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria que esté conectado, directa o indirectamente, a un radical que prolonga la semivida exhibe una semivida que es de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 20 veces, de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 15 veces, de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 10 veces más larga, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 2,5 veces a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 9 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 7 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 4 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 4 veces a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 4 veces a aproximadamente 6 veces, de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 7 veces, o aproximadamente 6 veces a aproximadamente 8 veces más larga que la semivida de la ADA2 correspondiente que carece de tal radical que extiende la semivida. Típicamente, la semivida para la actividad *in vivo* se exhibe cuando la ADA2 está en forma de dímero, y el producto conjugado de ADA2 es un dímero. También se entiende que la comparación de la semivida entre la forma conjugada y la no conjugada se evalúa bajo las mismas o sustancialmente las mismas condiciones.

En algunos ejemplos, la semivida de cualquier producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria que esté conectado, directa o indirectamente, a un radical que prolonga la semivida puede ser o es al menos o al menos aproximadamente 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 25 horas, 26 horas, 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 32 horas, 34 horas, 36 horas, 38 horas, 40 horas, 42 horas, 46 horas, 48 horas, 50 horas, 55 horas, 60 horas, 65 horas, 70 horas, 75 horas, 80 horas o más. Por ejemplo, la semivida de cualquier producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede ser de 10 horas a 60 horas, tal como de 12 horas a 48 horas o de 13 horas a 36 horas. Por ejemplo, el Ejemplo 9 muestra que un producto conjugado de ADA2 que es una ADA2 PEGilada exhibe una semivida de aproximadamente 12 a 14 horas, y moléculas variantes de ADA2 PEGiladas (p. ej. R20E o K371D) exhiben una semivida aún mayor de alrededor de o aproximadamente 16 horas a 24 horas. El Ejemplo 14 muestra que otras moléculas ADA2 variantes PEGiladas (p. ej. R219Q/S262N) exhiben una semivida aún mayor de alrededor de o aproximadamente 39 horas a 47 horas.

Las siguientes subsecciones describen radicales que prolongan la semivida ilustrativos en los productos conjugados de ADA2 proporcionados en la presente memoria.

#### 50 a. Polipéptidos de Baja Complejidad

Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a al menos un radical heterólogo que es un polipéptido con baja complejidad compositiva y/o estructural (p. ej., un polipéptido desordenado sin estructura secundaria o terciaria en solución en condiciones fisiológicas). En un ejemplo, las secuencias de polipéptidos de baja complejidad están constituidas de polímeros de aminoácidos hidrófilos no estructurados. Los polipéptidos de baja complejidad pueden proporcionar propiedades beneficiosas, por ejemplo, si la proteína está sujeta a temperaturas más altas o condiciones más duras, tales como la purificación mediante HPLC.

#### 60 b. Péptido C-terminal (CTP) de la Subunidad β de la Gonadotropina Coriónica Humana

Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a un radical heterólogo que incluye un péptido C-terminal (CTP) de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana, o fragmento, variante o derivado del mismo. Se sabe que uno o más péptidos CTP insertados en una proteína recombinante aumentan la semivida *in vivo* de esa proteína (véase, p.

ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.712.122). Los péptidos CTP ilustrativos incluyen DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPIL (SEQ ID NO: 303) o SSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ. (SEQ ID NO: 304) (Véase, p. ej., la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. US 2009/0087411).

### 5 C. Región Constante de Inmunoglobulina (Fc) o Porciones de la Misma

Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a un dominio Fc o variante del mismo. Los dominios Fc, fragmentos, variantes y derivados son conocidos por un experto en la técnica y se describen, p. ej., en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.457.035; la Publicación de patente de Estados Unidos US 2006/0024298, las Publicaciones PCT internacionales Núm. WO 2011/069164, WO 2012/006623, WO 2012/006635 o WO 2012/006633. Se han descrito preparaciones de proteínas de fusión que contienen polipéptidos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluido el dominio Fc), véanse p. ej., Ashkenazi et al. (1991) PNAS 88: 10535; Byrn et al. (1990) Nature, 344:667; y Hollenbaugh y Aruffo, (2002) "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Cap. 10, pág. 10.19.1-10.19.11.

Una región Fc tiene dominios denotados dominios  $C_H$  (pesados constantes) ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  (opcionalmente  $C_{H4}$ )). Dependiendo del isotipo, (es decir IgG, IgM, IgA IgD o IgE), la región Fc puede tener tres o cuatro dominios  $C_H$ . Algunas regiones Fc de isotipos (p. ej. IgG) también contienen una región bisagra (ver Janeway et al. 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y). En los seres humanos, existen cinco isotipos de anticuerpos clasificados en función de sus cadenas pesadas denotadas como delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), mu ( $\mu$ ) y alfa ( $\alpha$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ), que dan lugar a las clases IgD, IgG, IgM, IgA e IgE de anticuerpos, respectivamente. Las clases IgA e IgG contienen las subclases IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las diferencias de secuencia entre las cadenas pesadas de inmunoglobulina provocan que los diversos isotipos difieran, por ejemplo, en el número de dominios C, la presencia de una región bisagra y el número y ubicación de los enlaces disulfuro entre cadenas. Por ejemplo, las cadenas pesadas de IgM e IgE contienen un dominio C adicional ( $C_{H4}$ ), que reemplaza la región de la bisagra. Las regiones Fc de IgG, IgD e IgA se emparejan entre sí a través de sus dominios  $C\gamma 3$ ,  $C\delta 3$  y  $C\alpha 3$ , mientras que las regiones Fc de IgM e IgE se dimerizan a través de sus dominios  $C\mu 4$  y  $C\epsilon 4$ . IgM e IgA forman estructuras multiméricas con diez y cuatro sitios de unión a antígeno, respectivamente.

Un experto en la técnica conoce las regiones Fc, y se puede emplear cualquiera en los productos conjugados proporcionados en la presente memoria con tal que el producto conjugado resultante conserve la actividad adenosina desaminasa. Una región Fc o una porción de la misma para producir cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede obtener de varias fuentes diferentes. En algunos ejemplos, una región Fc o una porción de la misma se obtiene de una inmunoglobulina humana. La región Fc o una porción de la misma también se puede obtener de una inmunoglobulina de otra especie de mamífero, que incluye, por ejemplo, una especie de roedor (p. ej. ratón, rata, conejo, cobaya) o primate no humano (p. ej., chimpancé, macaco). Además, la región Fc o una porción de la misma se puede obtener de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas las IgG (incluidas las subclases humanas IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA (incluidas las subclases humanas IgA1 e IgA2), IgD, IgE e IgM. En un ejemplo, se emplea el isotipo humano IgG1. Una ADA2 proporcionada en la presente memoria que se conjuga con una región Fc de una inmunoglobulina puede conferir varias propiedades deseables que incluyen mayor estabilidad, mayor semivida en suero (véase Capon et al. (1989) Nature 337:525) así como la unión a receptores Fc como el receptor Fc neonatal (FcRn) (Patentes de Estados Unidos Núm. 6.086.875, 6.485.726, 6.030.613; documento WO 03/077834; documento US 2003/0235536). En otros ejemplos, donde las funciones efectoras mediadas por las interacciones del receptor Fc-Fc (FcR) deben ser minimizadas, se contempla la fusión con isotipos IgG que reclutan pobremente células complementarias o efectoras, tales como, por ejemplo, el Fc de IgG2 o IgG4. Adicionalmente, los conectores se pueden emplear para conectar covalentemente Fc a otro polipéptido para generar una quimera de Fc.

Las secuencias ilustrativas de las regiones constantes de la cadena pesada para los subtipos de IgG humana se exponen en SEQ ID NO: 355 (IgG1), SEQ ID NO: 356 (IgG2), SEQ ID NO: 357 (IgG3) y SEQ ID NO: 358 (IgG4). Por ejemplo, para la región constante de cadena pesada ilustrativa expuesta en SEQ ID NO: 355, el dominio  $C_{H1}$  corresponde a los aminoácidos 1-98, la región bisagra corresponde a los aminoácidos 99-110, el dominio  $C_{H2}$  corresponde a los aminoácidos 111-223, y el dominio  $C_{H3}$  corresponde a los aminoácidos 224-330.

Los dominios Fc modificados también se contemplan en la presente memoria para la conjugación con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. En algunos ejemplos, la región Fc se modifica de modo que exhibe una alteración de la unión a un FcR para dar como resultado una alteración (es decir más o menos) de la función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo salvaje. Por lo tanto, un dominio Fc modificado puede tener una alteración de la afinidad, que incluye, pero no se limita a, aumento o baja o nula afinidad por el receptor de Fc. Por ejemplo, las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por los receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), uniéndose típicamente sustancialmente mejor IgG1 e IgG3 a los receptores que IgG2 e IgG4. Además, diferentes Fc $\gamma$ R median diferentes funciones efectoras. Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ R1Ia/c, y Fc $\gamma$ R1IIa son reguladores positivos de la activación activada por complejos inmunitarios, caracterizados por tener un dominio

intracelular que tiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM). Sin embargo, FcγRIIb tiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) y, por lo tanto, es inhibidor. En algunos casos, un producto conjugado de ADA2 que incluye un dominio Fc proporcionado en la presente memoria se puede modificar para mejorar la unión a la proteína del complemento C1q.

5 En ciertos ejemplos, la región Fc para la conjugación con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede incluir una o más regiones Fc truncadas que, sin embargo, son suficientes para conferir propiedades de unión al receptor Fc (FcR) a la región Fc. Por ejemplo, la porción de una región Fc que se une a FcRn (es decir, la porción de unión a FcRn) puede incluir aproximadamente los aminoácidos 282-438 de IgG1, siendo los sitios de contacto primarios los aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio C<sub>H2</sub> y los residuos de aminoácido 385-387, 428 y 433-436 del dominio C<sub>H3</sub> (numeración de aminoácidos basada en el sistema de numeración EU; véase Edelman et al. (1969) PNAS 63:78-85 y Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH Núm. 91-3242). Por lo tanto, una región Fc en cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede incluir una porción de unión a FcRn. Las porciones de unión a FcRn se pueden obtener de cadenas pesadas de cualquier isotipo, incluidas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La alteración de la afinidad de una región Fc por un receptor puede modular las funciones efectoras y/o las propiedades farmacocinéticas asociadas al dominio Fc. Los dominios Fc modificados son conocidos por un experto en la técnica y se describen en la bibliografía, véanse p. ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.457.035; la Publicación de Patente de EE. UU. US 2006/0024298; y la Publicación de Patente Internacional Núm. WO 2005/063816 para las modificaciones ilustrativas.

En ciertos ejemplos, una región Fc para su conjugación con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede incluir al menos uno de: una bisagra (p. ej., dominio bisagra superior, medio y/o inferior) (aproximadamente los aminoácidos 216-230 de una región Fc de anticuerpo basada en la numeración EU), un dominio C<sub>H2</sub> (aproximadamente los aminoácidos 231-340 de una región Fc de anticuerpo basada en la numeración EU), un dominio C<sub>H3</sub> (aproximadamente los aminoácidos 341-438 de una región Fc de anticuerpo basada en la numeración EU), un dominio C<sub>H4</sub>, o una variante, porción o fragmento del mismo. En otros ejemplos, una región Fc puede incluir un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio C<sub>H2</sub> y un dominio C<sub>H3</sub>). En algunos ejemplos, una región Fc puede incluir un dominio bisagra (o una porción del mismo) fusionado a un dominio C<sub>H3</sub> (o una porción del mismo), un dominio bisagra (o una porción del mismo) fusionado a un dominio C<sub>H2</sub> (o una porción del mismo), un dominio C<sub>H2</sub> (o una porción del mismo) fusionado a un dominio C<sub>H3</sub> (o una porción del mismo), un dominio C<sub>H2</sub> (o una porción del mismo) fusionado tanto a un dominio bisagra (o una porción del mismo) como a un dominio C<sub>H</sub> (o una porción del mismo). En otros ejemplos, una región Fc carece de al menos una parte de un dominio C<sub>H2</sub> (p. ej., todo o parte de un dominio C<sub>H2</sub>). En un ejemplo concreto, una región Fc puede incluir aminoácidos correspondientes de 221 al 447 (basado en el sistema de numeración UE; véase Edelman et al. (1969) PNAS 63:78-85 y Kabat et al. (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH Núm. 91-3242).

Una región Fc para su conjugación con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede incluir, por ejemplo, una modificación (p. ej., una sustitución de aminoácidos) en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas en las Publicaciones Internacionales PCT Núm. WO88/07089, WO96/14339, WO98/05787, WO98/23289, WO99/51642, WO99/58572, WO00/09560, WO00/32767, WO00/42072, WO02/44215, WO02/060919, WO03/074569, WO04/016750, WO04/029207, WO04/035752, WO04/063351, WO04/074455, WO04/099249, WO05/040217, WO04/044859, WO05/070963, WO05/077981, WO05/092925, WO05/123780, WO06/019447, WO06/047350, y WO06/085967; Publicaciones de Patente Núm. US 2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US2007/0248603, US2007/0286859, US2008/0057056; o Patentes de Estados Unidos Núm. 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; 7.083.784; 7.404.956; y 7.317.091. En un ejemplo, la modificación específica (p. ej., la sustitución específica de uno o más aminoácidos descritos en la técnica) se puede realizar en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas. En otro ejemplo, se puede realizar un cambio diferente en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas (p. ej., la sustitución diferente de una o más posiciones de aminoácidos descritas en la técnica).

En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede conjugar con al menos una región Fc tal como una proteína de fusión. Típicamente, tal fusión retiene al menos una bisagra funcionalmente activa, dominios C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub> de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, una secuencia de Fc completa de IgG1 incluye los aminoácidos 99-330 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 355. Una secuencia de Fc ilustrativa para hIgG1 se expone en SEQ ID NO: 359, y contiene casi toda la secuencia bisagra, y la secuencia completa para el dominio C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub> como se expone en SEQ ID NO: 355. Otro ejemplo de polipéptido Fc es el polipéptido Fc expuesto en SEC ID NO: 361. Otro polipéptido Fc ilustrativo se expone en la Publicación PCT Núm. WO 93/10151, y es un polipéptido de cadena sencilla que se extiende desde la región bisagra N-terminal hasta el extremo C-terminal nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano (SEQ ID NO: 359). El sitio preciso en el que se realiza la conexión no es crítico: los sitios concretos son bien conocidos y se pueden seleccionar para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de la molécula

de proteína ADA2. Por ejemplo, otras secuencias de polipéptidos Fc ilustrativos comienzan en el aminoácido C109 o P113 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 355 (véase p. ej., la Publicación de Estados Unidos Núm. 2006/0024298).

5 Una región Fc para su conjugación con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria también puede contener una sustitución de aminoácidos que altera la glicosilación de la proteína quimérica conocida en la técnica. Por ejemplo, la región Fc de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede conjugar con una región Fc que tiene una mutación que conduce a una reducción de la glicosilación (p. ej., glicosilación ligada a N u O) o a una glicofoma alterada del radical Fc de tipo salvaje (p. ej., un glucano bajo en fucosa o libre de fucosa).

10 También se puede modificar genéticamente una región Fc para la conjugación con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria para que incluya una etiqueta con quelatos metálicos u otro epítipo. El dominio marcado se puede emplear para la purificación rápida mediante cromatografía de quelato metálico y/o mediante anticuerpos, para permitir la detección de transferencias Western, inmunoprecipitación o agotamiento/bloqueo de actividad en bioensayos.

#### d. Albúmina o Fragmento, o Variante de la misma

20 Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a un radical heterólogo que incluye albúmina o un fragmento funcional del mismo. La albúmina sérica humana (HSA o HA), una proteína de 609 aminoácidos en su forma completa (secuencia ilustrativa expuesta en SEQ ID NO: 305), es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como portador de ligandos endógenos y exógenos. La albúmina puede ser una albúmina completa o un fragmento funcional, variante, derivado o análogo de la misma. Los ejemplos de albúmina o sus fragmentos o variantes se describen en Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2008/0194481, 2008/0004206, 2008/0161243, 2008/0261877o 2008/0153751 o Publicaciones PCT Núm. 2008/033413, 2009/058322 o 2007/021494.

30 En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede incluir albúmina, un fragmento o una variante de la misma que se conecta adicionalmente a un radical heterólogo seleccionado entre una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (p. ej., una región Fc), una secuencia PAS, secuencias HES, XTEN, PEG o cualquier combinación de las mismas.

#### e. Radical de Unión a Albúmina

35 Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a un radical heterólogo que es un radical de unión a albúmina, por ejemplo, un péptido de unión a albúmina, un dominio de unión a albúmina bacteriana, un fragmento de anticuerpo de unión a albúmina, un ácido graso, o cualquier combinación de los mismos.

40 Por ejemplo, la proteína de unión a albúmina puede ser una proteína de unión a albúmina bacteriana, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye anticuerpos de dominio (véase la Patente de Estados Unidos Núm. 6.696.245). Una proteína de unión a la albúmina, por ejemplo, puede ser un dominio de unión a la albúmina bacteriana, tal como el de la proteína estreptocócica G (Konig, T. y A. Skerra, A. (1998) J Immunol. Methods 218:73-83). Otros ejemplos de péptidos de unión a albúmina que se pueden emplear para conjugar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria son, por ejemplo, aquellos que tienen una secuencia consenso Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys (SEQ ID NO: 306), en donde Xaa<sub>1</sub> es Asp, Asn, Ser, Thr o Trp; Xaa<sub>2</sub> es Asn, Gln, His, Ile, Leu o Lys; Xaa<sub>3</sub> es Ala, Asp, Phe, Trp o Tyr; y Xaa<sub>4</sub> es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser o Thr (Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2003/0069395; Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem 277: 35035-35043).

50 El dominio 3 de la proteína estreptocócica G (Kraulis et al., (1996) FEBS Lett. 378:190-194; Linhult et al. (2002) Protein Sci. 11:206-213) es un ejemplo de un dominio de unión a albúmina bacteriano. Los ejemplos de péptidos de unión a albúmina incluyen una serie de péptidos que tienen la secuencia central DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 307). (Véase, p. ej., Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem 277: 35035-35043). Otros ejemplos de péptidos de unión a albúmina incluyen: RLIEDICLPRWGCLWEDD (SEQ ID NO: 308); QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 309); QGLIGDICLPRWGCLWGDVSK (SEQ ID NO: 310) y GEWWEDICLPRWGCLWEEED (SEQ ID NO: 311).

60 Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos de unión a albúmina que se pueden conjugar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria incluyen los descritos por Muller y Kontermann, en Curr. Opin. Mol. Ther. (2007) 9:319-326; Roovers et al. (2007), Cancer Immunol. Immunother. 56:303-317; Holt et al. (2008) Prot. Ing. Design Sci., 21:283-288. Un ejemplo de tal radical de unión a albúmina es el 2-(3-maleimidopropanamido)-6-(4-(4-yodofenil)butanamido)hexanoato (etiqueta "Albu") (Trussel et al. (2009) Bioconjugate Chem. 20:2286-2292).

Los ácidos grasos, en particular los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) y los compuestos de unión a albúmina



similares a los ácidos grasos de cadena larga se pueden emplear para extender la semivida *in vivo* de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Un ejemplo de un compuesto de unión a albúmina similar a LCFA es el ácido 16-(1-(3-(9-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)-metil)-7-sulfo-9H-fluoren-2-ilamino)-3-oxopropil)-2,5-dioxopirrolidin-3-iltio)hexadecanoico (véase, p. ej., el documento WO 2010/140148).

#### f. Secuencias PAS

Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a al menos un radical heterólogo que es una secuencia PAS, que es una secuencia de aminoácidos que incluye principalmente residuos de alanina y serina o que incluye principalmente residuos de alanina, serina, y prolina. Las secuencias de aminoácidos forman una conformación de bobina al azar en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la secuencia PAS es un bloque de construcción, un polímero de aminoácidos o un casete de secuencia constituida de alanina, serina y prolina, que se puede emplear como parte del radical heterólogo conjugado con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.

Un experto en la técnica es consciente de que un polímero de aminoácidos también puede formar una conformación de bobina al azar cuando se añaden residuos distintos de alanina, serina y prolina como un constituyente minoritario en la secuencia PAS. Los componentes minoritarios incluyen aminoácidos distintos de la alanina, la serina y la prolina que se pueden añadir a la secuencia de PAS en cierto grado, p. ej., hasta aproximadamente 12%, es decir, aproximadamente 12 de 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta aproximadamente 10%, es decir, aproximadamente 10 de 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta aproximadamente 9%, es decir, aproximadamente 9 de 100 aminoácidos, hasta aproximadamente 8%, es decir, aproximadamente 8 de 100 aminoácidos, aproximadamente 6%, es decir, aproximadamente 6 de 100 aminoácidos, aproximadamente 5%, es decir, aproximadamente 5 de 100 aminoácidos, aproximadamente 4%, es decir, aproximadamente 4 de 100 aminoácidos, aproximadamente 3%, es decir, aproximadamente 3 de 100 aminoácidos, aproximadamente 2%, es decir, aproximadamente 2 de 100 aminoácidos, aproximadamente 1%, es decir, aproximadamente 1 de 100 aminoácidos. Los aminoácidos diferentes de alanina, serina y prolina se pueden seleccionar entre Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr o Val.

En condiciones fisiológicas, el estiramiento de la secuencia PAS forma una conformación de bobina al azar y, por lo tanto, puede mediar un aumento de estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* para cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Dado que el dominio de bobina al azar no adopta una estructura o función estable por sí mismo, la actividad biológica mediada por cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se conserva esencialmente. En otros ejemplos, las secuencias PAS que forman un dominio de la bobina al azar son biológicamente inertes, especialmente con respecto a la proteólisis en plasma sanguíneo, inmunogenicidad, punto isoelectrico/comportamiento electrostático, unión a receptores de superficie celular o internalización, pero aún son biodegradables, lo que proporciona claras ventajas sobre polímeros sintéticos como PEG.

Los ejemplos no limitantes de las secuencias PAS que forman una conformación de bobina al azar incluyen una secuencia de aminoácidos tal como ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 312), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 313), APSSPSPSPASSPSPASS (SEQ ID NO: 314), APSSPSPSPASSPSPASS (SEQ ID NO: 315), SSPSPSPSPASSPSPASS (SEQ ID NO: 316), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPP (SEQ ID NO: 317), ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 318) o cualquier combinación de las mismas. Se conocen ejemplos adicionales de secuencias PAS en la técnica (véase, p.ej., la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2010/0292130 y la Publicación PCT Internacional Núm. WO 2008/155134).

#### g. Secuencias HAP

Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a al menos un radical heterólogo que es un polímero de homo-aminoácidos (HAP) rico en glicina. La secuencia HAP puede incluir una secuencia repetitiva de glicina, que tiene al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, 120 aminoácidos, 140 aminoácidos, 160 aminoácidos, 180 aminoácidos, 200 aminoácidos, 250 aminoácidos, 300 aminoácidos, 350 aminoácidos, 400 aminoácidos, 450 aminoácidos o 500 aminoácidos de longitud. En un ejemplo, la secuencia HAP es capaz de prolongar la semivida de un radical fusionado o conectado a la secuencia HAP. Los ejemplos no limitantes de la secuencia HAP incluyen, pero no se limitan a (Gly)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 368), (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 343) o Ser (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 595), en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20. En un ejemplo, n es 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40. En otro ejemplo, n es 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200.

#### h. Secuencias XTEN

Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a al menos un radical heterólogo que incluye una secuencia, polipéptido o

fragmento, variante o derivado de XTEN. La secuencia XTEN es una secuencia de polipéptidos de longitud prolongada con secuencias no repetitivas que se producen de forma natural y que se componen principalmente de aminoácidos hidrófilos pequeños, teniendo la secuencia un bajo grado o ninguna estructura secundaria o terciaria en condiciones fisiológicas (Schellenberger et al. (2009) Nat Biotechnol. 27(12):1186-1190). Una secuencia XTEN ilustrativa es un polipéptido recombinante no estructurado de 864 aminoácidos (SEQ ID NO: 373), que prolonga la semivida en plasma de la proteína fusionada al radical. Como radical heterólogo, las secuencias XTEN pueden funcionar como un radical de prolongación de la semivida. Además, las secuencias XTEN pueden proporcionar propiedades deseables que incluyen, pero no se limitan a, mejora de los parámetros farmacocinéticos y de las características de solubilidad. Por ejemplo, la conjugación de secuencias XTEN a cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede conferir una o más de las siguientes propiedades ventajosas: flexibilidad conformacional, solubilidad en agua mejorada, alto grado de resistencia a proteasa, baja inmunogenicidad, baja unión a receptores de mamíferos o aumento de los radios hidrodinámicos (o Stokes). En algunos ejemplos, una secuencia XTEN puede aumentar propiedades farmacocinéticas tales como mayor semivida *in vivo* o aumento del área bajo la curva (AUC), de modo que cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria permanezca *in vivo* y conserve la actividad adenosina desaminasa durante un mayor período de tiempo en comparación con la misma ADA2 sin el radical heterólogo XTEN.

Los ejemplos de secuencias XTEN que se pueden emplear como radicales heterólogos conjugados con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria incluyen cualquiera de los descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.855.279 y 7.846.445, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2009/0092582, 2010/0239554, 2010/0323956, 2011/0046060, 2011/0046061, 2011/0077199, 2011/0172146, 2012/0178691, 2013/0017997o 2012/0263701, o las Publicaciones Internacionales de Patente Núm. WO 2010091122, WO 2010144502, WO 2010144508, WO 2011028228, WO 2011028229o WO 2011028344.

#### 25 i. Transferrina o Fragmento de la misma

Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a al menos un radical heterólogo que es una transferrina o un fragmento de la misma. Cualquier transferrina se puede conjugar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, la Tf humana salvaje (Tf) es una proteína de 679 aminoácidos (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 320 y 324; Núm. Acc. GenBank NP\_001054.1 y AAB22049.1; secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 319 y 322-323, Núm. Acc. GenBank NM001063, M12530, XM039845 y S95936), de aproximadamente 75 kDa (excluyendo la glicosilación), con dos dominios principales, el dominio N terminal (aproximadamente 330 aminoácidos) y el dominio C terminal (aproximadamente 340 aminoácidos), que parecen originarse a partir de una duplicación de genes. El dominio N incluye dos subdominios, el dominio N1 y el dominio N2, y el dominio C incluye dos subdominios, el dominio C1 y el dominio C2.

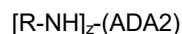
En un ejemplo, el radical heterólogo de transferrina incluye una variante de empalme de transferrina. En un ejemplo, la variante de empalme de transferrina puede ser una variante de empalme de transferrina humana (SEQ ID NO: 325; Genbank Acc. Núm. AAA61140). En otro ejemplo, la porción de transferrina de la proteína quimérica incluye uno o más dominios de la secuencia de transferrina, p. ej., dominio N, dominio C, dominio N1, dominio N2, dominio C1, dominio C2 o cualquier combinación de los mismos.

#### 45 j. Conjugación de polímeros

Un producto conjugado de ADA2 proporcionado en la presente memoria puede incluir una ADA2 que está conectada, directa o indirectamente, a al menos un radical heterólogo que es una molécula polimérica (polímero). Los polímeros ilustrativos son aquellos tales como polioles (es decir, poli-OH), poliaminas (es decir, poli-NH<sub>2</sub>) y ácidos policarboxílicos (es decir, poli-COOH) y otros heteropolímeros, es decir, polímeros que contienen uno o más grupos de acoplamiento diferentes p. ej., un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas entre los óxidos de polialquileño (PAO), tales como los polialquilenglicoles (PAG), incluidos los polietilenglicoles (PEG), los copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, los metoxipolietilenglicoles (mPEG) y los polipropilenglicoles, PEG-glicidil éteres (Epoxy-PEG), polietilenglicoles (PEG) ramificados de PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, polioxazolona, poliacriloilmorfolina, poli-D,L-aminoácidos, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, dextranos incluyendo carboximetil-dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, productos hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietil-almidones e hidroxipropil almidones, glucógeno, agarosas y derivados de los mismos, goma guar, pululano, inulina, goma de xantano, carragenano, pectina, productos hidrolizados de ácido algínico, biopolímero y los descritos en la técnica, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos Núm. 8.741.283 y en la Publicación PCT internacional Núm. WO 2007/149686.

Por ejemplo, el polímero conjugado con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria generalmente puede

corresponder a la siguiente fórmula:



- 5 en donde (ADA2) representa cualquier ADA2 descrita en la presente memoria, tal como formas de tipo salvaje, variantes o modificadas de la misma;  
 NH- es un grupo amino de un aminoácido encontrado en la ADA2 proporcionada en la presente memoria para el anclaje al polímero;  
 z es un número entero positivo, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 32, o 1-3, 2-4, 3-5, 4-6,  
 10 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, 18-20, 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25, 24-26, 25-27, 26-28, 27-29, 28-30, 29-31 o 30-32;  
 R es una molécula polimérica sustancialmente no antigénica que está unida a la ADA2 proporcionada en la presente memoria en una forma liberable o no liberable. Una molécula polimérica no antigénica ilustrativa puede ser cualquiera descrita en la presente memoria y las descritas en la técnica, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.741.283 y la Publicación PCT Internacional Núm. WO 2007/149686.

Por ejemplo, cualquier ADA2 descrita en la presente memoria se puede conjugar con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG). En algunos ejemplos, el polímero puede ser soluble en agua. En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se conjuga con un radical heterólogo de PEG e incluye adicionalmente un radical heterólogo seleccionado entre una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma (p. ej., una región Fc), una secuencia PAS, hidroxietilalmidón (HES) y albúmina o fragmento o variante de la misma, una secuencia XTEN o cualquier combinación de los mismos.

El anclaje (conjugación) covalente u otro anclaje estable de moléculas poliméricas, tales como el polietilenglicol (fracción de PEGilación (PEG)), a cualquier polipéptido de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, confieren propiedades beneficiosas a la composición resultante de polímero ADA2. Dichas propiedades incluyen mejora de la biocompatibilidad, prolongación de la semivida de la proteína (y actividad enzimática) en el plasma, células y/o en otros tejidos dentro de un sujeto, protección eficaz de la proteína frente a proteasas e hidrólisis, mejora de la biodistribución, mejora de la farmacocinética y/o farmacodinámica, aumento de la estabilidad, disminución de la inmunogenicidad, prolongación/mantenimiento de los efectos del tratamiento en un sujeto y aumento de la solubilidad en agua (véase la Patente de Estados Unidos Núm. 4.179.337).

#### i. Polietilenglicol (PEG)

35 El polietilenglicol (PEG) se ha utilizado ampliamente en biomateriales, biotecnología y medicina principalmente debido a que el PEG es un polímero biocompatible, no tóxico, soluble en agua que generalmente no es inmunogénico (Zhao y Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997). En el área de la administración de fármacos, los derivados de PEG se han utilizado ampliamente en el anclaje covalente (es decir, "PEGilación") a proteínas para reducir la inmunogenicidad, la proteólisis y la depuración renal y para mejorar la solubilidad (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995). De manera similar, el PEG se ha anclado a fármacos relativamente hidrófobos de bajo peso molecular para mejorar la solubilidad, reducir la toxicidad y alterar la biodistribución. Típicamente, los fármacos PEGilados se inyectan en forma de soluciones.

Una aplicación estrechamente relacionada es la síntesis de redes o formulaciones de PEG degradables entrecruzadas para su uso en la administración de fármacos, ya que gran parte de la misma química utilizada en el diseño de portadores de fármacos degradables y solubles también se puede utilizar en el diseño de geles degradables (Sawhney et al., Macromolecules 26: 581-87, 1993). También se sabe que se pueden formar complejos intermacromoleculares mezclando soluciones de dos polímeros complementarios. Tales complejos generalmente se estabilizan por medio de interacciones electrostáticas (polianión-policación) y/o enlaces de hidrógeno (poliácido-polibase) entre los polímeros implicados, y/o por medio de interacciones hidrófobas entre los polímeros en un entorno acuoso (Krupers et al., Eur. Polym J. 32:785-790, 1996). Por ejemplo, la mezcla de soluciones de poli(ácido acrílico) (PAAc) y poli(óxido de etileno) (PEO) en las condiciones adecuadas da como resultado la formación de complejos basados principalmente en enlaces de hidrógeno. La disociación de estos complejos en condiciones fisiológicas se ha utilizado para el suministro de fármacos libres (es decir, no PEGilados). Además, se han formado complejos de polímeros complementarios a partir de homopolímeros y copolímeros.

Se han descrito numerosos reactivos para PEGilación en la técnica. Tales reactivos incluyen, pero no están limitados a, PEG activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidil mPEG, mPEG<sub>2</sub>-N-hidroxisuccinimida, mPEG alfa-metilbutanoato de succinimidilo, mPEG-propionato de succinimidilo, mPEG-butanoato de succinimidilo, mPEG-éster de succinimidilo de ácido carboximetil 3-hidroxibutanoico, PEG homobifuncional-propionato succinimidilo, PEG homobifuncional-propionaldehído, PEG homobifuncional-butiraldehído, PEG-maleimida, PEG-hidrazida, carbonato de p-nitrofenilo-PEG, mPEG-carbonato de benzotriazol, propionaldehído-PEG, mPEG-butiraldehído, mPEG<sub>2</sub> ramificado-butiraldehído, mPEG-acetilo, mPEG-piperidona, mPEG-metilcetona, mPEG "sin conector" maleimida, mPEG-vinilsulfona, mPEG-tiol, mPEG-ortopiridiltoester, mPEG-disulfuro de ortopiridilo, Fmoc-PEG-NHS,

Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato de PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS, y biotina PEG-NHS (véanse p. ej., Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; documentos US 5.672.662; US 5.932.462; US 6.495.659; US 6.737.505; US 4.002.531; US 4.179.337; US 5.122.614; US 5.324.844; US 5.446.090; US 5.612.460; US 5.643.575; US 5.766.581; US 5.795.569; US 5.808.096; US 5.900.461; US 5.919.455; US 5.985.263; US 5.990.237; US 6.113.906; US 6.214.966; US 6.258.351; US 6.340.742; US 6.413.507; US 6.420.339; US 6.437.025; US 6.448.369; US 6.461.802; US 6.828.401; US 6.858.736; US 8.741.283; US 2001/0021763; US 2001/0044526; US 2001/0046481; US 2002/0052430; US 2002/0072573; US 2002/0156047; US 2003/0114647; US 2003/0143596; US 2003/0158333; US 2003/0220447; US 2004/0013637; US 2004/0235734; WO 05000360; US 2005/0114037; US 2005/0171328; US 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 94/28024; y WO 01/87925).

En particular, el polímero es un polietilenglicol (PEG). Las moléculas poliméricas adecuadas para su anclaje a cualquier polipéptido de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tales como metoxi-polietilenglicoles (mPEG), éteres de PEG-glicidilo (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y óxido de polietileno (PEO) (véanse p. ej., Roberts et al., *Advanced Drug Delivery Review* (2002) 54: 459-476; Harris y Zalipsky, S (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry y Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar et al., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1):125-136, 2000; Harris, (2003) *Nature Reviews Drug Discovery* 2:214-221; y Tsubery, (2004) *J Biol. Chem* 279(37):38118-24).

El radical polimérico, tal como el radical de PEG, puede tener un peso molecular que varía típicamente de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa. En algunas realizaciones, la molécula polimérica que se conjuga con una proteína, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, tiene un peso molecular de al menos, o al menos aproximadamente, o 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 kDa o más de 1000 kDa. Se pueden emplear otros tamaños, dependiendo del perfil deseado (p. ej., la duración deseada de la liberación sostenida, los efectos, si los hubiera, sobre la actividad biológica, la facilidad de manejo, el grado o la falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol en una proteína o análogo).

El radical de PEG puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. En algunos ejemplos, el polímero heterólogo es un PEG con una estructura ramificada. Los polietilenglicoles ramificados se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.643.575; Morpurgo et al. (1996) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 59-72; Vorobjev et al. (1999) *Nucleoside Nucleotide* 18: 2745-2750; y Caliceti et al. (1999) *Bioconjug. Chem* 10: 638-646.

Si bien se han descrito numerosas reacciones para la PEGilación, las que son más generalmente aplicables confieren direccionalidad, utilizan condiciones de reacción suaves y no requieren un procesamiento extensivo aguas abajo para eliminar catalizadores o subproductos tóxicos. Por ejemplo, el monometoxi PEG (mPEG) tiene solo un hidroxilo terminal reactivo y, por lo tanto, su uso limita parte de la heterogeneidad de la mezcla resultante de producto de PEG-proteína. La activación del grupo hidroxilo en el extremo del polímero opuesto al grupo metoxi terminal es generalmente necesaria para lograr una PEGilación de proteínas eficaz, con el objetivo de hacer que el PEG derivatizado sea más susceptible al ataque nucleofílico. El nucleófilo atacante suele ser el grupo épsilon-amino de un residuo de lisina, pero también pueden reaccionar otras aminas (p. ej. la alfa-amina N-terminal o las aminas del anillo de histidina) si las condiciones locales son favorables.

Es posible un anclaje más dirigido en proteínas que contienen una sola lisina o cisteína. El último residuo puede ser dirigido por PEG-maleimida para la modificación específica de tiol. Alternativamente, la hidrazida de PEG se puede hacer reaccionar con una proteína oxidada de peryodato y reducir en presencia de NaCNBH<sub>3</sub>. Más específicamente, los azúcares CMP PEGilados se pueden hacer reaccionar con una proteína en presencia de glicosiltransferasas apropiadas. Alternativamente, la pegilación de ADA2 se puede producir en variantes que contienen sustituciones con aminoácidos no naturales que permiten la conjugación química específica de sitio en posiciones optimizadas dentro de la proteína. Las técnicas de PEGilación pueden permitir que una serie de moléculas poliméricas se acoplen al polipéptido en cuestión. Cuando se emplea esta técnica, el sistema inmunitario tiene dificultades para reconocer los epítopos en la superficie del polipéptido responsables de la formación de anticuerpos, reduciendo así la respuesta inmunitaria. Para los polipéptidos introducidos directamente en el sistema circulatorio del cuerpo humano para proporcionar un efecto fisiológico concreto (es decir productos farmacéuticos) la respuesta inmunitaria potencial típica es una respuesta de IgG y/o IgM, mientras que los polipéptidos que se inhalan a través del sistema respiratorio (es decir polipéptido industrial) potencialmente pueden causar una respuesta de IgE (es decir respuesta alérgica). Una de las teorías que explican la reducción de la respuesta inmunitaria es que la molécula o las moléculas poliméricas protegen el epítipo o los epítopos en la superficie del polipéptido responsable de la respuesta inmunitaria que conduce a la formación de anticuerpos. Otra teoría o al menos un factor parcial es que cuanto más pesado es el producto conjugado, se obtiene una respuesta inmunitaria más reducida.

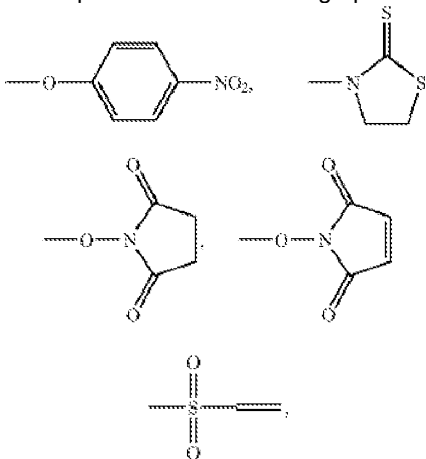
Típicamente, para preparar los polipéptidos de ADA2 PEGilados proporcionados en la presente memoria, incluyendo

polipéptidos de ADA2 variantes, los radicales de PEG se conjugan, mediante anclaje covalente, a los polipéptidos. Las técnicas para la PEGilación incluyen, entre otras, conectores especializados y químicas de acoplamiento (véase p. ej., Roberts et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), la unión de múltiples radicales de PEG a un único sitio de conjugación (por ejemplo, mediante el uso de PEG ramificados; véase p. ej., Guiotto et al., *Bioorg. Med. Chem Lett.* 12:177-180, 2002), PEGilación específica de sitio y/o mono-PEGilación (véase p. ej., Chapman et al., *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999) y PEGilación enzimática dirigida al sitio (véase p. ej., Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 487-504, 2002). Los métodos y mecanismos descritos en la técnica pueden producir proteínas que tienen al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 derivados de PEG o PEG unidos a una sola molécula de proteína (véase p. ej., el documento U.S. 2006/0104968).

El número de radicales de polietilenglicol anclados a cada molécula de ADA2 también puede variar. Por ejemplo, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede conjugar, de promedio, con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 o más moléculas de polietilenglicol. Por ejemplo, los polipéptidos de ADA2 PEGilados, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, generalmente contienen al menos 5 radicales de PEG por molécula. En otros ejemplos, el intervalo del número de moléculas de PEG por molécula de proteína puede ser 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, 18-20, 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25, 24-26, 25-27, 26-28, 27-29, 28-30, 29-31 o 30-32. Por ejemplo, los polipéptidos de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, pueden tener una razón molar de PEG a proteína entre 32:1 y 1:1, tal como aproximadamente o hasta 30:1, 20:1, 15:1, 10:1 y 5:1. El número de moléculas de PEG por proteína se puede variar para modificar las propiedades físicas y cinéticas del producto conjugado combinado para adaptarse a cualquier situación clínica particular, según lo determine un experto en la técnica. Los métodos para determinar la razón molar de PEG a proteína se describen en la técnica, por ejemplo, por Delgado et al. (1992) en *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.* 9: 249-304).

El anclaje covalente del PEG al fármaco (conocido como "PEGilación") se puede lograr mediante técnicas de síntesis química conocidas. Por ejemplo, la PEGilación de la proteína se puede lograr haciendo reaccionar el PEG activado por NHS con la proteína en condiciones de reacción adecuadas. En la técnica se conocen diversos métodos para modificar polipéptidos mediante el anclaje covalente (conjugación) de un PEG o derivado de PEG (es decir., "PEGilación") (véanse p. ej., los documentos U.S. 5.672.662; U.S. 6.737.505; U.S. 2004/0235734; U.S. 2006/0104968). El anclaje covalente de una variedad de polímeros, tales como PEG o derivados de PEG, se describe en el documento U.S. 8.741.283.

Los polímeros y derivados activados se pueden emplear para facilitar la conjugación del polímero con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Los polímeros y derivados activados tienen un grupo eliminable o activador, que facilita la unión del sistema polimérico a un grupo amina que se encuentra en el polipéptido, tal como una ADA2 proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, los grupos activados son aquellos grupos que son capaces de reaccionar con un grupo amina (nucleófilo) que se encuentra en cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, tal como el grupo amina épsilon de la lisina. Los grupos activadores ilustrativos incluyen:



y

u otros grupos eliminables o activadores adecuados tales como N-hidroxibenzotriazolilo, halógeno, N-hidroxiftalimidilo, imidazolilo, O-acilureas, pentafluorofenol, 2,4,6-tri-clorofenol u otros grupos eliminables adecuados evidentes para un experto en la técnica.

Los PEG activados ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos en la técnica, tales como en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.122.614, 5.324.844, 5.612.460 y 5.808.096 (polietilenglicol activado con carbonato de succinimidilo (SC-PEG) y PEG activados relacionados), y en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.349.001 (PEG activados con tiona de imida cíclica). Las reacciones de conjugación típicamente se llevan a cabo en un tampón

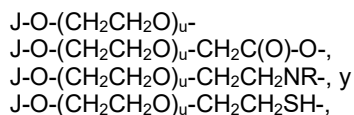
adecuado empleando un exceso molar de varias veces de PEG activado. En algunos ejemplos, los productos conjugados se preparan con PEG lineales, tales como SC-PEG, y pueden contener, de promedio, de aproximadamente 1 a aproximadamente 32 moléculas de PEG por molécula de proteína. En consecuencia, para estos, se pueden emplear excesos molares de varios cientos de veces, p. ej., de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces. El exceso molar empleado para los polímeros ramificados y los polímeros anclados a la enzima será menor y se puede determinar empleando los mecanismos conocidos en la técnica.

En algunos ejemplos, los conectores poliméricos activados de los sistemas poliméricos se basan en la eliminación de bencilo o la lactonización con bloqueo de trimetilo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.180.095, 6.720.306, 5.965.119, 6.624.142 y 6.303.569. En otros ejemplos, la conjugación polimérica de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede lograr empleando residuos de polímero bicina, como se describe en la técnica, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.122.189, 7.087.229 y 8.741.283. En otros ejemplos, la conjugación polimérica de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede lograr empleando residuos poliméricos ramificados, tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.681.567, 5.756.593, 5.643.575; 5.919.455, 6.113.906, 6.153.655, 6.395.266 y 6.638.499, 6.251.382, 6.824.766 y 8.741.283. En otros ejemplos, la conjugación polimérica de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede lograr empleando un conector basado en éster con impedimento estérico, tal como los descritos en International la Publicación PCT Núm. WO 2008/034119. En algunos ejemplos, el polietilenglicol activado es uno que proporciona una conexión uretano o una conexión amida con la proteína tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.

Los métodos para preparar polímeros que tienen ácidos carboxílicos terminales con alta pureza se describen en la técnica, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2007/0173615. Los métodos incluyen en primer lugar la preparación de un éster alquílico terciario de un poli(óxido de alquileo) seguida de la conversión en el derivado ácido carboxílico del mismo. La primera etapa de la preparación de los ácidos carboxílicos de PAO del procedimiento incluye formar un intermedio tal como el éster t-butílico del ácido carboxílico de poli(óxido de alquileo). Este intermedio se forma haciendo reaccionar un PAO con un haloacetato de t-butilo en presencia de una base tal como t-butóxido de potasio. Una vez que se ha formado el intermedio éster t-butílico, el derivado ácido carboxílico del óxido de polialquileo se puede proporcionar fácilmente en purezas superiores a 92%, por ejemplo, superiores a 97%, 99% o 99,5%.

En otros ejemplos, los polímeros que tienen grupos amino terminales se pueden emplear para preparar productos conjugados con ADA2 proporcionados en la presente memoria. Los métodos de preparación de polímeros que contienen aminas terminales en alta pureza se describen en la técnica, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.868.131 y 7.569.657. Por ejemplo, los polímeros que tienen azidas reaccionan con un agente reductor a base de fosfina como trifenilfosfina o un agente borohidruro de metal alcalino reductor tal como NaBH<sub>4</sub>. Alternativamente, los polímeros que incluyen grupos eliminables reaccionan con sales de amina protegidas tales como la sal de potasio de imidodicarbonato de metil-terc-butilo (KNMeBoc) o la sal de potasio de imidodicarbonato de di-terc-butilo (KNBoc<sub>2</sub>) seguido de la desprotección del grupo amina protegido. La pureza de los polímeros que contienen las aminas terminales formadas por medio de estos procedimientos es mayor que aproximadamente 95%, tal como mayor que 99%.

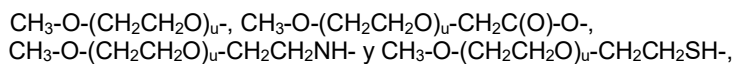
En algunos ejemplos, la porción PEG del producto conjugado polimérico de ADA2 proporcionado en la presente memoria se puede seleccionar entre:



en donde u es el grado de polimerización, es decir de aproximadamente 10 a aproximadamente 2.300; R se selecciona entre hidrógeno, alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilenilos, alquiniilos C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquilos C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> ramificados, cicloalquilos C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos, alqueniilos C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos, alquiniilos C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos, cicloalquilos C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sustituidos, arilos arilos sustituidos, aralquilos, heteroalquilos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenoxi y heteroalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y

J es un grupo de protección terminal, es decir, un grupo que se encuentra en el extremo del polímero y, en algunos aspectos, se puede seleccionar entre NH<sub>2</sub> (o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), H, SH (o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), CO<sub>2</sub>H (o CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tales como metilo, u otros grupos activadores terminales de PEG conocidos en la técnica.

Por ejemplo, la porción PEG del producto conjugado polimérico se puede seleccionar entre



donde u es un número entero positivo, de modo que el peso molecular total promedio de la porción de

polímero varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa.

En otros ejemplos, la porción PEG del producto conjugado polimérico de ADA2 proporcionado en la presente memoria se puede seleccionar entre:

- 5  
 -Y<sub>1</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-,  
 -Y<sub>1</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>C(=Y<sub>2</sub>)-Y<sub>1</sub>-,  
 -Y<sub>1</sub>-C(=Y<sub>2</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>a<sub>1</sub></sub>-Y<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Y<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>a<sub>1</sub></sub>-C(=Y<sub>2</sub>)-Y<sub>1</sub>-,  
 -Y<sub>1</sub>-(CR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>)<sub>a<sub>2</sub></sub>-Y<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>b<sub>1</sub></sub>-O--(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>b<sub>1</sub></sub>--(CH<sub>2</sub>)<sub>b<sub>1</sub></sub>-Y<sub>3</sub>-(CR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>)<sub>a<sub>2</sub></sub>-Y<sub>1</sub>-,  
 10  
 -Y<sub>1</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,  
 -Y<sub>1</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>C(=Y<sub>2</sub>)-,  
 -C(=Y<sub>2</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>a<sub>1</sub></sub>-Y<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Y<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>a<sub>1</sub></sub>-C(=Y<sub>2</sub>)-, y  
 -(CR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>)<sub>a<sub>2</sub></sub>-Y<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>b<sub>1</sub></sub>-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>b<sub>1</sub></sub>-Y<sub>3</sub>-(CR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>)<sub>a<sub>2</sub></sub>-,  
 en donde: Y<sub>1</sub> y Y<sub>3</sub> son independientemente O, S, SO, SO<sub>2</sub>, NR<sub>4</sub> o un enlace;  
 15  
 Y<sub>2</sub> es O, S, o NR<sub>5</sub>;  
 R<sub>2</sub>-R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>2</sub>-  
 C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>3</sub>-C<sub>19</sub> ramificado, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquino  
 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido,  
 20  
 heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ariloxi, heteroalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroariloxi,  
 alcanoilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, ariloxicarbonilo, alcanoiloxi C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, arilcarboniloxi,  
 alcanoilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, arilcarbonilo sustituido, alcanoiloxi C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, ariloxicarbonilo sustituido,  
 alcanoil(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)oxi sustituido y arilcarboniloxi sustituido;  
 a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, y B<sub>1</sub> son independientemente cero o un número entero positivo de 1 a 6, por ejemplo, 0, 1 o 2; y  
 u es un número entero de aproximadamente 10 a aproximadamente 2300.

25  
 En otros ejemplos, la porción PEG del producto conjugado polimérico de ADA<sub>2</sub> proporcionado en la presente memoria se puede funcionalizar, por ejemplo, de la siguiente manera:

- 30  
 -C(=Y<sub>4</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-,  
 -C(=Y<sub>4</sub>)-Y-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-,  
 -C(=Y<sub>4</sub>)-NR<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-,  
 -CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u</sub>-  
 35  
 en donde: R<sub>2</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilos, arilos  
 sustituidos, aralquilos, heteroalquilos, heteroalquilos sustituidos y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos;  
 m es cero o es un número entero positivo, tal como 1 o 2,  
 Y<sub>4</sub> es O o S; y  
 u representa el grado de polimerización.

40  
 En algunos ejemplos, los productos conjugados poliméricos de ADA2 proporcionados en la presente memoria se pueden preparar mediante métodos que incluyen convertir los productos de múltiples brazos PEG-OH o "PEG de tipo estrella", fabricados por NOF Corp, Tokio, Japón, en un polímero adecuadamente activado, utilizando las técnicas de activación descritas en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.122.614 o 5.808.096. En un ejemplo, los polímeros de múltiples brazos pueden contener cuatro o más brazos de polímero y preferiblemente de cuatro u ocho brazos de polímero. En algunos ejemplos, cuatro de los brazos de PEG se convierten en grupos funcionales adecuados, tales como carbonato de succinimidilo (SC), para facilitar la unión al polipéptido, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.

50  
 Los productos conjugados poliméricos proporcionados en la presente memoria pueden ser solubles en agua a temperatura ambiente. Una lista no limitante de tales polímeros incluye homopolímeros de poli(óxido de alqueno) tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxi etilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros en bloque de los mismos.

55  
 Como ejemplo de un método ilustrativo para fabricar polipéptidos de ADA2 PEGilados, que incluyen polipéptidos de ADA2 variantes, se han aplicado aldehídos, succinimidias y carbonatos de PEG para conjugar radicales de PEG, típicamente succinimidil PEG. Los reactivos de succinimidil monoPEG (mPEG) ilustrativos que incluyen mPEG-Propionatos de Succinimidilo (mPEG-SPA), mPEG-Éster de Carboximetil Succinimidilo (mPEG-SCM), mPEG-Butanoatos de Succinimidilo (mPEG-SBA) y (para anclar PEG "ramificados") mPEG2-N-Hidroxilsuccinimida. Estos ésteres de succinimidilo PEGilados contienen cadenas principales de carbono de diferente longitud entre el grupo PEG y el entrecruzador activado, y un grupo PEG único o ramificado. Estas diferencias se pueden emplear, por ejemplo, para proporcionar una cinética de reacción diferente y para restringir potencialmente los sitios disponibles para la unión de PEG a ADA2 durante el procedimiento de conjugación. Tales composiciones de ADA2 PEGiladas se pueden purificar fácilmente para producir composiciones que tienen al menos de aproximadamente 90% a aproximadamente 100% de moléculas de ADA2 PEGiladas, y que están sustancialmente libres de ADA2 no

PEGilada (menos del 5% no PEGiladas).

En un ejemplo, la PEGilación incluye la conjugación de mPEG-SCM, por ejemplo, mPEG-SCM-20K (que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa) u otros ésteres de carboximetil succinimidilo de derivados de PEG, con cualquier polipéptido de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes. Los ésteres de carboximetil succinimidilo de derivados de PEG, tales como mPEG-SCM-20K se acoplan fácilmente a los grupos amino de las lisinas en las proteínas o la amina N-terminal en moléculas biológicamente activas. Por ejemplo, la conjugación covalente de m-PEG-SCM-20K y ADA2 (que tiene un tamaño aproximado de 59 kDa como monómero) proporciona enlaces amida estables entre ADA2 y mPEG. Típicamente, el mPEG-SCM-20K u otro PEG se añade a cualquier polipéptido de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, a una razón molar de PEG:polipéptido de 15:1 en un tampón adecuado, seguido de esterilización, p. ej., filtración estéril y conjugación continua, por ejemplo, con agitación, durante la noche a 4°C en una sala fría.

En la técnica se conocen otros métodos de acoplamiento de ésteres succinimidilo de PEG, incluidos los derivados de ácido butanoico tales como mPEG-SBA-30K, a un polipéptido (véanse p. ej., los documentos U.S. 5.672.662; U.S. 6.737.505; U.S. 8.784.791; U.S. 2004/0235734 y U.S. 2005/0158273). Por ejemplo, un polipéptido, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, se puede acoplar a un derivado de PEG activado por NHS mediante reacción en un tampón de borato (0,1 M, pH 8,0) durante una hora a 4°C. La proteína PEGilada resultante se puede purificar por ultrafiltración. Alternativamente se puede lograr, la PEGilación de una fosfatasa alcalina bovina mezclando la fosfatasa con mPEG-SBA en un tampón que contiene fosfato de sodio 0,2 M y NaCl 0,5 M (pH 7,5) a 4°C durante 30 minutos. El PEG que no ha reaccionado se puede eliminar por ultrafiltración o empleando columnas de resina tales como las columnas de resina Capto Fenilo (GE Healthcare). Otro método hace reaccionar el polipéptido con mPEG-SBA en agua desionizada a la que se añade trietilamina para elevar el pH a 7,2-9. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante varias horas para completar la PEGilación.

Como se muestra en la presente memoria, la PEGilación de la ADA2 variante confiere reducción en la propiedad de unión a heparina de la ADA2. La reducción en la unión a heparina puede ser adicional a cualquier unión a heparina atenuada resultante de los reemplazos de aminoácidos que reducen la unión a heparina. Por lo tanto, la PEGilación de ADA2 también mejora las propiedades farmacocinéticas de ADA2, y la PEGilación se puede emplear en lugar de, o, además, de los reemplazos de aminoácidos para atenuar la unión a heparina.

## ii) Hidroxietilalmidón (HES)

En algunos ejemplos, al menos un radical heterólogo es un polímero, p. ej., hidroxietilalmidón (HES) o un derivado del mismo. El hidroxietilalmidón (HES) es un derivado de la amilopectina natural y es degradado por la alfa-amilasa en el organismo. El HES es un derivado sustituido del polímero carbohidratado amilopectina, que está presente en el almidón de maíz a una concentración de hasta 95% en peso. El HES exhibe propiedades biológicas ventajosas y se emplea como agente de reemplazo del volumen sanguíneo y en la terapia de hemodilución en la práctica clínica.

La amilopectina contiene radicales de glucosa, en donde en la cadena principal están presentes enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos y en los sitios de ramificación se encuentran enlaces  $\alpha$ -1,6-glicosídicos. Las propiedades fisicoquímicas de esta molécula están determinadas principalmente por el tipo de enlaces glicosídicos. Debido al enlace  $\alpha$ -1,4-glicosídico mellado, se producen estructuras helicoidales con aproximadamente seis monómeros de glucosa por giro. Las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas del polímero se pueden modificar mediante sustitución. La introducción de un grupo hidroxietilo se puede lograr mediante hidroxietilación alcalina. Al adaptar las condiciones de reacción, es posible explotar la diferente reactividad del grupo hidroxilo respectivo en el monómero de glucosa no sustituido con respecto a la hidroxietilación. Un experto en la técnica puede determinar el patrón de sustitución. El HES se caracteriza principalmente por la distribución del peso molecular y el grado de sustitución (DS), que se refiere a la razón molar de la sustitución.

En un ejemplo, el hidroxietilalmidón tiene un peso molecular medio (media de peso) de 1 a 300 kD, de 2 a 200 kD, de 3 a 100 kD o de 4 a 70 kD. El hidroxietilalmidón puede exhibir adicionalmente un grado molar de sustitución (DS) de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,1 a 2, más preferiblemente, de 0,1 a 0,9, preferiblemente de 0,1 a 0,8, y una razón entre la sustitución C2:C6 en el intervalo de 2 a 20 con respecto a los grupos hidroxietilo. Un ejemplo no limitante de HES que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD es un HES con un DS de 0,2 a 0,8, tal como 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8, y en particular, un DS de 0,4 a 0,7 tal como 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7.

En un ejemplo, el HES puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD y es VOLUVEN® (Fresenius Kabi, Alemania). VOLUVEN® es un coloide artificial, empleado, p. ej., para el reemplazo de volumen empleado en la indicación terapéutica para la terapia y la profilaxis de la hipovolemia. Las características de VOLUVEN® son un peso molecular medio de  $130 \pm 20$  kDa, con una sustitución molar de 0,4 y una razón C2:C6 de aproximadamente 9:1. En otros ejemplos, los intervalos de peso molecular medio del hidroxietilalmidón son, p. ej., de 4 a 70 kDa o de 10 a 70 kDa o de 12 a 70 kDa o de 18 a 70 kDa o de 50 a 70 kDa o de 4 a 50 kDa o de 10 a 50 kDa o de 12 a 50 kDa o de 18 a 50 kDa o de 4 a 18 kDa o de 10 a 18 kDa o de 12 a 18 kDa o de 4 a 12 kDa o de 10 a 12



kDa o de 4 a 10 kDa. En otros ejemplos, el peso molecular medio del hidroxietilalmidón empleado está en el intervalo de más de 4 kDa y menos de 70 kDa, tal como aproximadamente 10 kDa, o en el intervalo de 9 a 10 kDa o de 10 a 11 kDa o de 9 a 11 kDa, o aproximadamente 12 kDa, o en el intervalo de 11 a 12 kDa) o de 12 a 13 kDa o de 11 a 13 kDa, o aproximadamente 18 kDa, o en el intervalo de 17 a 18 kDa o de 18 a 19 kDa o de 17 a 19 kDa, o aproximadamente 30 kDa, o en el intervalo de 29 a 30, o de 30 a 31 kDa, o aproximadamente 50 kDa, o en el intervalo de 49 a 50 kDa o de 50 a 51 kDa o de 49 a 51 kDa.

En algunos ejemplos, el radical heterólogo puede ser una mezcla de hidroxietil almidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y/o diferentes grados de sustitución y/o diferentes razones de sustitución C2:C6. Por lo tanto, se pueden emplear mezclas de hidroxietilalmidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y diferentes razones de sustitución C2:C6, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y la misma o aproximadamente la misma razón de sustitución C2:C6, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y diferentes razones de sustitución C2:C6, o que tienen el mismo o aproximadamente el mismo peso molecular medio y diferentes grados de sustitución y diferentes razones de sustitución C2:C6, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y la misma o aproximadamente la misma razón de sustitución C2:C6, o que tienen los mismos o aproximadamente los mismos pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y la misma o aproximadamente la misma razón de sustitución C2:C6, o que tienen el mismo o aproximadamente el mismo peso molecular medio y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y diferentes razones de sustitución C2:C6, o que tienen aproximadamente el mismo peso molecular medio y aproximadamente el mismo grado de sustitución y aproximadamente la misma razón de sustitución C2:C6.

### iii) Ácidos Polisálicos (PSA)

En ciertos ejemplos, al menos un radical heterólogo es un polímero, p. ej., ácidos polisálicos (PSA) o un derivado de los mismos. Los ácidos polisálicos (PSA) son polímeros naturales no ramificados de ácido siálico producidos por ciertas cepas bacterianas y en mamíferos en ciertas células (Roth J., et al. (1993) en *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhauser Verlag, Basilea, Suiza), pág. 335-348). Se pueden producir en diversos grados de polimerización desde aproximadamente 80 o más residuos de ácido siálico hasta aproximadamente 2, por hidrólisis ácida limitada o por digestión con neuraminidasas, o por fraccionamiento de las formas naturales del polímero derivadas de bacterias.

La composición de diferentes ácidos polisálicos también varía de tal manera que existen formas homopoliméricas. es decir, el ácido polisialico conectado mediante  $\alpha$ -2,8 del polisacárido capsular de la cepa K1 de *E. coli* y los meningococos del grupo B, que también se encuentran en la forma embrionaria de la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM). También existen formas heteropoliméricas, tales como el ácido polisialico  $\alpha$ -2,8  $\alpha$ -2,9 alterno de la cepa K92 de *E. coli* y polisacáridos del grupo C de *N. meningitidis*. El ácido siálico también se puede encontrar en copolímeros alternantes con monómeros distintos del ácido siálico como el grupo W135 o el grupo Y de *N. meningitidis*. Los ácidos polisálicos tienen importantes funciones biológicas, incluida la evasión de los sistemas inmunitarios y del complemento por bacterias patógenas y la regulación de la adhesividad glial de las neuronas inmaduras durante el desarrollo fetal (en donde el polímero tiene una función antiadhesiva) (Cho y Troy, (1994) P.N.A.S. 91:11427-11431), aunque no se conocen receptores de ácidos polisálicos en mamíferos.

En otros ejemplos, se emplea el ácido polisialico conectado mediante  $\alpha$ -2,8 de la cepa K1 de *E. coli*, también conocido como ácido colomínico (en varias longitudes). Se han descrito varios métodos para anclar o conjugar ácidos polisálicos a un polipéptido (véanse p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.846.951; el documento WO 01/87922 y el documento US 2007/0191597).

### iv. Otros polimeros

En otros ejemplos, el radical polimérico para la conjugación con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede seleccionar entre uno o más materiales no antigénicos eficaces tales como dextrano, poli(alcoholes vinílicos), polímeros basados en carbohidratos, hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), poli(óxidos de alquileo) y/o copolímeros de los mismos, incluidos otros polímeros conocidos en la técnica y/o descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.153.655. Está dentro del nivel de un experto en la técnica seleccionar el polímero en función del propósito de uso, y seleccionar los métodos de conjugación adecuados.

## 2. Métodos de Producción de Productos Conjugados o Proteínas de Fusión

Los radicales heterólogos se pueden conjugar directa o indirectamente con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, los radicales heterólogos se pueden conjugar de manera postraduccional, después de la producción recombinante del polipéptido de ADA2, mediante enlace químico directo o indirectamente a través de un conector. En otros ejemplos, los radicales heterólogos que son radicales de proteínas o polipéptidos, se

pueden conjugar directa o indirectamente con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. En un ejemplo, los radicales de proteína o polipéptido se pueden conectar directamente, por ejemplo, como una proteína de fusión. En otros ejemplos, el radical heterólogo se conjuga indirectamente, a través de un conector. En otros ejemplos, el radical heterólogo puede estar conectado por enlaces disulfuro formados entre un grupo tiol en el radical heterólogo y los residuos de cisteína en la ADA2 proporcionada en la presente memoria.

### Conectores

Los conectores, o espaciadores, se pueden emplear para conectar radicales y polipéptidos heterólogos, tales como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Un conector se refiere a una secuencia de péptido o polipéptido (p. ej. un péptido sintético o secuencia de polipéptidos), o un conector no peptídico para el cual su función principal es conectar dos radicales, tales como una ADA2 proporcionada en la presente memoria y el radical heterólogo. Los conectores se pueden emplear para mantener la flexibilidad estructural y otras características conformacionales de los residuos individuales o en los niveles estructurales secundarios, terciarios o cuaternarios de dominios o radicales del producto conjugado de polipéptido o proteína de fusión, para mantener las propiedades funcionales de los radicales. Los conectores también pueden proporcionar propiedades beneficiosas adicionales para el producto conjugado de polipéptidos o la proteína de fusión, tales como el aumento de la expresión de proteínas en sistemas de expresión de mamíferos, mejora de las propiedades biofísicas tales como la estabilidad y la solubilidad, la purificación y detección de proteínas mejoradas y/o el aumento de la actividad enzimática. En algunos ejemplos, se pueden conectar en tándem dos o más conectores. Los conectores pueden ser conectores peptídicos que conectan un radical de proteína o polipéptido al polipéptido de ADA2. Otros conectores ilustrativos incluyen agentes de conexión química y agentes de conexión heterobifuncionales.

Cuando existen múltiples conectores entre la ADA2 y el radical heterólogo, cada uno de los conectores puede ser igual o diferente. En general, los conectores proporcionan flexibilidad a la molécula de polipéptido. Los conectores no suelen cortarse; sin embargo, en ciertos ejemplos, tal escisión puede ser deseable. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un conector puede contener uno o más sitios escindibles por proteasas, que pueden ubicarse dentro de la secuencia del conector o flanquear el conector en cualquier extremo de la secuencia del conector.

Los conectores se pueden introducir en secuencias de polipéptidos, tales como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, empleando mecanismos conocidos en la técnica (p. ej., conjugación química, técnicas recombinantes o síntesis de péptidos). Las modificaciones se pueden confirmar mediante análisis de secuencia de ADN. En algunos ejemplos, los conectores se pueden introducir empleando técnicas recombinantes. En otros ejemplos, los conectores se pueden introducir empleando síntesis de péptidos en fase sólida. En otros ejemplos, el polipéptido, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, puede contener simultáneamente uno o más conectores que se han introducido utilizando técnicas recombinantes y uno o más conectores que se han introducido empleando síntesis de péptidos en fase sólida o métodos de conjugación química conocidos en la técnica.

#### i. Conectores Peptídicos

Los conectores peptídicos se pueden emplear para conectar el radical heterólogo al polipéptido de ADA2 proporcionado en la presente memoria. En un ejemplo, los conectores peptídicos se pueden fusionar al extremo C-terminal de un primer polipéptido (p. ej., el polipéptido de ADA2) y el extremo N-terminal de un segundo polipéptido (p. ej., un radical heterólogo de proteína o polipéptido). Esta estructura se puede repetir varias veces de modo que al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4 o más polipéptidos estén conectados entre sí a través de enlaces peptídicos en sus respectivos extremos.

Por ejemplo, dos moléculas (p. ej., el polipéptido de ADA2 y el radical heterólogo) pueden ser adyacentes en la construcción o estar separados por un polipéptido conector que contiene, 1, 2, 3 o más aminoácidos. En algunos ejemplos, el conector peptídico puede contener al menos dos aminoácidos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos. En otros ejemplos, el conector peptídico puede contener al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900, o al menos 1.000 aminoácidos. En algunos ejemplos, el conector peptídico puede contener al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 aminoácidos. El conector peptídico puede contener 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos, 200-300 aminoácidos, 300-400 aminoácidos, 400-500 aminoácidos, 500-600 aminoácidos, 600-700 aminoácidos, 700-800 aminoácidos, 800-900 aminoácidos o 900-1000 aminoácidos. El conector tiene una longitud tal que los dos dominios variables se puentean sin interferencia sustancial. Por ejemplo, un polipéptido conector puede tener una secuencia  $Z_1$ -X- $Z_2$ , donde  $Z_1$  y  $Z_2$  son el polipéptido de ADA2 y el radical heterólogo, respectivamente, y donde X es una secuencia de un conector peptídico. En otro ejemplo, el polipéptido tiene una secuencia de  $Z_1$ -X- $Z_2$ (-X-Z)<sub>n</sub>, donde "n" es cualquier número entero, es decir generalmente 1 o 2.

Típicamente, el conector peptídico tiene una longitud suficiente para permitir que tanto el polipéptido de ADA2 como el radical heterólogo conserven su estructura y funciones conformacionales. Los ejemplos de conectores peptídicos incluyen, pero no están limitados a: residuos de -Gly-Gly, GGGG (SEQ ID NO:362), GGGGG (SEQ ID NO:360), GGGGS o (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:343), SSSSG o (SSSSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:344), GKSSSGSSESKS (SEQ ID NO:345), GGSTSGSGKSSEKKG (SEQ ID NO:346), GSTSGSGKSSSEGSSTKG (SEQ ID NO:347), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:348), EGKSSSGSSESKEF (SEQ ID NO:349), AlaAlaProAla o (AlaAlaProAla)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:350), SGGSGGS (SEQ ID NO:363), GGSGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:364), GGSGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:365), GGSGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:366), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:367), Ser(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:595) o (Gly-Ser)<sub>n</sub> con algunos residuos de Glu o Lys dispersados por todas partes para aumentar la solubilidad, donde n puede ser un número entero de 1 a 20, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. Otros conectores ilustrativos incluyen conectores peptídicos con la fórmula [(Gly)<sub>x</sub>-Ser]<sub>y</sub> donde x es de 1 a 4, y es 0 o 1, y z es de 1 a 50. En otros ejemplos, el conector peptídico incluye la secuencia G<sub>n</sub>, donde n puede ser un número entero de 1 a 100. En otro ejemplo, la secuencia del conector peptídico puede ser (GA)<sub>n</sub> o (GG)<sub>n</sub>. Otros conectores ilustrativos incluyen:

- (1) Gly<sub>4</sub>Ser con extremos Ncol (SEQ ID NO: 351)  
CCATGGGCGG CGGCGGCTCT GCCATGG  
(2) (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>2</sub> con extremos Ncol (SEQ ID NO: 352)  
CCATGGGCGG CGGCGGCTCT GCGGCGGCG GCTCTGCCAT GG  
(3) (Ser<sub>4</sub>Gly)<sub>4</sub> con extremos Ncol (SEQ ID NO: 353)

CCATGGCCTC GTCGTCGTCG GGCTCGTCGT CGTCGGGCTC

GTCGTCGTCG GGCTCGTCGT CGTCGGGCGC CATGG

- (4) (Ser<sub>4</sub>Gly)<sub>2</sub> con extremos Ncol (SEQ ID NO: 354)  
CCATGGCCTC GTCGTCGTCG GGCTCGTCGT CGTCGGGCGC CATGG

Los radicales conectores son descritos, por ejemplo, por Huston et al. (1988) en PNAS 85:5879-5883, Whitlow et al. (1993) Protein Engineering 6:989-995 y Newton et al., (1996) Biochemistry 35:545-553. Otros conectores peptídicos adecuados incluyen cualquiera de los descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.751.180 o 4.935.233. Se puede insertar un polinucleótido que codifica un conector peptídico deseado entre, y en el mismo marco de lectura que un polinucleótido que codifica cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y el radical heterólogo de proteína o polipéptido, empleando cualquier técnica convencional adecuada. Los radicales conectores también pueden incluir derivados y análogos de los aminoácidos naturales, así como diversos aminoácidos no naturales (D- o L-), hidrófobos o no hidrófobos, conocidos en la técnica.

En algunos ejemplos, un conector peptídico incluye péptidos (o polipéptidos) (p. ej., péptidos naturales o no naturales) que incluyen una secuencia de aminoácidos que conecta o fusiona genéticamente una primera secuencia lineal de aminoácidos a una segunda secuencia lineal de aminoácidos a la que no está naturalmente conectada o fusionada genéticamente. Por ejemplo, el conector peptídico puede incluir polipéptidos de origen no natural que son formas modificadas de polipéptidos de origen natural (p. ej., que incluye una mutación tal como una adición, sustitución o eliminación). En otro ejemplo, el conector peptídico puede incluir aminoácidos no naturales. En otro ejemplo, el conector peptídico puede incluir aminoácidos naturales que se producen en una secuencia lineal que no se produce en la naturaleza. En otro ejemplo más, el conector peptídico puede incluir una secuencia de polipéptidos de origen natural.

## ii) Agentes conectores heterobifuncionales

La conexión de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y un radical heterólogo puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la conexión se puede lograr mediante conexión química o facilitar mediante conexiones bifuncionales o heterobifuncionales, tales como cualquiera conocida en la técnica o proporcionada en la presente memoria.

Los expertos en la técnica conocen numerosos reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales que se emplean para formar enlaces covalentes entre grupos amino y grupos tiol y para introducir grupos tiol en proteínas (véase, p. ej., el CATÁLOGO PIERCE, ImmunoTechnology Catalog & Handbook, 1992-1993, que describe la preparación y el uso de dichos reactivos y proporciona una fuente comercial para dichos reactivos; véanse también, p. ej., Cumber et al. (1992) Bioconjugate Chem. 3:397-401; Thorpe et al. (1987) Cancer Res. 47:5924-5931; Gordon et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:308-312; Walden et al. (1986) J. Mol. Cell Immunol. 2:191-197; Carlsson et al. (1978) Biochem. J. 173:723-737; Mahan et al. (1987) anal. Biochem. 162:163-170; Wawrzynczak et al. (1992) Br. J. Cancer 66:361-366; Fattom et al. (1992) Infection & Immun. 60:584-589) Estos reactivos se pueden emplear para formar enlaces covalentes entre la porción N-terminal del radical heterólogo y la porción C-terminal de la ADA2 proporcionada en la presente memoria, o entre cada una de esas porciones y un conector. Estos reactivos incluyen,

pero no se limitan a: 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP; conector de disulfuro); 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SPDP); tiosulfato succinimidiloxycarbonil- $\alpha$ -metil bencilo (SMBT, conector de sulfato con impedimento estérico); 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP); 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC); 3-(2-piridilditio)butirato de succinimidilo (SPDB; conector de enlace disulfuro con impedimento estérico); 2-(7-azido-4-methylcoumarin-3-acetamido)etil-1,3'-ditiopropionato de sulfosuccinimidilo (SAED); 7-azido-4-methylcoumarin-3-acetato sulfosuccinimidilo (SAMCA); 6-[alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)toluamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT); 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano (DPDPB); 4-succinimidiloxycarbonil- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)tolueno (SMPT, conector de disulfato con impedimento estérico); 6-[ $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT); éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida (MBS); éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfo-succinimida (sulfo-MBS); N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB; conector de tioeter); (4-yodoacetil)amino benzoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SIAB); 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB); 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB); azidobenzoil hidrazida (ABH); maleimido caproilo (MC); maleimido propanoilo (MP); 4-(K-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil (SMCC); éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS); (4-yodoacetil)aminobenzonato de N-succinimidilo (SIAB); y 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP) (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 7.375.078) Otros conectores ejemplares incluyen, entre otros, conectores con la fórmula:

20  $--C(O)CH_2OCH_2CO--$ ;

$--C(O)CH_2NHCH_2CO--$ ;

$-C(O)CH_2SCH_2CO-$ ;

25  $-C(O)CH_2CH_2CH_2CO-$ ,

y

30  $-C(O)CH_2CH_2CO-$ .

Estos conectores, por ejemplo, se pueden emplear combinados con conectores peptídicos, tales como aquellos que aumentan la flexibilidad o la solubilidad o que proporcionan o eliminan el impedimento estérico. Se puede emplear cualquier otro conector conocido por los expertos en la técnica para conectar una molécula de polipéptido a otra molécula. Las propiedades generales son tales que la molécula resultante conserva la función adenosina desaminasa y la estabilidad de la proteína. Para el uso *in vivo* del producto conjugado o proteína de fusión de ADA2, generalmente el conector debe ser biocompatible para la administración a animales, incluidos los seres humanos.

## 40 E. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN ADA2 Y POLIPÉPTIDOS DE LOS MISMOS

Los polipéptidos de cualquier ADA2 como se describe en la presente memoria, incluidas las variantes o formas modificadas de los mismos, se pueden obtener por métodos bien conocidos en la técnica para la purificación de proteínas y la expresión de proteínas recombinantes. Los polipéptidos también se pueden sintetizar químicamente. Las formas modificadas o variantes se pueden diseñar a partir de un polipéptido de tipo salvaje empleando métodos de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, cualquier ADA2, incluidas las variantes o formas modificadas, se puede diseñar a partir de un polipéptido de tipo salvaje, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio.

### 50 1. Aislamiento o Preparación de Ácidos Nucleicos que Codifican Polipéptidos de ADA2

Los polipéptidos se pueden clonar o aislar empleando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen la amplificación por PCR de ácidos nucleicos y la selección de bibliotecas, incluido el escrutinio de hibridación de ácido nucleico, escrutinio basado en anticuerpos y escrutinio basado en actividad. Por ejemplo, cuando los polipéptidos se producen por medios recombinantes, se pueden emplear cualquier método conocido por los expertos en la técnica para la identificación de ácidos nucleicos que codifican los genes deseados. Se puede emplear cualquier método disponible en la técnica para obtener una longitud total o parcial (es decir, que abarca toda la región codificante) ADNc o clon de ADN genómico que codifica el polipéptido de ADA2, por ejemplo, a partir de una fuente celular o tisular.

60 Los métodos para la amplificación de ácidos nucleicos se pueden emplear para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido deseado, incluyendo, por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ejemplos de tales métodos incluyen el uso de un termociclador Perkin-Elmer Cetus y la polimerasa Taq (Gene Amp, Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Se puede emplear un material que contiene ácido nucleico como material de partida a partir del cual se puede aislar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido

deseado. Por ejemplo, preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos de tejidos, muestras de fluidos (p. ej., sangre, suero, saliva), las muestras de sujetos sanos y/o enfermos se pueden emplear en métodos de amplificación. La fuente puede ser de cualquier especie eucariota, incluidas, entre otras, vertebrados, mamíferos, seres humanos, porcina, bovina, felina, aviar, equina, canina y otras fuentes de primates. Las bibliotecas de ácido nucleico también se pueden emplear como fuente de material de partida. Los cebadores se pueden diseñar para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñarse basándose en secuencias expresadas a partir de las cuales se genera un polipéptido deseado. Los cebadores se pueden diseñar basándose en la traducción inversa de una secuencia de aminoácidos del polipéptido. Si se desea, se pueden emplear cebadores degenerados para la amplificación. Los cebadores oligonucleotídicos que hibridan con secuencias en los extremos 3' y 5' de la secuencia deseada se pueden emplear como cebadores para amplificar mediante secuencias de PCR a partir de una muestra de ácido nucleico. Los cebadores se pueden emplear para amplificar la ADA2 completa. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación se pueden secuenciar y confirmar para codificar un polipéptido deseado.

Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de ADA2 se pueden sintetizar químicamente o producir de manera semisintética. La molécula de ácido nucleico producida sintéticamente o semisintéticamente puede codificar la secuencia de aminoácidos de cualquier ADA2, tal como cualquiera de las descritas en la presente memoria en la Sección C anterior. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico sintetizada o producida semisintéticamente puede ser codificada por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las descritas en la presente memoria. Las moléculas de ácido nucleico sintetizadas químicamente pueden abarcar toda la longitud del gen ADA2 de tipo salvaje, o una secuencia truncada del mismo. La síntesis química de genes se puede lograr mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la reasociación de oligonucleótidos sintetizados químicamente. El ensamblaje genético semisintético, tal como el método de ensamblaje de Gibson, también se pueden emplear para producir la molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos de ADA2, incluidas las variantes, como se describe en la presente memoria.

El ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos de ADA2 puede ser una molécula de ácido nucleico de codón optimizado, donde el codón está optimizado para el sistema de expresión utilizado para producir el polipéptido (es decir, los codones que se prefieren en el organismo del sistema de expresión se emplean más frecuentemente en el ácido nucleico sintetizado). Por ejemplo, para la producción del polipéptido en un sistema de expresión de *Escherichia coli*, los codones para cada aminoácido se pueden optimizar de manera que el codón más preferido en *E. coli* se emplee para cada aminoácido.

Se pueden unir secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, incluidas secuencias conectoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción con el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de secuencias de ADN que codifican proteínas centrales. Además, las secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos funcionales de ADN se pueden conectar operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelulares, y secuencias de secreción, por ejemplo, secuencias señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Tales secuencias son conocidas por los expertos en la técnica. También se pueden conectar secuencias adicionales de residuos de nucleótidos tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteínas a moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Tales regiones incluyen, entre otras, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la absorción de una enzima en células diana específicas, o alteran de otro modo la farmacocinética de un producto de un gen sintético.

Además, se pueden añadir etiquetas u otros radicales, por ejemplo, para ayudar a la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, secuencias adicionales de residuos de nucleótidos tales como secuencias de bases que especifican una etiqueta epitópica u otro marcador detectable también se pueden conectar a moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Los ejemplos de tales secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican la etiqueta FLAG® o la etiqueta Strep.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados se pueden insertar a continuación en un vector de clonación apropiado. Se puede emplear una gran cantidad de sistemas de vector-anfitrión conocidos en la técnica. Los posibles vectores incluyen, entre otros, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vectores debe ser compatible con la célula anfitriona utilizada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados lambda o plásmidos tales como pCMV4, pCMV-Script (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), pBR322, derivados de plásmidos pUC o vectores pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación se puede lograr, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN a un vector de clonación que tenga extremos cohesivos complementarios. La inserción se puede realizar utilizando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, se puede

producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (conectores) en los extremos del ADN; estos conectores ligados pueden contener oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de la proteína se pueden modificar mediante colas homopoliméricas.

Las moléculas recombinantes se pueden introducir en las células anfitrionas mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generan muchas copias de la secuencia génica. En realizaciones específicas, la transformación de células anfitrionas con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de la proteína aislada, el ADNc o la secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen se puede obtener en grandes cantidades haciendo crecer transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

Además de la producción recombinante, cualquier ADA2, incluidas las variantes o formas modificadas de las mismas proporcionadas en la presente memoria, se puede producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida (véase p. ej., Stewart et al. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). La síntesis *in vitro* de proteínas se puede realizar empleando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, utilizando el Sintetizador de Péptidos 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Varios fragmentos de un polipéptido se pueden sintetizar químicamente por separado y combinar empleando métodos químicos.

## 2. Generación de Ácido Nucleico Mutante o Modificado y Polipéptidos Codificantes

Las modificaciones proporcionadas en la presente memoria se pueden realizar mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, tales como las rutinarias para un experto en la técnica. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para efectuar la mutación de uno o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida al sitio convencional (utilizando p. ej., un kit, tal como QuikChange disponible de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificante, o mediante métodos de síntesis de polipéptidos en fase sólida. Las variaciones específicas del sitio para la ADA2 de tipo salvaje o cualquiera de las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria también se pueden introducir durante la síntesis química del gen o el ensamblaje del gen semisintético si se emplean tales métodos para generar la secuencia de ácido nucleico que codifica la ADA2.

## 3. Vectores y Células

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tales como cualquier polipéptido de ADA2 descrito aquí, el ácido nucleico que contiene toda o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína se puede insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteínas insertada. El promotor nativo también puede suministrar las señales transcripcionales y traduccionales necesarias para los genes enzimáticos y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica la enzima. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son adecuados para su uso.

Se proporcionan células procariotas y eucariotas, incluidas las células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Arqueas, células vegetales, células de insectos y células animales. Las células se emplean para producir una proteína de las mismas haciendo crecer las células descritas anteriormente en condiciones por las cuales la proteína codificada es expresada por la célula y recuperando la proteína expresada. Para los fines de la presente memoria, por ejemplo, la enzima puede secretarse al medio.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier polipéptido de ADA2 o variantes, acoplados a la secuencia señal nativa o heteróloga, así como a múltiples copias de la misma. Los vectores se pueden seleccionar para la expresión de la proteína enzimática en la célula o de manera que la proteína enzimática se exprese como una proteína secretada.

Se puede emplear cualquiera de la variedad de sistemas de anfitrión-vector bien conocidos por los expertos en la técnica para expresar la secuencia codificante de proteínas. Estos incluyen, entre otros, sistemas de células de mamíferos infectados con virus (p. ej., virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insectos infectados con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de

los vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema de anfitrión-vector utilizado, se puede emplear cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

Se puede emplear cualquier método conocido por los expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico que contenga señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos métodos pueden incluir técnicas ADN recombinante y sintéticas *in vitro* y recombinantes (recombinación genética) *in vivo*. La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de las mismas, se puede regular mediante una segunda secuencia de ácidos nucleicos para que los genes o fragmentos de las mismas se expresen en un anfitrión transformado con la molécula o moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede ser controlada por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una realización específica, el promotor no es nativo para los genes para una proteína deseada. Los promotores que se pueden emplear incluyen, entre otros, el promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal 3' larga del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., Cell 22:787-797 (1980)), el promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de la  $\beta$ -lactamasa (Jay et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543 (1981)) o el promotor *tac* (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242:74-94 (1980)); vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de la nopalina sintetasa (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor de ARN del virus del mosaico de la coliflor 35S (Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bisfosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos como el promotor Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control de la transcripción de animales que exhiben especificidad de tejido y se han empleado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I que se activa en las células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell 38:639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Cuant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987)); la región de control del gen de insulina que está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan et al., Nature 315:115-122 (1985)), la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en las células linfoides (Grosschedl et al., Cell 38:647-658 (1984); Adams et al., Nature 318:533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), la región de control de virus de tumor mamario de ratón activa en células testiculares, mamarías, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., Genes y Devel. 1:268-276 (1987)), la región de control del gen de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235:53-58 (1987)), la región de control del gen de la alfa-1 antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., Genes y Devel. 1:161-171 (1987)), la región de control del gen de la beta globina que es activa en las células mieloides (Magram et al., Nature 315:338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986)), la región de control del gen de la proteína básica de mielina que está activa en las células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987)), la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que es activa en el músculo esquelético (Shani, Nature 314: 283-286 (1985)), y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activa en los gonadotropos del hipotálamo (Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986)).

En un ejemplo específico, se emplea un vector que contiene un promotor conectado operativamente a ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de la misma, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (p. ej., un gen de resistencia a los antibióticos). Los vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA). Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en el extremo N- o C- terminal de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE32, pQE30 y pQE31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de proteínas marcadas con 6xHis N-terminalmente. (se necesita cargar relleno l w/pCMV). Otros vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células *E. coli* incluyen, por ejemplo, pD444-SR (DNA2.0, Menlo Park, CA), que contiene un promotor T5 inducible por isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), un sitio fuerte de unión al ribosoma (RBS) y un origen de replicación derivado de pUC. Otros vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.952.496; disponible de Novagen, Madison, WI; véase, también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Tales plásmidos incluyen pET11a, que contiene el promotor T7lac, el terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible, y el gen represor lac; pET12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7 y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET15b y pET19b (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag™ para su uso en la purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región promotora T7-lac y el terminador T7.

Un vector ilustrativo para la expresión de células de mamífero es el vector de expresión pCMV-Script (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Núm. de Cat. 212220). El vector pCMV-Script se obtiene a partir de un plásmido

basado en pUC de alto número de copias, y contiene el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) para la expresión constitutiva de insertos clonados en una amplia variedad de líneas celulares. El vector contiene ADN que codifica el promotor de la  $\beta$ -lactamasa y el promotor temprano de SV40 conectado al gen de resistencia a la neomicina/kanamicina (neo/kan), un origen de replicación f1, un promotor temprano inmediato (CMV), una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40) y la señal de poliA del virus del herpes simple (HSV) - timidina quinasa (TK). Otro ejemplo de un vector de expresión de mamífero es el vector de expresión HZ24, derivado del esqueleto del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica el gen de resistencia a la beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación F1, una región potenciadora/promotora temprana inmediata (CMV) de citomegalovirus y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR).

Cualquiera de las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria también se puede codificar en vectores de expresión para su expresión *in vivo*, particularmente vectores dirigidos a tumores u oncolíticos para su expresión en células tumorales. Los vectores para la expresión *in vivo* incluyen vectores oncolíticos para el suministro a tumores y expresión en los mismos o dirigidos para el suministro a otras células y tejidos, o vectores de terapia génica. Los vectores oncolíticos para el suministro incluyen vectores virales para el virus de la enfermedad de Newcastle, parvovirus, virus vaccinia, reovirus, virus del sarampión, virus de la estomatitis vesicular (VSV), adenovirus oncolíticos y virus del herpes. Los vectores virales oncolíticos para el suministro dirigido son bien conocidos por un experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, el virus de la estomatitis vesicular, véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 2010/0178684, 2010/0172877, 2010/0113567, 2007/0098743, 20050260601, 20050220818 y Patentes EP Núm. 1385466, 1606411 y 1520175; virus del herpes simple, véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.897.146, 7.731.952, 7.550.296, 7.537.924, 6.723.316, 6.428.968 y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2011/0177032, 2011/0158948, 2010/0092515, 2009/0274728, 2009/0285860, 2009/0215147, 2009/0010889, 2007/0110720, 2006/0039894 y 20040009604; retrovirus, véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.689.871, 6.635.472, 6.639.139, 5.851.529, 5.716.826, 5.716.613 y la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20110212530; y virus adenoasociados, véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 8.007.780, 7.968.340, 7.943.374, 7.906.111, 7.927.585, 7.811.814, 7.662.627, 7.241.447, 7.238.526, 7.172.893, 7.033.826, 7.001.765, 6.897.045 y 6.632.670. Los vectores se pueden introducir en células para terapia celular, tales como células inmunitarias para inmunoterapia como se describe en la presente memoria.

Los vectores para la administración dirigida de cualquiera de las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria también pueden codificar agentes adicionales, tales como agentes para terapias combinadas que son proteínas o polipéptidos, por ejemplo, otros agentes inmunomoduladores, agentes quimioterapéuticos, inhibidores del punto de control inmunitario o enzimas que degradan hialuronano, tales como una hialuronidasa soluble o una hialuronidasa soluble conjugada con polímero (p. ej. PEGPH20). Por ejemplo, además de cualquiera de las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria, las enzimas que degradan hialuronano pueden codificarse en vectores de expresión para su expresión *in vivo*, particularmente vectores dirigidos a tumores u oncolíticos para la expresión en células tumorales (véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 8.450.470 y la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2011/0152359; véase también la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2012/0148535).

#### **Células inmunitarias que codifican y expresan las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria**

Cualquiera de las variantes de adenosina desaminasa 2 (ADA2) modificada proporcionada en la presente memoria se puede emplear en métodos de inmunoterapia adoptiva. Los métodos para la inmunoterapia adoptiva empleando células inmunitarias modificadas para expresar una proteína terapéutica u otra proteína, y opcionalmente otras proteínas y receptores que aumentan la respuesta inmunitaria para superar el efecto inmunosupresor de los cánceres y/o dirigir las células inmunitarias a células específicas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por consiguiente, se proporcionan células inmunitarias que codifican una o más de las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria, y opcionalmente moléculas adicionales para mejorar la elección como diana del tumor y las respuestas inmunitarias, particularmente para superar el efecto inmunosupresor de ciertos tumores. Las células inmunitarias incluyen, pero no se limitan a, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), linfocitos T citotóxicos (CTL), células asesinas naturales (NK), células asesinas activadas por linfocinas (LAK) y células inmunitarias, como células T, que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR).

Los métodos para la inmunoterapia mediante la administración de células inmunitarias son bien conocidos. Las células inmunitarias, que pueden ser autólogas o heterólogas, pero típicamente son células autólogas recolectadas del sujeto que se va a tratar, son modificadas para expresar ácido nucleico que codifica cualquiera o más de las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria, y tratadas para eliminar células tumorales según sea necesario, y expandidas, si fuera necesario. El ácido nucleico se puede introducir, por ejemplo, en un vector de expresión o en un vector o cromosoma artificial que da como resultado la incorporación del ADN que codifica la



variante o variantes de ADA2 en un cromosoma o cromosomas de las células inmunitarias. Las células inmunitarias se cultivan, expanden e introducen en un sujeto que tiene un tumor para su tratamiento. En algunas realizaciones, las células inmunitarias se dirigen a las células tumorales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células codifican una ADA2 variante y también expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR). Las células que contienen CAR dirigidas a antígenos tumorales particulares y los métodos para preparar tales células son conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., la Publicación PCT Internacional Núm. WO 2014/186469).

Los CAR son bien conocidos, véanse p. ej., cualquiera de las Publicaciones PCT Internacionales Núm. WO 2012/031744, WO 2012/079000, WO 2013/059593, WO 2015/112626, WO 2014/011988 y la Patente de Estados Unidos Núm. 8.465.743, que describen los CAR y las células que los expresan y los usos de los mismos y las mejoras de los mismos; véase también la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. US 20150064154, que describe las células y los sistemas de expresión para producir células inmunitarias que se dirigen a tumores para su uso en terapia celular. La célula se puede transfectar, transducir o modificar de otro modo para expresar estas proteínas heterólogas utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. El CAR se puede diseñar para dirigirse a cualquier antígeno de las células tumorales de interés, incluidos, entre otros, HER2, CD19, HERV-K, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glucolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR y GD2 y combinaciones de los mismos. Los expertos en la técnica conocen antígenos tumorales ilustrativos reconocidos por CAR (véanse, p. ej., Renkvist et al. *Cancer Immunol Immunother.* 50(1): 3-15 (2001) y Novelino et al. *Cancer Immunol Immunother.* 54(3): 187-207 (2005)). La región de unión a antígeno puede incluir, por ejemplo, un fragmento de las cadenas VH y VL de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal humano específico para un antígeno de células tumorales o puede incluir una pluralidad de dominios de unión a antígeno de un anticuerpo específico de antígeno humano. El scFv, por ejemplo, se puede conectar a un dominio transmembrana flexible seguido de un motivo de activación basado en tirosina (véase, p. ej., Sadelain et al. *Curr. Opin. Immunol* 21, 215-223 (2009)). Los CAR pueden incluir dominios de activación adicionales de moléculas co-estimuladoras tales como CD28 y CD137 para mejorar la supervivencia y proliferación de las células T. Los CAR y/o las células que los expresan pueden codificar y expresar adicionalmente regiones de señalización co-estimuladoras que incluyen, por ejemplo, el dominio intracelular de una molécula co-estimuladora, tal como el dominio intracelular de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, antígeno asociado a la función linfocítica-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente a CD83 y cualquier combinación de los mismos.

En la técnica se conoce una variedad de construcciones de CAR y vectores de expresión para las mismas. El vector de expresión puede ser uno que permanece episomal, o uno que da como resultado la incorporación de ácido nucleico que codifica el CAR y/o la ADA2 variante en un cromosoma, tal como por medio de integración homóloga o por inclusión de secuencias de transposones, de manera que la presencia de una transposasa permite que la secuencia codificante se integre en un cromosoma de una célula transfectada. El ácido nucleico que codifica la variante de ADA2 y CAR se puede incorporar al mismo vector o se puede introducir en vectores separados. Si se emplean transposones, las células pueden expresar una transposasa que facilita la integración del ácido nucleico que codifica la variante de CAR y/o ADA2 en un cromosoma de las células transfectadas. Los sistemas de transposones son conocidos (véase, p. ej., la Publicación PCT Internacional Núm. WO 2014/186469). La transposasa puede proporcionarse en un vector de expresión de ADN o como un ARN expresable o una proteína para la expresión transitoria. Los expertos en la técnica conocen los sistemas de transposones de tal manera que la expresión a largo plazo de la transposasa no se produce en las células transgénicas. Cualquier sistema de transposasa se puede emplear de acuerdo con las realizaciones. En otros aspectos, las células se pueden infectar con un lentivirus para facilitar la integración de la secuencia codificante de CAR y la secuencia de ácido nucleico que codifica la ADA2 variante en el genoma de la célula.

#### 4. Expresión

Cualquier polipéptido de adenosina desaminasa 2 (ADA2), incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, se puede producir mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, que incluye métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas se pueden expresar en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas, tales como, por ejemplo, las cantidades y formas necesarias para la administración y el tratamiento. Los anfitriones de expresión incluyen organismos procariontes y eucariotes tales como *E. coli*, levaduras, plantas, células de insectos, células de mamíferos, incluidas líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los anfitriones de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como en los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del anfitrión de expresión se puede realizar basándose en estos y otros factores, tales como consideraciones regulatorias y de seguridad, costes de producción y la necesidad y los métodos de purificación. Cualquiera de las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria también se puede codificar en vectores de expresión para la expresión *in vivo*, particularmente vectores dirigidos a tumores u oncolíticos para su expresión en células tumorales.

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden emplear

para la expresión de proteínas. La elección del vector de expresión estará influenciada por la elección del sistema de expresión del anfitrión. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente potenciadores, señales traduccionales y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión que se emplean para la transformación estable suelen tener un marcador seleccionable que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, se puede emplear un origen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

Los polipéptidos de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, también se pueden utilizar o expresar como fusiones de proteínas. Por ejemplo, se puede generar una fusión enzimática para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión enzimática incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta por ejemplo para la localización, p. ej., una etiqueta His<sub>6</sub> o una etiqueta FLAG™, o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o la asociación a la membrana.

#### a. Células Procariotas

Los procariotas, especialmente *Escherichia coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E. coli* es una técnica simple y rápida bien conocida por los expertos en la técnica. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles, tales promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que exhiben cierta toxicidad para las células anfitrionas. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor λPL regulado por temperatura.

Las proteínas, tales como cualquiera de las proporcionadas en la presente memoria, se pueden expresar en el entorno citoplasmático de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas, esto puede dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Se pueden emplear agentes reductores tales como ditioneitol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como guanidina-HCl y urea para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de las bacterias que proporciona un ambiente oxidante y disulfuro isomerasas de tipo chaperonina y puede conducir a la producción de proteínas solubles. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína que se va a expresar que dirige la proteína al periplasma. A continuación, el líder se elimina mediante señales peptidasas dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líder de direccionamiento periplásmico incluyen el líder pelB del gen de la peptidato liasa y el líder derivado del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la filtración de la proteína expresada al medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y simple del sobrenadante del cultivo. Las proteínas que no son secretadas se pueden obtener a partir del periplasma por medio de lisis osmótica. De una manera similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos las proteínas se pueden volver insolubles y se pueden emplear agentes desnaturalizantes y reductores para facilitar la solubilización y el repliegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y solubilidad, típicamente se emplean temperaturas entre 25°C y 37°C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glicosilación para funcionar, se puede añadir glicosilación *in vitro* después de la purificación de las células anfitrionas.

#### b. Células de Levadura

Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son anfitriones de expresión de levadura bien conocidos que se pueden emplear para la producción de proteínas, tales como cualquiera de las descritas en la presente memoria. La levadura se puede transformar con vectores de replicación episomales o mediante integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Típicamente, los promotores inducibles se emplean para regular la expresión génica. Los ejemplos de tales promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína, tales como CUP1, AOX1 u otro promotor de *Pichia* u otro de levadura. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son a menudo solubles. La co-expresión con chaperoninas tales como Bip y la proteína disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Además, las proteínas expresadas en la levadura se pueden dirigir para la secreción empleando fusiones de péptidos señal de secreción tales como la señal de secreción del factor alfa de tipo de apareamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de la superficie celular de levadura tales como el receptor de adhesión de apareamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adeninivorans*. Se puede diseñar un sitio de escisión de proteasa, tal como para la proteasa Kex-2, para eliminar las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados a medida que salen de la ruta de secreción. La levadura también es susceptible de glicosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

#### c. Células de Insecto

Las células de insecto, particularmente empleando la expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos

tales como cualquier polipéptido de ADA2 o variantes. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones postraduccionales utilizadas por los eucariotas superiores. Los baculovirus tienen una gama de anfitriones restrictiva que mejora la seguridad y reduce los problemas reguladores de la expresión eucariótica. Los vectores de expresión típicos emplean un promotor para la expresión de alto nivel tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus comúnmente utilizados incluyen baculovirus tales como el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) y el virus de la poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para la expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que se va a expresar se fusiona inmediatamente aguas abajo del codón de iniciación de polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos se procesan con precisión en células de insecto y se pueden emplear para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) produce proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas celulares de mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células transformadas de forma estable. Se pueden emplear líneas celulares tales como las células Schneider 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y células C7 (*Aedes albopictus*) para la expresión. El promotor de metalotioneína de *Drosophila* se puede emplear para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen típicamente mediante el uso de marcadores seleccionables tales como neomicina e higromicina.

#### d. Células de Mamífero

Los sistemas de expresión de mamíferos se pueden emplear para expresar proteínas que incluyen cualquier polipéptido de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero por infección viral por ejemplo de adenovirus o por transferencia directa de ADN por ejemplo mediante liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamíferos incluyen típicamente un sitio de protección terminal de ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. También se pueden añadir elementos IRES para permitir la expresión bicistónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores a menudo incluyen potenciadores del promotor de la transcripción para la expresión de alto nivel, por ejemplo, el potenciador del promotor de SV40, el promotor del citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos de células. Los promotores y las regiones potenciadoras de tejido y tipo celular también se pueden emplear para la expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfa fetoproteína, alfa 1 antitripsina, beta globina, proteína básica de mielina, cadena ligera de miosina de tipo 2, y el control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina. Los marcadores seleccionables se pueden emplear para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglucósidos fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, la expresión se puede realizar en presencia de metotrexato para seleccionar solo aquellas células que expresan el gen de la DHFR. La fusión con moléculas de señalización de la superficie celular tales como TCR- $\zeta$  y Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie celular.

Muchas líneas celulares están disponibles para la expresión en mamíferos, incluyendo células de ratón, rata, humanas, de mono, pollo y hámster. Las líneas celulares ilustrativas incluyen, pero no se limitan a CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretoras) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y HKB. Las líneas celulares también están disponibles adaptadas a medios sin suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas a partir de los medios de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, Núm. de cat. 11619-012) y la línea celular EBNA-1 libre de suero (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng 84:332-342). También están disponibles líneas celulares que están adaptadas para crecer en medios especiales optimizados para una máxima expresión. Por ejemplo, las células DG44 CHO están adaptadas para crecer en cultivo en suspensión en un medio libre de productos animales definido químicamente.

#### e. Plantas

Las células y plantas vegetales transgénicas se pueden emplear para expresar proteínas tales como cualquiera de las descritas en la presente memoria. Las construcciones de expresión se transfieren típicamente a plantas empleando transferencia directa de ADN tal como bombardeo con microproyectiles y transferencia mediada por PEG a protoplastos, y con transformación mediada por agrobacterias. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la

traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación generalmente se dividen entre anfitriones dicotiledóneos, tales como *Arabidopsis* y tabaco y anfitriones monocotiledóneos, tales como el maíz y el arroz. Los ejemplos de promotores de plantas empleados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintetasa, el promotor de la ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. A menudo se emplean marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células vegetales transformadas pueden mantenerse en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regenerarse en plantas enteras. Las células vegetales transgénicas también pueden incluir algas diseñadas para producir cualquier polipéptido de ADA2. Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de la proteína producida en estos anfitriones.

## 5. Técnicas de purificación

El método para la purificación de polipéptidos, incluidos los polipéptidos de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, de las células anfitrionas dependerá de las células anfitrionas y los sistemas de expresión elegidos. Para las moléculas secretadas, las proteínas generalmente se purifican de los medios de cultivo después de retirar las células. Para la expresión intracelular, las células se pueden lisar y las proteínas se pueden purificar del extracto. Cuando los organismos transgénicos, tales como las plantas y los animales transgénicos, se emplean para la expresión, los tejidos u órganos se pueden emplear como material de partida para preparar un extracto celular lisado. Además, la producción animal transgénica puede incluir la producción de polipéptidos en la leche o los huevos, que pueden recogerse y, si fuera necesario, las proteínas se pueden extraer y purificar adicionalmente utilizando métodos convencionales en la técnica.

Las proteínas, como los polipéptidos de ADA2, se pueden purificar utilizando técnicas convencionales de purificación de proteínas conocidas en la técnica, que incluyen, entre otras, SDS-PAGE, fracción de tamaño y cromatografía de exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como la cromatografía de intercambio aniónico. También se pueden utilizar técnicas de purificación por afinidad para mejorar la eficacia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, los anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a las enzimas ADA2 se pueden emplear en la purificación por afinidad. Las construcciones de expresión también se pueden modificar genéticamente para añadir una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítipo FLAG<sup>TM</sup>, fusión GST o His<sub>6</sub> y afinidad purificada con un anticuerpo anti-FLAG<sup>TM</sup>, resina de glutatión y resina de Ni, respectivamente.

Cuando las proteínas son expresadas por bacterias transformadas en grandes cantidades, típicamente después de la inducción del promotor, aunque la expresión puede ser constitutiva, los polipéptidos pueden formar agregados insolubles. Existen varios protocolos que son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión de polipéptidos conocidos por un experto en la técnica. Numerosas variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, en un método, la suspensión celular generalmente se centrifuga y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se vuelve a suspender en tampón que no disuelve, pero lava los cuerpos de inclusión, por ejemplo, Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y Triton-X 100 al 2%, un detergente no iónico. Puede ser necesario repetir la etapa de lavado para eliminar la mayor cantidad posible de radicales celulares. El sedimento restante de los cuerpos de inclusión se puede resuspender en un tampón apropiado (p. ej., fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM). Otros tampones apropiados son evidentes para los expertos en la técnica.

Alternativamente, las proteínas se pueden purificar del periplasma bacteriano. Cuando la proteína se exporta al periplasma de la bacteria, la fracción periplásmica de la bacteria se puede aislar mediante choque osmótico frío además de otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en un método, para aislar polipéptidos recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un gránulo. El sedimento se puede resuspender en un tampón adecuado que contenga sacarosa al 20%. Para lisar las células, las bacterias se pueden centrifugar y el sedimento resuspender en MgSO<sub>4</sub> 5 mM enfriado con hielo y mantener en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante se pueden separar de las proteínas anfitrionas mediante mecanismos de separación convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como las técnicas de separación descritas en la presente memoria. Estos métodos incluyen, entre otros, las siguientes etapas: fraccionamiento de solubilidad, filtración diferencial por tamaño y cromatografía en columna.

Las moléculas de la proteína ADA2 que tienen un peso molecular de aproximadamente 95 kDa a 120 kDa, y generalmente de aproximadamente 100 kDa a 110 kDa, inclusive, se pueden recoger y purificar. Cuando está en forma de monómero, o cuando se evalúa bajo condiciones reductoras en un gel SDS PAGE, el peso molecular de ADA2 es generalmente de, o de aproximadamente, 50 kDa a 60 kDa, tal como generalmente de, o de aproximadamente, 57 kDa a 59 kDa. Se entiende que las variantes u otras formas modificadas pueden exhibir pesos moleculares más altos o más bajos. Por ejemplo, típicamente las variantes o productos conjugados hiperglicosilados como los proporcionados en la presente memoria pueden presentar pesos moleculares más altos.

La pureza se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica, incluida la electroforesis en gel y las técnicas de tinción y espectrofotometría. Cualquier polipéptido de ADA2, incluidos los polipéptidos de ADA2 variantes, se puede purificar hasta una pureza de 60%, 70%, 80% y típicamente una pureza de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. La pureza se puede evaluar mediante métodos convencionales, tales como SDS-PAGE y tinción de Coomassie.

## F. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE ADA2

Se pueden emplear ensayos para evaluar las propiedades físicas, la estabilidad y/o la actividad de cualquiera de las moléculas de proteína ADA2 proporcionadas en la presente memoria, incluido el tipo salvaje y sus variantes y formas modificadas. Las propiedades y actividades pueden estar relacionadas con actividades biológicas y/o actividades de tratamiento tumoral. Los ensayos se pueden realizar *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, los ensayos se pueden emplear para evaluar la actividad adenosina desaminasa de ADA2, la unión a heparina, la estabilidad térmica, el óptimo de pH, la farmacocinética, la actividad inhibidora del crecimiento tumoral y otras actividades y propiedades. En otro ejemplo, los ensayos se pueden emplear para evaluar los efectos de la administración de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluidos los efectos de la dosis y la vía de administración. Los ensayos también se pueden emplear para hacer pequeños ajustes a las formulaciones proporcionadas en la presente memoria mientras se conserve la actividad de ADA2 para su uso terapéutico. Tales ensayos son bien conocidos por un experto en la técnica. Los ensayos ilustrativos no limitantes se describen en las siguientes subsecciones.

### 1. Ensayo de Adenosina Desaminasa

La actividad adenosina desaminasa (ADA; EC 3.5.4.4) de cualquiera de las ADA2 descritas en la presente memoria, incluyendo una de tipo salvaje, variante o conjugada, se puede evaluar empleando métodos bien conocidos en la técnica. Los ensayos de actividad de ADA comúnmente miden, directa o indirectamente, la velocidad de producción de un producto de la reacción enzimática. Por ejemplo, la producción de inosina o amoníaco se puede medir directa o indirectamente. En otros ejemplos, se mide la disminución del sustrato de la enzima, p. ej., adenosina o 2-desoxiadenosina. La disminución del sustrato, o el aumento del producto, se puede medir directamente por medio de espectrofotometría, o indirectamente, por medio de reacciones enzimáticas u oxidativas posteriores que emplean sustratos cromogénicos o cambian los espectros de absorbancia de la reacción.

Por ejemplo, algunos ensayos de adenosina desaminasa (ADA) disponibles en el mercado, tales como los kits de ensayo ADA disponibles de BQ Kits (San Diego, CA; Núm. de Cat. BQ014EALD) y Diazyme (Poway, CA; Núm. de Cat. DZ117A-K), utilizan sustrato colorimétrico y lectura espectrofotométrica para determinar la conversión de adenosina en inosina por las enzimas ADA. En estos ensayos, la producción de inosina se detecta mediante reacciones enzimáticas de varias etapas que producen un colorante cromogénico. La desaminación enzimática de adenosina produce inosina, que es convertida en hipoxantina por la nucleósido fosforilasa de purina específica de inosina (PNP; EC 2.4.2.1) presente en la reacción. La hipoxantina es convertida a continuación en ácido úrico y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por la xantina oxidasa (XOD; EC 1.1.3.22). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se hace reaccionar además con N-Etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina (EHSPT) y 4-aminoantipirina (4-AA) en presencia de peroxidasa (POD) para generar un colorante de quinona que es detectable cinéticamente utilizando un espectrofotómetro UV a 556 nm. La adenosina desaminasa del hígado bovino se pueden emplear como patrón. Se mide el cambio en la absorbancia a 556 nm ( $\Delta A_{556}$ ) a lo largo del tiempo, a 37°C. Una unidad de ADA se define como la cantidad de ADA que genera un  $\mu\text{mol}$  de inosina a partir de adenosina por minuto a 37°C. La actividad adenosina desaminasa en mU/ml se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$1 \text{ mU/mL} = (\Delta A_{556} / \text{min} \times T_v) / (S_v \times \epsilon \times l)$$

donde  $T_v$  = volumen total de reacción;  $S_v$  = volumen de muestra,  $\epsilon = 32,2 \times 10^{-3} \text{ uM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $l = 0,5 \text{ cm}$ .

La actividad ADA se puede visualizar utilizando otros métodos colorimétricos (véase, p. ej., Manchenko, G.P., Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, CRC Press, pág. 453-454). Por ejemplo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en el ensayo ADA descrito anteriormente, puede visualizarse mediante la adición de metosulfato de fenazina (PMS), que es convertido en dihidroPMS por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a continuación, el dihidroPMS convierte el nitroazul de tetrazolio (NBT) en formazán. La absorbancia de formazán se puede determinar a 570 nm.

Otro método para medir la actividad de ADA es midiendo la liberación de amoníaco a partir de la adenosina, cuando se desamina para formar inosina. La liberación de amoníaco se puede medir utilizando kits comercialmente disponibles, tales como el kit de ensayo de amoníaco (Núm. de Cat. A0853, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El kit contiene reactivos secos que contienen ácido  $\alpha$ -cetoglutarico y NADPH. El amoníaco reacciona con ácido  $\alpha$ -cetoglutarico (KGA) y dinucleótido fosfato de adenina y nicotinamida reducido (NADPH) en presencia de L-glutamato deshidrogenasa (GDH; Núm. de Cat. G2294, Sigma-Aldrich). La disminución de la absorbancia a 340 nm, debida a la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup>, es proporcional a la concentración de amoníaco y, por lo tanto, a la actividad

adenosina desaminasa. La disminución de la absorbancia se puede medir con un espectrofotómetro. La actividad de adenosina desaminasa en mU/ml (equivalente en  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$1 \text{ mU/mL} = (\Delta A/\text{min} \times T_v) / (S_v \times \epsilon \times l)$$

donde  $T_v$  = volumen total,  $S_v$  = volumen de muestra,  $\epsilon = 6,22 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ .

Otros ensayos de adenosina desaminasa basados en espectrofotometría incluyen el ensayo óptico continuo, que mide directamente los cambios en la absorbancia de adenosina. La absorbancia de la adenosina se puede medir a 265 nm, y la disminución de la absorbancia a 265 nm, a medida que la adenosina se desamina a inosina, se mide a lo largo del tiempo. Las muestras se preparan en un tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH 7,5 a 25°C que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% (p/v), y se incuban con una solución de adenosina 1,35 mM, pH 7,0 a 25°C. La disminución de la absorbancia a 265 nm ( $\Delta A_{265}$ ) se mide durante aproximadamente 5 minutos. En este ensayo, la actividad de ADA en U/mL se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades/mL de enzima} = (\Delta A_{265}/\text{min})(T_v)(df)/(8.1)(V_E)$$

donde  $T_v$  = Volumen total (en ml) de ensayo;  $df$  = factor de dilución; 8.1 = Coeficiente de extinción milimolar de adenosina a 265 nm;  $V_{mi}$  = Volumen (en mililitros) de la enzima utilizada.

Una unidad desaminará 1,0  $\mu\text{moles}$  de adenosina a inosina por minuto a pH 7,5 a 25°C. Tal método se puede realizar en un formato a mayor escala, tal como en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos (véase, por ejemplo, Lu et al. (2012) *Clinica Chimica Acta* 413:1637-1640).

Se puede emplear una variación de este método, con las correcciones necesarias hechas a las mediciones de absorbancia. Los picos de absorción UV de la adenosina y la inosina están a 261 nm y 249 nm, respectivamente, y los espectros se solapan significativamente. Durante la reacción de desaminación, la absorbancia de la adenosina disminuye mientras que la de la inosina aumenta con el tiempo. Para determinar la adenosina relativa, cuyos espectros se solapan con los de la inosina, se realizan dos mediciones espectrofotométricas. El punto isobéptico, donde la adenosina y la inosina tienen el mismo coeficiente de extinción y permanecen sin cambios, es a 253 nm y es independiente de la concentración. El punto isobéptico también se mide como el punto de referencia para corregir las discrepancias de volumen o intensidad. La razón de absorbancia a 261 nm/absorbancia a 253 nm ( $A_{261}/A_{253}$ ) se utiliza para medir los cambios en la concentración de adenosina, basándose en una curva patrón.

## 2. Métodos para Evaluar la Unión a Heparina

La unión a heparina, o la unión a otro GAG, por medio de cualquier ADA2 descrita en la presente memoria, incluyendo la de tipo salvaje, variante o conjugada, se puede evaluar empleando métodos bien conocidos en la técnica. Estos métodos y otros métodos conocidos en la técnica para evaluar la unión a GAG se pueden emplear para evaluar la unión y/o seleccionar variantes de ADA2 con alteración de la unión a heparina, p. ej. atenuación de la unión a heparina o aumento de la unión a heparina. En general, la unión a heparina es sensible a la presencia de iones metálicos, urea y detergentes (aniónicos, no iónicos y zwitteriónicos). El  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y el detergente zwitteriónico 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato aumenta la unión a la heparina. La presencia de NaCl, urea, dodecilsulfato de sodio y  $\text{La}^{3+}$  reduce la unión a heparina.

### a. Ensayo de Afinidad

La capacidad de ADA2 para unirse a la heparina se puede evaluar utilizando ensayos de unión de afinidad con heparina inmovilizada. La heparina es un glicosaminoglicano altamente sulfatado, y se emplea ampliamente como ligando de afinidad general. Su alto grado de sulfatación confiere una fuerte naturaleza ácida a la molécula, por lo tanto, una muchas sustancias, incluida la ADA2, mediante interacción iónica. Además, la heparina contiene secuencias únicas de carbohidratos, que actúan como sitios de unión específicos para algunas proteínas. Las columnas que contienen heparina inmovilizada se utilizan para evaluar la unión de, y purificar proteínas con alta afinidad por, la heparina, tales como proteínas de unión a ADN, factores de coagulación, lipoproteínas y factores de síntesis de proteínas. Por ejemplo, se pueden emplear columnas de resina de heparina disponibles comercialmente, tales como HiTrap Heparin HP cargada con resina de heparina-Sepharose™ (GE Healthcare, Pittsburgh, PA; Núm. de Cat. 17-0998-01), para evaluar la unión de una proteína específica, tal como ADA2. En la resina de heparina-Sepharose™, la heparina se acopla a la matriz base de Sepharose High Performance a través del método de acoplamiento de N-hidroxisuccinamida, para proporcionar alta capacidad, rendimiento y bajos niveles de pérdida.

La unión a heparina se puede evaluar mediante un ensayo de afinidad empleando la resina de heparina-Sepharose™. En dicho ensayo ilustrativo, se mezclan 35  $\mu\text{L}$  de ADA2, de tipo salvaje o variantes, con 20  $\mu\text{L}$  de resina de heparina-Sepharose™ (GE Healthcare, Pittsburgh, PA; Núm. de Cat. 17-0998-01), seguido de incubación a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se centrifuga a continuación a través de un filtro de centrifuga de

0,22  $\mu\text{m}$  y el flujo que contiene la proteína no unida se recoge para su análisis en un gel SDS-PAGE. Se añaden 35  $\mu\text{l}$  de NaCl 1,5 M a la resina de heparina-Sepharose y se incuba a temperatura ambiente (RT) durante 10 minutos para eluir la proteína unida a heparina restante de la heparina-Sepharose. El grado de unión a heparina se evalúa mediante SDS-PAGE, comparando la cantidad de ADA2, de tipo salvaje y variantes, unidas a las resinas y el flujo continuo con respecto a la cantidad de entrada.

#### b. Ensayo ELISA

La unión de una proteína a la heparina, como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, también se puede evaluar utilizando métodos basados en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Los métodos basados en ELISA emplean heparina inmovilizada sobre una superficie, tal como una placa de microtitulación. La proteína de interés que se une a la heparina, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, se incuba en la placa recubierta con heparina, y la unión se detecta empleando anticuerpos que detectan la proteína de interés, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.

Por ejemplo, se pueden emplear una placa de 96 pocillos recubierta con 100  $\mu\text{L}$  de sal de heparina sódica de 200  $\mu\text{g/ml}$  (Calbiochem, EMD Milipore, Billerica, MA; Núm. de Cat. 375095) en tampón de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 9,6) para analizar la unión de ADA2 a la heparina. Después de la unión de ADA2, tal como las de tipo salvaje o variantes o formas modificadas de las mismas, los pocillos se lavan y se incuban con un anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), p. ej., anticuerpo HRP-anti-FLAG (Abcam, Cambridge, Reino Unido; Núm. de Cat. Ab1238) para detectar la etiqueta FLAG en la proteína de interés, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Después de la incubación y el lavado, el grado de unión de la proteína de interés a la heparina inmovilizada en la plataforma se visualiza mediante un sustrato cromogénico, tal como la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Pierce, Thermo). Fisher Scientific, Rockford, IL) para HRP, añadido para el desarrollo del color. La densidad óptica (DO) de cada reacción se mide en un lector de placas.

En otro ejemplo, la heparina se inmoviliza incubando placas de microtitulación recubiertas de estreptavidina, tales como la placa de 96 pocillos recubierta de estreptavidina (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL; Núm. de Cat. 15520), con heparina biotinilada, tal como biotina-heparina. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Núm. de Cat. B9806-10MG). Después de la unión de ADA2, de tipo salvaje o variantes o formas modificadas de las mismas, los pocillos se lavan y se incuban con un anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), p. ej., anticuerpo HRP-anti-FLAG (Abcam, Cambridge, Reino Unido; Núm. de Cat. Ab1238) para detectar la etiqueta FLAG en la proteína de interés, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Después de la incubación y el lavado, el grado de unión de la proteína de interés a la heparina inmovilizada en la plataforma se visualiza mediante un sustrato cromogénico, tal como la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Pierce, Thermo). Fisher Scientific, Rockford, IL) para HRP, añadido para el desarrollo del color. La densidad óptica (DO) de cada reacción se mide en un lector de placas.

También se pueden emplear cualquier variación de estos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, está dentro del nivel de un experto en la técnica seleccionar un soporte sólido adecuado dependiendo de las condiciones de ensayo concretas, tales como una condición de pH concreta. Las microplacas recubiertas de níquel pueden ser menos adecuadas para la unión de proteínas marcadas con His, ya que el pH del tampón puede afectar al recubrimiento de antígeno de las placas recubiertas con Ni, pero no a las de alta unión. Además, se pueden emplear varios métodos para inmovilizar la heparina en la placa, tales como la conjugación con albúmina de suero bovino (BSA) u otros portadores que recubren con sulfato de protamina con un exceso de heparina.

Los tampones, las soluciones de bloqueo y las condiciones de reacción también se pueden seleccionar en función del ensayo de unión deseado. Por ejemplo, las soluciones de bloqueo incluyen aquellas que contienen albúmina o gelatina de suero humano, bovino, equino u otro. El bloqueo de un soporte sólido, tal como una placa, se puede realizar utilizando un tampón de ensayo de unión al que se añaden uno o más agentes de bloqueo. Los agentes de bloqueo ilustrativos incluyen 1-5% de albúmina de suero bovino (BSA), 1-5% de leche en polvo sin grasa, 0,1-1% de gelatina y 25% de suero humano. Se pueden añadir detergentes, tales como Tween-20, y conservantes, tales como timerosal, a la solución de bloqueo. Los tampones de ensayo de unión incluyen por ejemplo el tampón de microentorno tumoral o el tampón fisiológico normal. La mezcla de solución acuosa de proteína-soporte sólido se mantiene típicamente durante un período de tiempo de 30 minutos, 1 hora o más, y puede variar en función de la temperatura. La reacción de bloqueo se puede realizar a cualquier temperatura, y generalmente se puede realizar a 4°C-37°C, tal como 4°C, temperatura ambiente (es decir., 22°C) o 37°C. En algunos ejemplos, se deja que la reacción continúe durante al menos una hora a una temperatura de aproximadamente 4°C-37°C. Por ejemplo, el bloqueo se puede lograr a temperatura ambiente durante una hora. Después de la incubación y el bloqueo, la fase sólida resultante se puede enjuagar después de la proteína que no se ha unido antes del contacto con la molécula de prueba (p. ej., ADA2 de tipo salvaje, variantes y formas modificadas proporcionadas en la presente memoria).

Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -D-galactosidasa. Los ejemplos de sustratos enzimáticos que se pueden añadir para desarrollar la señal incluyen PNPP (fosfato de p-

nitrofenilo, sal disódica), ABTS (sal de diamonio de ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]), OPD (hidrocloruro de o-fenilendiamina), y TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (SOMA Labs, Romeo, Mich.), incluyendo Sureblue TMB Microwell Peroxidase Substrate (componente 1) (KPL, Núm. 52-00-03). La reacción se puede detener añadiendo un reactivo de parada (p. ej. solución de parada de TMB). Se puede determinar la absorbancia a una longitud de onda adecuada (es decir 450 nm).

Para determinar la fluorescencia, existe una gran cantidad de fluorómetros disponibles. Para la detección de quimioluminiscencia, tal como la detección de sustratos de peroxidasa de rábano picante (HRP), hay disponibles luminómetros o películas. Con las enzimas, se puede determinar un producto fluorescente, quimioluminiscente o coloreado o medir fluorometricamente, luminometricamente, espectrofotometricamente o visualmente. Por ejemplo, se puede conjugar un reactivo anti-etiqueta con peroxidasa de rábano picante (HRP) u otro agente detectable.

La detección puede ser facilitada por la presencia de un radical fluorescente, radiactivo u otro radical detectable. Por ejemplo, cualquier polipéptido de ADA2 proporcionado en la presente memoria, incluidos los polipéptidos de tipo salvaje y variante y sus formas modificadas, pueden albergar una etiqueta N o C-terminal, tal como una etiqueta FLAG, y se pueden detectar empleando un reactivo anti-etiqueta, tal como un anticuerpo anti-FLAG. La elección del reactivo anti-etiqueta es una función de la etiqueta que se emplea con la molécula o proteína de unión. Además, se elige un reactivo anti-etiqueta que sea compatible con las condiciones ambientales (p. ej. pH) utilizado en el ensayo. Está dentro del nivel de un experto en la técnica identificar o seleccionar dichos reactivos y probar su compatibilidad con las condiciones del ensayo. Los reactivos antiadhesivos están fácilmente disponibles, como fuentes comerciales u otras fuentes. Los reactivos anti-etiqueta ilustrativos ejemplares que se pueden emplear para la detección en los métodos de la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-FLAG o un anticuerpo anti-Myc (disponible de proveedores tales como Abcam, Cambridge, MA; GeneTex, Irvine, CA). Además, dependiendo de la proteína de interés y la fuerza de la señal, se pueden emplear otros anticuerpos y/o sustratos cromogénicos en una versión variante del ELISA. Por ejemplo, para las proteínas nativas que no albergan una etiqueta, la detección se puede lograr empleando dos anticuerpos, p. ej., un anticuerpo primario que reconoce la diana nativa y un anticuerpo secundario conjugado con enzimas utilizadas para la detección.

Típicamente, en los métodos de la presente memoria, el método de detección del complejo unido es uno que puede cuantificarse. Por ejemplo, una etiqueta puede producir una señal, tal como una señal colorimétrica, una señal quimioluminiscente, una señal quimiofluorescente o una señal radiactiva. Dependiendo de la naturaleza de la etiqueta, se pueden emplear varias técnicas para detectar o detectar y cuantificar la etiqueta. Por ejemplo, los métodos de cuantificación incluyen, entre otros, métodos espectrofotométricos, fluorescentes y radiactivos.

### C. Transferencia Puntual y otros Ensayos de Unión a Heparina Radiomarcados

El grado de unión a heparina también se puede detectar utilizando métodos basados en transferencia con heparina radiomarcada. Por ejemplo, se pueden emplear un método de transferencia puntual para detectar y cuantificar cantidades de picomoles de proteína de unión a heparina de interés. Las proteínas se aplican sobre nitrocelulosa y a continuación se incuban con <sup>125</sup>I-heparina. La unión de la heparina a las proteínas se detecta mediante radioautografía y se cuantifica mediante densitometría de barrido; las proteínas se cuantifican mediante análisis densitométrico de la nitrocelulosa teñida con negro amido (Hirose et al. (1986) *Bioquímica analítica* 156 (2):320-325). En otro ejemplo, la heparina radiomarcada, tal como la <sup>3</sup>H-heparina se incuban en un formato de microtitulación de 96 pocillos con la proteína de unión a heparina de interés, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, que incluye el tipo salvaje, variantes o formas modificadas de la misma. La mezcla se transfiere a continuación a placas de filtro de microtitulación de 96 pocillos que filtran la heparina no unida y la proteína de interés. La unión se detecta por recuento de centelleo (ver Proudfoot et al. (2003) *PNAS* 100(4):1885-1890).

### 3. Métodos para Evaluar la Estabilidad

La estabilidad de cualquiera de las ADA2 proporcionadas en la presente memoria en condiciones específicas se puede determinar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica utilizado para evaluar la estabilidad de la proteína. La estabilidad en una condición específica (p. ej., la condición de alta temperatura para la estabilidad térmica, las condiciones de pH alto o bajo para la tolerancia al pH, las condiciones del plasma para la estabilidad en plasma y el almacenamiento a largo plazo para la estabilidad a largo plazo) se pueden evaluar determinando los cambios en las propiedades físicas del polipéptido, incluyendo sin limitarse a, la configuración o conformación estructurales, la actividad enzimática, el desarrollo de proteínas, la agregación y la solubilidad, antes y después sin exposición a la condición específica. La estabilidad también se puede evaluar comparando una o más de la actividad, la agregación u otras propiedades físicas en presencia de una o más condiciones de desnaturalización en comparación con un polipéptido de ADA2 nativo, de tipo salvaje o de referencia.

La estabilidad de la proteína incluye una medida del mantenimiento de una o más propiedades físicas de una proteína en respuesta a una condición ambiental (p. ej. una temperatura elevada). En un ejemplo, la propiedad física es el mantenimiento de la estructura covalente de la proteína (p. ej. la ausencia de escisión proteolítica, oxidación o



desamidación no deseadas). En otro ejemplo, la propiedad física es la presencia de la proteína en un estado plegado adecuadamente (p. ej. la ausencia de agregados o precipitados solubles o insolubles). En un ejemplo, la estabilidad de una proteína se mide analizando una propiedad biofísica de la proteína, por ejemplo, la estabilidad térmica, el perfil de desplegamiento relacionado con el pH, la eliminación estable de la glicosilación, la solubilidad, la función bioquímica (p. ej., actividad enzimática, capacidad de unirse a una proteína (p. ej., un ligando, un receptor, un antígeno, etc.) o un radical químico, etc.), y/o combinaciones de los mismos. En otro ejemplo, la función bioquímica se demuestra medio de la afinidad de unión de una interacción. Además, la estabilidad se puede evaluar mediante inspección visual, recuperación porcentual, pureza de proteínas y temperatura de fusión aparente. Las mediciones de estabilidad también proporcionan información biológica importante; una disminución en la estabilidad puede ser un signo de desplegamiento, plegamiento y agregación de proteínas, lo que puede conducir a polipéptidos ineficaces para el tratamiento. Tale ensayos se pueden realizar bajo cualquier condición que pueda dar como resultado inestabilidades de proteínas, y se puede evaluar sobre cualquier propiedad física o funcional asociada con una proteína ADA2. La estabilidad se puede medir empleando cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en la presente memoria.

## a. Condiciones

### i. Estabilidad en plasma

Para usos terapéuticos, tales como el tratamiento de tumores o cánceres, es deseable administrar al sujeto una dosis de ADA2 que mantenga la actividad adenosina desaminasa plasmática (ADA) durante un tiempo suficiente para el efecto terapéutico. Por lo tanto, es necesaria una retención suficiente de estabilidad en el plasma y el microentorno tumoral (EMT) para la eficacia del tratamiento. La estabilidad plasmática de cualquier ADA2 descrita en la presente memoria, tal como de tipo salvaje, variante o conjugada, se puede determinar midiendo los cambios en la actividad enzimática y/u otras propiedades físicas, antes y después de la incubación en plasma, p. ej., plasma de mamíferos *ex vivo*.

La estabilidad puede ser evaluada *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la estabilidad se puede probar después de la exposición a plasma durante un período de tiempo deseado, que un experto en la técnica puede determinar empíricamente o seleccionar según el período de tiempo deseado. Por ejemplo, el tiempo de incubación puede ser de al menos 1 hora, tal como al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72 horas o más. La proteína se puede administrar directamente por vía sistémica, tal como por vía intravenosa, y se puede evaluar la actividad. En otros ejemplos, la proteína puede estar sujeta a condiciones de incubación apropiadas *in vitro*. En un ejemplo, la estabilidad de la actividad de ADA de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede medir después de la incubación a 37°C, en plasma o suero *ex vivo* a 25%, tal como plasma o suero humano o no humano, por ejemplo, plasma de ratón. Por ejemplo, como se muestra en la presente memoria, la ADA2 es más estable que la ADA1 después de una larga incubación (p. ej., 24 horas) en plasma. También se pueden seleccionar otras condiciones, tales como la temperatura, el tipo de plasma y las condiciones del tampón, en función de las condiciones deseadas que se vayan a analizar.

### ii) Estabilidad Térmica

Las proteínas difieren en sus grados de estabilidad térmica (o termoestabilidad). En particular, las proteínas con actividades biológicas, tales como las enzimas, pueden tener diferentes temperaturas óptimas. La termoestabilidad, la calidad de una proteína para resistir cambios irreversibles en su estructura química o física a una temperatura relativamente alta, puede ser indicativa de la estabilidad general de una proteína. El aumento de la temperatura generalmente induce el desarrollo de proteínas y la alteración de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, lo que lleva a la desestabilización de la proteína. La termoestabilidad de una proteína, tal como cualquier polipéptido de ADA2 proporcionado en la presente memoria, se puede determinar midiendo los cambios en la actividad enzimática y/u otras propiedades físicas, antes y después de la incubación a temperaturas relativamente altas o bajas.

La estabilidad de una proteína se puede determinar midiendo la actividad de la proteína en función del tiempo. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la proteína se puede emplear como marcador de estabilidad de la solución y la estabilidad *in vivo* para las proteínas. La temperatura de desplegamiento de una proteína particular se refiere a la temperatura a la cual la proteína pierde su estructura secundaria y típicamente, su actividad y se puede determinar empleando métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en la presente memoria, tal como la calorimetría diferencial de barrido (DSM). En otro ejemplo, se pueden utilizar otros métodos para determinar la propiedad física de la proteína, tal como la dispersión dinámica de la luz (DLS), para caracterizar la estabilidad de las proteínas en función de la temperatura. En otros ejemplos, la estabilidad térmica se puede medir bioquímicamente. Un método bioquímico ilustrativo para evaluar la estabilidad térmica es un ensayo de sensibilización térmica. En un "ensayo de sensibilización térmico", un polipéptido se somete a un intervalo de temperaturas elevadas durante un período de tiempo expuesto. Por ejemplo, en una realización, los polipéptidos de prueba están sujetos a un intervalo de temperaturas crecientes, p. ej., durante 10 minutos. La actividad de la proteína se analiza a continuación

mediante un ensayo bioquímico relevante (p. ej., ensayo de adenosina desaminasa). El ensayo de sensibilización térmica se puede emplear para determinar la temperatura a la que se conserva 50% de la actividad adenosina desaminasa (ADA) (es decir., el valor  $t_c$  o  $T_{50}$ ). Los valores  $t_c$  o  $T_{50}$  no son necesariamente equivalentes a los valores de  $T_m$  obtenidos físicamente. Tal ensayo se puede realizar para evaluar la estabilidad térmica de cualquiera de las ADA2 proporcionadas en la presente memoria, incluidas la de tipo salvaje, variantes, productos conjugados y otras formas modificadas de las mismas.

### iii) Estabilidad frente al pH u Óptimos de pH

Las proteínas también difieren en su capacidad para tolerar cambios en el pH, o pueden tener un óptimo de pH diferente para la actividad biológica. Las variaciones en el pH en el medio ambiente pueden provocar cambios en la carga de los grupos alcalinos y ácidos de las cadenas laterales de aminoácidos en una proteína, lo que provoca cambios en las interacciones electrostáticas que pueden desestabilizar la estructura nativa. Cambios relativamente pequeños en el pH pueden dar como resultado una disminución bastante drástica en la estabilidad conformacional de la proteína, y los cambios en la estabilidad conformacional también pueden conducir a la agregación de las proteínas. La fuerza iónica en solución y el punto isoeléctrico (pI) de la solución también contribuyen a la estabilidad de la proteína en solución en diferentes condiciones de pH.

Por ejemplo, el entorno de pH del tumor y el óptimo de pH de una proteína concreta pueden afectar a la eficacia terapéutica de una proteína ADA2. Por ejemplo, el microentorno tumoral (MET) tiene regiones, que generalmente se encuentran en áreas hipóxicas, con un pH relativamente ácido, tal como un pH de 6,5-6,9 o inferior. Por otro lado, en regiones con tejido proliferativo, tal como cerca de los vasos sanguíneos, el pH del MET es más neutro. Por lo tanto, el óptimo de pH de una proteína ADA2 puede ser un factor importante en la determinación de la dosificación y la formulación de proteínas utilizadas en los métodos de tratamiento de tumores como se describe en la presente memoria.

La estabilidad de una proteína, tal como cualquier polipéptido de ADA2 proporcionado en la presente memoria, en un entorno de pH específico, se puede determinar midiendo los cambios en la actividad enzimática y/u otras propiedades físicas, antes y después de la incubación a un pH relativamente alto o bajo. Por ejemplo, la actividad enzimática de cualquiera de las ADA2 proporcionadas en la presente memoria se puede medir empleando un ensayo de actividad de ADA descrito en la presente memoria, en diversas condiciones de pH (p. ej., a un pH que varía de aproximadamente 6,0 a 8,0, tal como de 6,5 a 7,5 aproximadamente, inclusive, por ejemplo  $6,5 \pm 0,2$  o  $7,4 \pm 0,2$ ). En otro ejemplo, se pueden utilizar otros métodos para determinar la propiedad física de la proteína, como la dispersión dinámica de la luz (DLS), para caracterizar la estabilidad de las proteínas en función del pH de la solución.

### iv. Otras Condiciones

Otras condiciones en el medio ambiente o la formulación, tales como la fuerza iónica, las composiciones tampón, la presencia de otras sustancias tales como otras proteínas en el microentorno tumoral, la presencia de excipientes farmacéuticos o la presencia de otros agentes utilizados para la terapia de combinación, pueden contribuir a la estabilidad del polipéptido empleado en el método de tratamiento, tal como cualquiera de los polipéptidos de ADA2 proporcionados en la presente memoria. La estabilidad del polipéptido en condiciones que pueden afectar a la estabilidad y la función de la proteína se puede probar empleando los métodos descritos a continuación, pero después de la incubación en la condición específica que se vaya a probar. Los ensayos se pueden emplear para realizar ajustes mínimos a las formulaciones proporcionadas en la presente memoria mientras se mantiene la estabilidad de ADA2 y/u otros agentes utilizados en la terapia de combinación.

### b. Determinación de las Propiedades Físicas

La estabilidad de un polipéptido, tal como cualquier polipéptido de ADA2 proporcionado en la presente memoria, se puede determinar midiendo los cambios en las propiedades o actividades físicas o funcionales del polipéptido, tales como actividad enzimática, configuración estructural o conformación, actividad enzimática, desarrollo de proteínas, agregación y solubilidad, utilizando cualquier método conocido en la técnica. La propiedad funcional o física que se evalúa se puede comparar en presencia o ausencia de la condición (p. ej. plasma, temperatura, pH u otra condición). Se entiende que el ensayo para comparar o evaluar la estabilidad de la proteína en presencia de una condición en comparación con su ausencia es sustancialmente el mismo, excepto por la presencia o la extensión de la condición presente.

Las proteínas se estabilizan mediante fuerzas físicas tales como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, interacciones electrostáticas, enlaces disulfuro y fuerzas de van der Waals. La interrupción de cualquiera de estas fuerzas puede desestabilizar la proteína, y la interrupción de estas fuerzas puede medirse empleando una variedad de métodos conocidos en la técnica. Además, en ciertas condiciones, tales como un pH o temperatura específicos, o una alta concentración de proteínas durante la expresión en exceso, el polipéptido puede formar agregados de

proteínas. Los agregados de proteínas son moléculas de proteínas ensambladas irreversiblemente para formar oligómeros de orden superior con estructuras de proteínas nativas o no nativas que pueden ser de naturaleza soluble o insoluble. La agregación a menudo da como resultado la desestabilización conformacional de la proteína.

5 Los métodos para determinar los cambios en las propiedades físicas incluyen espectroscopia, métodos termodinámicos, métodos hidrodinámicos, cromatografía, electroforesis, análisis de actividad biológica y análisis de interacción proteína-proteína (véanse, p. ej., Uversky, V. y E. Permiakov, eds., *Methods in Protein Structure y Stability Analysis*, Nova Science Publishers, New York (2007); Chaudhury et al. (2014) *The AAPS Journal* 16(1):48-64). Un aumento en el tamaño de partícula y/o una disminución en la temperatura de fusión también puede indicar desnaturalización y posterior agregación del polipéptido de ADA2. Además, la estabilidad de la proteína se puede evaluar mediante la inspección visual de la integridad de la proteína mediante métodos electroforéticos, calculando el porcentaje de recuperación, la pureza de la proteína y la temperatura de fusión aparente. Los ensayos ilustrativos para evaluar la estabilidad de la proteína se describen a continuación.

#### 15 **i. Actividad Enzimática**

La interrupción de la estabilidad puede causar cambios en la estructura terciaria del sitio activo de una enzima, lo que lleva a una interrupción de la actividad enzimática. La actividad biológica a menudo se correlaciona estrechamente con los cambios en otras propiedades físicas de la proteína, tales como los espectros de dicroísmo circular. Los ensayos funcionales, tales como los ensayos de actividad enzimática, que incluyen cualquiera de los ensayos de actividad adenosina desaminasa (ADA) descritos anteriormente, se pueden emplear como una medida de la estabilidad de la proteína en presencia y ausencia de una afección evaluada. Por ejemplo, la estabilidad de la adenosina desaminasa (ADA) se puede medir antes y después de la exposición a condiciones específicas, p. ej., condiciones descritas anteriormente en la Sección F.2.a, para evaluar la estabilidad de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. La exposición a una condición específica, tal como la incubación en plasma, se puede realizar en un punto de tiempo fijo o se puede evaluar en varios puntos de tiempo.

#### ii) Análisis Cromatográfico de la Pureza de las Proteínas.

30 Los métodos para evaluar la pureza de la proteína nativa se pueden emplear como una medida para determinar el estado de degradación u otros eventos desestabilizadores para una proteína. La pureza de la proteína se puede medir utilizando métodos cromatográficos, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC). La pureza de la proteína, determinada por RP-HPLC, es el porcentaje del pico principal de proteína ADA2 presente, en comparación con todas las especies de proteínas presentes. Por lo tanto, la RP-HPLC, y métodos similares conocidos por un experto en la técnica, pueden evaluar la degradación de la enzima. La pureza de la proteína se puede evaluar a lo largo del tiempo. La pureza de la proteína se puede evaluar en presencia de una o más condiciones, tales como las condiciones descritas anteriormente en la Sección F.2.a, y en cantidades variables de las mismas. El porcentaje de recuperación también puede determinarse como el porcentaje relativo del polipéptido en presencia de diversas condiciones durante diferentes períodos de tiempo en comparación con una muestra de referencia. La estabilidad de cualquiera de los polipéptidos de ADA2 proporcionados en la presente memoria, incluidas las de tipo salvaje, variantes, productos conjugados u otras formas modificadas de los mismos, también se puede determinar midiendo la oxidación del polipéptido por RP-HPLC. El porcentaje de oxidación es una medida de la suma de las áreas de pico de los picos mayor (ox-1) y menor (ox-2).

45 En otro ejemplo, se pueden emplear otros métodos cromatográficos tales como la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar el plegamiento de una proteína o el estado de multimerización. La SEC puede realizarse en condiciones de solución nativa, preservando las interacciones macromoleculares. La cromatografía de exclusión por tamaño mide el volumen hidrodinámico (no el peso molecular), lo que permite distinguir las versiones plegadas y desplegadas de la misma proteína. La evaluación cuantitativa de los niveles de agregados en las formulaciones de proteínas mediante SEC se realiza típicamente mediante detección UV, a veces a múltiples longitudes de onda, y a menudo combinada con la caracterización del peso molecular mediante detección de dispersión de luz de múltiples ángulos. La SEC también se puede emplear para estudiar la autoasociación de proteínas reversible (Chaudhury et al. (2014) *The AAPS Journal* 16(1):48-64).

#### 55 **iii) Calorimetría Diferencial de Barrido**

La termoestabilidad de un polipéptido en solución, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas del mismo, puede determinarse empleando calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la DSC, una celda de muestra (que contiene proteína y tampón) y una celda de referencia (solo tampón) se calientan juntas para elevar la temperatura a una velocidad constante, y el exceso de calor requerido en la celda de muestra para mantener la temperatura igual en ambas celdas (debido se registra la transición de un estado plegado, nativo de proteína a formas desplegadas a medida que aumenta la temperatura). La temperatura del punto medio de la transición térmica (o temperatura de fusión térmica,  $T_m$ ) se usa comúnmente como un indicador de termoestabilidad. La DSC también puede proporcionar información detallada sobre los

parámetros termodinámicos del despliegue de proteínas, incluido el cambio en la entalpía ( $\Delta H$ ), la entropía ( $\Delta S$ ), la energía libre de Gibb ( $\Delta G$ ) y la capacidad de calor ( $\Delta C_p$ ), si las condiciones experimentales permiten transiciones térmicas reversibles. La DSC se puede emplear para determinar el efecto de las condiciones de la solución (pH, fuerza iónica) y los excipientes sobre la estabilidad de la proteína durante la formulación de la proteína (Chaudhury et al. (2014) The AAPS Journal 16 (1): 48-64).

#### iv. Fluorimetría diferencial de barrido

La fluorimetría diferencial de barrido (DSF), también conocida como ensayo de cambio térmico de fluorescencia, es un método utilizado para controlar las transiciones térmicas de las proteínas, tales como el desplegamiento, en presencia de un colorante fluorescente. Los colorantes fluorescentes sensibles a la polaridad utilizados para la DSF son altamente fluorescentes en entornos no polares (p. ej., en bolsillos hidrófobos de proteínas (parcialmente) desplegadas), mientras que la fluorescencia se extingue en solución acuosa y/o en presencia de proteína nativa. La DSF se puede emplear para determinar la estabilidad conformacional de las proteínas. Cuando la intensidad de fluorescencia del colorante en presencia de proteína se representa en función de la temperatura, los puntos medios de las temperaturas de transición ( $T_h$ ) de la proteína se puede obtener a partir del punto de inflexión del gráfico sigmoideo resultante. Los valores de  $T_h$  para varias proteínas en diferentes soluciones, como se obtienen de los experimentos de DSF, están bien correlacionados con la temperatura de fusión térmica ( $T_m$ ) valores determinados por calorimetría diferencial de barrido. Además, mediante la DSF se puede obtener información sobre las transiciones de desarrollo cooperativas (de dos estados) o complejas en proteínas multidominio (Chaudhury et al. (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

El colorante puede ser una molécula pequeña, un péptido o un ácido nucleico, y se puede realizar empleando un aparato de PCR en tiempo real convencional. Los colorantes fluorescentes de uso común incluyen SYRPO Orange, ANS, ROX™ y rojo Nilo. Por ejemplo, la temperatura de fusión de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluida la de tipo salvaje, variantes, productos conjugados u otras formas modificadas, se puede evaluar utilizando el colorante de cambio térmico de proteína ROX™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; Núm. de Cat. 4461146) como colorante fluorescente y el sistema ViiA7 RT-PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) para medir el cambio en la fluorescencia a medida que aumentaba la temperatura de las muestras.

#### v. Espectroscopia de Fluorescencia Intrínseca

La estabilidad de un polipéptido, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, que incluye la de tipo salvaje, variantes, productos conjugados y otras formas modificadas de la misma, se puede determinar midiendo los cambios en su fluorescencia intrínseca. La espectroscopia de fluorescencia intrínseca detecta la fluorescencia de los fluoróforos internos de las proteínas, tales como los residuos de aminoácido aromáticos triptófano y tirosina. Las propiedades de la fluorescencia del triptófano, incluida su intensidad y la longitud de onda de emisión máxima, son especialmente sensibles a su entorno local. Como resultado, la emisión a menudo se puede emplear como sonda para estudiar los cambios en la estructura de orden superior de las proteínas. El desplegamiento de las proteínas a menudo se acompaña de una disminución en la intensidad de fluorescencia y el cambio de la emisión máxima de residuos de Trp a longitudes de onda más largas (cambio a rojo). Los fluorómetros equipados con lector de placas y capacidad de control de temperatura se pueden emplear para evaluar la estabilidad conformacional de las proteínas terapéuticas. (Chaudhury et al. (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

#### vi. Dicroísmo Circular

La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) mide la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente a izquierda y derecha, y es una herramienta popular para caracterizar el contenido de la estructura secundaria de una proteína (es decir., hélice  $\alpha$  y hoja  $\beta$ ) en función de la temperatura y las condiciones de la solución. Los espectros de CD de UV lejano (160-250 nm) se utilizan para este propósito, mientras que los espectros de CD de UV cercano (230-320 nm) pueden proporcionar información sobre el entorno local de las cadenas laterales y disulfuros de aminoácidos aromáticos, que a continuación se pueden emplear para controlar los cambios en la estructura terciaria. El CD es incompatible con ciertos tampones y aditivos que poseen una alta absorción UV (Chaudhury et al. (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

#### vii. Dispersión Dinámica de la Luz

La dispersión dinámica de la luz (DLS), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi-elástica, se utiliza para controlar los cambios en las propiedades hidrodinámicas de las proteínas en solución (p. ej., agregación), así como realizar mediciones de tamaño absoluto. La DLS mide la fluctuación dependiente del tiempo en la intensidad de la luz dispersa de una solución, y a través del análisis de autocorrelación puede proporcionar información que incluye coeficientes de difusión, radios hidrodinámicos y distribución de tamaño de partículas con tamaños de unos pocos nanómetros hasta aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Una señal DLS es muy sensible a la presencia de la partícula de mayor tamaño en solución. La DLS es útil para la

detección de oligómeros y agregados de proteínas de orden superior. La DLS se ha empleado para caracterizar la estabilidad coloidal de las proteínas terapéuticas, tales como los anticuerpos monoclonales en función del pH y la temperatura de la solución. La DLS también se ha aplicado para evaluar la propensión a la agregación de proteínas en respuesta al estrés físico presente durante la producción, suministro y administración de muchas proteínas (Chaudhury et al. (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64). La formación de agregados de ADA2 después de la exposición a condiciones específicas se puede determinar midiendo el radio hidrodinámico de las partículas mediante dispersión dinámica de la luz en diversas condiciones (p. ej., condiciones de desnaturalización u otras condiciones de almacenamiento).

#### 10 **viii. Dispersión de Luz Estática**

La dispersión de luz estática (SLS) es una técnica que mide la intensidad promediada en el tiempo de la luz dispersa, proporcionando información sobre el tamaño de las partículas suspendidas en la solución. La dispersión de luz de múltiples ángulos (MALS), una técnica que recolecta y analiza la intensidad de dispersión de luz estática desde múltiples ángulos, se puede emplear para determinar el peso molecular absoluto y el radio de giro de proteínas y oligómeros de mayor peso molecular. La detección de MALS se puede acoplar a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o fraccionamiento de campo de flujo (FFF) para separar y a continuación caracterizar los agregados de proteínas. La dispersión de la luz también se puede medir con la detección de fluorescencia simplemente mediante barrido a través de toda la región espectral que contiene tanto la fluorescencia como la dispersión de la luz. Esto permite obtener tanto la estabilidad conformacional como los datos de agregación (Chaudhury et al. (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

#### ix. Mediciones de Turbidez

La magnitud de la turbidez (o densidad óptica) de una solución es proporcional tanto al tamaño como a la cantidad de agregados de proteínas en la solución (densidad óptica = absorbancia + dispersión de luz). La turbidez generalmente se mide en el intervalo de longitud de onda de 320-400 nm debido a que las proteínas generalmente no tienen una absorbancia significativa en este intervalo de longitud de onda, y la magnitud de la señal de dispersión de luz es mayor a medida que se reduce la longitud de onda. Durante las pruebas de estabilidad, la propensión a la agregación de proteínas en diversas formulaciones se puede evaluar mediante un método de rampa de temperatura (que mide los cambios de turbidez en función del aumento de la temperatura) o un método cinético (que mide los cambios de turbidez en función del tiempo a una temperatura constante (Chaudhury et al. (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

#### 35 **x. Otros Métodos para Determinar la Estabilidad**

Otros métodos conocidos por un experto en la técnica que se pueden emplear para determinar la estabilidad de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluida la de tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas en el método de tratamiento proporcionado en la presente memoria, incluyen electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y análisis visual de integridad de proteínas, inmunotransferencia, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), calorimetría de titulación isotérmica, electroforesis en gradiente de urea transversal (TUG-PAGE), dispersión de neutrones, ultracentrifugación analítica, planigrafía de tritio y análisis viscosimétrico. El análisis visual de la integridad de la proteína puede incluir, por ejemplo, la observación de productos de degradación de menor peso molecular o productos de agregación de mayor peso molecular en geles PAGE.

#### 4. Ensayo de Actividad Terapéutica

La actividad terapéutica, tal como una actividad anticancerosa, de cualquiera de las ADA2 empleadas en el método de tratamiento proporcionado en la presente memoria, se puede medir empleando ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*. En la presente memoria se proporcionan ensayos y sistemas ilustrativos utilizados para controlar el efecto terapéutico del tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.

##### a. Pruebas *In vitro*

Se puede examinar la actividad anticancerosa de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluida la de tipo salvaje y las variantes, los productos conjugados y otras formas modificadas de las mismas, y la terapia combinada que utiliza cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y otros agentes *in vitro*, por ejemplo, incubando un cultivo de células cancerosas con el derivado, y a continuación evaluando la inhibición del crecimiento celular en el cultivo. Las células adecuadas para tales pruebas incluyen, pero no se limitan a, leucemia P388 murina, melanoma B16 y células de cáncer de pulmón de Lewis, así como células de cáncer de mama humano MCF7, células de cáncer OVCAR-3, células de cáncer de pulmón A549, células de tumor de mama humano MX-1, línea celular de cáncer de colon HT29, células de cáncer de hígado HepG2, células de cáncer de colon HCT116, células de cáncer de colon humano Caco-2, línea celular de glioma humano U138MG, células de cáncer de próstata

humano DU 145, células de leucemia linfática L1210, células de leucemia linfática L4946, células de linfoma 6C3HED, células de adenocarcinoma mamario TA3, células de carcinoma E2 de Ehrlich, células de adenocarcinoma755, células de sarcoma 180 y células de melanoma B16.

5 Se puede examinar la reversión de la inmunosupresión mediada por adenosina por cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluida la de tipo salvaje y las variantes, los productos conjugados y otras formas modificadas de las mismas, y la terapia combinada con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y otros agentes *in vitro*, por ejemplo, realizando ensayos de proliferación. Tales ensayos incluyen, entre otros, ensayos de proliferación de células T o una mezcla de ensayos de proliferación de células NK y T (NK/T), en presencia de adenosina y/o cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y/o cualquier otro agente de terapia combinada. Por ejemplo, el efecto inmunosupresor de la adenosina en diversas células inmunitarias, tales como los linfocitos, las células asesinas naturales (NK), los granulocitos polimorfonucleares y las células fagocíticas, tales como los macrófagos tisulares, se puede evaluar mediante ensayos de proliferación utilizando las células inmunitarias o mezclas de las mismas tales como la mezcla de células NK y T (NK/T) preparadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El efecto de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y cualquier otro agente de terapia combinada proporcionado en la presente memoria, se puede evaluar comparando los resultados de tales ensayos de proliferación en presencia de adenosina, con o sin la adición de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y/o cualquier otra terapia combinada con agentes proporcionados en la presente memoria, incluidos los inhibidores del punto de control inmunitario. Los agentes de terapia combinada se describen en la Sección H.4 a continuación.

Los ensayos de proliferación se pueden emplear para medir la actividad de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluida la de tipo salvaje y variantes, productos conjugados y otras formas modificadas de las mismas, y la terapia combinada empleando cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y otros agentes, en presencia de adenosina. Los ensayos pueden medir la proliferación de células inmunitarias cuya actividad se suprime mediante la adición de adenosina. Las células se pueden incubar durante un tiempo suficiente para que las células exhiban proliferación (tal como, por ejemplo, 12 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 2, 3, 4, 5 semanas o más). La proliferación celular se puede medir por cualquier método conocido en la técnica, que incluye el ensayo de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), ELISA, ensayo de microplacas de tetrazolio y ensayo de fosfatasa ácida (p. ej., Maghni et al. (1999) J. Immunol. Method. 223(2):185-194). La proliferación celular también se puede medir utilizando kits disponibles de Invitrogen (kit de ensayo de proliferación celular Cyquant NF), Cambrex (ViaLight HS (alta sensibilidad) BioAssay), CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay), Guava Technologies (ensayo CellGrowth), Stratagene (ensayo de proliferación celular Quantos) (p. ej., Assays for Cell Proliferation Studies, Genetic Eng. Biotechnol. News. 26(6)). En algunos ejemplos, la proliferación celular se puede normalizar a la proliferación de células en presencia de adenosina. En algunos ejemplos, la proliferación celular se puede normalizar a la proliferación de células en ausencia de adenosina. En ensayos de proliferación ilustrativos, las células se pueden añadir a un pocillo de una placa de 96 pocillos en medio de crecimiento normal que incluye adenosina y cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria o cualquier otro agente de terapia combinada para ser analizadas.

#### 40 **b. Modelos Animales *in vivo***

Se pueden emplear modelos animales para evaluar los efectos de la actividad terapéutica, tales como la actividad de inhibición del crecimiento tumoral, proporcionada en la presente memoria, utilizando cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, los modelos animales se pueden utilizar para evaluar el tamaño, el volumen o el crecimiento del tumor. Además, los modelos animales se pueden utilizar para evaluar la farmacocinética o la tolerabilidad de las composiciones o combinaciones.

Los modelos animales pueden incluir, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, cobayas y modelos de primates no humanos, tales como monos cynomolgus o macacos rhesus. Los modelos animales incluyen modelos genéticos, así como modelos de xenoinjerto. Por ejemplo, los modelos de xenoinjerto incluyen aquellos en los que, antes de someter a prueba los agentes, se pueden establecer tumores en animales de prueba adecuados, tales como animales inmunodeficientes o inmunocompetentes. En algunos ejemplos, se trasplanta a los ratones inmunodeficientes, tales como ratones carentes de sistema inmunitario o ratones SCID, una línea celular tumoral, por ejemplo, una de un cáncer asociado a adenosina, para establecer un modelo animal de ese cáncer. En otros casos, se utilizan modelos singénicos que emplean animales inmunocompetentes.

Las líneas celulares ilustrativas, incluyendo los cánceres asociados con la señalización de adenosina, incluyen, pero no se limitan a, células de cáncer de colon murino CT26, células de cáncer de mama humano MCF7, células de cáncer de hígado HepG2, células de cáncer de colon humano Caco-2, línea de células de glioma humano U138MG, células de cáncer de próstata humano DU 145, células de leucemia linfática L1210, células de leucemia linfática L4946, células de linfoma 6C3HED, células de adenocarcinoma mamario TA3, células de carcinoma de Ehrlich E2, células de adenocarcinoma755, células de sarcoma 180 y células de melanoma B16. Otras células cancerosas que se pueden utilizar en modelos de xenoinjerto animal incluyen células de carcinoma de próstata PC3, células de

adenocarcinoma pancreático BxPC-3, células de carcinoma de mama MDA-MB-231, células de tumor de mama BT474, células de tumor de próstata Tramp C2, células de cáncer de próstata Mat-LyLu, células de carcinoma pancreático de ratón MH194 y células de cáncer de pulmón murino KLN205.

5 Un ejemplo de un modelo de tumor animal que se puede usar para evaluar el efecto del tratamiento del cáncer utilizando ADA2 proporcionada en la presente memoria es el modelo de tumor singénico CT26. Este modelo se crea mediante inyección subcutánea de células de carcinoma de colon primario murino CT26 (ATCC CRL-2638) en ratones singénicos BALB/c. Los ratones se estadifican hasta que se establece el tumor, a continuación, se administra el agente utilizado para el tratamiento, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria o una terapia combinada que incluye el tratamiento con ADA2. Otro ejemplo de un modelo de tumor animal de cáncer pancreático implica la generación de tumores en animales utilizando células de adenocarcinoma pancreático BxPC-3 (véase p. ej., Von Hoff et al. (2011) J. Clin. Oncol., 29: 4548-54). Otros ejemplos de modelos de tumor animal incluyen el modelo de tumor singénico murino MH194 + PSC4 y el modelo de tumor singénico murino KLN205 de cáncer de pulmón murino.

15 Se pueden utilizar otros modelos animales, tales como los modelos de ratón desarrollados para estudiar inmunoterapias o terapias combinadas contra el cáncer, para evaluar el efecto terapéutico del tratamiento con ADA2. Por ejemplo, se pueden utilizar modelos de ratón desarrollados para estudiar tanto la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer como los eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE). Algunas inmunoterapias contra el cáncer que se dirigen a los receptores inmunomoduladores, tales como la terapia combinada anti-CTLA4 y anti-PD-1, también pueden provocar irAE, tales como erupción cutánea, diarrea, colitis y daño hepático. Por lo tanto, el uso de modelos de ratón que pueden imitar la cinética de respuesta que se observa en la medicina clínica y los modelos que pueden reflejar posibles irAE se puede emplear para evaluar tanto la eficacia como los posibles eventos adversos asociados con el tratamiento. Tales modelos incluyen los inducidos por carcinógenos, tales como los fibrosarcomas inducidos por metilcolantreno (MCA) y los papilomas cutáneos inducidos por 7,12-dimetilbenz[*a*] antraceno (DMBA)/13 acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) o modelos de tumores de ratón modificados por ingeniería genética, que han forzado la expresión de oncogenes y/o la pérdida de la función de los supresores tumorales, a menudo de una manera específica de tejido y/o controlada temporalmente. Los ejemplos incluyen los ratones transgénicos Her2/neu o PyMT para imitar el cáncer de mama, el modelo MT/ret de melanoma metastásico espontáneo y los ratones BrafCATyr-creERT2Ptenfl/fl en los que el 4-hidroxitamoxifeno (4-HT) induce melanoma de novo, así como el uso de vectores adenovirales que codifican recombinasa Cre para introducir selectivamente mutaciones en el oncogén Kras y el gen supresor de tumores Tp53 en el epitelio pulmonar para inducir tumores pulmonares autóctonos. Los modelos de cáncer de ratón inducidos por carcinógenos imitan mejor los cánceres que son inmunogénicos. Alternativamente, en los modelos de explante tumoral, los tumores se pueden trasplantar ortotópicamente, es decir, al lugar normal de ocurrencia, en lugar de subcutáneamente, para reflejar con mayor precisión el microentorno tumoral. Otro modelo de ratón ilustrativo para evaluar la eficacia y los irAE de la inmunoterapia combinada contra el cáncer son los ratones Foxp3-DTR, cuyas Treg se pueden agotar condicionalmente para imitar la supresión máxima en todas las células inmunitarias. Este modelo permite evaluar la eficacia de la modulación de receptores co-inhibitorios/co-estimuladores o con otras terapias para atenuar la inmunidad antitumoral/irAE (Liu et al. (2014) Clinical & Translational Immunology 3:e22).

También se pueden emplear modelos genéticos en los que los animales presentan deficiencia de uno o más genes, lo que da como resultado la generación o formación de tumores. Tales modelos de ratones modificados por ingeniería genética (GEMM) pueden recapitular las características moleculares y clínicas de las enfermedades. Por ejemplo, un modelo genético ilustrativo de cáncer de páncreas implica la expresión específica pancreática de alelos mutantes endógenos *Kras* y *Trp53*, lo que da como resultado ratones mutantes que muestran un fenotipo deficiente (denominados ratones KPC; LSL-Kras<sup>G12D</sup>, LSL-Trp53<sup>R172H</sup>, Pdx-1-Cre). Los ratones KPC desarrollan tumores pancreáticos primarios que muestran características similares a la enfermedad humana, incluyendo la resistencia al análogo de nucleósido gemcitabina (véase p. ej., Frese et al. (2012) Cancer Discovery, 2:260-269).

#### 50 i. Actividad Metabólica Tumoral

Se puede someter a prueba una reducción en la actividad metabólica del tumor para el tratamiento con ADA2 proporcionada en la presente memoria. La actividad metabólica del tumor se puede evaluar utilizando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la tomografía por emisión de positrones con [<sup>18</sup>F]-fluorodesoxiglucosa (FDG-PET). La PET es un diagnóstico no invasivo que proporciona imágenes y parámetros cuantitativos de perfusión, viabilidad celular, proliferación y/o actividad metabólica de los tejidos. Las imágenes resultan del uso de diferentes sustancias biológicas (p. ej., azúcares, aminoácidos, precursores metabólicos, hormonas) marcados con radioisótopos emisores de positrones. Por ejemplo, FDG es un análogo de glucosa y es absorbido por las células vivas a través de las primeras fases de la vía normal de glucosa. En los cánceres, existe una mayor actividad glicolítica que da como resultado la captura de FDG en la célula cancerosa. Una disminución en la captura de FDG se correlaciona con una disminución de la actividad metabólica del tumor y actividad anticancerígena. Los expertos en la técnica conocen las pautas para la obtención de imágenes por medio de PET y deben ser seguidas por cualquier médico o técnico a cargo.

## ii) Tamaño y Volumen del Tumor

Por ejemplo, se pueden controlar el tamaño y la ubicación del tumor y/o las metástasis. El tamaño del tumor y/o las metástasis se puede controlar mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos de evaluación externa o los métodos de obtención de imágenes tomográficas o magnéticas, tales como los métodos de detección descritos en la presente memoria. El seguimiento del tamaño en varios puntos temporales puede proporcionar información sobre la eficacia de los métodos terapéuticos proporcionados en la presente memoria. Además, el seguimiento del aumento o la disminución del tamaño de un tumor o metástasis, también puede proporcionar información sobre la presencia (es decir, detección y/o diagnóstico) de tumores adicionales y/o metástasis en el sujeto. El seguimiento del tamaño del tumor durante varios puntos temporales puede proporcionar información sobre el desarrollo de una enfermedad neoplásica en un sujeto, incluyendo la eficacia de los tratamientos de una enfermedad neoplásica en un sujeto, tal como el tratamiento proporcionado en la presente memoria.

En ejemplos concretos, las reducciones en el tamaño y/o volumen del tumor indican que la terapia está funcionando. Se puede hacer un seguimiento del tamaño y el volumen del tumor basándose en mecanismos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tamaño y el volumen del tumor se pueden controlar mediante radiografía, ultrasonido, necropsia, mediante el uso de calibradores, microCT o <sup>18</sup>F-FDG-PET. El tamaño del tumor también se puede evaluar visualmente. En ejemplos concretos, el tamaño del tumor (diámetro) se mide directamente utilizando calibradores.

En otros ejemplos, el volumen del tumor se puede medir utilizando un promedio de mediciones del diámetro del tumor (D) obtenidas mediante calibradores o evaluaciones por ultrasonido. Por ejemplo, el volumen del tumor se puede determinar utilizando el ultrasonido de alta resolución VisualSonics Vevo 770 u otro ultrasonido similar. El volumen se puede determinar a partir de la fórmula  $V = D^3 \times \pi/6$  (para el diámetro medido utilizando calibradores) o  $V = D^2 \times d \times \pi/6$  (para el diámetro medido utilizando ultrasonido donde d es la profundidad o el grosor). Por ejemplo, se pueden realizar mediciones con calibre de la longitud (l) y la anchura (w) del tumor y el volumen del tumor se puede calcular como longitud x anchura<sup>2</sup> x 0,52. En otro ejemplo, se pueden emplear las exploraciones microCT para medir el volumen del tumor (véase, por ejemplo, Huang et al. (2009) PNAS, 106: 3426-3430). Como ejemplo, se puede inyectar a los ratones el medio de contraste Optiray Pharmacy inyección de ioversol al 74% (p. ej., 741 mg de ioversol/mL), anestesiarse los ratones y realizar una Tomografía Computarizada utilizando un escáner MicroCat 1A u otro escáner similar (p. ej., IMTek) (40 kV, 600 μA, 196 etapas de rotación, ángulo total o rotación = 196). Las imágenes se pueden reconstruir utilizando un soporte lógico (p. ej., el programa de soporte lógico RVA3; ImTek). Los volúmenes tumorales se pueden determinar utilizando el soporte lógico disponible (p. ej., el soporte lógico Amira 3.1; Mercury Computer Systems). El volumen o el tamaño del tumor también se pueden determinar en función del tamaño o peso de un tumor.

El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral se puede calcular en función del volumen utilizando la ecuación: % TGI =  $[1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$ , donde "T<sub>n</sub>" es el volumen tumoral promedio para el grupo de tratamiento el día "n" después de la dosis final de ADA2; "T<sub>0</sub>" es el volumen tumoral promedio en ese grupo de tratamiento el día 0, antes del tratamiento; "C<sub>n</sub>" es el volumen tumoral promedio para el grupo de control correspondiente el día "n"; y "C<sub>0</sub>" es el volumen tumoral promedio en el grupo de control el día 0, antes del tratamiento. Se puede determinar el análisis estadístico de los volúmenes tumorales.

## c. Seguimiento Clínico

Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden incluir adicionalmente una o más etapas para el seguimiento del efecto del tratamiento, tal como el tratamiento de tumores utilizando cualquiera de las ADA2 proporcionadas en la presente memoria. Se puede realizar un seguimiento de los sujetos mediante seguimiento del tumor, la salud general del sujeto y/o el curso de la enfermedad en el sujeto. Se puede incluir cualquiera de una variedad de etapas de seguimiento en los métodos proporcionados en la presente memoria, que incluyen, pero no se limitan a, seguimiento del tamaño del tumor, seguimiento del título de anticuerpos anti-(antígeno tumoral), seguimiento de la presencia y/o el tamaño de las metástasis, seguimiento de los ganglios linfáticos del sujeto y seguimiento del peso del sujeto u otros indicadores de salud, incluyendo marcadores de sangre u orina. El propósito del seguimiento puede ser evaluar el estado de salud del sujeto o el progreso del tratamiento terapéutico del sujeto, o puede ser determinar si se justifica o no la administración adicional de ADA2, o determinar cuándo administrar o no otro agente o tratamiento, o puede ser para determinar si se administra o se continúa con la terapia combinada.

También se puede realizar un seguimiento de los parámetros indicativos de la salud de un sujeto. El seguimiento de la salud de un sujeto se puede utilizar para determinar la eficacia del método terapéutico, como se conoce en la técnica. Se puede realizar un seguimiento de cualquiera de una variedad de métodos de diagnóstico de salud para el seguimiento de enfermedades tales como enfermedades neoplásicas u otras enfermedades, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, el peso, la presión arterial, el pulso, la respiración, el color, la temperatura u otro estado observable de un sujeto pueden indicar la salud de un sujeto. Además, la presencia o ausencia o el nivel de uno o más componentes en una muestra de un sujeto pueden indicar la salud de un sujeto. Las muestras típicas pueden



incluir muestras de sangre y orina, donde la presencia o ausencia o el nivel de uno o más componentes se pueden determinar realizando, por ejemplo, una prueba de diagnóstico de un panel de sangre o de un panel de orina. Los componentes ilustrativos indicativos de la salud de un sujeto incluyen, pero no se limitan a, recuento de glóbulos blancos, hematocrito o concentración de proteína reactiva.

5

## 5. Farmacodinámica/Farmacocinética y Tolerabilidad

También se puede evaluar el efecto de la administración de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y las formas modificadas de la misma, sola o combinada con otro agente terapéutico, sobre las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de cualquier agente administrado *in vivo* utilizando modelos animales y/o sujetos humanos, por ejemplo, en el marco de un ensayo clínico. Los estudios farmacocinéticos o farmacodinámicos se pueden realizar utilizando modelos animales o se pueden realizar durante estudios con pacientes a los que se ha administrado cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y las formas modificadas de la misma.

10

15

Los modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, conejos, perros, cobayas y modelos de primates no humanos, tales como monos *cynomolgus* o macacos rhesus. En algunos casos, los estudios farmacocinéticos o farmacodinámicos se realizan con animales sanos. En otros ejemplos, los estudios se realizan utilizando modelos animales de una enfermedad para la que se considera la terapia con ADA2, tales como modelos animales de cualquier enfermedad o trastorno asociados con adenosina, por ejemplo, un modelo tumoral.

20

Las propiedades farmacocinéticas de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y sus formas modificadas, se pueden evaluar midiendo parámetros tales como la concentración máxima (pico) ( $C_{max}$ ), el momento pico (es decir, cuando ocurre la concentración máxima;  $T_{max}$ ), la concentración mínima (es decir, la concentración mínima entre dosis;  $C_{min}$ ), la semivida de eliminación ( $T_{1/2}$ ) y el área bajo la curva (es decir, el área bajo la curva generada al trazar el tiempo versus la concentración; AUC), después de la administración. La biodisponibilidad absoluta de ADA2 se puede determinar comparando el área bajo la curva de ADA2 después del suministro subcutáneo (AUC<sub>sc</sub>) con el AUC de ADA2 después del suministro intravenoso (AUC<sub>iv</sub>). La biodisponibilidad absoluta (F), se puede calcular utilizando la fórmula:  $F = ([AUC]_{sc} \times dosis_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times dosis_{iv})$ . Se pueden administrar un intervalo de dosis y una frecuencia de dosificación diferentes en los estudios farmacocinéticos para evaluar el efecto de aumentar o disminuir las concentraciones de la enzima, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y las formas modificadas de la misma.

25

30

Los estudios para evaluar la seguridad y la tolerabilidad de un tratamiento también se conocen en la técnica y se pueden emplear en la presente memoria. Después de la administración de cualquiera de las ADA2 proporcionadas en la presente memoria, o de cualquier terapia combinada proporcionada en la presente memoria, se puede hacer un seguimiento del desarrollo de cualquier reacción adversa. Las reacciones adversas pueden incluir, pero no se limitan a, reacciones en el lugar de la inyección, tales como edema o hinchazón, dolor de cabeza, fiebre, fatiga, escalofríos, sofocos, mareos, urticaria, sibilancias u opresión en el pecho, náuseas, vómitos, rigores, dolor de espalda, dolor de pecho, calambres musculares, convulsiones o ataques, cambios en la presión arterial y respuestas anafilácticas o de hipersensibilidad severa. Típicamente, se administran un rango de dosis y diferentes frecuencias de dosificación en los estudios de seguridad y tolerabilidad para evaluar el efecto de aumentar o disminuir las concentraciones de cualquier ADA2 o agente utilizado en la terapia combinada en la dosis.

35

40

45

## G. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen una adenosina desaminasa 2 (ADA2), tal como una ADA2 de tipo salvaje, variantes, productos conjugados u otras formas modificadas de la misma, y un excipiente o aditivo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con niveles elevados de adenosina (p. ej., enfermedad o afección hiperproliferativa, tal como un tumor o cáncer). Cualquiera de las ADA2 se puede administrar en una terapia de agente único, o se puede administrar en una terapia combinada con un agente o tratamiento adicional como se describe en la presente memoria. Las composiciones se pueden formular para administración de dosificación única o para administración de dosificación múltiple. Los agentes se pueden formular para administración directa. Las composiciones se pueden proporcionar como una formulación líquida o liofilizada.

50

55

Las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan en vista de las aprobaciones por una agencia reguladora u otra agencia preparada de acuerdo con la farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en seres humanos. Las composiciones se pueden preparar en forma de soluciones, suspensiones, polvos o formulaciones de liberación sostenida. Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas utilizando mecanismos y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase p. ej., Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126). La formulación se debe adaptar al modo de administración.

60

Las composiciones se pueden formular para la administración por cualquier vía conocida por los expertos en la técnica, incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesional, intraperitoneal, subcutánea, intratumoral, epidural, nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, inhalatoria, bucal (p. ej., sublingual), y la administración transdérmica o cualquier vía. También se contemplan otros modos de administración. La administración puede ser local, tópica o sistémica dependiendo del lugar de tratamiento. La administración local en un área que necesita tratamiento se puede lograr, por ejemplo, pero sin limitarse a, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, p. ej., junto con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante. Las composiciones también se pueden administrar con otros agentes biológicamente activos, ya sea de forma secuencial, intermitente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada que incluyen formulaciones de liberación controlada y liberación controlada a partir de un dispositivo, tal como por ejemplo mediante una bomba.

La vía más adecuada en cualquier caso depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad, el progreso de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la composición particular que se utiliza. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. En particular, las composiciones se pueden formular en cualquier preparación farmacéutica adecuada para administración sistémica, intraperitoneal, oral o directa. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular para administración subcutánea, intramuscular, intratumoral, intravenosa o intradérmica. En algunas realizaciones, las composiciones contienen ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria, tales como vectores virales oncolíticos o vectores de terapia génica, o células, tales como células inmunitarias modificadas para inmunoterapia adoptiva, y se pueden formular composiciones particulares en formas de dosificación apropiadas para la composición particular.

Se pueden emplear métodos de administración para disminuir la exposición del agente activo a procesos degradativos, tales como la degradación proteolítica y la intervención inmunológica mediante respuestas antigénicas e inmunogénicas. Los ejemplos de tales métodos incluyen la administración local en el sitio de tratamiento o la infusión continua (p. ej., del polipéptido de ADA2 o una variante del mismo).

Los compuestos se pueden formular en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administraciones orales, así como preparaciones de parches transdérmicos e inhaladores de polvo seco. Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas utilizando mecanismos y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase p. ej., Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126). Generalmente, el modo de formulación es una función de la vía de administración. Generalmente, las composiciones se formulan en forma liofilizada o líquida. Cuando las composiciones se proporcionan en forma liofilizada, se pueden reconstituir justo antes de utilizarlas con un tampón apropiado, por ejemplo, una solución salina estéril.

### 1. Formulaciones - Líquidos, Inyectables, Emulsiones

La formulación generalmente se elabora para que se adapte a la vía de administración. En la presente memoria se contempla la administración parenteral, generalmente caracterizada por inyección o infusión, ya sea por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos estériles solubles en seco, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente justo antes del uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos estériles insolubles secos listos para ser combinados con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Las formulaciones liofilizadas son ideales para el almacenamiento de grandes dosis unitarias para su posterior uso o almacenamiento.

En un ejemplo, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones. Si se proporcionan en forma líquida, las preparaciones farmacéuticas se pueden proporcionar como una preparación concentrada para su dilución a una concentración terapéuticamente eficaz antes de su uso. Las preparaciones farmacéuticas también se pueden proporcionar en una forma de dosificación que no requiera dilución para su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas se pueden presentar en forma liofilizada para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

Los inyectables están diseñados para la administración local y sistémica. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o

suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos estériles solubles en seco, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente justo antes del uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos estériles insolubles secos listos para ser combinados con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas. Si se administran por vía intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y sus mezclas.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores u otros excipientes. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden contener uno o más de diluyentes, coadyuvantes, antiadherentes, aglutinantes, recubrimientos, cargas, aromas, colores, lubricantes, deslizantes, conservantes, detergentes, sorbentes o edulcorantes y una combinación de los mismos o vehículo con el que se administra un polipéptido de PH20 modificado. Por ejemplo, los portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en las preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersantes, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones, incluyendo las preparaciones líquidas, se pueden preparar por medios convencionales con aditivos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o agente, generalmente en forma purificada o parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración adecuada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un portador típico. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábiga, gelatina, glucosa, melazas, polivinilpirrolidina, celulosas y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes similares conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Por ejemplo, los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Una composición, si se desea, también puede contener otras cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes similares, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersantes, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, e inyección de Ringer con dextrosa y lactato. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Se pueden añadir agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a las preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen hidrocloreto de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen sal de sodio de carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles con agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajustar el pH.

En particular, se pueden añadir agentes antimicrobianos (p. ej., conservantes) a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas (p. ej., una cantidad eficaz como antimicrobiano) a las preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres del ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y bencetonio. cloruro.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otras cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes tales, como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. También se contempla en la presente memoria la implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de modo que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 3.710.795). El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales depende en gran medida de la naturaleza específica del mismo, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

## 10 Polvos Liofilizados

Tienen interés en la presente memoria los polvos liofilizados, que se pueden reconstituir para su administración en forma de soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se pueden reconstituir y formular como sólidos o geles. Los polvos liofilizados se pueden preparar a partir de cualquiera de las soluciones descritas anteriormente. Las preparaciones farmacéuticas se pueden presentar en forma liofilizada para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

El polvo liofilizado estéril se prepara disolviendo un compuesto en una solución tampón. La solución tampón puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. La posterior filtración en condiciones estériles de la solución seguida de liofilización en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. Brevemente, el polvo liofilizado se prepara disolviendo un excipiente, tal como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un tampón adecuado, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón conocido por los expertos en la técnica. A continuación, se añade una enzima, agente o compuesto seleccionados a la mezcla resultante, y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se filtra o se trata en condiciones estériles para eliminar sólidos particulados y asegurar la esterilidad, y se distribuye en viales para su liofilización. Cada vial contendrá una dosificación única (1 mg - 1 g, generalmente 1-100 mg, tal como 1-5 mg) u otras dosificaciones como se describe en la presente memoria, o dosificaciones múltiples del compuesto. El polvo liofilizado se puede almacenar en condiciones apropiadas, tal como a aproximadamente 4°C a temperatura ambiente.

La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución tampón proporciona una formulación para su uso en administración parenteral. La cantidad precisa depende de la indicación tratada y del compuesto seleccionado. Tal cantidad se puede determinar empíricamente.

## 35 2. Composiciones para Otras Vías de Administración

Dependiendo de la afección tratada, también se contemplan en la presente memoria otras vías de administración, tales como aplicación tópica, parches transdérmicos, administración oral y rectal.

Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéutica para administración rectal son supositorios, cápsulas y comprimidos rectales para un efecto sistémico. Los supositorios rectales incluyen cuerpos sólidos para la inserción en el recto que se ablandan a la temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológica o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, Carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono, di y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden utilizar combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar por el método de compresión o por moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es de aproximadamente 2 a 3 g. Los comprimidos y las cápsulas para administración rectal se fabrican utilizando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y los mismos métodos que para las formulaciones para administración oral. Las formulaciones adecuadas para administración rectal se pueden proporcionar como supositorios de dosis unitarias. Estos se pueden preparar mezclando el compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y moldeando después la mezcla resultante.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de patata o sal de sodio de glicolato de almidón); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen, por ejemplo, grageas que contienen el compuesto activo en una base aromatizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que

contienen el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las mezclas tópicas se preparan como se describe para la administración local y sistémica. Las mezclas resultantes pueden ser soluciones, suspensiones, emulsiones o similares y están formuladas como cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.

Los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden formular como aerosoles para aplicación tópica, por ejemplo, por inhalación (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, que describen aerosoles para el suministro de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente el asma). Estas formulaciones, para la administración al tracto respiratorio, pueden estar en forma de aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insufflación, solo o combinado con un portador inerte tal como la lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán típicamente diámetros de menos de 50 micras, o menos de 10 micras.

Los compuestos se pueden formular para aplicación local o tópica, tal como para la aplicación tópica a la piel y las membranas mucosas, tales como el ojo, en forma de geles, cremas y lociones, y para la aplicación al ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para el suministro transdérmico y también para la administración a los ojos o las mucosas, o para terapias de inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales del compuesto activo solo o combinado con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se proporcionan formulaciones adecuadas para administración transdérmica. Se pueden proporcionar en cualquier formato adecuado, tales como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Tales parches contienen el compuesto activo en una solución acuosa opcionalmente tamponada, por ejemplo, de una concentración de 0,1 a 0,2 M con respecto al compuesto activo. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también se pueden suministrar por iontoforesis (véase, p. ej., Tyle, P, Pharmaceutical Research 3 (6): 318-326 (1986)) y típicamente adoptan la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar por medio de formulaciones de liberación controlada y/o dispositivos de suministro (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.769.027; 5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533 y 5.733.566).

### 3. Dosificaciones y Administración

La ADA2 de la composición, tal como cualquiera de las descritas en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variante, producto conjugado u otra forma modificada, se puede formular en forma de composiciones farmacéuticas para administración de dosificación única o dosificaciones múltiples. La proteína se puede incluir en una cantidad suficiente para que ejerza un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado. Por ejemplo, la concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección proporcione una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente sometiendo a prueba la proteína en sistemas *in vitro* y *en vivo* por ejemplo mediante el uso de los ensayos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden emplear técnicas clínicas convencionales. Adicionalmente, se pueden emplear ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa, que se puede determinar empíricamente, puede depender de la edad, el peso y el estado del paciente o animal, la molécula de ADA2 particular que se éste administrando, la vía de administración, el tipo de enfermedad a tratar y la gravedad de la enfermedad.

Por lo tanto, se entiende que la dosis precisa y la duración del tratamiento son una función de la enfermedad que se está tratando y se puede determinar empíricamente utilizando protocolos de prueba conocidos o mediante extrapolación de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Cabe señalar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Se debe entender además que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son solo ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance o el uso de las composiciones y combinaciones que los contienen. Las composiciones se pueden administrar cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez. En general, los regímenes de dosificación se eligen para limitar la toxicidad. Cabe señalar que el médico a cargo sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la terapia para reducir la dosis debido a la toxicidad, o la disfunción de la médula ósea, el hígado o los riñones u otros tejidos. Por el contrario, el médico a cargo también

sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos).

5 Las composiciones de una proteína ADA2, tal como un tipo salvaje, variante, producto conjugado u otras formas modificadas de la misma, se incluyen en la composición en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil. Por ejemplo, la cantidad es aquella que logra un efecto terapéutico en el tratamiento de una enfermedad o afección hiperproliferativa, tal como el cáncer. Generalmente, las composiciones contienen de 0,5 µg a 100 gramos de una proteína ADA2, por ejemplo, de 20 µg a 10 gramos, de 20 µg a 50 gramos, de 20 µg a 1 gramo, de 20 µg a 500 mg, de 20 µg a 200 mg, de 20 µg a 5 mg, de 20 µg a 0,5 mg, de 0,5 mg a 100 gramos, de 0,5 mg a 10 gramos, de 0,5 mg a 5 gramos, de 0,5 mg a 1 gramo, de 0,5 mg a 500 mg, de 0,5 mg a 200 mg, de 0,5 mg a 5 mg, de 5 mg a 100 gramos, de 5 mg a 10 gramos, de 5 mg a 5 gramos, de 5 mg a 1 gramo, de 5 mg a 500 mg, de 5 mg a 200 mg, de 100 mg a 100 gramos, de 100 mg a 10 gramos, de 100 mg a 5 gramos, de 100 mg a 1 gramo, de 100 mg a 500 mg, de 100 mg a 200 mg, de 200 mg a 100 gramos, de 200 mg a 10 gramos, de 200 mg a 5 gramos, de 200 mg a 1 gramo, de 200 mg a 500 mg, de 500 mg a 100 gramos, de 500 mg a 10 gramos, de 500 mg a 5 gramos, de 500 mg a 1 gramo, de 1 gramo a 100 gramos, de 1 gramo a 10 gramos, de 1 gramo a 5 gramos, de 5 gramos a 100 gramos, de 5 gramos a 10 gramos o de 10 gramos a 100 gramos. Por ejemplo, la composición puede contener una cantidad de ADA2 que es al menos o al menos aproximadamente 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 gramo, 5 gramos, 10 gramos, 20 gramos, 30 gramos, 40 gramos, 50 gramos, 60 gramos, 70 gramos, 80 gramos, 90 gramos, 100 gramos, 200 gramos, 300 gramos o más.

En ejemplos adicionales, la composición contiene entre o aproximadamente entre 1 miliunidad (mU) y 10.000 unidades (U), 1 mU y 1.000 U, 1 mU y 100 U, 1 mU y 10 U, 1 mU y 1 U, 1 mU y 100 mU, 1 mU y 10 mU, 10 mU y 10.000 U, 10 mU y 1.000 U, 10 mU y 100 U, 10 mU y 10 U, 10 mU y 1 U, 10 mU y 100 mU, 100 mU y 10.000 U, 100 mU y 1.000 U, 100 mU y 100 U, 100 mU y 10 U, 100 mU y 1 U, 1 U y 10.000 U, 1 U y 1.000 U, 1 U y 100 U, 1 U y 10 U, 10 U y 10.000 U, 10 U y 1.000 U, 10 U y 100 U, 100 U y 10.000 U, 100 U y 1.000 U, 1.000 U y 10.000 U, de ADA2. Por ejemplo, la composición puede contener una cantidad de ADA2 que es al menos o al menos aproximadamente o es 1 mU, 2 mU, 3 mU, 4 mU, 5 mU, 6 mU, 7 mU, 8 mU, 9 mU, 10 mU, 20 mU, 30 mU, 40 mU, 50 mU, 60 mU, 70 mU, 80 mU, 90 mU, 100 mU, 200 mU, 300 mU, 400 mU, 500 mU, 600 mU, 700 mU, 800 mU, 900 mU, 1 U, 10U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 60 U, 70 U, 80 U, 90 U, 100 U, 200 U, 300 U, 400 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1000 U, 2000 U, 3000 U, 4000 U, 5000 U, 6000 U, 7000 U, 8000 U, 9000 U, 10000 U o más.

El volumen de la composición que contiene la ADA2 proporcionada en la presente memoria puede estar entre o aproximadamente entre 0,1 ml y 100 ml, tal como 0,5 ml y 100 ml, 0,5 ml y 50 ml, 0,5 ml y 10 ml, 1 ml y 100 ml, 1 ml y 50 ml, 1 ml y 40 ml, 1 ml y 20 ml, 1 ml y 10 ml, o 3 ml y 10 ml. Típicamente, los volúmenes de inyecciones o infusiones de una composición son al menos o al menos aproximadamente 0,01 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml o más.

Cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, tipo salvaje, variantes o productos conjugados (p. ej., ADA2 PEGilada), se puede proporcionar a una concentración de aproximadamente 1 mU/ml, 10 mU/ml, 20 mU/ml, 10 mU/ml, 20 mU/ml, 30 mU/ml, 40 mU/ml, 50 mU/ml, 60 mU/ml, 70 mU/ml, 80 mU/ml, 90 mU/ml, 100 mU/ml, 200 mU/ml, 300 mU/ml, 400 mU/ml, 500 mU/ml, 600 mU/ml, 700 mU/ml, 800 mU/ml, 900 mU/ml, 1 U/ml, 2 U/ml, 3 U/ml, 4 U/ml, 5 U/ml, 6 U/ml, 7 U/ml, 8 U/ml, 9 U/ml, 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 1000 U/ml, 2000 unidades/ml, 3000 U/mL, 4000 U/mL, 5000 U/mL, 6000 U/mL, 7000 U/mL, 8000 U/mL, 9000 U/mL, o 10,000 U/mL. La composición se puede preparar para su uso directo o para dilución a la concentración eficaz antes de su uso.

Los compuestos farmacéuticamente y terapéuticamente activos y sus derivados se formulan y administran típicamente en formas de dosificación unitarias o formas de dosificación múltiples. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, asociado con el portador, vehículo o diluyente farmacéuticos requeridos. Las formas de dosificación unitaria incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles y soluciones o suspensiones orales y emulsiones de agua y aceite que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las formas de dosis unitarias pueden estar contenidas en ampollas y jeringas o comprimidos o cápsulas empaquetados individualmente. Las formas de dosis unitarias se pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un único recipiente para ser administradas en forma de dosis unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de 0,47 L (pintas) o 0,378 L (galones). Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregadas en el envase. Generalmente, se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,005% a 100% estando compuesto el resto por un portador no tóxico. La composición farmacéutica se puede formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

Las preparaciones parenterales de dosis unitarias se envasan en una ampolla, un vial o una jeringa con una aguja. El volumen de solución líquida o preparación de polvo reconstituido, que contiene el compuesto farmacéuticamente activo, es una función de la enfermedad a tratar y del artículo de fabricación particular elegido para el envase. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como es conocido y puesto en práctica en la técnica.

Como se indica, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden formular para cualquier vía conocida por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesional, intraperitoneal, administración epidural, vaginal, rectal, local, ótica, transdérmica o cualquier vía de administración. Las formulaciones adecuadas para tales vías son conocidas por un experto en la técnica. Las composiciones también se pueden administrar con otros agentes biológicamente activos, ya sea de forma secuencial, intermitente o en la misma composición.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante formulaciones y/o dispositivos de administración de liberación controlada (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.847.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.687.660; 4.769.027; 5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.354.556; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533 y 5.733.566).

Se conocen varios sistemas de suministro y se pueden utilizar para administrar composiciones seleccionadas, tales como, pero no limitadas a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor y suministro de moléculas de ácido nucleico que codifican una ADA2, tales como formas de tipo salvaje, variantes o modificadas de los mismos, u otro agente tal como sistemas de suministro de retrovirus. En algunas realizaciones, las composiciones contienen ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de ADA2 variante proporcionado en la presente memoria, tal como vectores virales oncolíticos o vectores de terapia génica, o células, tales como células inmunitarias modificadas para inmunoterapia adoptiva, y se pueden administrar composiciones particulares en sistemas de suministro apropiados para la composición particular.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, también se pueden emplear liposomas y/o nanopartículas con la administración de composiciones y combinaciones de la presente memoria. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también llamadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de los MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 angstroms que contienen una solución acuosa en el núcleo. En algunas realizaciones, los liposomas pueden ser liposomas multivesiculares (MVL).

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras distintas de los liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la razón molar de lípido con respecto a agua. A bajas proporciones, se forman los liposomas. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas experimentan una transición de fase que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada muy compacta, conocida como estado de gel, a una estructura menos ordenada y poco compacta, conocida como estado fluido. Esto ocurre a una temperatura de transición de fase característica y da como resultado un aumento de la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interactúan con las células a través de diferentes mecanismos: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, tales como los macrófagos y los neutrófilos; adsorción a la superficie celular, ya sea por fuerzas hidrófobas o electrostáticas débiles inespecíficas, o por interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana de las células plasmáticas mediante la inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposomales al citoplasma; y por transferencia de lípidos liposomales a membranas celulares o subcelulares, o viceversa, sin ninguna asociación de los contenidos de los liposomas. La variación de la formulación de liposomas puede alterar qué mecanismo está operativo, aunque puede funcionar más de uno puede al mismo tiempo. Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos de manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de un tamaño de alrededor de 0,1 µm) deben diseñarse utilizando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas biodegradables de poli(cianoacrilato de alquilo) que satisfacen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente memoria, y tales partículas se pueden fabricar fácilmente.

#### 4. Envasado y Artículos de Manufactura

También se proporcionan artículos de manufactura que contienen materiales de envasado, cualquier composición farmacéutica proporcionada en la presente memoria y una etiqueta que indica que las composiciones deben utilizarse para el tratamiento de enfermedades o afecciones como se describe en la presente memoria. Por ejemplo,

la etiqueta puede indicar que el tratamiento es para un tumor o cáncer. La etiqueta también puede indicar que el tratamiento es para una enfermedad o afección asociadas con la elevación de un marcador como se describe en la presente memoria, tal como niveles elevados o acumulados de adenosina en tejidos o células, niveles elevados de receptor de adenosina (ADR) y/o niveles elevados de CD73 o CD39.

Las combinaciones de una proteína ADA2 descrita en la presente memoria, incluyendo una variante, producto conjugado (p. ej., ADA2 PEGilada) u otra forma modificada, y otro agente terapéutico también se pueden envasar en un artículo de manufactura. En un ejemplo, el artículo de manufactura contiene una composición farmacéutica que contiene una ADA2, tal como cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, y ningún otro agente o tratamiento. En otros ejemplos, el artículo de manufactura contiene una composición farmacéutica que contiene una ADA2 y otro agente terapéutico adicional. Por ejemplo, el artículo de manufactura contiene una composición farmacéutica que contiene una ADA2 y otro tratamiento, tal como un agente inhibidor de punto de control inmunitario o un agente antitumoral. En este ejemplo, los agentes se pueden proporcionar juntos o por separado, para el envasado como artículos de manufactura.

Los artículos de manufactura proporcionados en la presente memoria contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.252. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, envases de tipo burbuja, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y el modo de administración y tratamiento previstos. Los ejemplos de artículos de manufactura son recipientes que incluyen recipientes de cámara simple y cámara doble. Los recipientes incluyen, pero no se limitan a tubos, botellas y jeringas. Los recipientes pueden incluir adicionalmente una aguja para administración intravenosa.

La elección del envase depende de los agentes y de si tales composiciones se envasarán juntas o por separado. En general, el envase no es reactivo con las composiciones contenidas en el mismo. En otros ejemplos, algunos de los componentes se pueden empaquetar como una mezcla. En otros ejemplos, todos los componentes se envasan por separado. Así, por ejemplo, los componentes se pueden envasar como composiciones separadas que, al mezclarlas justo antes de la administración, se pueden administrar directamente juntas. Alternativamente, los componentes se pueden envasar como composiciones separadas para su administración por separado.

Las composiciones seleccionadas que incluyen los artículos de manufactura de las mismas también se pueden proporcionar en forma de kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un artículo para su administración proporcionado como un artículo de manufactura. Por ejemplo, se puede suministrar una ADA2 con un dispositivo para su administración, tal como una jeringa, un inhalador, un vaso dosificador, un gotero o un aplicador. Las composiciones pueden estar contenidas en el artículo para su administración o se pueden proporcionar por separado para añadirlas más tarde. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación, incluyendo las dosificaciones, los regímenes de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un elemento para el diagnóstico.

## H. MÉTODO DE TRATAMIENTO CON UNA ADENOSINA DESAMINASA 2 (ADA2)

En la presente memoria se proporcionan proteínas ADA2 de acuerdo con las presentes reivindicaciones para su uso en métodos de administración o el uso de cualquier adenosina desaminasa 2 (ADA2) descrita en la presente memoria, tal como variantes, productos conjugados (p. ej., ADA2 PEGilada) u otras formas modificadas de las mismas, para el tratamiento de sujetos que tienen un enfermedad o afección cuyos síntomas se pueden aliviar o disminuir mediante una reducción de los niveles de adenosina o desoxiadenosina en el sujeto. Por ejemplo, la enfermedad o afección están asociadas con niveles elevados de adenosina. Por ejemplo, dado que ADA2 muestra una baja afinidad de unión por adenosina con una  $K_m$  de aproximadamente  $200 \times 10^{-5}$  M, muestra preferentemente actividad en condiciones de niveles elevados o superiores de adenosina. Por lo tanto, el uso de ADA2 como agente terapéutico ofrece el beneficio de mostrar especificidad por enfermedad o ambientes aberrantes, mientras que no muestra actividad en ambientes normales en los que los niveles de adenosina son más bajos. En ejemplos concretos, como se describe a continuación, la enfermedad o afección es un tumor o un cáncer. El sujeto se puede seleccionar en función de los niveles de adenosina extracelular, el nivel de expresión del receptor de adenosina (ADR) y/o el nivel de expresión de ectonucleotidasa. Además, también se proporcionan métodos de terapias combinadas con uno o más agentes adicionales para el tratamiento, tales como un agente anticanceroso o un agente antihialuronano.

### 1. Enfermedades y afecciones ilustrativas

Las concentraciones de adenosina, que está presente fisiológicamente en los fluidos intersticiales de los tejidos sin estrés a niveles bajos, pueden aumentar rápidamente en respuesta a afecciones patológicas, tales como hipoxia,



isquemia, entorno tumoral o trauma. Cuando se libera en el espacio extracelular, la adenosina funciona como una señal de peligro y, a través de la activación de los receptores de adenosina (ADR), se generan varias respuestas celulares para restaurar la homeostasis del tejido. La adenosina está asociada con una variedad de actividades que pueden contribuir a la etiología de enfermedades y afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, la estimulación del crecimiento tumoral y la angiogénesis, la inhibición de la síntesis de citocinas y la adhesión de las células inmunitarias a la pared endotelial, la inhibición de función de las células T, los macrófagos y las células asesinas naturales, y la promoción de metástasis tumorales.

Las adenosina desaminasas, tales como cualquier ADA2 o variantes, productos conjugados u otras formas modificadas de las mismas descritas en la presente memoria, pueden modular los niveles de adenosina extracelular en tales condiciones desaminando las moléculas de adenosina a inosina. Por lo tanto, cualquiera de tales enfermedades se puede tratar con una ADA2 descrita en la presente memoria, tal como un tipo salvaje, variante, producto conjugado (p. ej., ADA2 PEGilada) u otra forma modificada. En particular, ADA2 posee propiedades que contribuyen a la estabilidad extracelular, tales como la glicosilación extensa y la presencia de enlaces disulfuro conservados, que la convierten en un agente terapéutico deseable. En la presente memoria se proporcionan enfermedades y afecciones ilustrativas en las que se puede utilizar el tratamiento con ADA2.

Las composiciones que contienen una ADA2 se pueden administrar por cualquier ruta que se desee para el tratamiento de la enfermedad o afección. La ruta de administración particular puede depender de la enfermedad o afección particulares, la gravedad de la enfermedad o afección, la formulación particular y otros factores dentro del nivel de un experto en la técnica. Típicamente, las composiciones se administran por vía intravenosa, aunque se contemplan otras vías de administración, tales como cualquier vía conocida por los expertos en la técnica, incluyendo inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intralesional, intraperitoneal, administración epidural, vaginal, rectal, local, ótica, transdérmica o cualquier vía de administración.

#### a. Cánceres y tumores

Se puede utilizar ADA2, tal como cualquiera de las descritas en la presente memoria, incluyendo un tipo salvaje, variante, producto conjugado (p. ej., ADA2 PEGilada) u otra forma modificada, para el tratamiento de un tumor o cáncer. La adenosina extracelular elevada en los microentornos tumorales (TME) crea un entorno inmunosupresor local y suprime la actividad de las células T y NK. A través de la generación de TME inmunosupresor y la señalización de ADR para células tumorales e inmunitarias específicas, la adenosina generalmente crea una TME que es favorable para el crecimiento tumoral, la vascularización y la metástasis.

Se ha demostrado que los agentes que modulan la señalización de adenosina tienen efectos en la inhibición del crecimiento tumoral y la modulación de la señalización de las células aguas abajo en una variedad de tipos de cáncer, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, carcinoma de colon, cáncer de próstata y células de melanoma (Antonioli et al. (2013) Nat Rev Can 13:842-857). Las adenosina desaminasas, tales como cualquier ADA2 o variantes, productos conjugados o formas modificadas de las mismas descritos en la presente memoria, pueden modular los niveles de adenosina extracelular en el entorno tumoral, desaminando las moléculas de adenosina a inosina. Por lo tanto, cualquier ADA2, variante, producto conjugado (p. ej., ADA2 PEGilado) o formas modificadas de los mismos se pueden emplear como un agente para modular los niveles de adenosina y la señalización, la inmunosupresión inversa de la respuesta inmunitaria antitumoral y, en última instancia, reducir el crecimiento tumoral.

En particular, las enfermedades y afecciones que se pueden tratar o mejorar mediante los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen, por ejemplo, aquellas en las que se estimula el crecimiento tumoral mediante una alta concentración de adenosina y/o señalización del receptor de adenosina (ADR). Por ejemplo, el TME que produce activamente una alta concentración de adenosina, creando así un entorno inmunosupresor local, puede ser más susceptible al tratamiento con ADA2. En comparación con los niveles normales de adenosina de aproximadamente o alrededor de 0,1 micromolar, los niveles de adenosina en el TME aumentan a aproximadamente 10 micromolar. Dado que ADA2 tiene una Km elevada y es preferentemente activa en condiciones que contienen adenosina elevada, como la que se presenta comúnmente en el microentorno tumoral (TME), ADA2 puede reducir los niveles de adenosina en el TME por su actividad adenosina desaminasa. Cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluidos el tipo salvaje de ADA2, sus variantes y formas modificadas, se puede utilizar para tratar tumores, incluidos tumores sólidos, con una alta concentración de adenosina en el TME.

Además, como se muestra en la presente memoria, ADA2, o las variantes, también muestran varios óptimos de pH que se pueden dirigir preferentemente a regiones dentro del TME. Por ejemplo, las regiones hipóxicas de TME generalmente tienen un pH bajo de aproximadamente o alrededor de pH 6,5, que es el mismo que el óptimo de pH de ADA2. Por ejemplo, un pH alterado es un microentorno común que se encuentra en estados de enfermedad tales como en el TME (véase p. ej., Fogh Andersen et al. (1995) Clin. Chem., 41:1522-1525; Bhujwala et al. (2002) NMR Biomed., 15:114-119; Helmlinger et al. (1997) Nature Med., 3:177; Gerweck y Seetharaman (1996), Cancer Res. 56(6):1194-1198). Por ejemplo, en muchos tumores, el efecto Warburg crea un microentorno con un pH que varía de

aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,8, tal como menos de o aproximadamente pH 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 o 6,8. Por lo tanto, las ADA2 que son más activas a pH ácido que a pH neutro, tales como el tipo salvaje de ADA2 o las variantes descritas en la presente memoria, se pueden emplear para tratar tumores dentro de un TME de pH bajo, a la vez que se minimiza la actividad en células o tejidos de enfermedades no diana.

Por lo tanto, la administración de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria para reducir la concentración de adenosina en el TME mediante la conversión enzimática de adenosina en inosina se puede utilizar para prevenir el crecimiento tumoral y la metástasis, mientras se minimiza la actividad en células o tejidos de enfermedades no diana.

Las proteínas ADA2 para su uso en los métodos descritos son aplicables al tratamiento de todos los tipos de tumores, incluidos los cánceres, que están asociados con niveles elevados de adenosina y/o son susceptibles a la reducción en los niveles de adenosina o desoxiadenosina en el sujeto a tratar. En términos generales, estos incluyen tumores de la sangre, así como tumores sólidos. Se incluyen entre los tumores aquellos cuyo crecimiento se suprime cuando se reducen los niveles de adenosina. Se incluyen entre los tumores aquellos en los que la reducción de los niveles de adenosina permite que el sistema inmunitario del sujeto suprima más eficazmente el crecimiento del tumor, y/o tumores cuyo crecimiento se suprime cuando la reducción de los niveles de adenosina inhibe el suministro de sangre, p. ej., tumores hipóxicos. En particular, los tumores sólidos son susceptibles de tratamiento mediante los métodos proporcionados en la presente memoria, porque son más sensibles a la reducción de la angiogénesis tumoral, resultante de la reducción de los niveles de adenosina. Los niveles elevados de adenosina en secciones del TME promueven la angiogénesis, y la reducción de los niveles de adenosina utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria puede dar como resultado la reducción del efecto angiogénico de la adenosina. Además, los altos niveles de adenosina y la actividad de CD73 están asociados con la diseminación de células cancerosas y la metástasis. Por lo tanto, la reducción de los niveles de adenosina, efectuada por la administración de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, puede dar como resultado la supresión de la diseminación y metástasis de las células cancerosas.

Los tumores sujetos a tratamiento por medio de proteínas ADA2 para su uso en los métodos descritos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se originan en el sistema inmunitario, el sistema esquelético, los músculos y el corazón, la mama, el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central y periférico, el sistema renal, el sistema reproductivo, el sistema respiratorio, la piel, los sistemas de tejido conectivo, incluidas las articulaciones, los tejidos grasos y el sistema circulatorio, incluidas las paredes de los vasos sanguíneos. Los ejemplos de tumores que se pueden tratar administrando cualquier ADA2 o variante o forma modificada de las mismas proporcionadas en la presente memoria incluyen carcinomas, gliomas, sarcomas (incluido el liposarcoma), adenocarcinomas, adenosarcomas y adenomas. Tales tumores pueden existir en prácticamente todas las partes del organismo, incluidos, por ejemplo, mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, cuello uterino o hígado.

Los tumores del sistema esquelético incluyen, por ejemplo, sarcomas y blastomas tales como osteosarcoma, condrosarcoma y condroblastoma. Los tumores musculares y cardíacos incluyen tumores de los músculos esqueléticos y lisos, p. ej., leiomiomas (tumores benignos del músculo liso), leiomiomas, rhabdomiomas (tumores benignos del músculo esquelético), rhabdomiomas, sarcoma cardíaco. Los tumores del tracto gastrointestinal incluyen, p. ej., tumores de boca, esófago, estómago, intestino delgado, colon y tumores colorrectales, así como tumores de órganos secretores gastrointestinales tales como glándulas salivales, hígado, páncreas y tracto biliar. Los tumores del sistema nervioso central incluyen tumores del cerebro, la retina y la médula espinal, y también se pueden originar en el tejido conectivo, los huesos, los vasos sanguíneos o el tejido nervioso asociados. También se contempla el tratamiento de tumores del sistema nervioso periférico. Los tumores del sistema nervioso periférico incluyen tumores malignos de la vaina del nervio periférico. Los tumores del sistema renal incluyen los de los riñones, p. ej., el carcinoma de células renales, así como los tumores de los uréteres y la vejiga. Los tumores del sistema reproductivo incluyen tumores del cuello uterino, útero, ovario, próstata, testículos y glándulas secretoras relacionadas. Los tumores del sistema inmunitario incluyen tumores tanto sanguíneos como sólidos, incluidos linfomas, p. ej., tanto de Hodgkin como de no Hodgkin. Los tumores del sistema respiratorio incluyen tumores de las fosas nasales, bronquios y pulmones. Los tumores de mama incluyen, p. ej., carcinoma tanto lobular como ductal.

Otros ejemplos de tumores que se pueden tratar con cualquier ADA2 o variante o forma modificada de la misma que se proporcionan en la presente memoria incluyen sarcoma de Kaposi, neoplasias del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales, melanoma, carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rhabdomiomas, glioblastoma (tal como glioblastoma multiforme) y leiomiomas. Los ejemplos de cáncer que se pueden tratar con cualquier ADA2 o variante o forma modificada de la misma que se proporcionan en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, linfoma, blastoma, tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, melanoma y leucemia o neoplasias malignas linfoides. Los ejemplos de tales cánceres incluyen neoplasia malignas hematológicas, tales como el linfoma de Hodgkin; linfomas no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de células del

5 manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmocítica), tumores de células precursoras de linfocitos, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B, y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T, timoma, tumores de las células T y NK maduras, incluidas leucemia de células T periféricas, leucemia de células T/linfomas de células T adultas y  
 10 leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mieloides tales como leucemias mielógenas agudas, incluyendo AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mielodisplásicos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica; tumores del sistema nervioso central tales como glioma, glioblastoma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma; tumores sólidos de la cabeza y el cuello (p. ej., cáncer de nasofaringe, carcinoma de glándulas salivales y cáncer de esófago), pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón escamoso), sistema digestivo (p. ej., cáncer gástrico o estomacal, incluido el cáncer gastrointestinal, cáncer del conducto biliar o del tracto biliar, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal y carcinoma anal), sistema reproductivo (p. ej., cáncer de testículo, pene o próstata, uterino, vaginal, vulvar, cervical, ovárico y endometrial), piel (p. ej., melanoma, carcinoma de células basales, cáncer de células escamosas, queratosis actínica, melanoma cutáneo), hígado (p. ej., cáncer de hígado, carcinoma hepático, cáncer hepatocelular, y hepatoma), hueso (p. ej., osteoclastoma y cánceres óseos osteolíticos) tejidos y órganos adicionales (p. ej., cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o renal, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de peritoneo y sarcoma de Kaposi), tumores del sistema vascular (p. ej., angiosarcoma y hemangiopericitoma), tumor de Wilms, retinoblastoma, osteosarcoma y sarcoma de Ewing.

#### b. Enfermedades hiperproliferativas no cancerosas

25 Cualquier ADA2 descrita en la presente memoria, tal como un tipo salvaje, variante, producto conjugado (p. ej., ADA2 PEGilada) u otra forma modificada de la misma, se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa no cancerosa en un sujeto. La señalización de adenosina y ADR desempeña un papel en diversas rutas de señalización que incluyen receptores acoplados a proteínas G (GPCR), señalización de AMP cíclico (AMPC) y/o señalización de citocinas, para una variedad de respuestas celulares tales como la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno, la transcripción y la proliferación de genes. La activación de ciertos receptores de adenosina (ADR), tales como el receptor de A1, puede iniciar rutas celulares que conducen a la proliferación celular. La expresión anormalmente alta y/o la estimulación anormalmente alta pueden provocar hiperproliferación. Cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede utilizar para tratar trastornos hiperproliferativos no cancerosos reduciendo la activación de los ADR en células involucradas en los trastornos hiperproliferativos.

35 Los ejemplos de enfermedades hiperproliferativas que se pueden tratar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y las formas modificadas de las mismas que se proporcionan en la presente memoria, incluyen cualquier enfermedad hiperproliferativa, que incluye, por ejemplo, psoriasis, queratosis actínicas y queratosis seborreicas, verrugas, cicatrices queloides y eccema. También se incluyen enfermedades hiperproliferativas causadas por infecciones virales, tales como la infección por el virus del papiloma. Los diferentes tipos de psoriasis pueden mostrar características tales como ampollas similares a pus (psoriasis pustulosa), desprendimiento severo de la piel I (psoriasis eritrodérmica), puntos con forma de gota (psoriasis guttae) y lesiones inflamadas suaves (psoriasis inversa). Se entiende que el tratamiento de la psoriasis incluye el tratamiento de todos los tipos de psoriasis (p. ej., psoriasis vulgar, psoriasis pustulosa, psoriasis eritrodérmica, psoriasis artropática, parapsoriasis, pustulosis palmoplantar).

#### C. Enfermedades fibróticas

50 Cualquier ADA2 descrita en la presente memoria, tal como un tipo salvaje, variante, producto conjugado (p. ej., ADA2 PEGilada) u otra forma modificada de la misma, se puede utilizar para tratar enfermedades fibróticas, y particularmente aquellas asociadas con una adenosina elevada. Los niveles de adenosina están elevados en condiciones de estrés, tales como hipoxia, isquemia, inflamación, entorno tumoral o trauma. En estas condiciones, la adenosina extracelular funciona como una señal de peligro y promueve diversas respuestas para la homeostasis de los tejidos. Sin embargo, la persistencia de concentraciones elevadas de adenosina más allá de la fase de lesión aguda puede ser perjudicial para los tejidos al activar rutas que desencadenan la supresión inmunitaria o promueven un proceso incesante de cicatrización de heridas, que conduce a la remodelación fibrótica (Antonoli et al. (2013) Nat Rev Can 13: 842-857). La administración de ADA2 proporcionada en la presente memoria, que puede reducir el aumento relacionado con el estrés de la adenosina extracelular, se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con un depósito excesivo de tejido fibrótico, tal como la fibrosis, la formación de tejido conectivo fibroso en exceso en un órgano o tejido en un proceso reparativo o reactivo. Las enfermedades o afecciones asociadas con la fibrosis incluyen, por ejemplo, fibrosis de los pulmones, incluyendo fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística; fibrosis del hígado, incluyendo la cirrosis; fibrosis del corazón, incluyendo fibrosis endomiocárdica, infarto de miocardio, fibrosis auricular; y otras afecciones de fibrosis, incluyendo fibrosis mediastínica (fibrosis del tejido blando del mediastino), mielofibrosis (fibrosis de la médula ósea), fibrosis retroperitoneal (fibrosis del tejido blando del retroperitoneo), fibrosis masiva progresiva (fibrosis de los pulmones),

fibrosis sistémica nefrogénica (fibrosis de la piel), enfermedad de Crohn (fibrosis del intestino), queiloide (fibrosis de la piel), esclerodermia/esclerosis sistémica (fibrosis de la piel, pulmones), artrofibrosis (fibrosis de la rodilla, hombro, otras articulaciones), enfermedad de Peyronie (fibrosis del pene), contractura de Dupuytren (fibrosis de las manos, dedos), capsulitis adhesiva (fibrosis del hombro).

5

#### d. Enfermedades infecciosas

Cualquier ADA2 descrita en la presente memoria, tal como un tipo salvaje, variante, producto conjugado (p. ej., ADA2 PEGilada) u otra forma modificada de la misma, se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades infecciosas asociadas con adenosina elevada. Los patógenos invasivos pueden aprovechar los mecanismos inmunosupresores endógenos del anfitrión, tales como la inmunosupresión mediada por adenosina, para promover la propagación o la supervivencia dentro del anfitrión. Por ejemplo, las hifas de *Candida albicans* liberan adenosina para suprimir la destrucción del organismo mediada por neutrófilos, y *Staphylococcus aureus* también produce adenosina para suprimir la respuesta inmunitaria del anfitrión. Además, el aumento de susceptibilidad a la infección en neonatos y ancianos también se asocia con una señalización de elevados niveles de adenosina (Hasko et al. (2013) Front Immunol. 4:85).

10

15

Por lo tanto, en ciertas enfermedades infecciosas, se puede utilizar ADA2 como tratamiento para disminuir la inmunosupresión mediada por adenosina. Cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y las formas modificadas de las mismas, se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, enfermedades causadas por patógenos tales como virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos. Las enfermedades infecciosas pueden ser causadas por virus que incluyen adenovirus, citomegalovirus, dengue, Epstein-Barr, hantavirus, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, herpes simple tipo I, herpes simple tipo II, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH), influenza, sarampión, paperas, papovavirus, polio, virus sincitial respiratorio, peste bovina, rinovirus, rotavirus, rubéola, virus del SARS, viruela y meningitis viral. Las enfermedades infecciosas también pueden ser causadas por bacterias que incluyen, *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Diphtheria*, *Escherichia coli*, *Legionella*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium rickettsia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma Neisseria*, *Pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*. Las enfermedades infecciosas Las enfermedades infecciosas también pueden estar causadas por hongos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Penicillium marneffe*. Las enfermedades infecciosas también pueden estar causadas por protozoos y parásitos tales como clamidia, coccidia, leishmania, malaria, rickettsia, y tripanosoma.

20

25

30

35

#### e. Otras enfermedades y afecciones

Las personas que albergan mutaciones perjudiciales en el gen ADA1 pueden desarrollar diversos grados de trastorno de inmunodeficiencia, de leve a grave. Tal trastorno de inmunodeficiencia se debe a la acumulación tóxica de los sustratos enzimáticos, adenosina y desoxiadenosina, en las células linfoides inmaduras. El inicio del trastorno también puede variar desde la primera infancia hasta la edad adulta, dependiendo de las mutaciones heredadas. Las deficiencias de ADA1 son una de las principales causas de enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) en niños y es uno de los objetivos principales para los enfoques de terapia génica (R. Parkman et al., 2000, "Gene therapy for adenosine deaminase deficiency", Ann. Rev. Med., 51:33-47).

40

45

Una ADA2 proporcionada en la presente memoria, tal como un tipo salvaje, variante, producto conjugado (p. ej., ADA2 PEGilada u otras formas modificadas, se pueden utilizar en el tratamiento de SCID u otras inmunodeficiencias mediadas por ADA1. Las inmunodeficiencias generalmente se clasifican como inmunodeficiencias adquiridas o inmunodeficiencias heredadas. Las inmunodeficiencias adquiridas incluyen la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), las infecciones por el virus del herpes, las infecciones por el virus de Epstein-Barr, la lepra lepromatosa y la disminución de la capacidad inmunitaria resultante de quemaduras en la piel en pacientes con quemaduras, es decir, la inmunodeficiencia relacionada con las quemaduras. Las inmunodeficiencias heredadas incluyen varias formas genéticamente diferentes de SCID, incluyendo SCID dependiente de deficiencia de adenosina desaminasa (SCID ADA), SCID autosómica recesiva con y sin células B (sin deficiencia de ADA), SCID recesiva ligada a X sin células B, SCID autosómica recesiva (con deficiencia de ADA), deficiencia de purina nucleótido fosforilasa (SCID PNP), inmunodeficiencia combinada grave (deficiencia del receptor de IL-2; es decir, SCID ligada a X) y síndrome de linfocitos desnudos. Otras inmunodeficiencias incluyen diversas formas de anomalías hematopoyéticas congénitas o genéticamente determinadas, varias leucemias de alto riesgo y varias formas de anemia aplásica grave que pone en peligro la vida. Otras inmunodeficiencias que se pueden tratar incluyen el síndrome de Wiskott-Aldrich; el síndrome de Blackfan-Diamond; la anemia de Fanconi; la disfunción severa de neutrófilos; la enfermedad granulomatosa crónica de la infancia; la agranulocitosis severa (tipo Kostman); la inmunodeficiencia y neutropenia de hipoplasia de cartílago-cabello; la osteoporosis infantil y de inicio tardío; anemia aplásica - por agentes químicos tóxicos, idiopática, inmunológica y genética (no Fanconi); leucemia mieloide

50

55

60

aguda; leucemia mieloide crónica; linfoma de Burkitt y leucemia linfática aguda recurrente. En ejemplos concretos, el trastorno del sistema inmunitario que se trata es la inmunodeficiencia combinada grave dependiente de deficiencia de adenosina desaminasa (SCID ADA).

## 5 2. Métodos de selección de pacientes

En la presente memoria se describen métodos de selección de pacientes para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, basándose en el nivel de biomarcadores asociados a adenosina descritos en la presente memoria. Los ejemplos de biomarcadores asociados a adenosina incluyen los niveles de adenosina en  
10 plasma, los niveles de receptor de adenosina (ADR) y los niveles de ectonucleotidasa.

Por ejemplo, los sujetos con niveles elevados de adenosina en el plasma u otras muestras pueden responder mejor al tratamiento con ADA2, ya que los efectos de la administración de ADA2 reducen directamente los niveles elevados de adenosina extracelular. En otro ejemplo, los sujetos que expresan niveles elevados o altos de ADR, tales como los receptores de adenosina A2A y A2B en las muestras, tales como las muestras tumorales, pueden responder mejor a los tratamientos que utilizan ADA2, ya que los efectos sobre la adenosina y el crecimiento tumoral pueden estar mediados directamente por la unión a los ADR expresados sobre las células tumorales. En otro ejemplo, los sujetos con niveles o expresión elevados de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en la muestra tumoral u otras muestras pueden responder mejor al tratamiento con ADA2, ya que el aumento de la expresión de CD39 y CD73 conduce a niveles elevados de adenosina, y los niveles elevados de adenosina, a través de la señalización de los ADR, tienen efectos promotores del cáncer aguas abajo. Por lo tanto, estos biomarcadores se pueden emplear para seleccionar o identificar pacientes que se espera que respondan al tratamiento y/o para controlar el tratamiento y la eficacia del tratamiento, proporcionando así un mejor régimen de tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas a la adenosina, tales como un tumor o un cáncer, utilizando cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.  
15  
20  
25

### a. Biomarcadores asociados a adenosina

En la presente memoria se describen métodos para seleccionar pacientes que tienen tumores en los que es aplicable el tratamiento con ADA2. Los métodos proporcionados en la presente memoria son aplicables para tratar afecciones y enfermedades que están asociadas con niveles elevados de adenosina y/o susceptibles a una reducción en los niveles de adenosina o desoxiadenosina en el sujeto a tratar. Por ejemplo, tales afecciones o enfermedades incluyen un tumor o un cáncer. Los niveles de biomarcadores asociados a adenosina, tales como los niveles plasmáticos de adenosina, los niveles del receptor de adenosina (ADR) y los niveles de ectonucleotidasa, se pueden emplear para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o afección asociadas a la adenosina, para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene una enfermedad o afección asociadas a adenosina a cualquier ADA2 o terapia combinada proporcionada en la presente memoria, y/o para controlar o predecir la eficacia del tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o afección asociadas a adenosina que ha sido tratada con una ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo tipos salvajes, variantes y formas modificadas de las mismas.  
30  
35  
40

En cualquiera de los ejemplos proporcionados en la presente memoria, las enfermedades o afecciones asociadas con adenosina son enfermedades y afecciones en las que los niveles de adenosina se elevan como causa, consecuencia u otra forma observada en la enfermedad o afección. Las enfermedades o afecciones asociadas con adenosina ilustrativas, incluyen, pero no se limitan a, un cáncer, un tumor, una enfermedad inflamatoria, una infección y otras afecciones y enfermedades asociadas con niveles elevados de adenosina y/o son susceptibles a una reducción de los niveles de adenosina o desoxiadenosina en el sujeto a tratar. En particular, las enfermedades y afecciones asociadas con la adenosina incluyen, pero no se limitan a, cánceres con niveles elevados de adenosina en el entorno extracelular, por ejemplo, tumores, incluyendo tumores sólidos que son hipóxicos. En la presente memoria se describen métodos de tratamiento que incluyen la medición de biomarcadores asociados a adenosina y la selección de sujetos para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.  
45  
50

### i. Niveles de adenosina en plasma

En un ejemplo, se puede seleccionar un paciente o sujeto para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, basándose en los niveles o la expresión de adenosina extracelular en la muestra, tal como el plasma. En otros ejemplos, se puede utilizar el nivel de adenosina extracelular en el microentorno tumoral de un tumor específico. El nivel de adenosina en plasma se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los métodos basados en cromatografía. Está dentro del nivel de un experto en la técnica la evaluación, cuantificación, determinación y/o detección de los niveles de adenosina en una muestra de plasma utilizando ensayos conocidos en la técnica. Los ensayos incluyen ensayos *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos ilustrativos que se pueden emplear para evaluar, evaluar, determinar, cuantificar y/o detectar específicamente los niveles de adenosina en una muestra incluyen, pero no se limitan a, ensayos basados en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (véase, p. ej., Jackson y Ohnishi (1987) Hypertension 10:189-197), métodos  
55  
60

espectrofotométricos, ensayos radioenzimáticos (véase, p. ej., German y Kredich (1984) Anal Biochem. 142 (2):536-541), detección basada en microelectrodos y métodos de obtención de imágenes *in vivo*, tales como los métodos basados en bioluminiscencia. En algunos ejemplos, los niveles plasmáticos de adenosina se pueden detectar utilizando un método de HPLC modificado que utiliza una reacción que convierte la adenosina en un derivado fluorescente, tal como 1,N<sup>6</sup>-etanoadenosina para la detección de niveles de adenosina. (Howard et al. (1998) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 39(10):1942-1946).

## ii) Receptores de adenosina (ADR)

El nivel de expresión de los receptores de adenosina (ADR) se puede utilizar como biomarcador para la selección de pacientes o sujetos para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. En particular, se pueden utilizar los ADR que se expresan en células tumorales y/o células inmunitarias implicadas en la inmunidad tumoral, tales como los receptores de adenosina A2A (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 375) y A2B (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 376). Los tumores que expresan niveles elevados o altos de ADR, tales como los receptores de adenosina A2A y A2B, pueden responder mejor a los tratamientos que utilizan ADA2, ya que los efectos sobre la adenosina y el crecimiento tumoral pueden estar mediados por la unión de la adenosina a los ADR expresados sobre las células tumorales. Algunos tumores tienen una expresión elevada de ADR, en particular, A2A y A2B, y la expresión de estos receptores tiene efectos promotores del cáncer aguas abajo. En otros ejemplos, la señalización de adenosina, a través de la estimulación de los receptores A2A y A2B, regula los procesos inflamatorios endoteliales y la angiogénesis tumoral. En otros ejemplos, la expresión de los ADR, tales como los receptores de adenosina A2A y A2B, tiene efectos inhibidores sobre la activación y diferenciación de las células inmunitarias, tales como los macrófagos y las células dendríticas. Por lo tanto, las mediciones de los ADR, tales como los receptores de adenosina A2A y A2B se pueden emplear para seleccionar tumores, incluidos los cánceres, que están asociados con niveles elevados de adenosina y/o son susceptibles a una reducción en los niveles de adenosina o desoxiadenosina. Los niveles de ADR, tales como los receptores de adenosina A2A y A2B, se pueden emplear para seleccionar o identificar pacientes que se espera que respondan al tratamiento y/o para controlar el tratamiento y la eficacia del tratamiento, proporcionando así un mejor régimen de tratamiento de las enfermedades o afecciones asociadas a adenosina, tales como un tumor o un cáncer.

Por ejemplo, se puede seleccionar un paciente o sujeto para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, en función de los niveles o la expresión de los receptores de adenosina A2A y A2B en una muestra, tal como un tumor o una muestra de fluido de un sujeto que tiene un tumor o se sospecha que tiene un tumor. El nivel de expresión de los ADR, por ejemplo, los receptores de adenosina A2A y A2B, se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica para determinar los niveles de receptores extracelulares sobre una célula. Está dentro del nivel de un experto en la técnica la evaluación, cuantificación, determinación y/o detección de los niveles de ADR, tales como los de los receptores de adenosina A2A y A2B, en una muestra utilizando ensayos conocidos en la técnica. Los ensayos incluyen ensayos *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos ilustrativos que se pueden emplear para evaluar, evaluar, determinar, cuantificar y/o detectar de otro modo específicamente los niveles de ADR, tales como los de los receptores de adenosina A2A y A2B, en una muestra incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión en fase sólida (p. ej., ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunorradiométrico, ensayo de fluorescencia, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente, transferencia Western e histoquímica, tal como inmunohistoquímica (IHC) o pseudo-inmunohistoquímica utilizando un agente de unión distinto de un anticuerpo. En los métodos de ensayo de unión en fase sólida, tales como los métodos ELISA, por ejemplo, el ensayo puede ser un formato sándwich o un formato de inhibición competitiva. En otros ejemplos se pueden utilizar métodos de obtención de imágenes *in vivo*.

Los métodos descritos en la presente memoria están dirigidos a la medición de los niveles de proteína ADR, tales como los de los receptores de adenosina A2A y A2B, en una muestra, tal como una muestra de tumor o fluido de un sujeto que tiene un tumor o se sospecha que tiene un tumor, utilizando anticuerpos contra ADR, tales como los receptores de adenosina A2A y A2B. Los anticuerpos ilustrativos contra el receptor de adenosina A2A incluyen los de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; Núm. de Cat. Sc-70321), Abcam (Cambridge, Reino Unido; Núm. de Cat. Ab3461) y EMD Milipore (Billerica, MA; Núm. de Cat. AB1559P). Los anticuerpos ilustrativos contra el receptor de adenosina A2B incluyen los de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; Núm. de Cat. Sc-7505), Abcam (Cambridge, Reino Unido; Núm. de Cat. Ab40002) y EMD Milipore (Billerica, MA; Núm. de Cat. AB1589P). Los anticuerpos se pueden emplear para detectar los niveles de proteína ADR en muestras, utilizando métodos tales como inmunohistoquímica, ELISA, RIA, ensayo inmunorradiométrico, ensayo de fluorescencia, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente y transferencia Western. Los anticuerpos se pueden modificar por conjugación, directa o indirectamente, a biotina, un radical fluorescente, un radiomarcador u otra marca detectable. En otros ejemplos, se pueden emplear anticuerpos secundarios, que se conjugan con una marca detectable.

Los niveles de ADR, tales como los de los receptores de adenosina A2A y A2B, también se pueden determinar utilizando métodos de obtención de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, la tomografía por emisión de positrones (PET) con la administración de derivados de xantina, que tienen actividad antagonista del receptor A2A, radiomarcados con el emisor de positrones carbono-11 (<sup>11</sup>C), tales como <sup>11</sup>C-SCH442416, <sup>11</sup>C-KF1783, <sup>11</sup>C-KF18446, <sup>11</sup>C-KF19631,

<sup>11</sup>C-CSC, <sup>11</sup>C-KW-6002 y <sup>11</sup>C-TMSX (Grachev et al. (2014) Journal of Diagnostic Imaging in Therapy 1(1):1-19).

Otros métodos para determinar los niveles de ADR, tales como los de los receptores de adenosina A2A y A2B, incluyen métodos basados en ácido nucleico, tales como la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR), micromatrices, PCR cuantitativa, secuenciación de transcriptomas de alto rendimiento y otros métodos de este tipo.

### iii) Ectonucleotidasas CD39 y CD73

El nivel de expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 que se expresan en células tumorales se puede utilizar como biomarcador para la selección de pacientes o sujetos para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. CD39 y CD73 son las ectonucleotidasas que generan adenosina extracelular a partir de trifosfato de adenosina (ATP). CD39 (Ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa 1; EC 3.6.1.5; secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 378) metaboliza el ATP extracelular para generar adenosina difosfato (ADP) y adenosina monofosfato (AMP), y CD73 (ecto-5'-nucleotidasa; EC 3.1.3.5; secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 543) metaboliza el AMP para generar adenosina. CD39 y CD73 son la fuente principal de adenosina extracelular durante las afecciones asociadas con una elevación rápida de los niveles de adenosina, tales como hipoxia, isquemia, inflamación, entorno tumoral o trauma. En estas condiciones, el ATP extracelular aumenta, lo que conduce a un aumento posterior en los niveles de adenosina, por la acción de las ectonucleotidasas CD39 y CD73. En ciertos tipos de cáncer, el nivel de CD39 y CD73 se expresa de manera anormalmente alta, y los niveles elevados de CD73 se asocian con un mal pronóstico y una alta recurrencia tumoral temprana. Por lo tanto, el nivel de expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 se puede utilizar como un biomarcador para tumores asociados con niveles elevados de adenosina y para la selección de pacientes para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.

Por ejemplo, un paciente o sujeto se puede seleccionar para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, en función de los niveles o la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en una muestra, tal como una muestra de tumor o fluido de un sujeto que tiene un tumor o se sospecha que tiene un tumor o células inmunitarias. El nivel de expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica para determinar los niveles de proteínas de la membrana plasmática o extracelulares. Están dentro del nivel de un experto en la técnica la evaluación, cuantificación, determinación y/o detección del nivel de expresión de ectonucleotidasas CD39 y CD73 en una muestra utilizando ensayos conocidos en la técnica. Los ensayos incluyen ensayos *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos ilustrativos que se pueden emplear para evaluar, evaluar, determinar, cuantificar y/o detectar específicamente el nivel de expresión de ectonucleotidasas CD39 y CD73 en una muestra incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión en fase sólida (p. ej., ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico, ensayo de fluorescencia, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente, transferencia Western e histoquímica, tal como inmunohistoquímica (IHC) o pseudo-inmunohistoquímica utilizando un agente de unión distinto de un anticuerpo. En los métodos de ensayo de unión en fase sólida, tales como los métodos ELISA, por ejemplo, el ensayo puede ser un formato sándwich o un formato de inhibición competitiva. En otros ejemplos se pueden utilizar métodos de obtención de imágenes *in vivo*.

Los métodos descritos en la presente memoria están dirigidos a la medición de ectonucleotidasas CD39 y CD73 en una muestra, tal como una muestra de tumor o fluido de un sujeto que tiene un tumor o se sospecha que tiene un tumor, utilizando anticuerpos contra las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Los anticuerpos ilustrativos contra CD39 incluyen los de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; Núm. de Cat. Sc-65262), Abcam (Cambridge, Reino Unido; Núm. de Cat. Ab49580) y EMD Milipore (Billerica, MA; Núm. de Cat. 04-973). Los anticuerpos ilustrativos contra CD73 incluyen los de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; Núm. de Cat. Sc-8502), Abcam (Cambridge, Reino Unido; Núm. de Cat. Ab4056) y EMD Milipore (Billerica, MA; Núm. de Cat. IHCR2023-6). Los anticuerpos se pueden emplear para detectar los niveles de proteína ADR en muestras, utilizando métodos tales como inmunohistoquímica, ELISA, RIA, ensayo inmunoradiométrico, ensayo de fluorescencia, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente y transferencia Western. Los anticuerpos se pueden modificar por conjugación, directa o indirectamente, a biotina, un radical fluorescente, una radiomarca u otra marca detectable. En otros ejemplos, se pueden emplear anticuerpos secundarios, que se conjugan con un marcador detectable.

Otros métodos para determinar los niveles de ectonucleotidasa CD39 y CD73 incluyen métodos basados en ácido nucleico, tales como la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR), micromatrices, PCR cuantitativa, secuenciación de transcriptomas de alto rendimiento y otros métodos similares.

### b. Selección de pacientes

Una vez que se determina la cantidad del nivel de biomarcadores, tales como los niveles de adenosina en plasma, los niveles de ADR tales como A2A o A2B, o los niveles de ectonucleotidasas CD39 y CD73, se puede comparar la cantidad con un nivel de control o umbral. El nivel de control o umbral generalmente es un nivel o cantidad umbral predeterminado que es indicativo de enfermedad o afección asociadas con niveles elevados de adenosina (p. ej., un

tumor o cáncer). Tal nivel o cantidad pueden determinados empíricamente por un experto en la técnica. Se entiende que los criterios de selección o clasificación predeterminados particulares para los métodos en la presente memoria dependen del ensayo particular que se utiliza para detectar el nivel de biomarcadores asociados a adenosina y la muestra particular que se está sometiendo a ensayo. Está dentro del nivel de un experto en la técnica la determinación de si un ensayo es compatible con la prueba de una muestra particular. Los ensayos en fase sólida *in vitro* o los ensayos basados en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se pueden utilizar para someter a prueba muestras de fluidos corporales. Los ensayos tales como la histoquímica o la inmunohistoquímica se pueden emplear para someter a prueba muestras de tejido. También se entiende que en los métodos que implican comparaciones con un nivel o cantidad predeterminados o con una muestra de control o referencia, las referencias se hacen con el mismo tipo de muestra y utilizando el mismo ensayo y reactivos (incluyendo el mismo radical detectable y método de detección).

Por ejemplo, el nivel umbral predeterminado se puede determinar en función del nivel o la cantidad del marcador en una muestra de referencia o control, tal como la mediana o el nivel o la cantidad medios del marcador en una población de sujetos, para evaluar las diferencias en los niveles o la expresión. En un ejemplo, el nivel umbral predeterminado puede representar el nivel o la cantidad medios o la mediana del nivel del biomarcador asociado a adenosina en una muestra de un sujeto sano o un sujeto que se sabe que tiene una afección o enfermedad asociadas con niveles elevados de adenosina (p. ej., un tumor o cáncer) En una realización, el nivel o cantidad predeterminados del biomarcador asociado a adenosina de una muestra de tejido o fluido corporal normal es el nivel o cantidad medio observado en muestras normales (p. ej., todas las muestras normales analizadas). En otra realización, el nivel o cantidad del biomarcador asociado a adenosina de una muestra de tejido o fluido corporal normal es la mediana del valor para el nivel o cantidad observada en muestras normales. El nivel umbral predeterminado también se puede basar en el nivel o la cantidad del biomarcador asociado a adenosina en una línea celular u otra muestra de control (p. ej., línea celular tumoral). Como se describe en la presente memoria, estos valores predeterminados se pueden determinar mediante la comparación o el conocimiento de los niveles de biomarcadores asociados a adenosina en una muestra normal correspondiente según se determina mediante el mismo ensayo de detección y utilizando los mismos reactivos, por ejemplo, el mismo anticuerpo y método de detección.

La muestra de referencia o control puede ser otro tejido, fluido celular o corporal, tal como un tejido, fluido celular o corporal normal, por ejemplo, un tejido, fluido celular o corporal que sea análogo a la muestra que se está sometiendo a prueba, pero aislada de un sujeto diferente. El sujeto de control o referencia puede ser un sujeto o una población de sujetos que sea normal (es decir, que no tiene una enfermedad o afección), un sujeto que tiene una enfermedad pero no tiene el tipo de enfermedad o afección que tiene o se sospecha que tiene el sujeto que se está sometiendo a prueba, por ejemplo, un sujeto que no tiene una afección o enfermedad asociadas con niveles elevados de adenosina (p. ej., un tumor o cáncer), o un tejido análogo de otro sujeto que tiene una enfermedad o afección similares, pero cuya enfermedad no es tan grave y/o expresa relativamente menos biomarcador asociado a adenosina. Por ejemplo, cuando la célula, el tejido o el líquido que se está sometiendo a prueba es un sujeto o una población de sujetos que tienen cáncer, el nivel o la cantidad del marcador se pueden comparar con el nivel o la cantidad del marcador en un tejido, célula o fluido de un sujeto que tiene un cáncer menos grave, tal como un estadio temprano, diferenciado u otro tipo de cáncer. En otro ejemplo, una muestra de control o referencia es un fluido, tejido, extracto (p. ej., extracto celular o nuclear), preparación de ácido nucleico o péptido, línea celular, biopsia, patrón u otra muestra, con una cantidad conocida o una cantidad relativa del biomarcador asociado a adenosina, tal como una muestra, por ejemplo, una línea celular tumoral o tumores de modelos tumorales generados utilizando tales líneas celulares.

En cualquier método en la presente memoria, el nivel o los niveles del biomarcador asociado a adenosina en muestras de sujetos sospechosos de tener o que se sabe que tienen una afección o enfermedad asociadas con niveles elevados de adenosina (p. ej., cáncer) se pueden determinar simultáneamente con la determinación del nivel o los niveles del biomarcador asociado a adenosina en los tejidos de referencia o normales. Alternativamente, los niveles del biomarcador asociado a adenosina en muestras de sujetos sospechosos de tener o que se sabe que tienen una afección o enfermedad asociadas con niveles elevados de adenosina (p. ej., cáncer) se pueden comparar con el nivel o los niveles del biomarcador asociado a adenosina previamente determinado en tejido o fluido corporal normal. Por lo tanto, el nivel del biomarcador asociado a adenosina en muestras normales o sanas u otras muestras de referencia empleadas en cualquier detección, comparación, determinación o evaluación puede ser un nivel o cantidad determinados antes de cualquier detección, determinación o evaluación del nivel o cantidad del biomarcador asociado a adenosina en una muestra de un paciente humano.

El nivel o la cantidad del biomarcador asociado a adenosina se determinan y/o califican y se comparan con fenotipos predeterminados del biomarcador asociado a adenosina asociado con la enfermedad. Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar el nivel umbral para el diagnóstico de la enfermedad dependiendo de la enfermedad particular, el ensayo se esté utilizando para la detección del biomarcador asociado a adenosina y/o el reactivo de detección que se utilice. Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar el nivel umbral del biomarcador asociado a adenosina para clasificar la capacidad de respuesta al tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en



la presente memoria. A continuación, se proporcionan métodos ilustrativos para la estratificación de muestras tumorales o muestras de fluidos corporales para el diagnóstico, pronóstico o selección de sujetos para el tratamiento.

5 Se entiende que el cambio particular, p. ej., el aumento o la disminución del biomarcador asociado a adenosina depende del ensayo utilizado. En un ELISA, la multiplicidad de incremento o disminución en la absorbancia a una longitud de onda particular o en la cantidad de proteína (p. ej., según lo determinado mediante el uso de una curva patrón) se puede expresar con respecto a un control. En un ensayo de PCR, tal como RT-PCR, los niveles de expresión se pueden comparar con los niveles de expresión de control (p. ej., expresada como la multiplicidad de cambio) utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el uso de patrones.

15 En ejemplos concretos de los métodos de la presente memoria, se selecciona un sujeto como candidato para la terapia con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, si se determina que la cantidad del biomarcador asociado a adenosina está elevada en la muestra. Por ejemplo, los niveles elevados o acumulados o biomarcadores asociados a adenosina en un sujeto enfermo en comparación con un sujeto sano o normal son indicativos de una afección o enfermedad asociadas con niveles elevados de adenosina (p. ej., tumor o cáncer). El biomarcador asociado a adenosina se puede elevar 0,5 veces, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces o más. Por lo tanto, en los ejemplos de los métodos de la presente memoria, cuando se está sometiendo a prueba la cantidad del biomarcador asociado a adenosina en una muestra de un sujeto, la detección del marcador puede estar determinando que la cantidad del biomarcador asociado a adenosina en la muestra (p. ej., células, tejidos o fluidos cancerosos) del sujeto es elevada en comparación con un nivel o cantidad predeterminados o muestra de control. En un ejemplo, se determina que el sujeto tiene una afección o enfermedad asociadas con niveles elevados de adenosina si la cantidad del biomarcador asociado a adenosina en el tejido, la célula o el fluido se eleva, o se eleva aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces o más, en comparación con el nivel o la cantidad predeterminados o la muestra de control.

30 Se puede seleccionar un sujeto como candidato para la terapia con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, en función del nivel o la cantidad de niveles de adenosina en una muestra (p. ej., plasma) del sujeto. Por ejemplo, niveles de adenosina en plasma superiores a 0,1 mM, tales como 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM o más, se correlacionan con la presencia de un tumor o cáncer. Utilizando tales métodos, en los métodos ilustrativos proporcionados en la presente memoria, un sujeto se puede seleccionar para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria si el nivel de adenosina en la muestra de fluido, tal como una muestra de plasma, es mayor que 0,1 mM, tal como 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM o más.

40 Se puede seleccionar un sujeto como candidato para la terapia con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, en función del nivel o la cantidad del biomarcador asociado a adenosina, tal como los ADR, tales como los receptores de adenosina A2A (SEQ ID NO: 533) y A2B (SEQ ID NO: 534) o las ectonucleotidasas CD39 (SEQ ID NO: 378) y CD73 (SEQ ID NO: 379), en una muestra de células o tejidos. En tal ejemplo, si el nivel es indicativo de enfermedad, en ese caso el paciente es diagnosticado de una afección o enfermedad asociadas con niveles elevados de adenosina. Por ejemplo, un alto porcentaje de tinción indica que el sujeto tiene un tumor con un elevado biomarcador asociado a adenosina, tal como los ADR, tales como los receptores de adenosina A2A y A2B o la ectonucleotidasa CD39 y CD73, indicativo de la presencia de un tumor que se beneficiaría del tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y, por lo tanto, es un candidato para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. En otros ejemplos, se puede seleccionar un sujeto para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, en función del porcentaje de tinción, por ejemplo, si el grado de tinción del biomarcador asociado a adenosina es 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más del área total de tinción, y generalmente al menos 25% o más. Utilizando métodos histoquímicos, se cuantifica la cantidad de biomarcador asociado a adenosina detectado y se proporciona como un porcentaje de los píxeles positivos para el biomarcador asociado a adenosina y/o una puntuación. Por ejemplo, la cantidad de biomarcador asociado a adenosina detectada en la muestra se puede cuantificar como un porcentaje de los píxeles positivos para biomarcador asociado a adenosina. En algunos ejemplos, la cantidad del biomarcador asociado a adenosina presente en una muestra se cuantifica como el porcentaje de área manchada, p. ej., el porcentaje de píxeles positivos para biomarcadores asociados a adenosina. Por ejemplo, una muestra puede tener al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 0, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 95% o más de los píxeles positivos para biomarcadores asociados a adenosina en comparación con el área de tinción total.

La eficacia del tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria o la capacidad de respuesta al tratamiento también se pueden controlar comparando el nivel o la cantidad de biomarcadores asociados a adenosina en un sujeto a lo largo del tiempo. Los cambios en el nivel o la cantidad de biomarcadores asociados a adenosina se pueden emplear para optimizar la dosificación o la programación del tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. En el método, el nivel de biomarcadores asociados a adenosina en muestras, de sujetos tratados, se compara con un nivel predeterminado de biomarcadores asociados a adenosina.

Con el fin de controlar el tratamiento, el nivel predeterminado del biomarcador asociado a adenosina puede ser el de un sujeto normal o sano, un valor de biomarcador asociado a adenosina en el momento inicial antes del tratamiento, el nivel previo medido el nivel de biomarcador asociado a adenosina en el mismo sujeto en un momento anterior después del tratamiento, o una clasificación o estratificación de los niveles de biomarcadores asociados a adenosina que se sabe que están asociados con la progresión o regresión de la enfermedad. Por ejemplo, si el nivel de biomarcador asociado a adenosina es aproximadamente igual o inferior (o disminuido) en comparación con la muestra de referencia o control, se indica que el tratamiento es eficaz y el tratamiento se puede continuar, interrumpir o modificar. Por ejemplo, el nivel predeterminado del biomarcador asociado a adenosina puede ser un nivel de biomarcador asociado a adenosina de una muestra de tejido normal o sano, y si el nivel del biomarcador asociado a adenosina medido en el sujeto después del tratamiento es mayor que los niveles normales de biomarcadores asociados a adenosina, se reanuda o continúa el tratamiento. Por ejemplo, el nivel predeterminado del biomarcador asociado a adenosina puede ser el nivel de biomarcador asociado a adenosina según lo determinado a partir de un valor de biomarcador asociado a adenosina en el momento inicial antes del tratamiento, y el curso del tratamiento se determina en consecuencia. Por ejemplo, si el nivel del biomarcador asociado a adenosina es el mismo que el de los niveles en el momento inicial, en ese caso el tratamiento continúa o se reanuda; si el nivel del biomarcador asociado a adenosina es más alto que los niveles en el momento inicial, en ese caso el tratamiento continúa o se reanuda o el tratamiento se acelera o aumenta (p. ej., aumentando la dosificación de ADA2 o aumentando el programa de dosis en un ciclo de régimen de dosificación); si el nivel del biomarcador asociado a adenosina es menor que los niveles en el momento inicial, en ese caso el tratamiento continúa o se reanuda, se finaliza o se reduce o disminuye (p. ej., disminuyendo la dosificación de ADA2 o disminuyendo el programa de dosis en un ciclo de régimen de dosificación). En un ejemplo adicional, el nivel predeterminado del biomarcador asociado a adenosina puede ser un nivel de biomarcador asociado a adenosina como se determina en una medición previa en un curso anterior de tratamiento del mismo sujeto. Por ejemplo, si el nivel del biomarcador asociado a adenosina es el mismo que los niveles medidos anteriormente, en ese caso el tratamiento continúa o se reanuda; si el nivel del biomarcador asociado a adenosina es más alto que los niveles medidos anteriormente, en ese caso el tratamiento continúa o se reanuda o el tratamiento se acelera o aumenta (p. ej., aumentando la dosis de ADA2 o aumentando el programa de dosis en un ciclo de régimen de dosificación); si el nivel del biomarcador asociado a adenosina es menor que los niveles medidos anteriormente, en ese caso el tratamiento continúa o se reanuda, finaliza o se reduce o disminuye (p. ej., disminuyendo la dosificación de ADA2 o disminuyendo el programa de dosis en un ciclo de régimen de dosificación).

En los métodos de control o los métodos para determinar la eficacia del tratamiento, la terapia particular se puede alterar durante el curso del tratamiento para maximizar la respuesta individual. La dosificación y la programación del tratamiento se pueden modificar en respuesta a niveles cambiantes. La terapia combinada que utiliza otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes anticancerosos, también se puede emplear en tales métodos de tratamiento. Está dentro del nivel de habilidad del médico a cargo determinar el curso exacto del tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento se puede modificar, de modo que la cantidad de dosificación, el programa (p. ej., la frecuencia de administración), o el régimen se ajustan en consecuencia, por ejemplo, se interrumpe, disminuye o se hace menos frecuente, o se combina con otro tratamiento para la enfermedad o afección. Por otro lado, si el nivel de biomarcadores asociados a adenosina está por encima de una muestra de referencia o control comparada, se indica que el paciente no responde al tratamiento. En tales casos, la naturaleza particular y el tipo de agente terapéutico, tal como ADA2 o la terapia combinada, se pueden modificar o cambiar. En otros casos, la dosificación, la cantidad, el programa y/o el régimen se pueden ajustar en consecuencia, por ejemplo, aumentar o hacerse más frecuentes. Está dentro del nivel del médico a cargo determinar el curso exacto del tratamiento.

Con el fin de controlar la eficacia del tratamiento, se pueden determinar empíricamente niveles o cantidades predeterminados del biomarcador asociado a adenosina, por lo que el nivel o cantidad indica que el tratamiento está funcionando. Estos valores predeterminados se pueden determinar mediante la comparación o el conocimiento de los niveles de biomarcadores asociados a adenosina en una muestra normal correspondiente o muestras de sujetos con enfermedades según lo determinado por el mismo ensayo de detección y utilizando el mismo reactivo. Por ejemplo, los altos niveles del biomarcador asociado a adenosina según la evaluación mediante métodos de inmunohistoquímica utilizando un esquema de puntuación cuantitativa o porcentaje de tinción tumoral para el biomarcador asociado a la adenosina de más de 25% se correlacionan con la existencia de enfermedad maligna en una variedad de tipos de cáncer e indican que un paciente no responde al tratamiento.

En los métodos de la presente memoria, la comparación con un nivel predeterminado o con los niveles de una muestra de control o referencia se puede determinar mediante cualquier método conocido por expertos en la técnica.

Por ejemplo, la comparación del nivel del biomarcador asociado a adenosina con un nivel de referencia, control o predeterminado se puede realizar mediante un sistema automatizado, tal como un programa de soporte lógico o un sistema inteligente que sea parte de, o sea compatible con el equipo (p. ej. plataforma informática) en el que se realiza el ensayo. Alternativamente, esta comparación puede ser llevada a cabo por un médico u otro profesional o técnico capacitado o experimentado.

### 3. Dosis y Administración

Cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se puede formular en forma de composiciones farmacéuticas para administración de dosificación única o dosificación múltiple. El polipéptido ADA2 se incluye en la composición en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente sometiendo a prueba los polipéptidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tales como el uso de los ensayos proporcionados en la presente memoria o conocidos en la técnica (véanse p. ej., Taliani et al. (1996) Anal. Biochem., 240:60-67; Filocamo et al. (1997) J Virology, 71:1417-1427; Sudo et al. (1996) Antiviral Res. 32:9-18; Bouffard et al. (1995) Virology, 209:52-59; Bianchi et al. (1996) Anal. Biochem., 237:239-244; Hamatake et al. (1996) Intervirology 39:249-258; Steinkuhler et al. (1998) Biochem., 37:8899-8905; D'Souza et al. (1995) J Gen. Virol., 76:1729-1736; Takeshita et al. (1997) Anal. Biochem., 247:242-246; véanse también p. ej., Shimizu et al. (1994) J. Virol. 68:8406-8408; Mizutani et al. (1996) J. Virol. 70:7219-7223; Mizutani et al. (1996) Biochem. Biophys Res. Commun., 227: 822-826; Lu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1412-1417; Hahn et al., (1996) Virology, 226:318-326; Ito et al. (1996) J. Gen. Virol., 77:1043-1054; Mizutani et al. (1995) Biochem. Biophys Res. Commun., 212:906-911; Cho et al. (1997) J. Virol. Meth. 65:201-207) y a continuación se extrapola de allí para las dosificaciones a seres humanos.

La cantidad de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria para ser administrada para el tratamiento de una enfermedad o afección se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Adicionalmente, se pueden emplear ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa, que se puede determinar empíricamente, puede depender del agente particular, la vía de administración, el tipo de enfermedad a tratar y la gravedad de la enfermedad. En algunas realizaciones, las composiciones administradas pueden contener ácidos nucleicos que codifican el polipéptido ADA2 variante proporcionado en la presente memoria, tal como vectores virales oncolíticos o vectores de terapia génica, o células, tales como células inmunitarias modificadas para inmunoterapia adoptiva. La dosificación particular puede depender de la vía particular de administración, la enfermedad o afección particular, la gravedad de la enfermedad o afección, la formulación particular y otros factores dentro del nivel de un experto en la técnica.

Por lo tanto, se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento son una función de la enfermedad que se está tratando y se pueden determinar empíricamente utilizando protocolos de prueba conocidos o mediante extrapolación de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Cabe señalar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Se debe entender adicionalmente que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son solo ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance o el uso de composiciones y combinaciones que los contienen. Las composiciones se pueden administrar cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez. En general, los regímenes de dosificación se eligen para limitar la toxicidad. Cabe señalar que el médico a cargo sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la terapia para reducir la dosificación debido a la toxicidad, o la disfunción de la médula ósea, el hígado o los riñones u otros tejidos. Por el contrario, el médico a cargo también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos).

Un experto en la técnica puede, en un entorno clínico, determinar la dosis individual de ADA2 proporcionada en la presente memoria para la administración, dependiendo de la respuesta clínica del tumor y el perfil de efectos secundarios de un sujeto individual, tal como un ser humano o un animal. Por ejemplo, las composiciones de ADA2 PEGilada proporcionadas en la presente memoria se pueden formular a 25 U/mL. Si se le inyectan a un ratón de 25 g 0,2 mL de esta formulación, esto se traduciría en 200 U/kg de peso corporal. Un experto en la técnica puede determinar la dosis equivalente humana (HED), basándose en el área de superficie corporal, de aproximadamente 16 U/kg de peso corporal para seres humanos. La HED apropiada se puede calcular utilizando el área de superficie corporal o la conversión basada en el peso corporal (Reagan-Shaw et al. (2008) The FASEB Journal 22(3):659-661).

El intervalo de dosis de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede ser de aproximadamente 10 mU/kg de peso corporal a aproximadamente 50 U/kg de peso corporal o más. Por ejemplo, una dosis única puede ser 10 mU/kg de peso corporal, 10 mU/kg, 20 mU/kg, 30 mU/kg, 40 mU/kg, 50 mU/kg, 60 mU/kg, 70 mU/kg, 80 mU/kg, 90 mU/kg, 100 mU/kg, 200 mU/kg, 300 mU/kg, 400 mU/kg, 500 mU/kg, 600 mU/kg, 700 mU/kg, 800 mU/kg, 900 mU/kg, 1 U/kg, 2 U/kg, 3 U/kg, 4 U/kg, 5 U/kg, 6 U/kg, 7 U/kg, 8 U/kg, 9 U/kg, 10 U/kg, 20 U/kg, 30 U/kg, 40

U/kg, o 50 U/kg de peso corporal. En otros ejemplos, la dosis única puede ser entre o aproximadamente entre 10 mU/kg de peso corporal y 50 U/kg de peso corporal, 10 mU/kg y 40 U/kg, 10 mU/kg y 30 U/kg, 10 mU/kg y 20 U/kg, 10 mU/kg y 10 U/kg, 10 mU/kg y 9 U/kg, 10 mU/kg y 8 U/kg, 10 mU/kg y 7 U/kg, 10 mU/kg y 6 U/kg, 10 mU/kg y 5 U/kg, 10 mU/kg y 4 U/kg, 10 mU/kg y 3 U/kg, 10 mU/kg y 2 U/kg, 10 mU/kg y 1 U/kg, 10 mU/kg y 900 mU/kg, 10 mU/kg y 800 mU/kg, 10 mU/kg y 700 mU/kg, 10 mU/kg y 600 mU/kg, 10 mU/kg y 500 mU/kg, 10 mU/kg y 400 mU/kg, 10 mU/kg y 300 mU/kg, 10 mU/kg y 200 mU/kg, 10 mU/kg y 100 mU/kg, 100 mU/kg y 50 U/kg, 100 mU/kg y 40 U/kg, 100 mU/kg y 30 U/kg, 100 mU/kg y 20 U/kg, 100 mU/kg y 10 U/kg, 100 mU/kg y 9 U/kg, 100 mU/kg y 8 U/kg, 100 mU/kg y 7 U/kg, 100 mU/kg y 6 U/kg, 100 mU/kg y 5 U/kg, 100 mU/kg y 4 U/kg, 100 mU/kg y 3 U/kg, 100 mU/kg y 2 U/kg, 100 mU/kg y 1 U/kg, 100 mU/kg y 900 mU/kg, 100 mU/kg y 800 mU/kg, 100 mU/kg y 700 mU/kg, 100 mU/kg y 600 mU/kg, 100 mU/kg y 500 mU/kg, 100 mU/kg y 400 mU/kg, 100 mU/kg y 300 mU/kg, 100 mU/kg y 200 mU/kg, 500 mU/kg y 50 U/kg, 500 mU/kg y 40 U/kg, 500 mU/kg y 30 U/kg, 500 mU/kg y 20 U/kg, 500 mU/kg y 10 U/kg, 500 mU/kg y 9 U/kg, 500 mU/kg y 8 U/kg, 500 mU/kg y 7 U/kg, 500 mU/kg y 6 U/kg, 500 mU/kg y 5 U/kg, 500 mU/kg y 4 U/kg, 500 mU/kg y 3 U/kg, 500 mU/kg y 2 U/kg, 500 mU/kg y 1 U/kg, 500 mU/kg y 900 mU/kg, 500 mU/kg y 800 mU/kg, 500 mU/kg y 700 mU/kg, 500 mU/kg y 600 mU/kg, 1 U/kg y 50 U/kg, 1 U/kg y 40 U/kg, 1 U/kg y 30 U/kg, 1 U/kg y 20 U/kg, 1 U/kg y 10 U/kg, 1 U/kg y 9 U/kg, 1 U/kg y 8 U/kg, 1 U/kg y 7 U/kg, 1 U/kg y 6 U/kg, 1 U/kg y 5 U/kg, 1 U/kg y 4 U/kg, 1 U/kg y 3 U/kg, 1 U/kg y 2 U/kg, 5 U/kg y 50 U/kg, 5 U/kg y 40 U/kg, 5 U/kg y 30 U/kg, 5 U/kg y 20 U/kg, 5 U/kg y 10 U/kg, 5 U/kg y 9 U/kg, 5 U/kg y 8 U/kg, 5 U/kg y 7 U/kg, 5 U/kg y 6 U/kg, 10 U/kg y 50 U/kg, 10 U/kg y 40 U/kg, 10 U/kg y 30 U/kg, y 10 U/kg de peso corporal y 20 U/kg de peso corporal.

En otro ejemplo, el intervalo de dosis de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede estar entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal y 50 mg/kg de peso corporal, 0,1 mg/kg y 40 mg/kg, 0,1 mg/kg y 30 mg/kg, 0,1 mg/kg y 20 mg/kg, 0,1 mg/kg y 10 mg/kg, 0,1 mg/kg y 9 mg/kg, 0,1 mg/kg y 8 mg/kg, 0,1 mg/kg y 7 mg/kg, 0,1 mg/kg y 6 mg/kg, 0,1 mg/kg y 5 mg/kg, 0,1 mg/kg y 4 mg/kg, 0,1 mg/kg y 3 mg/kg, 0,1 mg/kg y 2 mg/kg, 0,1 mg/kg y 1 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,9 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,8 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,7 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,6 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,4 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg y 50 mg/kg, 0,5 mg/kg y 40 mg/kg, 0,5 mg/kg y 30 mg/kg, 0,5 mg/kg y 20 mg/kg, 0,5 mg/kg y 10 mg/kg, 0,5 mg/kg y 9 mg/kg, 0,5 mg/kg y 8 mg/kg, 0,5 mg/kg y 7 mg/kg, 0,5 mg/kg y 6 mg/kg, 0,5 mg/kg y 5 mg/kg, 0,5 mg/kg y 4 mg/kg, 0,5 mg/kg y 3 mg/kg, 0,5 mg/kg y 2 mg/kg, 0,5 mg/kg y 1 mg/kg, 0,5 mg/kg y 0,9 mg/kg, 0,5 mg/kg y 0,8 mg/kg, 0,5 mg/kg y 0,7 mg/kg, 0,5 mg/kg y 0,6 mg/kg, 1 mg/kg y 50 mg/kg, 1 mg/kg y 40 mg/kg, 1 mg/kg y 30 mg/kg, 1 mg/kg y 20 mg/kg, 1 mg/kg y 10 mg/kg, 1 mg/kg y 9 mg/kg, 1 mg/kg y 8 mg/kg, 1 mg/kg y 7 mg/kg, 1 mg/kg y 6 mg/kg, 1 mg/kg y 5 mg/kg, 1 mg/kg y 4 mg/kg, 1 mg/kg y 3 mg/kg, 1 mg/kg y 2 mg/kg, 2 mg/kg y 50 mg/kg, 2 mg/kg y 40 mg/kg, 2 mg/kg y 30 mg/kg, 2 mg/kg y 20 mg/kg, 2 mg/kg y 10 mg/kg, 2 mg/kg y 9 mg/kg, 2 mg/kg y 8 mg/kg, 2 mg/kg y 7 mg/kg, 2 mg/kg y 6 mg/kg, 2 mg/kg y 5 mg/kg, 2 mg/kg y 4 mg/kg, 2 mg/kg y 3 mg/kg, 5 mg/kg y 50 mg/kg, 5 mg/kg y 40 mg/kg, 5 mg/kg y 30 mg/kg, 5 mg/kg y 20 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg, 5 mg/kg y 9 mg/kg, 5 mg/kg y 8 mg/kg, 5 mg/kg y 7 mg/kg, 5 mg/kg y 6 mg/kg, 10 mg/kg y 50 mg/kg, 10 mg/kg y 40 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg, 20 mg/kg y 50 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg, 20 mg/kg y 30 mg/kg, 30 mg/kg y 50 mg/kg, 30 mg/kg y 40 mg/kg, y 40 mg/kg de peso corporal y 50 mg/kg de peso corporal. La dosis se puede administrar una sola vez o varias veces. Un experto en la técnica puede determinar la cantidad de dosis adecuada, en función del régimen de administración. La dosis total durante un período de tiempo específico también puede ser seleccionada por un experto en la técnica.

El intervalo de dosis óptimo para la administración de composiciones que contienen cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se puede ajustar mediante control en plasma. La dosis de administración puede ser tal que el sujeto mantendrá la actividad de ADA en plasma en el intervalo de aproximadamente 10 a 1.000 mM/h, y demostrará una disminución en la adenosina eritrocitaria, es decir, dATP menor o igual a aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,057 mM, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,015 mM en eritrocitos empaquetados, o menor o igual a aproximadamente 1% del total de adenosina eritrocitaria (es decir, contenido de ATP + dATP), del nivel normal de adenosina, medido en una muestra antes de la administración. El valor normal de dATP es inferior a aproximadamente 0,001 mM.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporciona ADA2 para su uso en un método de tratamiento de un tumor que comprende administrar una cantidad eficaz de ADA2 al sujeto. Un experto en la técnica determina fácilmente una cantidad eficaz para reducir los niveles de adenosina o desoxiadenosina en el tejido en el sujeto, y en donde el crecimiento o la diseminación del tumor son inhibidos por los niveles de adenosina en el tejido sustancialmente reducidos en el sujeto. También se describen en la presente memoria métodos para evaluar el nivel de biomarcadores asociados a adenosina en un sujeto para seleccionar un sujeto para el tratamiento con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Las dosis o el régimen de tratamiento se pueden variar o ajustar en función de la susceptibilidad del paciente al tratamiento, según lo determine un experto en la técnica utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria.

Cuando la ADA2 proporcionada en la presente memoria se formula conjuntamente o se administra conjuntamente con otro agente terapéutico, tal como un agente inhibidor del punto de control inmunitario, una enzima de degradación de hialuronano o un agente antitumoral, las dosificaciones se pueden proporcionar como una razón de la cantidad del polipéptido ADA2 con respecto a la cantidad del otro agente terapéutico administrado. Por ejemplo,

un polipéptido ADA2 se puede administrar a 1 U de ADA:1 U de otro agente terapéutico (1:1) a 50:1 o más, por ejemplo, a 1:1, 2:1, 3:1, 4 :1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 o más. En otros ejemplos, un polipéptido ADA2 se puede administrar a 1 U de ADA:1 U de otro agente terapéutico (1:1) a 1:50 o menos, por ejemplo, a aproximadamente 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50 o menos.

#### 4. Terapias Combinadas

En los métodos proporcionados en la presente memoria, la ADA2 proporcionada en la presente memoria, que incluye el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se puede administrar antes, después o concomitantemente con uno o más de otros regímenes o agentes terapéuticos. El médico experto puede determinar empíricamente, o considerando la farmacocinética y los modos de acción de los agentes, la dosis o las dosis apropiadas de cada régimen o agente terapéuticos, así como los tiempos y métodos de administración apropiados. Los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden mejorar la eficacia o seguridad de la ADA2 proporcionada en la presente memoria. En algunos ejemplos, los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden tratar la misma enfermedad o una comorbilidad en lugar de alterar la acción de la ADA2 proporcionada en la presente memoria. En algunos ejemplos, los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden mejorar, reducir o eliminar uno o más efectos secundarios que están asociados con la administración de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria.

Por ejemplo, una ADA2 descrita en la presente memoria se puede administrar con quimioterapia, radioterapia o tanto quimioterapia como radioterapia. Cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y las formas modificadas de las mismas, se pueden administrar combinadas con uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos, que incluyen, entre otros, anticuerpos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de la quinasa, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimuladores, agentes inmunosupresores, inhibidores del punto de control inmunitario, antibióticos, inhibidores de la angiogénesis u otros agentes terapéuticos. El otro agente terapéutico utilizado combinado con el tratamiento que utiliza la ADA2 proporcionada en la presente memoria, puede ser, por ejemplo, una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un agente de molécula pequeña, una toxina, un lípido, un carbohidrato o combinaciones de los mismos, o cualquier otro tipo de agente terapéutico. En otros ejemplos, el régimen terapéutico adicional puede ser la radioterapia.

Los uno o más agentes adicionales se pueden administrar de forma simultánea, secuencial o intermitente con cualquiera de las ADA2 proporcionadas en la presente memoria de los mismos. Los agentes se pueden administrar conjuntamente con su ADA2, por ejemplo, como parte de la misma composición farmacéutica o el mismo método de administración. En algunos ejemplos, los agentes se pueden administrar conjuntamente con la ADA2 proporcionada en la presente memoria al mismo tiempo que su ADA2, pero por un medio de administración diferente. Los agentes también se pueden administrar en un momento diferente que la administración de su ADA2, pero lo suficientemente cerca en el tiempo de la administración de ADA2 para que tenga un efecto profiláctico o terapéutico combinado. En algunos ejemplos, los uno o más agentes adicionales se administran después o antes de la administración de la ADA2 proporcionada en la presente memoria, separados por un período de tiempo seleccionado. En algunos ejemplos, el período de tiempo es de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o 3 meses. En algunos ejemplos, los uno o más agentes adicionales se administran varias veces y/o la ADA2 proporcionada en la presente memoria se administra varias veces. En otros ejemplos, las variantes de ADA2 proporcionadas en la presente memoria y los uno o más agentes adicionales que son proteínas, pueden estar codificados en uno o más vectores de expresión para la expresión *in vivo*, particularmente, vectores dirigidos a tumores u oncolíticos para la expresión en células tumorales. En otro ejemplo más, la variante de ADA2 proporcionada en la presente memoria y los uno o más agentes adicionales que son proteínas, se pueden expresar en células inmunitarias modificadas, y las células inmunitarias modificadas se pueden administrar para la inmunoterapia adoptiva que puede dirigir y suministrar la ADA2 y el agente o los agentes adicionales a células tumorales en particular.

##### a. Agentes anticancerosos

El método de tratamiento que utiliza la ADA2 proporcionada en la presente memoria se puede administrar combinado con uno o más agentes anticancerosos conocidos en la técnica. El tratamiento combinado de la presente invención incluye la administración de ADA2 con una cantidad eficaz de los agentes anticancerosos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica, simultánea o secuencialmente. El agente anticanceroso puede ser, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un anticuerpo, un péptido o un vector de terapia génica, virus o ADN o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes anticancerosos para el tratamiento combinado incluyen, por ejemplo, Taxol™, bevacizumab (Avastin®), vincristina, vinblastina, neomicina, combretastatinas, podofilotoxinas, TNF- $\alpha$ , angiostatina, endostatina, vasculostatina, antagonistas de  $\alpha$ -v- $\beta$ 3, ionóforos de calcio, agentes inductores de flujo de calcio y

5 cualquier derivado o profármaco de los mismos. Los agentes anticancerosos para la terapia combinada también incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, citocinas, agentes antiangiogénicos, agentes inductores de la apoptosis o inmunotoxinas anticancerosas o coaguligandos, por ejemplo, Erbitux® (cetuximab). Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, opcionalmente  
 10 combinado con leucovorina, 5-fluorodesoxiuridina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, mitoxantrona, aziridinilbenzoquinona (AZQ), Carmustina (BCNU o BCNU; Bristol-Myers Squibb), bleomicina, carboplatino (CBDCA), Lomustina (CCNU), metil-CCNU o MeCCNU, clorambucilo, clorodesoxiadenosina, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dactinomicina, daunorrubicina, desoxicofomicina, doxorubicina, doxicofomicina, DTIC (dacarbazina), epirubicina, etopósido (VP-16), fludarabina, hexametilmelamina, hidroxiiurea, idarrubicina, ifosfamida, ifosfamida y mesna, levamisol, N-acetilcisteína (NAC), mostaza de 1-fenilalanina, 4'-(9-acridinilamino)metanosulfon-  
 15 m-anisidida (mAMSA), inhibidores de resistencia a múltiples fármacos (es decir, inhibidores de MDR), melfalán, metotrexato, opcionalmente combinado con leucovorina, mitramicina, mitomicina-c, inhibidores de la proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos (inhibidores "MRP"), paclitaxel, procarbazona, estreptozotocina, N,N'-trietilenotiofosforamida ("tioTEPA"), inhibidores de topoisomerasa I y/o topoisomerasa II, taxol, vinblastina, vincristeína, vincristina, vindesina, y tenipósido (VM-26®).

Otros ejemplos de agentes anticancerosos que se pueden administrar después, coincidiendo con o antes de la administración de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, incluyen, pero no se limitan a Acivicinas; Aclarrubicinas; Acodazoles; Acroninas; Adozelesinas; Aldesleucinas; Alemtuzumab; Alitretinoínas (Ácidos 9-Cis-Retinoicos); Alopurinoles; Altretaminas; Alvocidib; Ambazonas; Ambomicinas; Ametantronas; Amifostinas; Aminoglutetimidas; Amsacrinas; Anastrozoles; Anaxironas; Ancitabinas; Antramincinas; Apaziquonas; Argimesnas; Trióxidos de Arsénico; Asparginas; Asperlinas; Atrimustinas; Azacitidinas; Azetepas; Azotomicinas; Banoxantronas; Batabulinas; Batimastat; BCG Vivo; Benaxibinas; Bendamustinas; Benzodepas; Bexarotenas; Bevacizumab; Bicalutamidas; Bietaserpinas; Biricodar; Bisantrenos; Bisantrenos; Dimesilatos de Bisnafida; Bizelesinas; Bleomicinas; Bortezomib; Brequinar; Bropiriminas; Budotitanos; Busulfanos; Cactinomicinas; Calusteronas; Canertinib; Capecitabinas; Caracemidas; Carbetimetros; Carboplatinos; Carboquonas; Carmofur; Carmustinas con Polifeprosanos; Carmustinas; Carrubicinas; Carzelesinas; Cedefingoles; Celecoxib; Cemadotinas; Clorambucilos; Cloteronelos; Ciplactinas; Cirolemicinas; Cisplatinos; Cladribinas; Clanfenur; Clofarabinas; Crisnatoles; Ciclofosfamidas; Citarabinas liposomales; Citarabinas; Dacarbazinas; Dactinomicinas; Darbepoetina Alfa; Daunorrubicinas liposomales; Daunorrubicinas/Daunomicinas; Daunorrubicinas; Descitabinas; Denileucina Diftitox; Dexniguldipina; Dexonas; Dexrazoxanos; Dezaguaninas; Diaziquonas; Dibrospidium; Dienogest; Dinalina; Disermolida; Docetaxel; Dofequidar; Doxifluridina; Doxorubicina liposomal; Doxorubicina HCL; inyección de liposomas de Doxorubicina HCL; Doxorubicina; Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Ecomustina; Edatrexato; Edotecarina; Eflornitina; Elacridar; Elinafida; Solución B de Elliott; Elsamitrucina; Emitefur; Enloplatino; Enpromato; Enzastaurina; Epiropidina; Epirubicina; Epoetina alfa; Eptaloprost; Eribulozol; Esorubicina; Estramustina; Etanidazol; Etoglucida; fosfatos de Etopósido; Etopósido VP-16; Etopósido; Etoprina; Exemestano; Exisulinda; Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Filgrastim; Floxuridina; Fludarabina; Fluorouracilo; 5-fluorouracilo; Fluoximesterona; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina; Fostriecina; Fotretamina; Fulvestrant; Galarrubicina; Galocitabina; Gemcitabina; Gemtuzumab/Ozogamicina; Geroquinol; Gimitecano; Gimeracilo; Gloxazona; Glufosfamida; acetato de goserelina; hidroxiiurea; Ibritumomab/Tiuxetano; Idarrubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Ilomastat; mesilato de Imatinib; Imexon; Improsulfano; Indisulam; Inproquona; Interferón alfa-2a; Interferón alfa-2b; Interferón Alfa; Interferón Beta; Interferón Gamma; Interferón; Interleucina-2 y otras interleucinas (incluyendo interleucinas recombinantes); Intoplicina; Iobenguano [131-1]; Iproplatino; Irinotecán; Irsogladina; Ixabepilona; Cetotrexato; L-Alanosina; Lanreotida; Lapatinib; Ledoxantrona; Letrozol; Leucovorina; Leuprolida; Leuprorelina (Leuprolida); Levamisol; Lexacalcitol; Liarozol; Lobaplatino; Lometrexol; Lomustina/CCNU; Lomustina; Lonafarnib; Losoxantrona; Lurtotecán; Mafosfamida; Manosulfano; Marimastat; Masoprocol; Maytansina; Mecloretamina; Mecloretamina/mostaza nitrogenada; Acetato de megestrol; Megestrol; Melengestrol; Melfalán; Melfalán L-PAM; Menogaril; Mepitiostano; Mercaptopurina; 6-Mercaptopurina; Mesna; Metesind; Metotrexato; Metoxsaleno; Metomidato; Metoprina; Meturedapa; Miboplatino; Miproxifeno; Misonidazol; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitoflaxona; Mitogilina; Mitoguzona; Mitomalcina; Mitomicina C; Mitomicina; Mitonafida; Mitoquidona; Mitosper; Mitotano; Mitoxantrona; Mitozolomida; Mivobulina; Mizoribina; Mofaroteno; Mopidamol; Mubritinib; Ácido micofenólico; Fenpropionato de nandrolona; Nedaplatino; Nelarabina; Nemorrubicina; Nitracrina; Nocodazol; Nofetumomab; Nogalamicina; Nolatrexed; Nortopixantrona; Octreotida; Oprelvekin; Ormaplatino; Ortataxel; Oteracilo; Oxaliplatino; Oxisuran; Oxofenarsina; Paclitaxel; Pamidronato; Patupilona; Pegademasa; Pegaspargasa; Pegfilgrastim; Peldesina; Peliomicina; Pelitrexol; Pemetrexed; Pentamustina; Pentostatina; Peplomicina; Perfosfamida; Perifosina; Picoplatino; Pinafida; Pipobroman; Puposulfan; Pirfenidona; Piroxantrona; Pixantrona; Pevitrexed; Plicamicina Mitramicina; Plicamicina; Plomestano; Plomestano; Porfímero de sodio; Porfímero; Porfiromicina; Prednimustina; Procarbazona; Propamidina; Prospidio; Pumitepa; Puomicina; Pirazofurina; Quinacrinas; Ranimustina; Rasburicasa; Riboprina; Ritrosulfan; Rituximab; Rogletimida; Roquinimex; Rufocromomicina; Sabarrubicina; Safingol; Sargramostim; Satraplatino; Sebriplatino; Semustina; Simtrazeno; Sizofiran; Sobuzoxana; Sorafenib; Esparfosato; Ácido esparfósico; Esparsomicina; Espirogermanio; Espiromustina; Espiroplatino; Espiroplatino; Escualamina; Estreptonigrina; Estreptovaricina; Estreptozocina; Sufosfamida; Sulofenur; Malato de sunitinib; 6-TG; Tacedinalina; Talco; Talisomicina; Talimustina; Tamoxifeno; Tariquidar; Tauromustina; Tecogalano; Tegafur; Teloxantrona; Temoporfin; Temozolomida; Tenipósido/VM-26; Tenipósido; Teroxirona;

Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiamiprina; Tiazofurina; Tilomisol; Tilorona; Timcodar; Timonacic; Tirapazamina; Topixantrona; Topotecán; Toremifeno; Tositumomab; Trabectedina (Ecteinascidina 743); Trastuzumab; Trestolona; Tretinoína/ATRA; Triciribina; Trilostano; Trimetrexato; Tetrinitrato de triplatino; Triptorelina; Trofosfamida; Tubulozol; Ubenimex; Mostaza de Uracilo; Uredopa; Valrubicina; Valspodar; Vapreotida; Verteporfina; Vinblastina; Vincristina; Vindesina; Vinepidina; Vinflunina; Vinformida; Vinglicinato; Vinleucinol; Vinleurosina; Vinorelbina; Vinrosidina; Vintriptol; Vinzolidina; Vorozol; Xantomicina A (Guameciclina); Zeniplatino; Zilascorb [2-H]; Zinostatin; Zoledronato; Zorrubicina; y Zosuquidar; Aldesleucina (p. ej., PROLEUKIN®); Alemtuzumab (p. ej., CAMPATH®); Alitretinoína (p. ej., PANRETIN®); Alopurinol (p. ej., ZYLOPRIM®); Alitretamina (p. ej., HEXALEN®); Amifostina (p. ej., ETHYOL®); Anastrozol (p. ej., ARIMIDEX®); Trióxidos de arsénico (p. ej., TRISENOX®); Asparraginasa (p. ej., ELSPAR®); BCG Vivo (p. ej., TICE® BCG); Bexaroteno (p. ej., TARGRETIN®); Bevacizumab (AVASTIN®); Bleomicina (p. ej., BLENOXANE®); Busulfan intravenoso (p. ej., BUSULFEX®); Busulfan oral (p. ej., MYLERAN™); Calusterona (p. ej., METHOSARB®); Capecitabina (p. ej., XELODA®); Carboplatino (p. ej., PARAPLATIN®); Carmustina (p. ej., BCNU®, BiCNU®); Carmustina con Polifeprosan (p. ej., GLIADEL® Oblea); Celecoxib (p. ej., CELEBREX®); Clorambucilo (p. ej., LEUKERAN®); Cisplatino (p. ej., PLATINOL®); Cladribina (p. ej., LEUSTATIN®, 2-CdA®); Ciclofosfamida (p. ej., CYTOXAN®, NEOSAR®); Citarabina (p. ej., CYTOSAR-U®); Citarabina liposomal (p. ej., DepoCyt®); Dacarbazina (p. ej., DTIC-Domeu); Dactinomomicina (p. ej., COSMEGEN®); Darbepoetina Alfa (p. ej., ARANESP®); Daunorrubicina liposomal (e. g. DAUNOXOME®); Daunorrubicina/Daunomicina (p. ej., CERUBIDINE®); Denileucina Diftitox (p. ej., ONTAK®); Dexrazoxano (p. ej., ZINECARD®); Docetaxel (p. ej., TAXOTERE®); Doxorubicina (p. ej., ADRIAMYCIN®, RUBEX®); Doxorubicina liposomal, incluyendo inyecciones de liposomas de Doxorubicina HCL (p. ej., DOXIL®); Propionatos de dromostanolona (p. ej., DROMOSTANOLONE® y MASTERONE® Inyectable); Solución B de Elliott (p. ej., Elliott's B Solution®); Epirubicina (p. ej., ELLENCE®); Epoetina alfa (p. ej., EPOGEN®); Estramustina (p. ej., EMCYT®); Fosfatos de etopósido (p. ej., ETOPOPHOS®); Etopósido VP-16 (p. ej., VEPESID®); Exemestano (p. ej., AROMASIN®); Filgrastim (p. ej., NEUPOGEN®); Floxuridina (p. ej., FUDR®); Fludarabina (p. ej., FLUDARA®); Fluorouracilo incl. 5-FU (p. ej., ADRUCIL®); Fulvestrant (p. ej., FASLODEX®); Gemcitabina (p. ej., GEMZAR®); Gemtuzumab/Ozogamicina (p. ej., MYLOTARG®); Acetato de goserelina (p. ej., ZOLADEX®); Hidroxiurea (p. ej., HYDREA®); Ibritumomab/Tiuxetán (p. ej., ZEVALIN®); Idarrubicina (p. ej., IDAMYCIN®); Ifosfamida (p. ej., IFEX®); Mesilato de imatinib (p. ej., GLEEVEC®); Interferón alfa-2a (p. ej., ROFERON-A®); Interferón alfa-2b (p. ej., INTRON A®); Irinotecan (p. ej., CAMPTOSAR®); Letrozol (p. ej., FEMARA®); Leucovorina (p. ej., WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®); Levamisol (p. ej., ERGAMISOL®); Lomustina/CCNU (p. ej., CeeNU®); Mecloretamina/Mostaza nitrogenada (p. ej., MUSTARGEN®); Acetato de megestrol (p. ej., MEGACE®); Melfalán/L-PAM (p. ej., ALKERAN®); Mercaptopurina incl. 6-MP (p. ej., PURINETHOL®); Mesna (p. ej., MESNEX®); Metotrexato; Metoxsalen (p. ej., UVADEX®); Mitomicina C (p. ej., MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); Mitotano (p. ej., LYSODREN®); Mitoxantrona (p. ej., NOVANTRONE®); Fenpropionato de nandrolona (p. ej., DURABOLIN-50®); Nofetumomabs (p. ej., VERLUMA®); Oprelvekin (p. ej., NEUMEGA®); Oxaliplatino (p. ej., ELOXATIN®); Paclitaxel (p. ej., PAXENE®, TAXOL®); Pamidronato (p. ej., ARELIA®); Pegademasa (p. ej., ADAGEN®); Pegaspargasa (p. ej., ONCASPAR®); Pegfilgrastim (p. ej., NEULASTA®); Pentostatina (p. ej., NIPENT®); Pipobroman (p. ej., VERCYTE®); Plicamicina/Mitramicina (p. ej., MITHRACIN®); Porfímero de sodio (p. ej., PHOTOFRIN®); Procarbazona (p. ej., MATULANE®); Quinacrina (p. ej., ATABRINE®); Rasburicasa (p. ej., ELITEK®); Rituximab (p. ej., RITUXAN®); Sargramostim (p. ej., PROKINE®); Estreptozocina (p. ej., ZANOSAR®); Malato de sunitinib (p. ej., SUTENT®); Talco (p. ej., SCLEROSOL®); Tamoxifeno (p. ej., NOLVADEX®); Temozolomida (p. ej., TEMODAR®); Tenipósido/VM-26 (p. ej., VUMON®); Testolactona (p. ej., TESLAC®); Tioguanina incl. 6-TG; Tiotepa (p. ej., THIOPLEX®); Topotecán (p. ej., HYCAMTIN®); Toremifeno (p. ej., FARESTON®); Tositumomab (p. ej., BEXXAR®); Trastuzumab (p. ej., HERCEPTIN®); Tretinoína/ATRA (p. ej., VESANOID®); Mostaza de uracilo; Valrubicina (p. ej., VALSTAR®); Vinblastina (p. ej., VELBAN®); Vincristina (p. ej., ONCOVIN®); Vinorelbina (p. ej., NAVELBINE®); y Zoledronato (p. ej., ZOMETA®). Se puede utilizar cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria en la terapia combinada con otros agentes anticancerosos, tales como los proporcionados en la presente memoria y/o los descritos por Goodman y Gilman en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Eds. Hardman y Limbird, Décima edición (2002).

## 50 i. Anticuerpos Anticancerígenos

Los ejemplos de anticuerpos anticancerosos que se pueden administrar conjuntamente con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-antígeno de la superficie celular 17-IA tales como Panorex® (edrecolomab); anticuerpos anti-4-1BB; anticuerpos anti-4Dc; anticuerpos anti-A33 tales como A33 y CDP-833; anticuerpos anti-integrina tales como natalizumab; anticuerpos anti-integrina  $\alpha 4\beta 7$  tales como LDP-02; anticuerpos anti-integrina  $\alpha V\beta 1$  tales como F-200, M-200 y SJ-749; anticuerpos anti-integrina  $\alpha V\beta 3$  tales como abcximab, CNTO-95, Mab-17E6 y Vitaxin®; anticuerpos anti-factor 5 del complemento (C5) tales como 5G1.1; anticuerpos anti-CA125 tales como OvaRex® (oregovomab); anticuerpos anti-CD3 tales como Nuvion® (visilizumab) y Rexomab; anticuerpos anti-CD4 tales como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A; anticuerpos anti-CD6 tales como Oncolisina B y Oncolisina CD6; anticuerpos anti-CD7 tales como HB2; anticuerpos anti-CD19 tales como B43, MT-103 y Oncolisina B; anticuerpos anti-CD20 tales como 2H7, 2H7.v16, 2H7.v114, 2H7.v115, Bexxar® (tositumomab), Rituxan® (rituximab) y Zevalin® (Ibritumomab tiuxetán); anticuerpos anti-CD22 tales como Lymphocide® (epratuzumab); anticuerpos anti-CD23 tales como IDEC-152; anticuerpos anti-CD25 tales como basiliximab y Zenapax® (daclizumab); anticuerpos anti-CD30 tales como AC10, MDX-060 y SGN-30; anticuerpos

anti-CD33 tales como Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicina), Oncolisina M y Smart MI 95; anticuerpos anti-CD38; anticuerpos anti-CD40 tales como SGN-40 y toralizumab; anticuerpos anti-CD40L tales como 5c8, Antova® e IDEC-131; anticuerpos anti-CD44 tales como bivatuzumab; anticuerpos anti-CD46; anticuerpos anti-CD52 tales como Campath® (alemtuzumab); anticuerpos anti-CD55 tales como SC-1; anticuerpos anti-CD56 tales como huN901-DM1; anticuerpos anti-CD64 tales como MDX-33; anticuerpos anti-CD66e tales como XR-303; anticuerpos anti-CD74 tales como IMMU-1 10; anticuerpos anti-CD80 tales como galiximab e IDEC-1 14; anticuerpos anti-CD89 tales como MDX-214; anticuerpos anti-CD123; anticuerpos anti-CD138 tales como B-B4-DM1; anticuerpos anti-CD146 tales como AA-98; anticuerpos anti-CD148; anticuerpos anti-CEA tales como cT84.66, labetuzumab y Pentacea®; anticuerpos anti-CTLA4 tales como MDX-101; anticuerpos anti-CXCR4; anticuerpos anti-EGFR tales como ABX-EGF, Erbitux® (cetuximab), IMC-C225 y Merck Mab 425; anticuerpos anti-EpCAM tales como anti-EpCAM de Crucell, ING-1 e IS-IL-2; anticuerpos anti-efrina B2/EphB4; anticuerpos anti-Her2 tales como Herceptin®, MDX-210; anticuerpos anti-FAP (proteína de activación de fibroblastos) tales como sibrotuzumab; anticuerpos anti-ferritina tales como NXT-211; anticuerpos anti-FGF-1; anticuerpos anti-FGF-3; anticuerpos anti-FGF-8; anticuerpos anti-FGFR, anticuerpos anti-fibrina; anticuerpos anti-G250 tales como WX-G250 y Rencarex®, anticuerpos anti-gangliósido GD2 tales como EMD-273063 y TriGem; anticuerpos anti-gangliósido GD3 tales como BEC2, KW-2871 y mitumomab; anticuerpos anti-gpIIb/IIIa tales como ReoPro; anticuerpos anti-heparinasa; anticuerpos anti-Her2/ErbB2 tales como Herceptin® (trastuzumab), MDX-210 y pertuzumab; anticuerpos anti-HLA tales como Oncolym®, Smart 1D10; anticuerpos anti-HM1.24; anticuerpos anti-ICAM tales como ICM3; anticuerpos anti-receptor de IgA; anticuerpos anti-IGF-1 tales como CP-751871 y EM-164; anticuerpos anti-IGF-1R tales como IMC-A12; anticuerpos anti-IL-6 tales como CNTO-328 y elsilimomab; anticuerpos anti-IL-15 tales como HuMax®-IL15; anticuerpos anti-KDR; anticuerpos anti-laminina 5; anticuerpos anti-antígeno de Lewis Y tales como Hu3S193 e IGN-311; anticuerpos anti-MCAM; anticuerpos anti-Mucl tales como BravaRex y TriAb; anticuerpos anti-NCAM tales como ERIC-1 e ICRT; anticuerpos anti-antígeno PEM tales como Theragyn y Therex; anticuerpos anti-PSA; anticuerpos anti-PSCA tales como IG8; anticuerpos anti-Ptk; anticuerpos anti-PTN; anticuerpos anti-RANKL tales como AMG-162; anticuerpos anti-RLIP76; anticuerpos anti-antígeno SK-1 tales como Monopharm C; anticuerpos anti-STEAP; anticuerpos anti-TAG72 tales como CC49-SCA y MDX-220; anticuerpos anti-TGF- $\beta$  tales como CAT-152; anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  tales como CDP571, CDP870, D2E7, Humira® (adalimumab) y Remicade® (infliximab); anticuerpos anti-TRAIL-R1 y TRAIL-R2; anticuerpos anti-VE-cadherina-2; y anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren®. Además, se pueden emplear anticuerpos anti-idiotipo que incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo del epítipo GD3 BEC2 y el anticuerpo del epítipo gp72 105AD7. Además, se pueden emplear anticuerpos biespecíficos que incluyen, pero no se limitan al anticuerpo anti-CD3/CD20 Bi20.

## ii. Agentes quimioterapéuticos

En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se administra con uno o más agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfano, improsulfán y pipsulfán; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; antibióticos tales como aclacinomicinas, actinomicina, antramycin, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carubicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, porfiromycin, puromycin, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (Fareston); antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterin, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido folínico; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; proteínas tales como arginina desiminasa y asparraginasas; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; taxanos, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®), Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; inhibidor de timidilato sintasa (tal como Tomudex); agentes quimioterapéuticos adicionales que incluyen aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatrexato; desfosfamida; demecolcina; diaziquona; difluorometilomitina (DMFO); eflornitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina;



5 uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; Navelbine; Novantrone; tenipósido; daunomicina; aminopterina; Xeloda; ibandronato; CPT-11; ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; e inhibidores de topoisomerasa tales como irinotecán. También se pueden emplear sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

10 Se puede administrar un agente quimioterapéutico como profármaco. Los ejemplos de profármacos que se pueden administrar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo.

### 15 **iii. Terapia de radiación**

20 Cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y las formas modificadas de las mismas, se puede combinar con otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, en una realización, el paciente que se va a tratar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria puede recibir radioterapia. La radioterapia se puede administrar de acuerdo con protocolos comúnmente empleados en la técnica y conocidos por el experto. Tal terapia incluye, pero no se limita a, cesio, iridio, yodo, radiación de cobalto, irradiación con rayos X, rayos gamma, incluida la irradiación directa y con focalización tomográfica, tratamiento de tejidos cancerosos con gránulos radiactivos implantados o "semillas", irradiación con haz de neutrones de tejidos cebados con compuestos de boro y/u otros tipos de terapia con haz de partículas conocidos en la técnica. La radioterapia puede ser irradiación de todo el organismo, o se puede dirigir localmente a un sitio o tejido específico dentro o sobre el organismo, tal como el pulmón, la vejiga o la próstata. Por lo general, la radioterapia se administra en pulsos durante un período de tiempo de aproximadamente 1 a 2 semanas. Sin embargo, la radioterapia se puede administrar durante períodos de tiempo más largos. Por ejemplo, la radioterapia se puede administrar a pacientes con cáncer de cabeza y cuello durante aproximadamente 6 a aproximadamente 7 semanas. Opcionalmente, la radioterapia se puede administrar como una dosis única o como múltiples dosis secuenciales. El médico experto puede determinar empíricamente la dosis o las dosis apropiadas de radioterapia útiles en la presente memoria. En algunos ejemplos, se emplea cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas y, opcionalmente, una o más terapias contra el cáncer para tratar las células cancerosas *ex vivo*. Se contempla que tal tratamiento *ex vivo* pueda ser útil en el trasplante de médula ósea y, particularmente, en el trasplante autólogo de médula ósea. Por ejemplo, el tratamiento de células o tejidos que contienen células cancerosas con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria y una o más terapias contra el cáncer se pueden emplear para agotar o agotar sustancialmente las células cancerosas antes del trasplante en un paciente receptor. La radioterapia también puede comprender el tratamiento con una molécula marcada isotópicamente, tal como un anticuerpo. Entre los ejemplos de agentes radioinmunoterapéuticos se incluyen Zevalin® (anti-CD20 marcado con Y-90), LymphoCide® (anti-CD22 marcado con Y-90) y Bexxar® (anti-CD20 marcado con 1-131). Además, se contempla que cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se puede administrar a un paciente o sujeto combinada con otras técnicas terapéuticas tales como la cirugía o la fototerapia.

### 45 **iv. Agentes antiangiogénicos**

50 En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se administra con uno o más agentes antiangiogénicos. Por ejemplo, el factor antiangiogénico puede ser una molécula pequeña o una proteína (p. ej., un anticuerpo, fusión de Fc o citocina) que se une a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento involucrado en la promoción de la angiogénesis. Los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) o que se unen a VEGF-R, agentes terapéuticos basados en ARN que reducen los niveles de expresión de VEGF o VEGF-R, fusiones de VEGF- toxina, Trampade VEGF de Regeneron, angiostatina (fragmento de plasminógeno), antitrombina III, angiozima, ABT-627, Bay 12-9566, BeneFin, bevacizumab, bisfosfonatos, BMS-275291, inhibidor derivado del cartílago (CDI), CAI, fragmento del complemento CD59, CEP-7055, Col 3, Combretastatina A-4, endostatina (fragmento de colágeno XVIII), inhibidores de farnesil transferasa, fragmento de fibronectina, gro-beta, halofuginona, heparinasas, fragmento de hexasacárido de heparina, HMV833, gonadotropina coriónica humana (hCG), IM-862, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, proteína 10 inducible por interferón (IP-10), interleucina-12, kringle 5 (fragmento de plasminógeno), marimastat, inhibidores de metaloproteinasas (p. ej., TIMP), 2-metoxiestradiol, MMI 270 (CGS 27023A), inhibidor del activador de plasminógeno (PAI), factor plaquetario 4 (PF4), prinomastat, fragmento de prolactina de 16 kDa, proteína relacionada con la proliferina (PRP), PTK 787/ZK 222594, retinoides, solimastat, escualamina, SS3304, SU5416, SU6668, SU11248, tetrahidrocortisol-S, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina-1 (TSP-1), TNP470,

factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), vasculostatina, vasoestatina (fragmento de calreticulina), ZS6126 y ZD6474.

**v. Inhibidores del punto de control inmunitario**

5 En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se administra con uno o más agentes que aumentan la respuesta inmunitaria al bloquear una proteína de punto de control inmunitario (es decir, inhibidor del punto de control inmunitario). En las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria, el inhibidor del punto de control inmunitario puede ser un anticuerpo dirigido contra una proteína del punto de control inmunitario, tal como un anticuerpo dirigido contra el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4 o CD152), proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), o el ligando de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-L1).

15 En particular, la terapia combinada proporcionada en la presente memoria es aplicable al tratamiento de todos los tipos de tumores, incluyendo los cánceres, que están asociados con niveles elevados de adenosina y/o susceptibles a una reducción en los niveles de adenosina o desoxiadenosina en el sujeto a tratar. En términos generales, estos incluyen tumores de la sangre, así como tumores sólidos. Los cánceres ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se originan en el sistema inmunitario, sistema esquelético, músculos y corazón, mama, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central y periférico, sistema renal, sistema reproductivo, sistema respiratorio, piel, sistemas de tejido conectivo, incluyendo las articulaciones, los tejidos grasos y el sistema circulatorio, incluyendo las paredes de los vasos sanguíneos.

25 Las terapias para el tratamiento del cáncer incluyen inmunoterapias (p.ej., antagonistas o agonistas de proteínas de puntos de control inhibitorio) que inhiben la señalización inmunosupresora o potencian la señalización inmunoestimuladora. En lugar de dirigirse directamente al tumor en sí, tales terapias utilizan las defensas endógenas del anfitrión para combatir el tumor. Por ejemplo, los antagonistas y/o agonistas de proteínas inhibitoras del punto de control de los receptores coestimuladores pueden estimular la respuesta inmunitaria antitumoral endógena del anfitrión al amplificar las respuestas de células T específicas del antígeno. Mejorar la respuesta inmunitaria del anfitrión ofrece la ventaja sobre las terapias citotóxicas de que los efectos pueden ser duraderos, de modo que el sujeto puede desarrollar una respuesta antitumoral duradera que puede persistir durante meses o años después de la interrupción del tratamiento.

35 En ejemplos concretos, las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria emplean un agente (p. ej., anticuerpo) que se dirige a una proteína inhibidora de punto de control. En la Tabla 5 se proporcionan ejemplos de proteínas diana inhibitoras de punto de control inmunitario y anticuerpos terapéuticos para las dianas.

**Tabla 5. Proteínas diana e inhibidores de punto de control inmunitario ilustrativos**

Diana	Función diana	Anticuerpo/proteína de fusión	Sinónimos y Nombres en clave
CTLA4	Receptor inhibidor	Ipilimumab	(MDX-CTLA4; BMS-734016; MDX-010)
		Tremelimumab	(ticilimumab; CP-675,206)
PD-1	Receptor inhibidor	MK-3475	(Pembrolizumab; Lambrolizumab; SCH 900475)
		AMP-224	(proteína de fusión anti-PD-1 AMP-224)
		Nivolumab	(BMS-936558; MDX-1106; ONO-4538)
		Pidilizumab	(CT-011)
PD-L1	Ligando para PD-1	MDX-1105	
		BMS-936559	(RG7446)
		MED14736	
		MPDL33280A	
LAG3	Receptor inhibidor	IMP321	ImmuFact
B7-H3	Ligando inhibidor	MGA271	
B7-H4	Ligando inhibidor		
TIM3	Receptor inhibidor		

**Tabla 5. Proteínas diana e inhibidores de punto de control inmunitario ilustrativos**

Diana	Función diana	Anticuerpo/proteína de fusión	Sinónimos y Nombres en clave
CD25	subunidad del receptor inhibidor		
CD137	receptor estimulador		
OX40	receptor estimulador		
4-1BB	receptor coestimulador	Ligando aptámero	
IDO	enzima inmunosupresora		

En particular, los inhibidores de las moléculas inhibitoras inmunológicas CTLA4, PD-1 y PD-L1 se contemplan para las combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria. Si bien tanto CTLA4 como PD-1 funcionan como reguladores negativos, cada uno de ellos desempeña un papel no redundante en la modulación de las respuestas inmunitarias: CTLA4 participa en la atenuación de la activación temprana de las células T no sometidas a tratamiento previo y de memoria (en reposo), mientras que PD-1 desempeña un papel en la modulación de la actividad de las células T en tejidos periféricos (véanse, p. ej., Keir et al. (2008) *Annu Rev Immunol.* 26:677-704; Pardoll, (2012) *Nat Rev Cancer.* 12(4):252-264; Quezada et al., (2013) *Br J Cancer.* 108(8):1560-1565; Callahan et al., (2010) *Semin Oncol.* 37(5):473-84).

El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4; también llamado CD152; SEQ ID NO: 544) es un receptor coinhibidor que se empaqueta en vesículas que se mantienen en el citoplasma de las células T no sometidas a tratamiento previo o en reposo. Cuando se inicia la activación de las células T, también se activa el transporte de las vesículas que contienen CTLA4 a la superficie de las células T. La actividad inhibitora de CTLA4 actúa para amortiguar la amplitud de las señales estimuladoras. En este papel, CTLA4 funciona para reducir la actividad de las células T y, por lo tanto, limitar la autoinmunidad. CTLA4 también juega un papel en la modulación por disminución de la actividad de las células T auxiliares y en la mejora de la actividad de las células T reguladoras ( $T_{reg}$ ). La inhibición de CTLA4, por ejemplo, mediante la administración de anticuerpos anti-CTLA4, puede mejorar la respuesta inmunitaria al aumentar la actividad de los CTL, aumentar la presencia de células T efectoras y auxiliares y/o inhibir las funciones supresoras de las células  $T_{reg}$ . La inhibición de CTLA4 permite la activación completa de las células T durante la fase de cebado de la respuesta inmunitaria.

Tras la activación de las células T y la entrada en el torrente sanguíneo, se induce la expresión de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1; SEQ ID NO: 545), un receptor que inhibe la activación de las células T. PD-1 también está presente en las células T reguladoras ( $T_{reg}$ ), células T agotadas, células B activadas, células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DC) y monocitos activados. PD-1 tiene dos ligandos principales, el ligando 1 de PD-1 (PD-L1; también llamado B7-H1 o CD274; SEQ ID NO: 546) y PD-L2 (también llamado B7-DC o CD273). Las señales inflamatorias en los tejidos inducen la expresión de PD-L1 y PD-L2. Al unirse a uno de sus ligandos, PD-1 actúa atenuando la actividad de las células T, inhibiendo la señalización del receptor de células T (TCR), regulando por disminución la secreción de citocinas inmunoestimuladoras y la expresión de proteínas de supervivencia, y aumentando la producción de células T de la citocina inmunosupresora IL-10. Estas actividades sirven para limitar el daño colateral del tejido y limitar la autoinmunidad durante una respuesta inmunitaria en condiciones normales. El bloqueo de la vía de señalización de PD-1, por ejemplo, mediante la administración de anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1, da como resultado la restauración de las funciones efectoras de las células T, tales como las funciones efectoras de las células T específicas del tumor, tal como la destrucción de células tumorales y la secreción de citocinas inmunoestimuladoras, tales como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

Otros ligandos y receptores de punto de control inmunitario están implicados en la modulación de la respuesta inmunitaria y pueden ser dianas para terapias destinadas a mejorar la inmunidad antitumoral. Adicionalmente, el bloqueo de dos o más receptores o ligandos expresados coordinadamente puede producir actividades antitumorales aditivas o sinérgicas. Las dianas incluyen ligandos inhibidores de B7, distintos de PD-L1 y PD-L2, tales como B7-H3 y B7-H4, que están regulados por incremento en células tumorales o células infiltrantes de tumores. Otras dianas, que están asociadas con la inhibición de la actividad de los linfocitos, incluyen el gen 3 de activación de linfocitos (LAG3; también llamado CD223), 2B4 (también llamado CD244), atenuador de linfocitos B y T (BTLA; o CD272), proteína 3 de membrana de células T (TIM3; o HAVcr2), receptor de adenosina A2a (A2aR) y la familia de receptores inhibidores asesinos. Muchos de estos receptores de punto de control inmunitario regulan la actividad de las células T efectoras y las células  $T_{reg}$ . Por ejemplo, LAG3 se expresa altamente en células  $T_{reg}$  (que ayudan a prevenir la autoinmunidad), donde se cree que es importante para amplificar la actividad inmunosupresora. LAG3 también se asocia con la inhibición de la actividad de las células T efectoras y puede inducir la anergia de las células T (Pardoll, (2012) *Nat Rev Cancer.* 12(4):252-264). El direccionamiento de anticuerpos de estas proteínas solos o

combinados puede mejorar la inmunidad antitumoral en modelos de cáncer animal. Debido a que muchas células tumorales expresan múltiples ligandos inhibidores, y los linfocitos infiltrantes de tumores expresan múltiples receptores inhibidores, un enfoque combinatorio para inhibir estas proteínas puede ser eficaz para mejorar la inmunidad antitumoral (véase Pardoll, (2012) Nat Rev Cancer. 12(4):252-264 para una revisión). Además de los ligandos inhibidores secretados o unidos a la membrana, las enzimas metabólicas tales como la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y la arginasa, que son expresadas por células supresoras derivadas de mieloides inhibidores que comúnmente se infiltran en los tumores, pueden inhibir localmente las respuestas inmunitarias al agotar los aminoácidos esenciales para el metabolismo anabólico de las células T. Estas enzimas pueden ser inhibidas por fármacos de molécula pequeña.

Dado que los inhibidores de punto de control inmunitario actúan sobre las células inmunitarias para mejorar las respuestas inmunitarias, el aumento de la respuesta cuando se proporcionan combinados con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, puede deberse a efectos sobre el aumento del acceso de las células inmunitarias (p. ej., CTL) al tumor. Por ejemplo, como se describió anteriormente, las células tumorales y estromales producen un alto nivel de adenosina, que puede ejercer efectos inmunosupresores. Al reducir la inmunosupresión mediada por adenosina, puede haber una mayor actividad de las células inmunitarias circulantes contra los tumores, aumentando así el número de células citotóxicas y otras células inmunitarias disponibles para destruir las células tumorales. La eficacia de los agentes o fármacos antitumorales, tales como los inhibidores de punto de control inmunitario (p. ej., anticuerpo anti-CTLA4), también se puede aumentar.

Por lo tanto, el uso de cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, por ejemplo, ADA2 PEGilada), puede sensibilizar un tumor a las respuestas mediadas por el sistema inmunitario, que pueden aumentar aún más en presencia de un inhibidor de punto de control inmunitario (p. ej., anticuerpo anti-CTLA4 y anticuerpo anti-PD1 o un anticuerpo anti-PD-L1). Mejorar la actividad de las células inmunitarias contra el tumor, es decir, reducir el efecto de la inmunosupresión mediada por adenosina, por cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, puede permitir una reducción de la dosificación del inhibidor de punto de control inmunitario, mientras se mantiene o mejora la eficacia terapéutica. La capacidad de ajustar más eficazmente la dosificación de anticuerpos puede dar como resultado una reducción de los eventos adversos que pueden estar asociados con la terapia con anticuerpos. Por lo tanto, la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede facilitar una respuesta inmunitaria anti-tumoral mejorada para la erradicación de tumores y el tratamiento tumoral.

La terapia combinada, que incluye composiciones, combinaciones y métodos y el uso de la misma, que se proporciona en la presente memoria, contiene inhibidores de proteínas de punto de control inmunitario que bloquean una proteína de punto de control inmunitario para estimular una respuesta inmunitaria antitumoral. Tales inhibidores de punto de control inmunitario son conocidos en la técnica. En la presente memoria se proporcionan ejemplos de tales inhibidores, e incluyen cualquier agente inhibidor que se dirija a una proteína de punto de control inhibidor descrita en la Tabla 5. Por ejemplo, el inhibidor o agente inhibidor de punto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA4, PD-1 y PD-L1. En ejemplos concretos, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo o un aptámero. Los inhibidores ilustrativos de CTLA4, PD-1 y PD-L1 incluyen anticuerpos y aptámeros anti-CTLA4, anti-PD-1 y anti-PD-L1.

Se puede emplear un inhibidor que sea un aptámero en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Un aptámero incluye aptámeros oligonucleotídicos (ADN, ARN o XNA) o peptídicos. Un aptámero puede ser monovalente o multivalente, tal como bivalente o tetravalente. En algunos casos, el aptámero puede ser modificado por polímeros, tales como el colesterol o el polietilenglicol (PEG) para prolongar la semivida de los aptámeros circulantes.

En ejemplos concretos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo que bloquea una molécula de punto de control inmunitario (p. ej., anti-CTLA4, anti-PD-1 y anti-PD-L1). El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une inmunoespecíficamente a la molécula de punto de control inmunitario (p. ej., CTLA4, PD-1 y PD-L1). Otros agentes inmunomoduladores que se contemplan para su uso en las combinaciones, métodos y usos proporcionados en la presente memoria incluyen agentes inhibidores dirigidos contra los receptores inhibidores del gen de activación de linfocitos 3 (LAG3) y la proteína 3 de membrana de células T (TIM3), ligandos inhibidores tales como PD- L2 (o B7-H2), B7-H3, B7-H4 y CD25, y la enzima inmunosupresora Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Los agentes dirigidos contra LAG3 (p. ej., proteína de fusión IMP321 y múltiples mAb) y anticuerpos anti B7-H3 (p. ej., MGA271) se han caracterizado y están en uso en pruebas clínicas. Los anticuerpos o agentes inhibidores de B7-H4 y TIM3 están en desarrollo preclínico (Pardoll, Nat Rev Cáncer. 22 de marzo de 2012; 12(4):252-264). Se puede incluir uno cualquiera de estos agentes en cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria. Además, las variantes y formas modificadas de los anticuerpos también se pueden emplear en el método de terapia combinada proporcionado en la presente memoria.

#### **(a) Terapias anti-CTLA4**

Se han utilizado dos anticuerpos que bloquean CTLA4, Ipilimumab y Tremelimumab, para el tratamiento eficaz de algunos tipos de cáncer, tales como melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de células renales (CCR), cáncer colorrectal (CRC), cáncer gástrico, y NSCLC (véase Kyi et al., (2014) FEBS Letters 588:368-376 para una revisión). El bloqueo terapéutico de CTLA4 puede afectar a la regresión del tumor meses a años después de completar la terapia (Prieto et al., (2012) Clin Cancer Res. 18(7):2039-2047; Kirkwood et al., (2010) Clin Cancer Res. 16(3):1042-1048), pero también puede reducir la tolerancia a otros tejidos del anfitrión, lo que lleva a eventos adversos, tales como los eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE).

Las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria, que incluyen composiciones y métodos y los usos de las mismas, pueden incluir agentes terapéuticos que inhiben CTLA4. Los inhibidores incluyen anticuerpos y aptámeros. Se conocen los inhibidores de anticuerpos y aptámeros que se unen a CTLA4 e inhiben la señalización de CTLA4. Los aptámeros ilustrativos que se unen a CTLA4, inhiben la función de CTLA4 y mejoran la inmunidad tumoral se han descrito y se exponen en SEQ ID NO: 384-388, 539-541 (Santulli-Marotto (2003) Cancer Res. 63(21):7483-7489; Gilboa et al., (2013) Clin Cancer Res 19(5):1054-1062).

Se han descrito diversos anticuerpos, que se unen e inhiben la actividad de CTLA4, que se han utilizado en la inmunoterapia antitumoral. Los anticuerpos anti-CTLA4 incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.682.736, 6.984.720; las Publicaciones de Estados Unidos Núm. 2002/0086014; 2009/0074787; los documentos EP 1262193; y WO 2000/037504. En particular, los anticuerpos anti-CTLA4 incluyen Ipilimumab (también llamado MDX-010, MDX-101, 10D1; Núm. de Acceso Drug Bank DB06186) y Tremelimumab (también llamado Ticilimumab, CP-675,206 o 11.2.1).

Por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA4 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir Ipilimumab (también llamado MDX-010, MDX-101, 10D1; Núm. de Acceso de Dug Bank DB06186) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de ipilimumab. Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1k completamente humano que se une específicamente a CTLA4 humano (véase, p. ej., el anticuerpo designado 10D1 en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2002/0086014 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.984.720). La cadena pesada de ipilimumab tiene un dominio variable ( $V_H$ ) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 390, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 389. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen  $V_H$  CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 393);  $V_H$  CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 394); y  $V_H$  CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 395). La cadena ligera de Ipilimumab tiene un dominio variable ( $V_L$ ) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 392, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 391. Las CDR de la cadena ligera incluyen,  $V_L$  CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 396);  $V_L$  CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 397); y  $V_L$  CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 398). Cuando se produce de forma recombinante, Ipilimumab está formado por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas idénticas de 447 aminoácidos cada una y dos cadenas ligeras kappa idénticas de 215 aminoácidos cada una. Cada par de cadenas pesadas y ligeras está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

En otro ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA4 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir Tremelimumab (también llamado Ticilimumab, CP-675,206 u 11.2.1) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de Tremelimumab. Tremelimumab es un anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano que se une específicamente a CTLA4 humano (véase, por ejemplo, el anticuerpo designado 11.2.1 del documento WO 00/37504). La cadena pesada de Tremelimumab tiene un dominio variable ( $V_H$ ) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 400, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 399. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen  $V_H$  CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 471);  $V_H$  CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 472); y  $V_H$  CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 473). La cadena ligera de Tremelimumab tiene un dominio variable ( $V_L$ ) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 402, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 401. Las CDR de la cadena ligera incluyen,  $V_L$  CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 474);  $V_L$  CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 475); y  $V_L$  CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 476). Cuando se produce de forma recombinante, Tremelimumab está formado por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesadas y ligeras está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

Estos anticuerpos anti-CTLA4 han participado en numerosas pruebas clínicas para el tratamiento del cáncer. Ipilimumab está aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma y ha estado en pruebas clínicas para otros tipos de cáncer, tales como el cáncer de próstata, cáncer de pulmón y RCC. Tremelimumab ha sido investigado en pruebas clínicas para el tratamiento de CCR, cáncer gástrico, melanoma y NSCLC.

Los anticuerpos anti-CTLA4 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también pueden incluir variantes de ipilimumab o tremelimumab, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen las variaciones, donde el anticuerpo variante se une inmunoespecíficamente a CTLA4. Las variaciones pueden ser, por ejemplo, reemplazos de aminoácidos, inserción o eliminación de aminoácidos.

**(b) Terapias Anti-PD-1 y Anti-PD-L1**

Las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria, que incluyen composiciones y métodos y los usos de las mismas, incluyen agentes terapéuticos que inhiben PD-1 o PD-L1. Los inhibidores incluyen anticuerpos y proteínas de fusión aptámeros. Se conocen inhibidores de anticuerpos, aptámeros y proteínas de fusión que se unen a PD-1 o PD-L1 e inhiben la señalización inhibitoria de PD-1. Las proteínas de fusión ilustrativas incluyen AMP-224 (también conocido como B7-DCIg), que es un receptor soluble de fusión PD-L2-Fc descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342.

Se han descrito varios anticuerpos que se unen a PD-1 o PD-L1 e inhiben la actividad inhibitoria de PD-1, que se han utilizado en inmunoterapia antitumoral. Los anticuerpos anti-PD-1 incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.943.743, 8.008.449, 8.779.105, 8.735.553; las Publicaciones de Estados Unidos Núm. 2005/0180969 2007/0166281; WO 2008/156712. Los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los descritos en las Publicaciones de Estados Unidos Núm. 2013/0034559 y 2013/0045202; las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.943.743, 8.217.149, 8.679.767 y 8.779.108; y las Publicaciones Internacionales Núm. WO 2010/077634 y WO 2013/019906.

En particular, los anticuerpos anti-PD-1 incluyen Nivolumab (también conocido como BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 o 5C4), MK-3475 (también conocido como Pembrolizumab, Lambrolizumab o h409A11), Pidilizumab (también conocido como hBAT-1 o CT-011) y AMP-224 (también conocido como B7-DCIg). Estos anticuerpos anti-PD-1 han participado en numerosas pruebas clínicas para el tratamiento del cáncer, tal como melanoma, NSCLC, RCC, neoplasias malignas hematológicas, linfomas, leucemias, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y mieloma múltiple.

Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir Nivolumab (también conocido como BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 o 5C4) o derivados de los mismos, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de Nivolumab. El Nivolumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que se une específicamente a PD-1 humana (véase, p. ej., el anticuerpo designado 5C4 en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.008.449). La cadena pesada de Nivolumab tiene un dominio variable (VH) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 404, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 403. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen VH CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 407); VH CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 408); y VH CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 409). La cadena ligera de Nivolumab tiene un dominio variable (VL) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 406, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 405. Las CDR de la cadena ligera incluyen, VL CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 410); VL CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 411); y VL CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 412). Cuando se produce de forma recombinante, Nivolumab está formado por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesadas y ligeras está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

En otro ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir MK-3475 (también llamado Pembrolizumab, Lambrolizumab o h409A11) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de MK-3475. MK-3475 es un anticuerpo monoclonal IgG4k humanizado que se une específicamente a la PD-1 humana (véase, por ejemplo, el anticuerpo designado h409A11 en el documento WO 2008/156712). La cadena pesada completa de MK-3475 tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 414, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 413, y la cadena ligera completa tiene la secuencia de aminoácidos expuesta adelante en SEQ ID NO: 416, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 415. La cadena pesada está compuesta de un dominio variable (VH), con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 418, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 417). La cadena ligera está compuesta por un dominio variable (VL) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 420, codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEQ ID NO: 419) y una región constante ligera kappa humanizada. Cuando se produce de forma recombinante, MK-3475 está formado por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas idénticas de 447 aminoácidos cada una y dos cadenas ligeras kappa idénticas de 218 aminoácidos cada una. Cada par de cadenas pesadas y ligeras está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

Las CDR de MK-3475 incluyen, VH CDR 1 (SEQ ID NO: 421); VH CDR 2 (SEQ ID NO: 422); VH CDR 3 (SEQ ID NO: 423); VL CDR 1 (SEQ ID NO: 424); VL CDR 2 (SEQ ID NO: 425); y VL CDR 3 (SEQ ID NO: 426).

En otro ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir Pidilizumab (también denominado hBAT-1 o CT-011) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de Pidilizumab. Pidilizumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado que, específicamente, generado a partir de un anticuerpo murino (BAT), que se originó contra las membranas de las células linfoides B, y se ha demostrado que provoca actividades basadas en células T y células

NK. Pidilizumab se une a PD-1 humana (véase, por ejemplo, el anticuerpo designado BAT-1 RkD/RHC en el documento US 2005/0180969). La cadena pesada completa de Pidilizumab tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 428, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 427, y la cadena ligera completa tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 430, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 429. La cadena pesada está compuesta por un dominio variable (VH), con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 432, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 431. La cadena ligera está compuesta de un dominio variable (VL), con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 434, codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEQ ID NO: 433, y una región constante ligera kappa humanizada. Cuando se produce de forma recombinante, Pidilizumab está formado por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesadas y ligeras está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

Las CDR de Pidilizumab incluyen, VH CDR 1 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 435); VH CDR 2 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 436); VH CDR 3 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 437); VL CDR 1 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 438); VL CDR 2 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 439); y VL CDR 3 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 430).

Los anticuerpos anti-PD-1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también pueden incluir variantes de Nivolumab, MK-3475, Pidilizumab y AMP-224, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen las variaciones, donde el anticuerpo variante se une inmuno-específicamente a PD-1. Las variaciones pueden ser, por ejemplo, reemplazos de aminoácidos, inserciones o eliminaciones de aminoácidos.

En particular, los anticuerpos anti-PD-L1 (o anti-B7H1) incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos llamados BMS-936559 (también conocidos como MDX-1105 o 12A4), MPDL3280A (también conocido como RG7446) y MEDI4736. Estos anticuerpos anti-PD-L1 han participado en numerosas pruebas clínicas para el tratamiento del cáncer, tal como melanoma, NSCLC, cáncer de ovario, RCC y cáncer de pulmón.

Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir BMS-936559 (también conocido como MDX-1105 o 12A4) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de BMS-936559. BMS-936559 es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que se une específicamente a PD-L1 humana (véase, por ejemplo, el anticuerpo designado 12A4 en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.943.743). La cadena pesada de BMS-936559 tiene un dominio variable (VH) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 442, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 441. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen VH CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 445); VH CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 446); y VH CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 447). La cadena ligera de BMS-936559 tiene un dominio variable (VL) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 444, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 443. Las CDR de la cadena ligera incluyen, VL CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 448); VL CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 449); y VL CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 450). Cuando se produce de forma recombinante, BMS-936559 está formado por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesadas y ligeras está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

En otro ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir MPDL3280A (también conocido como RG7446) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de MPDL3280A que se unen a antígenos. MPDL3280A es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que se une específicamente a PD-L1 humana (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 8.217.149 y el documento WO 2013/019906). MPDL3280A contiene un dominio variable de cadena pesada (VH) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 463 y un dominio variable de cadena ligera (VL) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 464. El anticuerpo de longitud completa contiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 477 o 479 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 478. También se informa que el anticuerpo de longitud completa contiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 461 y la secuencia de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 462 (véase el documento WO 2013019906). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen VH CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 465); VH CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 466); y VH CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 467). Las CDR de la cadena ligera incluyen, VL CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 468); VL CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 469); y VL CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 470). Cuando se produce de forma recombinante, MPDL3280A está formado por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesadas y ligeras está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

En otro ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir MEDI4736 o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de MEDI4736 que se unen a antígenos. MEDI4736 es un anticuerpo monoclonal IgG1k completamente humano que se une específicamente a PD-L1 humana (véase, p. ej., el anticuerpo designado 2.7A4OPT en la Publicación de Estados

Unidos Núm. 2013/0034559). La cadena pesada de MEDI4736 tiene un dominio variable (VH) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 452, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 451. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen VH CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 455); VH CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 456); y VH CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 457). La cadena ligera de MEDI4736 tiene un dominio variable (VL) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 454, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 453. Las CDR de la cadena ligera incluyen, VL CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 458); VL CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 459); y VL CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 460). Cuando se produce de forma recombinante, MEDI4736 está formado por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesadas y ligeras está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

Los anticuerpos anti-PD-L1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también pueden incluir variantes de BMS-936559, MPDL3280A y MEDI4736, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen las variaciones, donde el anticuerpo variante se une inmunoespecíficamente a PD-L1. Las variaciones pueden ser, por ejemplo, reemplazos de aminoácidos, inserciones o deleciones de aminoácidos.

#### b. Otros agentes inmunomoduladores

En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se administra con uno o más agentes inmunomoduladores. Tales agentes pueden aumentar o disminuir la producción de una o más citocinas, regular por incremento o por disminución la auto-presentación de antígenos, enmascarar los antígenos MHC o promover la proliferación, diferenciación, migración o estado de activación de uno o más tipos de células inmunitarias. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, indometacina, ketorolaco, oxaprozina, nabumetona, sulindac, tolmetina, rofecoxib, ketoprofeno y nabumetona; esteroides (p. ej., glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, triamcinolona, azulfidina, eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos; así como esteroides tópicos tales como antralina, calcipotrieno, clobetasol, y tazaroteno); citocinas tales como TGF $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10; antagonistas de citocina, quimiocina, o receptores que incluyen anticuerpos, receptores solubles y fusiones de receptor-Fc contra BAFF, B7, CCR2, CCR5, CD2, CD3, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD14, CD15, CD17, CD18, CD20, CD23, CD28, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD52, CD64, CD80, CD86, CD147, CD152, factores del complemento (C5, D) CTLA4, eotaxina, Fas, ICAM, ICOS, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IFNAR, IgE, IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5R, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, IL-13R1, IL-15, IL-18R, IL-23, integrinas, LFA-1, LFA-3, MHC, selectinas, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TNF-R1, receptor de células T, incluyendo Enbrel® (etanercept), Humira® (adalimumab) y Remicade® (infliximab); globulina anti-linfocitaria heteróloga; otras moléculas inmunomoduladoras, tales como pirimidinas 2-amino-6-aryl-5 sustituidas, anticuerpos antiidiotípicos para péptidos de unión a MHC y fragmentos de MHC, azatioprina, brequinar, Bromocriptina, ciclofosfamida, ciclosporina A, D-penicilamina, desoxiespergualina, FK506, glutaraldehído, oro, hidroxiclороquina, leflunomida, malononitriloamidas (p. ej., leflunomida), metotrexato, minociclina, mizoribina, micofenolato de mofetilo, rapamicina y sulfasalazina.

En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, se administra con una o más citocinas. Los ejemplos de citocinas incluyen, pero no se limitan a, linfoquinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona del crecimiento, tal como la hormona del crecimiento humana, la N-metionil-hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteicas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento de tipo insulínico I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL).

Además de los anticuerpos inhibidores que eligen como diana e inhiben las proteínas de punto de control inmunitario, se contemplan anticuerpos agonísticos, que son capaces de estimular una respuesta inmunitaria uniendo su proteína/receptor diana, en las combinaciones, métodos y usos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, Urelumab (también conocido como BMS-663513 y anti-4-1BB) es un anticuerpo monoclonal humanizado agonístico dirigido al co-receptor CD137, que es miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF)/factor de crecimiento nervioso (NGF) y se expresa sobre células dendríticas, células



dendríticas foliculares, células asesinas naturales, granulocitos y células de las paredes de los vasos sanguíneos en sitios de inflamación, con propiedades inmunoestimuladoras. Urelumab se une específicamente y activa las células inmunitarias que expresan CD137, estimulando una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta de células T citotóxicas, que se puede montar contra las células tumorales cuando se administra como parte de una terapia combinada proporcionada en la presente memoria (véase, p. ej., Vinay et al., (2012) *Mol Cancer Ther.* 11(5):1062-1070). También se pueden incluir otros agonistas de 4-1BB en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, tales como cualquiera de las descritas por Snell et al. en *Immunol Rev.* 244:197-217 (2011) OX40 (también conocido como CD134) es otro receptor inmunoestimulador, de la familia de TNF, que puede ser elegido como diana mediante la incorporación de agonistas de OX40, tales como los descritos por Weinberg et al. en *Immunol Rev.* 244 (1):218-231 (2011), en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria. También se han descrito ligandos de aptámeros que se unen y estimulan la señalización de 4-1BB u OX40 (Gilboa et al., *Clin Cancer Res.* 19 (5):1054-1062) y se contemplan para su inclusión en las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria.

En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, las variantes y las formas modificadas de las mismas, se administra con una o más citocinas u otros agentes que estimulan las células del sistema inmunitario y mejoran la función efectora deseada. Por ejemplo, los agentes que estimulan las células NK, que incluyen, pero no se limitan a IL-2, se pueden administrar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. En otra realización, los agentes que estimulan los macrófagos, que incluyen, pero no se limitan a C5a, formil péptidos tales como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Beigier-Bompadre et al. *Alabama.* (2003) *J. Immunol.* 57:221-8), se pueden administrar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Asimismo, los agentes que estimulan los neutrófilos, que incluyen, pero no se limitan a, G-CSF y GM-CSF, se pueden administrar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. Además, los agentes que promueven la migración de tales citocinas inmunoestimuladoras se pueden administrar con cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria. También los agentes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, interferón gamma, IL-3 e IL-7, pueden promover una o más funciones efectoras. En algunos ejemplos, cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria se administra con una o más citocinas u otros agentes que inhiben la función de las células efectoras.

### c. Enzima de degradación de hialuronano

La terapia combinada, que incluye combinaciones y métodos y uso de las mismas, descrita en la presente memoria puede contener, además de la ADA2 proporcionada en la presente memoria, un agente antihialuronano, tal como una enzima soluble de degradación de hialuronano. Las enzimas de degradación de hialuronano son enzimas que catalizan la hidrólisis del hialuronano y pueden degradar temporalmente el hialuronano. El hialuronano es un componente de la matriz extracelular y un componente principal de la barrera intersticial. Las enzimas de degradación de hialuronano actúan degradando el hialuronano al escindir los polímeros de hialuronano, que están compuestos de unidades repetidas de disacáridos, ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), conectadas entre sí alternando enlaces glicosídicos  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4 y  $\beta$  -1  $\rightarrow$  3. Las cadenas de hialuronano pueden alcanzar aproximadamente 25.000 repeticiones de disacáridos o más de longitud y los polímeros de hialuronano pueden tener un tamaño que varía de aproximadamente 5.000 a 20.000.000 Da *in vivo*. Al catalizar la hidrólisis del hialuronano, un componente principal de la barrera intersticial, las enzimas de degradación de hialuronano reducen la viscosidad del hialuronano, lo que aumenta la permeabilidad del tejido. Como tales, las enzimas de degradación de hialuronano, tales como las hialuronidasas, se han utilizado, por ejemplo, como agentes de propagación o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y suministro.

Ciertas enfermedades también están asociadas con la expresión y/o producción de hialuronano, incluyendo las enfermedades inflamatorias y el cáncer. El HA está vinculado a una variedad de procesos biológicos involucrados con la progresión de tales enfermedades (véanse p. ej. Itano et al. (2008) *Semin Cancer Biol* 18(4):268-274; Tammi et al. (2008) *Semin Cancer Biol* 18(4):288-295). Por ejemplo, el HA está vinculado a procesos biológicos asociados con la progresión tumoral, incluyendo la transición epitelial-mesenquimatosa y la vía supresora de tumores p53. Además, el HA está implicado en el aumento de la absorción de agua y la presión del líquido intersticial (IFP) en los tejidos enfermos, tales como los tumores, lo que da como resultado una vasculatura tumoral comprimida. Por ejemplo, en sitios de inflamación o en un foco tumoral, hay una acumulación rápida de hialuronano, otros componentes de la matriz y agua. Debido a esta rápida acumulación, el sitio enfermo no puede equilibrarse con su entorno y, por lo tanto, tiene una presión de líquido intersticial más alta que los tejidos normales.

El tratamiento con enzimas de degradación de hialuronano, tales como la hialuronidasa soluble conjugada con polímeros (p. ej., PEGPH20) puede degradar el HA sobre los tejidos y células acumulados, incluso sobre las células tumorales. Este tratamiento puede reducir el hialuronano de modo que el tejido se desinfe, los vasos sanguíneos se expandan y pueda fluir más sangre a través del sitio. Por consiguiente, el tratamiento con una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble o una hialuronidasa soluble conjugada con polímeros (p. ej., PEGPH20), puede disminuir la presión del líquido intersticial (IFP) y el contenido de agua en el sitio del tejido y el incremento asociado de la perfusión vascular, tratando así las enfermedades y afecciones asociadas

con el hialuronano, tales como tumores y cánceres. En consecuencia, las enzimas de degradación de hialuronano para las combinaciones, usos y métodos proporcionados incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de catalizar la escisión de una cadena o polímero de disacárido de hialuronano.

5 Las enzimas de degradación de hialuronano incluyen hialuronidasas, así como otras enzimas tales como las condrotinasas y las liasas que tienen la capacidad de escindir el hialuronano. Las hialuronidasas son miembros de una gran familia de enzimas de degradación de hialuronano. Hay tres clases generales de hialuronidasas: hialuronidasas de tipo mamífero, hialuronidasas bacterianas y hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35) son *endo-β-N*-acetil-hexosaminidasas que hidrolizan el enlace glicosídico β-1→4 del hialuronano en oligosacáridos de varias longitudes tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Estas enzimas tienen actividades tanto hidrolíticas como transglucosidasa, y pueden degradar el hialuronano y controitin sulfato (CS), generalmente C4-S y C6-S. Se han identificado cinco genes similares a la hialuronidasa en el genoma humano, PH20 (o SPAM1), HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 e HYALP1.

15 Las hialuronidasas de mamíferos se pueden subdividir en aquellas que son activas en condiciones neutras, predominantemente encontradas en extractos de testículos, y activas en condiciones ácidas, predominantemente encontradas en órganos tales como el hígado. HYALP1 es un pseudogen, y no se ha demostrado que HYAL3 posea actividad enzimática hacia ningún sustrato conocido. HYAL4 es una condroitinasa y muestra poca actividad hacia el hialuronano. HYAL1 es la enzima prototípica ácida activa y PH20 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 551 y la proteína madura expuesta en SEQ ID NO: 480) es la enzima prototípica activa en condiciones neutras. Las hialuronidasas activas en condiciones ácidas, tales como HYAL1 e HYAL2 generalmente carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir, pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* por encima de pH 4,5 (Frost et al. (1997) Anal. Biochem. 251:263-269). HYAL2 es una enzima ácida activa con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas similares a la hialuronidasa también se pueden caracterizar por aquellas que generalmente están ancladas a la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI) tal como la HYAL2 humana y la PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100(8):4580-4585) y aquellas que generalmente son solubles, tales como la HYAL1 humana (Frost et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-15). Muchas hialuronidasas también están glicosiladas y requieren glicosilación para su actividad. Por ejemplo, la PH20 humana contiene seis sitios de glicosilación unidos a N en N82, N166, N235, N254, N368, N393 y S490 del polipéptido ilustrado en SEQ ID NO: 551.

PH20 está naturalmente involucrada en la adherencia de espermatozoides y ayuda a la penetración por los espermatozoides de la capa de células del cúmulo al digerir el ácido hialurónico. PH20 se encuentra sobre la superficie del espermatozoide y en el acrosoma derivado del lisosoma, donde está unido a la membrana acrosómica interna. El transcrito de ARNm de PH20 humana normalmente se traduce para generar un polipéptido precursor de 509 aminoácidos (SEQ ID NO: 551) que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N (residuos de aminoácidos posiciones 1-35) y una secuencia de señal de fijación de ancla de glicosilfosfatidilinositol de 19 aminoácidos (GPI) en el extremo C-terminal (residuos de aminoácidos posiciones 491-509). La PH20 madura, por lo tanto, es un polipéptido de 474 aminoácidos expuesto en SEQ ID NO: 480. Después del transporte del polipéptido precursor al ER y la eliminación del péptido señal, el péptido señal de fijación a GPI C-terminal se escinde para facilitar la fijación covalente de un ancla de GPI al aminoácido C-terminal recién formado en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 551. En contraste, no se pronostican anclas de GPI claras en muchas otras especies de PH20 además de los seres humanos. Por lo tanto, los polipéptidos PH20 producidos a partir de ovinos y bovinos existen naturalmente como formas solubles. Aunque la PH20 bovina existe unida a la membrana plasmática de manera muy laxa, no está fijada a través de un ancla sensible a la fosfolipasa (Lalancette et al. (2001) Biol Reprod. 65(2):628-636). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículo bovinos soluble como extracto para su uso clínico (Wydase®, Hyalase®).

50 Por lo tanto, las enzimas de degradación de hialuronano existen en formas unidas a la membrana o solubles que son secretadas por las células. Las enzimas de degradación de hialuronano pueden volverse solubles para ser expresadas por y secretadas desde las células. Por ejemplo, cuando las enzimas de degradación de hialuronano incluyen un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y/o están ancladas a la membrana de otra manera o son insolubles, las enzimas de degradación de hialuronano se pueden proporcionar en forma soluble por truncamiento o eliminación de todo o una parte del ancla de GPI para hacer que la enzima sea secretada y soluble. Las enzimas de degradación de hialuronano solubles se pueden emplear en el método de terapia combinada que se proporciona en la presente memoria. Por lo tanto, las enzimas de degradación de hialuronano incluyen variantes truncadas, p. ej., truncadas para eliminar todo o una parte de un ancla de GPI. Los ejemplos de tales hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas PH20 solubles, tales como cualquiera de las expuestas en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.767.429; las Publicaciones de Estados Unidos US20040268425, US20100143457 o US20130302275, véanse también las hialuronidasas PH20 humanas solubles ilustrativas expuestas en cualquiera de SEQ ID NO: 481-488, 493-514 o 526-532).

Se han preparado y aprobado diversas formas de enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo las

hialuronidasas, para su uso terapéutico en sujetos, incluidos los seres humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasa derivadas de animales incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular bovina e Hydase™ (Prima Pharm Inc.), una hialuronidasa testicular bovina. Hylenex® (Halozyme Therapeutics) es una hialuronidasa recombinante humana producida por células de Ovario de Hámster Chino (CHO) modificada por ingeniería genética que contienen ácido nucleico que codifica formas solubles de PH20, designada rHuPH20 (véanse *p. ej.*, la Publicación de Estados Unidos US20040268425; Patente de Estados Unidos Núm. 7.767.429). Se entiende que se puede utilizar cualquier preparación de hialuronidasa en el método de terapia combinada que se proporciona en la presente memoria (véanse, *p. ej.*, las Patentes de Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565, 2.676.139, 2.795.529, 2.806.815, 2.808.362, 5.747.027 y 5.827.721 y la Publicación Internacional PCT Núm. WO2005/118799; la Publicación de Estados Unidos US20040268425; la Patente de Estados Unidos Núm. 7.767.429; o cualquiera proporcionada en la presente memoria).

En la presente memoria se describen ejemplos no limitantes de enzimas de degradación de hialuronano, tales como la enzima hialuronidasa o la enzima hialuronidasa soluble, por ejemplo, PH20, para su uso en las combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria. Generalmente, tales enzimas de degradación de hialuronano incluyen aquellas que se conjugan con un polímero. La enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, puede ser, por ejemplo, de origen humano, mamífero, bacteriano u otro origen biológico. En otros ejemplos, la enzima de degradación del hialuronano se puede modificar, por ejemplo, mediante conjugación con un polímero.

#### **Enzimas de degradación de hialuronano solubles (*p. ej.*, PH20 soluble)**

En particular, se describe en la presente memoria un método de terapia combinada y composiciones que incluyen cualquier proteína ADA2 proporcionada en la presente memoria, tal como cualquier proteína ADA2 variante, y enzimas de degradación de hialuronano solubles, tales como una hialuronidasa soluble (*p. ej.*, PH20 soluble). Las enzimas de degradación de hialuronano solubles incluyen cualquier enzima de degradación de hialuronano que se secreta de las células (*p. ej.*, células CHO) tras la expresión y que exista en forma soluble. Tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas solubles, incluyendo hialuronidasas solubles no humanas, incluyendo hialuronidasas solubles animales no humanas, hialuronidasas solubles bacterianas y hialuronidasas humanas, Hyal1, PH20 bovina y PH20 ovina, variantes alélicas de las mismas y otras variantes de las mismas. Por ejemplo, entre las enzimas de degradación de hialuronano solubles se encuentran las enzimas de degradación de hialuronano que se han modificado para que sean solubles. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano que contienen un ancla de GPI se pueden hacer solubles por truncamiento y eliminación de todo o una porción del ancla de GPI. En un ejemplo, la hialuronidasa PH20 humana, que normalmente está anclada a la membrana a través de un ancla de GPI, se puede hacer soluble por truncamiento y eliminación de todo o una parte del ancla de GPI en el extremo C-terminal.

Las enzimas de degradación de hialuronano solubles también incluyen hialuronidasas activas en condiciones neutras y activas en condiciones ácidas. Dependiendo de factores, tales como, pero no limitados a, el nivel de actividad deseado de la enzima después de la administración y/o el sitio de administración, se pueden seleccionar hialuronidasas activas en condiciones neutras y activas en condiciones ácidas. En un ejemplo particular, la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa activa en condiciones neutras soluble, tal como un polipéptido PH20 soluble.

El polipéptido PH20 soluble puede ser un PH20 ovino, PH20 bovino o un PH20 soluble que está truncado en el extremo C y carece de toda o una parte de la secuencia de fijación de ancla de GPI. Por ejemplo, es ilustrativa de una hialuronidasa soluble PH20 de cualquier especie o formas truncadas de la misma que carecen de todo o una parte del ancla de GPI C-terminal, siempre que la hialuronidasa sea soluble (secretada tras la expresión) y conserve la actividad hialuronidasa. En algunos casos, la enzima de degradación de hialuronano soluble, tal como la PH20 soluble, normalmente está anclada a GPI (tal como, por ejemplo, la PH20 humana) y se vuelve soluble por truncamiento en el extremo C. Tal truncamiento puede eliminar toda la secuencia de señal de fijación de ancla de GPI, o puede eliminar solo parte de la secuencia de señal de fijación de ancla de GPI. Por ejemplo, se pueden eliminar hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 o más residuos de aminoácido C-terminales. El polipéptido resultante, sin embargo, es soluble. En los casos en que la enzima de degradación de hialuronano soluble, tal como una PH20 soluble, conserva una porción de la secuencia señal de fijación de ancla de GPI, se pueden conservar hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más residuos de aminoácido de la secuencia de señal de fijación de ancla de GPI, siempre que el polipéptido sea soluble. Un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido está anclado a GPI utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de algoritmos conocidos para predecir la presencia y la ubicación de la secuencia de fijación del ancla de GPI y el sitio  $\omega$ , y realizar análisis de solubilidad antes y después de la digestión con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o D (PI-PLD).

Típicamente, la enzima de degradación de hialuronano soluble, tal como una PH20 soluble, es humana. Aunque se pueden utilizar enzimas de degradación el hialuronano, tales como PH20, de otros animales, tales preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestra una sensibilización previa secundaria a los alimentos ingeridos, y dado que se trata de proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización posterior. Por lo tanto, las preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para su uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas, se contempla en la presente memoria que tales polipéptidos se puedan preparar para que tengan una inmunogenicidad reducida. Tales modificaciones están dentro del nivel de un experto en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, la eliminación y/o el reemplazo de uno o más epítomos antigénicos en la molécula.

Un ejemplo de una hialuronidasa soluble es la PH20 humana soluble. Se han producido y se conocen formas solubles de PH20 humana recombinante. La producción de tales formas solubles de PH20 se describe en las Solicitudes de Patente Publicadas en Estados Unidos Núm. US20040268425; US20050260186, US20060104968, US20100143457 y la Solicitud PCT Internacional Núm. WO2009111066. Entre estos polipéptidos se incluyen polipéptidos PH20 solubles que carecen por completo de toda o una parte de la secuencia de señal de fijación del ancla de GPI. Por ejemplo, un polipéptido soluble de PH20 (esPH20) puede contener al menos un aminoácido del ancla de GPI o puede carecer de todos los residuos de aminoácido del ancla de GPI. Por lo tanto, en lugar de tener un ancla de GPI fijada covalentemente al extremo C de la proteína en ER y estar anclada a la capa extracelular de la membrana plasmática, estos polipéptidos son secretados y son solubles. Los polipéptidos de PH20 con truncamiento en C pueden estar truncados en C en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo salvaje completo, tal como un polipéptido de tipo salvaje completo con una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 480, o variantes alélicas o de especies u otras variantes de las mismas.

Las formas solubles de PH20 humana generalmente incluyen aquellas que contienen los aminoácidos 36-464 expuestos en SEQ ID NO: 551. Por ejemplo, las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos truncados C-terminales de PH20 humana expuesta en SEQ ID NO: 551 que tienen un residuo de aminoácido C-terminal 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 551, formas maduras de los mismos o polipéptidos que muestran al menos 85% de identidad con los mismos. Por ejemplo, cuando se expresa en células de mamífero, la secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y se produce la forma madura de la proteína y se puede secretar. Por lo tanto, los polipéptidos maduros solubles contienen aminoácidos 36 a 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de SEQ ID NO: 441. La Tabla 6 proporciona ejemplos no limitantes de polipéptidos de PH20 solubles truncados terminalmente ilustrativos, que incluyen formas precursoras y maduras de los mismos. En la Tabla 6 a continuación, se proporcionan la longitud (en aminoácidos) de los polipéptidos precursores y maduros, y el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos ilustrativas de los polipéptidos precursores y maduros de las proteínas PH20 truncadas en el extremo C. El polipéptido de PH20 de tipo salvaje también se incluye en la Tabla 6 para su comparación.

**Tabla 6. Polipéptidos de PH20 truncados C-terminalmente ilustrativos**

Precursor			Maduro		
aminoácidos de SEQ ID NO:217	longitud (aa)	SEQ ID NO	aminoácidos de SEQ ID NO:217	longitud (aa)	SEQ ID NO
1-509	509	551	36-509	47	480
1-500	500		36-500	465	526
1-499	499		36-499	464	493
1-498	498		36-498	463	527
1-497	497		36-497	462	494
1-496	496		36-496	461	528
1-495	495		36-495	460	495
1-494	494		36-494	459	529
1-493	493		36-493	458	496
1-492	492		36-492	457	530
1-491	491		36-491	456	497

Tabla 6. Polipéptidos de PH20 truncados C-terminalmente ilustrativos					
Precursor			Maduro		
aminoácidos de SEQ ID NO:217	longitud (aa)	SEQ ID NO	aminoácidos de SEQ ID NO:217	longitud (aa)	SEQ ID NO
1-490	490		36-490	455	499
1-489	489		36-489	454	498
1-488	488		36-488	453	531
1-487	487		36-487	452	500
1-486	486		36-486	451	532
1-485	485		36-485	450	501
1-484	484		36-484	449	502
1-483	483		36-483	448	488
1-482	482		36-482	447	481
1-481	481		36-481	446	482
1-480	480		36-480	445	483
1-479	479		36-479	444	484
1-478	478		36-478	443	485
1-477	477		36-477	442	486
1-476	476		36-476	441	503
1-475	475		36-475	440	504
1-474	474		36-474	439	505
1-473	473		36-473	438	506
1-472	472		36-472	437	507
1-471	471		36-471	436	508
1-470	470		36-470	435	509
1-469	469		36-469	434	510
1-468	468		36-468	433	511
1-467	467		36-467	432	487
1-466	466		36-466	431	512
1-465	465		36-465	430	513
1-464	464		36-464	429	514

5 Por ejemplo, las formas solubles de PH20 para su uso en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria incluyen, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 481-488, 493-514, o 526-532, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 481-488, 493-514 o 526-532 y son solubles y conservan la actividad hialuronidasa. Las variantes de aminoácidos incluyen mutaciones conservativas y no conservativas. Se entiende que los residuos que son importantes o que de otra forma se requieren para la actividad de una hialuronidasa, tales como cualquiera de los descritos anteriormente o conocidos por los expertos en la técnica, generalmente son invariables y no pueden cambiarse. Estos incluyen, por ejemplo, residuos del sitio activo. Por lo tanto, por ejemplo, los residuos de aminoácido 111, 113 y 176 (correspondientes a los residuos en el polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEQ ID NO: 551) de un polipéptido de PH20 humano, o una forma soluble del mismo, generalmente son invariables y no están alterados. Otros residuos que confieren glicosilación y formación de enlaces disulfuro requeridos para un plegamiento adecuado también pueden ser invariables.

15

En particular, un polipéptido de PH20 humano soluble es un polipéptido que se trunca después del aminoácido 482 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 551. Tal polipéptido se puede generar a partir de una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia señal y codifica los aminoácidos 36-482. La secuencia señal puede ser la secuencia señal nativa, una secuencia señal IgG kappa u otra secuencia señal capaz de procesar la proteína para su secreción. El procesamiento posterior a la traducción elimina la secuencia señal, dejando una PH20 humana recombinante soluble de 447 aminoácidos (SEQ ID NO: 480). Un producto producido tras la expresión da como resultado un producto secretado, designado rHuPH20, en el medio de cultivo que muestra heterogeneidad en el extremo C de tal manera que el producto incluye una mezcla de especies que puede incluir uno o más cualesquiera de SEQ ID NO: 481-486 en diversa abundancia. Típicamente, la rHuPH20 se produce en células que facilitan la correcta N-glicosilación para conservar la actividad, tales como células de mamífero, por ejemplo, células CHO (p. ej., células CHO DG44). Hylenex® (Halozyme) es una hialuronidasa recombinante humana producida por células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas por ingeniería genética que contienen ácido nucleico que codifica un polipéptido de PH20 humano truncado (designado rHuPH20).

Las variantes de PH20, tales como una PH20 humana (p. ej., una PH20 humana soluble) son conocidas y se describen en la Solicitud Publicada de Estados Unidos Núm. US2013/0302275. Cualquier variante PH20 descrita en la solicitud publicada de Estados Unidos Núm. US2013/0302275 se puede incorporar en un polipéptido de PH20 soluble para su uso en la combinación proporcionada en la presente memoria. Tales variantes incluyen aquellas que muestran mayor resistencia a las condiciones de desnaturalización. (p. ej., un conservante fenólico) o un aumento de la actividad. Un ejemplo de semejante polipéptido es una PH20 humana soluble que contiene el reemplazo de aminoácidos F204P, V58K o V58R con referencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en la PH20 humana completa expuesta en SEQ ID NO: 480 o en una PH20 humana soluble expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 481-488, 493-514 o 526-532.

Generalmente, las formas solubles de PH20 se producen utilizando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la N-glicosilación correcta para asegurar que el polipéptido conserva la actividad, ya que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y la estabilidad de las hialuronidasas. Tales células incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) (p. ej., células CHO DG44).

Las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo las hialuronidasas (p. ej., PH20), en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria se pueden producir de forma recombinante o se pueden purificar o purificar parcialmente de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículo. Los métodos para la producción de proteínas recombinantes, que incluyen enzimas de degradación de hialuronano recombinantes, se proporcionan en otra parte de la presente memoria y son bien conocidos en la técnica.

Las enzimas de degradación de hialuronano se pueden administrar en formas que aumenten su semivida. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano se puede proporcionar como parte de un liposoma o una vesícula laminar multicelular u otro vehículo de suministro de este tipo (véase, p. ej., el Ejemplo 24 en la presente memoria). La enzima de degradación de hialuronano se puede codificar en un vector, tal como un vector oncolítico o un vector dirigido para el suministro.

La enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble (p. ej., un polipéptido de PH20 soluble) proporcionada en las combinaciones de la presente memoria, puede ser modificado por medio de un polímero. En algunos ejemplos, el polímero es un polialquilenglicol, dextrano, pululano o celulosa. Los polímeros de polialquilenglicol, que pueden modificar la enzima de degradación de hialuronano incluyen el polietilenglicol (PEG) y el metoxipolietilenglicol (mPEG). En los ejemplos en los que la enzima de degradación de hialuronano es modificada por PEG, el PEG puede ser ramificado o lineal. En algunas realizaciones, el polímero se puede producir por reacción con metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (5 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)- $\alpha$ -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)- $\alpha$ -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butiraldehído (mPEG-butiraldehído) (30 kDa), metoxi-poli(etilenglicol)-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA) (30 kDa); (metoxi-poli(etilenglicol))<sub>2</sub>-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG<sub>2</sub>-NHS) (10 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))<sub>2</sub>-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG<sub>2</sub>-NHS) (20 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))<sub>2</sub>-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG<sub>2</sub>-NHS) (40 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))<sub>2</sub>-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG<sub>2</sub>-NHS) (60 kDa ramificado); biotina-poli(etilenglicol)-éster de N-hidroxisuccinimida (biotina-PEG-NHS) (5 kDa biotilado); poli(etilenglicol)-carbonato de p-nitrofenilo (PEG-p-carbonato de nitrofenilo) (30 kDa); o poli(etilenglicol)-propionaldehído (PEG-propionaldehído) (30 kDa). En algunas realizaciones, el polímero puede ser un PEG que tiene un peso molecular de 30 o aproximadamente 30 kilodaltons.

#### d. Anticuerpos para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas

En algunos ejemplos, se administra cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, tal como un tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, con uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para tratar

enfermedades infecciosas. Los ejemplos de anticuerpos que pueden administrarse conjuntamente para tratar enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-ántrax tales como ABthrax, anticuerpos anti-CMV tales como CytoGam y sevirumab, anticuerpos anti-cryptosporidium tales como CryptoGAM, Sporidin-G, anticuerpos anti-helicobacter tales como Pyloran, anticuerpos anti-hepatitis B tales como HepeX-B, Nabi-HB, anticuerpos anti-VIH tales como HRG-214, anticuerpos anti-RSV tales como felvizumab, HNK-20, palivizumab, RespiGam, y anticuerpos anti-estafilococos tales como Aurexis, Aurograb, BSYX-A110 y SE-Mab.

#### e. Antibióticos y Antifúngicos

En algunos ejemplos, se administra cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, con uno o más antibióticos, que incluyen pero no se limitan a: antibióticos aminoglucósidos (p. ej., apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, espectinomina), aminociclitolos (p. ej., espectinomina), antibióticos de anfenicol (p. ej., azidanfenicol, cloranfenicol, florfenicol, y tianfenicol), antibióticos de ansamicina (p. ej., rifamida y rifampina), carbapenemos (p. ej., imipenemo, meropenemo, panipenemo); cefalosporinas (p. ej., cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, ceftazopran, cefpimizol, cefpiramida, cefpiroma, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefalexina, cefradina), cefamicinas (cefbuperazona, ceftioxina, cefminox, cefmetazol y cefotetán); lincosamidas (p. ej., clindamicina, lincomicina); macrólidos (p. ej., azitromicina, brefeldina A, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, tobramicina), monobactamas (p. ej., aztreonam, carumonam y tigemonam); mupirocina; Oxacefemos (p. ej., flomoxef, latamoxef y moxalactam); penicilinas (p. ej., amdinocilina, amdinocilina, pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbencilina, floxacilina, penamecilina, penetamato hidrocloreto, penicilina, o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzoato, penicilina V hidrabamina, penimepicilina, y feneticilina potasio); polipéptidos (p. ej., bacitracina, colistina, polimixina B, teicoplanina, vancomicina); quinolonas (amifloxacina, cinoxacina, ciprofloxacina, enoxacina, enrofloxacina, fleroxacina, flumequina, gatifloxacina, gemifloxacina, grepafloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidixico, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolinico, pefloxacina, ácido pipemídico, rosoxacina, rufloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, tosufloxacina, y trovafloxacina); rifampina; estreptograminas (p. ej. quinupristina, dalfopristina); sulfonamidas (sulfanilamida, sulfametoxazol); tetraciclinas (clortetraciclina, demeclociclina hidrocloreto, desmetilclortetraciclina, doxiciclina, duramicina, minociclina, neomicina, oxitetraciclina, estreptomina, tetraciclina y vancomicina).

En algunos ejemplos, se administra cualquier ADA2 proporcionada en la presente memoria, incluyendo el tipo salvaje, variantes y formas modificadas de las mismas, con uno o más agentes antifúngicos, que incluyen, pero no se limitan a, anfotericina B, ciclopirox, clotrimazol, econazol, fluconazol, flucitosina, itraconazol, ketoconazol, miconazol, nistatina, terbinafina, terconazol y tioconazol. En algunos ejemplos, se administra una ADA2 proporcionada en la presente memoria con uno o más agentes antivirales, que incluyen pero no se limitan a inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa y otros, incluyendo interferones de tipo I, inhibidores de fusión viral, inhibidores de neuraminidasa, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, clevidina, enfuvirtida, entecavir, foscarnet, ganciclovir, idoxuridina, indinavir, lopinavir, pleconaril, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, trifluridina, vidarabina y zidovudina.

#### I. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

##### EJEMPLO 1

#### CLONACIÓN DE ADENOSINA DEAMINASA 2 HUMANA (ADA2) Y GENERACIÓN DE VARIANTES DE ADA2

##### A. Clonación de ADA3 de Tipo salvaje (WT)

El gen de la adenosina desaminasa humana de tipo salvaje (ADA2) que incluye su secuencia señal (secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1; que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 (precursor)) se amplificó y clonó entre los sitios de restricción Seall y XhoI del vector pCMV-Script (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Núm. de Cat. 212220; secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6). En el extremo C-terminal de la secuencia codificante, el codón de parada fue reemplazado por la secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta FLAG™ (secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 8; que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9) y un codón de parada, para fines de purificación y/o detección de proteínas. La construcción resultante pCMV-Script-hADA2-FLAG codifica el polipéptido ADA2-FLAG humano recombinante WT (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7).

##### B. Generación de variantes de ADA2

Esta construcción resultante que codifica rHuADA2 WT descrita anteriormente se utilizó para introducir sustituciones

de aminoácidos específicas del sitio para crear variantes de ADA2. Como se describe en las subsecciones a continuación, se generaron sustituciones de aminoácidos específicas del sitio basándose en estudios de modelado de ADA2 para identificar los residuos indicados que están involucrados en la unión de heparina, la actividad catalítica y/o para atenuar las interacciones proteína-proteína entre ADA2 y cualquier otro receptor al que se une ADA2. Cada una de las variantes de ADA2 generadas se realizó a partir del vector pCMV-Script-hADA2-FLAG descrito anteriormente, con sustituciones específicas del sitio utilizando el kit QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Núm. de Cat. 210514) según las instrucciones del fabricante.

Las variantes generadas se exponen en la Tabla 7-12 a continuación. Las variantes se designan con la numeración de Zavialov, adoptada a partir de la numeración utilizada en los Números de Acceso PDB 3LGG y 3LGD (secuencia de aminoácidos del polipéptido utilizado para la estructura cristalina expuesta en SEQ ID NO: 4; basada en Zavialov et al., J. Biol. Chem 285:12367-12377 (2010)), y con la numeración de ADA2 madura, basada en la secuencia de aminoácidos de ADA2 humana madura expuesta en SEQ ID NO: 5 (basada en el Número de Acceso Uniprot Q9NZK5; la secuencia de aminoácidos precursora, que contiene los residuos de aminoácido 1-29 de la secuencia de señal, expuesta en SEQ ID NO: 2). La Tabla 1 muestra los números de posición correspondientes de la numeración de Zavialov (SEQ ID NO: 4) y la numeración de ADA2 madura (SEQ ID NO: 5).

#### a. Variantes candidatas con unión a heparina alterada

La heparina es un glicosaminoglicano natural, ampliamente presente en la superficie del tejido en todo el organismo. Se sabe que ADA2 interactúa físicamente con la heparina (Zavialov et al., J. Biol. Chem 285:12367-12377 (2010)), la unión a la heparina podría agotar los niveles circulantes de ADA2 administrada. Para generar variantes de ADA2 con una farmacocinética mejorada, se realizó el reemplazo de los residuos identificados en la presente memoria, basándose en estudios de modelado, implicados en la unión a heparina. Se utilizaron dos estructuras cristalinas disponibles de ADA2 humana, como describen Zavialov et al., en J. Biol. Chem 285:12367-12377 (2010), para identificar las posiciones candidatas para la mutagénesis: estructura cristalina de ADA2 que carece de heparina unida y expresada a partir de células de *Drosophila* (RCSB Protein Data Bank (PDB) Núm. 3LGG; ADA2 humana unida a análogo de estado de transición de coformicina); y ADA2 humana en forma apo (Núm. de Acceso de Protein Data Bank 3LGD; enzima vacía sin cofactores ni sustratos unidos). A partir de las estructuras cristalinas, se calculó el potencial de superficie electrostática para identificar superficies sobre ADA2 que poseen potencial electrostático positivo, utilizando el paquete de visualización molecular 3D de código abierto PyMOL. Las superficies con potencial electrostático positivo pueden formar interacciones electrostáticas complementarias con el sulfato de heparina altamente cargado negativamente. A partir de los cálculos de potencial de superficie electrostática, se identificó un conjunto de residuos de lisina y arginina como sitios candidatos para la sustitución con los aminoácidos alanina (para el reemplazo de la cadena lateral de lisina o arginina cargada positivamente por un grupo metileno sin afectar los ángulos phi-psi de la proteína), aspartato o glutamato (los dos aminoácidos con carga negativa conocidos), para generar una repulsión de carga entre la heparina y la variante de ADA2.

Según el modelo, los residuos de aminoácido 14, 16, 23, 29, 220, 261, 280, 286, 312, 320, 324, 369, 374, 375, 444, 447, 455, 464, 472 o 473 por la numeración de Zavialov (correspondientes a los residuos 11, 13, 20, 26, 217, 258, 277, 283, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 441, 444, 452, 461, 469 o 470, respectivamente, por la numeración madura) fueron elegidos como diana para la mutagénesis. Las variantes de ADA2 se generaron mediante el reemplazo de aminoácidos del aminoácido en la posición para alanina, aspartato o glutamato. También se realizaron reemplazos de aminoácidos individuales, así como reemplazos de aminoácidos dobles y triples. La Tabla 7 expone los reemplazos de aminoácidos en variantes candidatas ilustrativas. El ejemplo 7 describe estudios que evalúan la unión a heparina y la actividad adenosina desaminasa de variantes candidatas seleccionadas expuestas en la Tabla 7.

**Tabla 7. Variantes de ADA2 candidatas para la atenuación de las propiedades de unión a heparina (HBP)**

Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración de ADA2 madura)	SEQ ID NO:
K14A	K11A	13
K14D	K11D	14
K14E	K11E	15
K16A	K13A	16
K16D	K13D	17
K16E	K13E	18
R23A	R20A	28



<b>Tabla 7. Variantes de ADA2 candidatas para la atenuación de las propiedades de unión a heparina (HBP)</b>		
Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración de ADA2 madura)	SEQ ID NO:
R23D	R20D	29
R23E	R20E	30
K29A	K26A	71
K29D	K26D	72
K29E	K26E	73
R220A	R217A	74
R220D	R217D	75
R220E	R217E	76
K261A	K258A	77
K261D	K258D	78
K261E	K258E	79
R280A	R277A	80
R280D	R277D	81
R280E	R277E	82
R286A	R283A	83
R286D	R283D	84
R286E	R283E	85
K312A	K309A	86
K312D	K309D	87
K312E	K309E	88
K320A	K317A	89
K320D	K317D	90
K320E	K317E	91
K324A	K321A	92
K324D	K321D	93
K324E	K321E	94
R355A	R352A	95
R355D	R352D	96
R355E	R352E	97
R369A	R366A	31
R369D	R366D	32
R369E	R366E	33
K374A	K371A	19
K374D	K371D	20
K374E	K371E	21
K375A	K372A	22
K375D	K372D	23
K375E	K372E	24

Tabla 7. Variantes de ADA2 candidatas para la atenuación de las propiedades de unión a heparina (HBP)		
Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración de ADA2 madura)	SEQ ID NO:
R444A	R441A	98
R444D	R441D	99
R444E	R441E	100
K447A	K444A	101
K447D	K444D	102
K447E	K444E	103
K455A	K452A	25
K455D	K452D	26
K455E	K452E	27
K464A	K461A	104
K464D	K461D	105
K464E	K461E	106
K472A	K469A	107
K472D	K469D	108
K472E	K469E	109
K473A	K470A	110
K473D	K470D	111
K473E	K470E	112
K14A/R23A	K11A/R20A	55
K14A/R23A/K374A	K11A/R20A/K371A	56
R23A/K374A	R20A/K371A	57
K14A/K374A	K11A/K371A	58

#### b. Variantes de sitio activo (SA) candidatas

5 Para generar variantes de ADA2 con una mayor eficacia catalítica, se generaron variantes candidatas mediante el reemplazo de residuos de aminoácido en el sitio activo identificado basándose en estudios de modelado molecular. Las estructuras cristalinas de ADA2 humana, unidas al análogo de estado de transición coformicina (Número de Acceso Protein Data Bank 3LGG) y en la forma apo (Número de Acceso Protein Data Bank 3LGD), como se describió anteriormente, se visualizaron utilizando el programa de modelado molecular 3D de código abierto PyMol. La mutagénesis dirigida al sitio *in silico* se realizó utilizando PyMol para evaluar el empaquetamiento de las cadenas laterales de aminoácidos introducidas en la adenosina o los residuos adyacentes dentro del sitio activo, evaluar el empaquetamiento de los residuos adyacentes cerca del sitio activo o sobre la hendidura del bolsillo activo, medir distancias y posibles choques estéricos de los residuos introducidos, evaluar los cambios en la concavidad relativa del bolsillo del sitio activo y evaluar el potencial de la adenosina para acceder al sitio activo. Los residuos seleccionados elegidos como diana para la mutagénesis fueron los identificados en la presente memoria como candidatos para afectar a la eficacia catalítica mejorada ( $k_{cat}/K_m$ ) para la adenosina y, por lo tanto, han aumentado la actividad adenosina desaminasa.

20 Basándose en el modelo, los residuos de aminoácido 89, 182, 222, 224, 265, 267, 229, 270 y 299 por la numeración de Zavialov (correspondientes a los residuos 86, 179, 219, 221, 262, 264, 266, 267 o 296, por la numeración madura) fueron elegidos como diana para la mutagénesis. Las variantes de ADA2 se generaron mediante el reemplazo de aminoácidos del aminoácido en la posición de los otros diecinueve aminoácidos. La Tabla 8 expone los reemplazos de aminoácidos de variantes candidatas ilustrativas. El ejemplo 10 describe estudios que evalúan la actividad adenosina desaminasa de variantes candidatas seleccionadas.

<b>Tabla 8. Variantes de rHuADA2 candidatas para el sitio activo (SA)</b>		
Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	SEQ ID NO:
D89A	D86A	113
D89C	D86C	114
D89E	D86E	115
D89F	D86F	116
D89G	D86G	117
D89H	D86H	118
D89I	D86I	119
D89K	D86K	120
D89L	D86L	121
D89M	D86M	122
D89N	D86N	123
D89P	D86P	124
D89Q	D86Q	125
D89R	D86R	126
D89S	D86S	127
D89T	D86T	128
D89V	D86V	129
D89W	D86W	130
D89Y	D86Y	131
E182A	E179A	46
E182C	E179C	132
E182D	E179D	45
E182F	E179F	133
E182G	E179G	50
E182H	E179H	134
E182I	E179I	135
E182K	E179K	136
E182L	E179L	137
E182M	E179M	138
E182N	E179N	139
E182P	E179P	140
E182Q	E179Q	141
E182R	E179R	142
E182S	E179S	47
E182T	E179T	48
E182V	E179V	49
E182W	E179W	143
E182Y	E179Y	144

<b>Tabla 8. Variantes de rHuADA2 candidatas para el sitio activo (SA)</b>		
Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	SEQ ID NO:
R222A	R219A	41
R222C	R219C	145
R222D	R219D	146
R222E	R219E	147
R222F	R219F	148
R222G	R219G	149
R222H	R219H	150
R222I	R219I	151
R222K	R219K	38
R222L	R219L	152
R222M	R219M	153
R222N	R219N	40
R222P	R219P	154
R222Q	R219Q	39
R222S	R219S	155
R222T	R219T	156
R222V	R219V	157
R222W	R219W	158
R222Y	R219Y	159
L224A	L221A	42
L224C	L221 C	160
L224D	L221D	161
L224E	L221E	162
L224F	L221F	163
L224G	L221G	44
L224H	L221H	164
L224I	L221I	165
L224K	L221K	166
L224M	L221M	167
L224N	L221N	168
L224P	L221P	169
L224Q	L221Q	170
L224R	L221R	171
L224S	L221S	172
L224T	L221T	173
L224V	L221V	43
L224W	L221W	174
L224Y	L221Y	175

<b>Tabla 8. Variantes de rHuADA2 candidatas para el sitio activo (SA)</b>		
Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	SEQ ID NO:
S265A	S262A	51
S265C	S262C	176
S265D	S262D	177
S265E	S262E	178
S265F	S262F	179
S265G	S262G	180
S265H	S262H	181
S265I	S262I	182
S265K	S262K	183
S265L	S262L	184
S265M	S262M	53
S265N	S262N	54
S265P	S262P	185
S265Q	S262Q	186
S265R	S262R	187
S265T	S262T	188
S265V	S262V	52
S265W	S262W	189
S265Y	S262Y	190
H267A	H264A	34
H267C	H264C	191
H267D	H264D	192
H267E	H264E	193
H267F	H264F	194
H267G	H264G	37
H267I	H264I	195
H267K	H264K	196
H267L	H264L	197
H267M	H264M	198
H267N	H264N	36
H267P	H264P	199
H267Q	H264Q	35
H267R	H264R	200
H267S	H264S	201
H267T	H264T	202
H267V	H264V	203
H267W	H264W	204
H267Y	H264Y	205

<b>Tabla 8. Variantes de rHuADA2 candidatas para el sitio activo (SA)</b>		
Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	SEQ ID NO:
S269A	S266A	206
S269C	S266C	207
S269D	S266D	208
S269E	S266E	209
S269F	S266F	210
S269G	S266G	211
S269H	S266H	212
S269I	S266I	213
S269K	S266K	214
S269L	S266L	215
S269M	S266M	216
S269N	S266N	217
S269P	S266P	218
S269Q	S266Q	219
S269R	S266R	220
S269T	S266T	221
S269V	S266V	222
S269W	S266W	223
S269Y	S266Y	224
K270A	K267A	225
K270C	K267C	226
K270D	K267D	227
K270E	K267E	228
K270F	K267F	229
K270G	K267G	230
K270H	K267H	231
K270I	K267I	232
K270L	K267L	233
K270M	K267M	234
K270N	K267N	235
K270P	K267P	236
K270Q	K267Q	237
K270R	K267R	238
K270S	K267S	239
K270T	K267T	240
K270V	K267V	241
K270W	K267W	242
K270Y	K267Y	243

<b>Tabla 8. Variantes de rHuADA2 candidatas para el sitio activo (SA)</b>		
Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	SEQ ID NO:
V299A	V296A	244
V299C	V296C	245
V299D	V296D	246
V299E	V296E	247
V299F	V296F	248
V299G	V296G	249
V299H	V296H	250
V299I	V296I	251
V299K	V296K	252
V299L	V296L	253
V299M	V296M	254
V299N	V296N	255
V299P	V296P	256
V299Q	V296Q	257
V299R	V296R	258
V299S	V296S	259
V299T	V296T	260
V299W	V296W	261
V299Y	V296Y	262

### c. Variantes candidatas con glicosilación alterada

5 Para generar variantes de ADA2 que están hiperglicosiladas, se generaron variantes candidatas por mutación (p. ej., inserción y/o reemplazo de aminoácidos) de residuos para crear un sitio de N-glicosilación mediante la incorporación de un nuevo motivo de sitio de N-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr). La Tabla 9 expone las mutaciones de las variantes candidatas ilustrativas.

<b>Tabla 9. Variantes de hiperglicosilación de rHuADA2 candidatas</b>		
Mutación (numeración Zavialov)	Mutación (numeración madura)	SEQ ID NO:
---->N4/---->A5/---->S6	---->N1/---->A2/---->S3	274
R23N/V25S	R20N/V22S	275
K374N/D376S	K371N/D373S	276
K375N/I377S	K372N/I374S	277
T406N/H408S	T403N/H405S	278
G407N/P409S	G404N/P406S	279

### 10 d. Variantes candidatas que carecen del dominio de unión al receptor (PRB)

Para generar variantes de ADA2 que carecen del dominio de unión al receptor (PRB), los residuos V102-Q147 (V99-Q144 por la numeración madura) o C108-T150 (C105-T147 por la numeración madura) se eliminaron y reemplazaron por un conector de glicina de varias longitudes (p. ej., 3, 5, 7, 10 o 15; véase SEQ ID NO: 280) o un

conector (GGGGS)<sub>n</sub> de varias longitudes (p. ej., n = 1, 2 o 3; véanse SEQ ID NO: 581 y 582). La Tabla 10 expone las mutaciones de variantes candidatas ilustrativas.

<b>Tabla 10. Variantes de delección de dominio PRB de rHuADA2 candidatas</b>		
Mutación (numeración de Zavialov)	Mutación (numeración madura)	SEQ ID NO:
C108_T150delins(G) <sub>15</sub>	C105_T147delins(G) <sub>15</sub>	281
C108_T150delins(G) <sub>10</sub>	C105_T147delins(G) <sub>10</sub>	282
C108_T150delins(G) <sub>7</sub>	C105_T147delins(G) <sub>7</sub>	283
C108_T150delins(G) <sub>5</sub>	C105_T147delins(G) <sub>5</sub>	284
C108_T150delins(G) <sub>3</sub>	C105_T147delins(G) <sub>3</sub>	285
V102_Q147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	V99_Q144delins(GGGGS) <sub>1</sub>	583
V102_Q147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	V99_Q144delins(GGGGS) <sub>2</sub>	584
V102_Q147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	V99_Q144delins(GGGGS) <sub>3</sub>	585
C108_T150delins(GGGGS) <sub>1</sub>	C105_T147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	586
C108_T150delins(GGGGS) <sub>2</sub>	C105_T147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	587
C108_T150delins(GGGGS) <sub>3</sub>	C105_T147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	588

#### 5 e. Variantes candidatas con glicosilación alterada en el dominio de unión al receptor (PRB)

Para interrumpir la interacción potencial de ADA2 con receptores potenciales a través de la unión del receptor (PRB), se generaron variantes candidatas de ADA2 mediante la introducción de la mutación (p. ej., inserción y/o reemplazo de aminoácidos) de residuos para crear un sitio de N-glicosilación mediante la incorporación de un nuevo motivo de sitio de N-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr) en el dominio PRB. La Tabla 11 expone las mutaciones de variantes candidatas ilustrativas.

<b>Tabla 11. Variantes de hiperglicosilación del dominio PRH de rHuADA2 candidatas</b>		
Mutación (numeración de Zavialov)	Mutación (numeración madura)	SEQ ID NO:
R128N/P129A	R125N/P126A	552
S130N/K132S	S127N/K129S	553
P129N/E131T	P126N/E128T	554
R115N/I117T	R112N/I114T	555
I137N/L138C/L139T	I134N/L135C/L136T	556
I137N/L138S/L139T	I134N/L135S/L136T	557
R145N/Q147S	R142N/Q144S	558
E140N/Y142T	E137N/Y139T	559
P114N/G116S	P111N/G113S	560

#### 15 f. Variantes candidatas con interacción alterada entre el dominio de unión al receptor (PRB) y el dominio de ADA

Para generar variantes de ADA2 que tengan una interacción alterada entre el dominio de unión al receptor (PRB) y el resto de ADA2 (p. ej., el dominio de adenosina desaminasa (ADA)), se introdujeron mutaciones en aminoácidos individuales o múltiples del dominio PRB. El diseño basado en la estructura se utilizó para identificar residuos sobre la superficie de ADA2 en el contexto de su estructura tridimensional que podría alterar la capacidad del dominio PRB para interactuar con otros residuos de contacto fuera del dominio PRB en ADA2. La Tabla 12 expone las mutaciones de variantes candidatas ilustrativas.

25



<b>Tabla 12. Variantes de interacción del dominio PRH candidato de rHuADA2</b>		
Mutación (numeración de Zavialov)	Mutación (numeración madura)	SEQ ID NO:
F122S	F119S	561
F122K	F119K	562
Y227R	Y224R	563
Y227N	Y224N	564
Y194S	Y191S	565
Y194D	Y191D	566
F186K	F183K	567
Y194D/Y227R	Y191D/Y224R	568
F112S	F109S	569
F112A	F109A	570
R121D	R118D	571
R121A	R118A	572
Y142T	Y139T	573
Y142A	Y139A	574
W136S	W133S	575
W136T	W133T	576
P127A	P124A	577
P127S	P124S	578

## EJEMPLO 2

### PRODUCCIÓN DE ADENOSINA DESAMINASA 2 HUMANA RECOMBINANTE (rHuADA2) Y VARIANTES

5

#### A. Expresión transitoria

10 Para la expresión transitoria de ADA2 de tipo salvaje y las variantes generadas en el Ejemplo 1, se transfectaron 300 ml de  $1,0 \times 10^9$  células/ml de células CHO-S (Invitrogen, Núm. de Cat. 11619-012) con 375 µg de plásmido pCMV-Script-hADA2-FLAG o plásmido variante utilizando el reactivo FreeStyle™ MAX (Life Technologies, Carlsbad, CA; Núm. de Cat. 16447-500). Las células transfectadas se cultivaron durante 4 días, y el sobrenadante de cultivo se recogió por centrifugación a 100 rpm durante 10 minutos.

15 El sobrenadante recogido se utilizó para purificar la proteína, ya sea la ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5 o una variante madura (p. ej., variantes expuestas en las Tablas 7-12), cada una con una etiqueta FLAG. La purificación por lotes se realizó utilizando una resina de afinidad anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Núm. de Cat. A2220), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las ADA2 se hicieron eluir de la resina utilizando el péptido FLAG™. La pureza de la proteína eluida se evaluó utilizando SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los resultados de la SEC confirmaron que la proteína purificada era un dímero. También se realizó la secuenciación N-terminal y se confirmó que la secuencia señal correspondía a los residuos de aminoácido 1-29 de SEQ ID NO: 2, de modo que la proteína madura purificada comienza con los residuos de aminoácido IDET como se expone en SEQ ID NO: 5.

#### C. Clonación y expresión estable

25 El gen ADA2 humano de tipo salvaje (secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1) o variante con una etiqueta FLAG™ C-terminal (secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 8; que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9) se subclonó en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector de expresión lentiviral pLV-EF1a-MCS-IRES-GFP-Bsd. El vector de expresión resultante, pLV-EF1a-hADA2-Flag-IRES-GFP-Bsd (secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 10) se utilizó para generar un lentivirus capaz de transfectar establemente células CHO-S. En el vector de expresión, la expresión del gen ADA2 humano recombinante fue dirigida por el promotor EFla. Se insertó una secuencia IRES después del transgen seguido del ADNc para la

30

proteína verde fluorescente (GFP) utilizada para la identificación de células transducidas por microscopía, combinado con el gen de resistencia a blasticidina (*Bsd*) utilizado para la selección de células transducidas. Se insertó el elemento regulador de la Postranscripción del Virus de la Hepatitis de Marmota (WPRE) después de la secuencia GFP-*Bsd* para mejorar la expresión génica.

5 El vector de expresión de lentivirus construido pLV-EF1a-hADA2-Flag-IRES-GFP-*Bsd* se utilizó para producir lentivirus como se describe en el manual de instrucciones del fabricante de ViraPower™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Brevemente, se cultivaron en placa células 293FT a  $6 \times 10^6$  células sobre placas de cultivo de tejidos de 10 cm. Después de 24 horas, se mezclaron 9 µg de ViraPower™ Packaging Mix (que contiene una mezcla de los plásmidos pLP1, pLP2 y pLP/VSVG a 1 µg/µl en tampón TE, pH 8,0 según lo suministra el fabricante) y 3 µg del plásmido de expresión lentiviral pLV-EF1a-hADA2-Flag-IRES-GFP-*Bsd* en 1,5 ml de medio Opti-MEM (Life Technologies). Se diluyeron 36 µl de Lipofectamine™ 2000 (LF2000; Life Technologies, Carlsbad, CA) en 1,5 ml de Opti-MEM (Life Technologies). El ADN y la LF2000 se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir que el ADN y los lípidos formen complejos. Mientras tanto, el medio de cultivo nocturno se reemplazó por 5,0 ml de Opti-MEM + FBS al 10% sin antibióticos. Los complejos de ADN-LF2000 se añadieron a las células 293FT para la transfección. Las células se incubaron durante la noche a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio que contenía los complejos de ADN-LF2000 se reemplazó por 10 mL de medio completo y las células se incubaron durante la noche a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante se recogió a las 48 horas de la transfección y el medio se transfirió a un tubo de almacenamiento estéril. El medio que contenía el virus se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para sedimentar cualquier célula 293FT que se transportara durante la recolección. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo de almacenamiento estéril.

25 Para la transducción, se cultivaron células CHO-S (Life Technologies, Carlsbad, CA; Núm. de Cat. 16447-500) en medio CD-CHO (Life Technologies, Carlsbad, CA; Núm. de Cat. 10743-029). La transducción de la línea celular CHO-S se realizó en placas de seis pocillos que contenían  $2 \times 10^7$  unidades infecciosas lentivirales (UI) y  $2 \times 10^6$  células CHO-S en 2 ml de medio CD-CHO con un suplemento de Glutamax 4 mM (Invitrogen, Carlsbad CA) y 4 µg/ml de bromuro de hexadimetrina (Polybrene; Biosettia, San Diego, CA). Las células infectadas se incubaron con movimiento oscilante a aproximadamente 30 rpm a 37°C en una incubadora de aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas. Las células se cosecharon a continuación y se centrifugaron a baja velocidad (1000 x g, 5 min) y el medio de transducción se retiró y se reemplazó por medio de nueva aportación CD-CHO. Las células se transfirieron a un matraz ventilado T-25 ml y se devolvieron a la incubadora. Cuatro días después de la infección inicial, al medio se le añadió un suplemento de 1 µg/ml de blasticidina (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio se cambió cada 3-4 días hasta que la confluencia de las células CHO-S alcanzó aproximadamente 90% y las células comenzaron a desprenderse de los matraces. Las células se transfirieron a matraces con movimiento oscilante para la expansión, la creación de bancos de células y la producción de proteínas.

40 El medio acondicionado se recogió para purificar la proteína, ya sea ADA2 madura expuesta en SEQ ID NO: 5 ya sea una variante madura (p. ej., expuesta en las Tablas 7-12), cada una con una etiqueta FLAG. Se cosecharon de dos a cinco litros de medio acondicionado y se hicieron pasar sobre una resina de afinidad anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Núm. de Cat. A2220). La resina se equilibró con aproximadamente 10 volúmenes de lecho de tampón de lavado (solución salina tamponada con Tris (TBS), pH 7,5) a un caudal de 4 mL/min antes de cargar el medio acondicionado. La columna cargada se lavó después con ~10 volúmenes de lecho de TBS y a continuación se conectó a un purificador AKTA (GE Healthcare, Pittsburgh, PA), y la proteína unida se hizo eluir utilizando un tampón de pH bajo (0,1 M de Glicina-HCl a pH 2,7). Las fracciones se neutralizaron inmediatamente con 1/10 de volumen de Tris-HCl 1 M, pH 8,8.

50 Las fracciones de proteína purificada se agruparon y se sometieron a diálisis en 4 litros de PBS con dos cambios de tampón utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (20 kD MWCO; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). El producto proteico sometido a diálisis se concentró de nuevo utilizando un concentrador centrífugo Amicon Ultra (30 kD MWCO; EMD Milipore, Billerica, MA) y la concentración final de proteína se determinó utilizando Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). La pureza de la preparación se evaluó utilizando SDS-PAGE, y la actividad adenosina desaminasa se sometió a prueba como se describe a continuación en el Ejemplo 4.

55 La pureza de la preparación de la proteína rHuADA2-FLAG, según lo evaluado por SDS-PAGE fue de 95% o mayor. La preparación también se caracterizó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), que mostró que la proteína rHuADA2-FLAG estaba presente como una especie de peso molecular único con una pureza superior a 95% según los cálculos del área bajo la curva (AUC).

60 Alternativamente, rHuADA2 de tipo salvaje y las variantes se expresaron utilizando CHO Freedom CHO-S Kit (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se purificaron como se describió anteriormente.

**EJEMPLO 3****PRODUCCIÓN DE ADENOSINA DEAMINASA 1 HUMANA RECOMBINANTE (rHuADA1)****A. Clonación de ADA1 de tipo salvaje (WT)**

5 El gen de adenosina desaminasa 1 humana (ADA1) (secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 11; que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12) se amplificó y clonó en el vector de expresión de *E. coli* pD444-SR: T5-sRBS-ORF (DNA2.0, Menlo Park, CA; Núm. de Cat. FPB-27-444), bajo el control de un promotor inducible por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (DNA 2.0, Menlo Park, CA). La construcción también contenía un conector (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 64) y una etiqueta Strep C-terminal (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 65) para facilitar la purificación por afinidad de la proteína. La secuencia de aminoácidos de ADA1-Strep codificado se expone en SEQ ID NO: 3. En la forma madura de la proteína, el residuo de metionina N-terminal se elimina, de modo que el polipéptido ADA1-Strep maduro tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 67 (correspondiente a una secuencia de polipéptido maduro expuesta en SEQ ID NO: 66, sin la etiqueta Strep).

**B. Generación de Variantes de ADA1**

Esta construcción resultante que codifica rHuADA1-Strep WT se utilizó para introducir sustituciones de aminoácidos específicas del sitio para crear la variante de ADA1 C74S, con la numeración basada en la ADA1 madura expuesta en SEQ ID NO: 67 (correspondiente a C75S con la numeración basada en polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 12). La variante se generó como un candidato para estabilizar la actividad porque un residuo de cisteína de ADA1 expuesto al disolvente se podría oxidar en el plasma y tener un impacto negativo sobre la actividad enzimática en el plasma. La sustitución específica del sitio se realizó utilizando el Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio Múltiple QuikChange Lightning (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Núm. de Cat. 210514) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En la forma madura de la proteína, la variante C74S-ADA1-Strep madura tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 69 (correspondiente a una secuencia de polipéptidos madura expuesta en SEQ ID NO: 70, sin la etiqueta Strep).

**C. Expresión en *E. coli***

30 Para la expresión de ADA1 de tipo salvaje y variante, la construcción clonada resultante se transformó en *Escherichia coli* BL21-DE3 (Calbiochem, San Diego, CA). Las bacterias transformadas se cultivaron en placas de agar-ampicilina de Caldo Luria (LB) (TekNova, Hollister, CA) y se seleccionó una colonia individual para el cultivo a gran escala. Las bacterias de la colonia seleccionada se cultivaron durante la noche (37°C, 200 rpm) en medio LB con un suplemento de antibiótico carbenicilina (50  $\mu$ g/ml; EMD Millipore, Billerica, MA). El cultivo se utilizó para sembrar cultivos de agitación grandes. Se permitió que el cultivo creciera hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,8 y a continuación se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG 1 mM. El cultivo se transfirió luego a una incubadora a 25°C y se dejó crecer durante la noche (~15 horas) con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, las células bacterianas se centrifugaron a 9000 x g durante 30 minutos y las células del sedimento se lisaron por sonicación utilizando un Branson Sonifier 250 (Emerson, Danbury, CT) empleando pulsos repetidos en hielo a un ciclo de trabajo de 20% durante aproximadamente 5 min. El producto lisado bacteriano se incubó después con lisozima (100  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y Benzonasa (50 U/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante cuatro horas a 4°C con agitación suave. El lisado producto bacteriano se centrifugó (5000 x g; 45 min) para eliminar los restos celulares.

El producto lisado del cultivo se utilizó para purificar la proteína, ya sea ADA1 madura expuesta en SEQ ID NO: 66 ya sea una variante C74S-ADA1 madura expuesta en SEQ ID NO: 69, cada una con una etiqueta Strep. El producto lisado clarificado se retiró y se filtró en condiciones estériles antes de cargarlo en columnas StrepTrap™ que contenían resinas de afinidad StrepTactin™ (capacidad de 5 mL; GE Healthcare, Pittsburgh, PA). La columna se conectó a continuación a un purificador AKTA y la proteína se hizo eluir utilizando una solución de d-destiobiotina 2,5 mM en tampón (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM). Las fracciones que contenían la proteína purificada se agruparon y se sometieron a 4°C en 4 litros de 1 x tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 4 horas con dos cambios de tampón utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (20 kD MWCO; Thermo Fisher Científico, Rockford, IL). La preparación de proteína se concentró después utilizando un concentrador centrífugo Amicon Ultra (30 kD MWCO; EMD Millipore, Billerica, MA) y la concentración final de proteína se determinó utilizando Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). La pureza de la preparación de proteína, según lo evaluado por SDS-PAGE fue de 95% o mayor.

**EJEMPLO 4****PRUEBA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ADENOSINA DEAMINASA**

La actividad de la adenosina desaminasa se determinó utilizando un kit de ensayo de adenosina desaminasa (ADA) (Genway, San Diego, CA; Núm. de Cat. BQ014EALD) con modificaciones menores. El ensayo de ADA se basa en la

desaminación enzimática de adenosina a inosina, que se convierte en hipoxantina por la purina nucleósido fosforilasa (PNP). La hipoxantina se convierte después en ácido úrico y peróxido de hidrógeno por la xantina oxidasa (XOD). El peróxido de hidrógeno se hace reaccionar adicionalmente con N-Etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina (EHSPT) y 4-aminoantipirina (4-AA) en presencia de peroxidasa (POD) para generar colorante de quinona, que se controla de forma cinética.

Brevemente, se añadieron muestras de 5  $\mu$ L por duplicado (a diluciones apropiadas para medir la actividad enzimática no saturante en estado estacionario) a 120  $\mu$ L de reactivo R1 (proporcionado por el fabricante; Tris HCL 50 mM, pH 8,0, 4-AA 2 mM, 0,1 U/mL de PNP, 0,2 U/mL de XOD, 0,6 U/mL de peroxidasa) en una placa de 96 pocillos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mezclas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 5 min y se añadieron 60  $\mu$ L de reactivo R2 (proporcionado por el fabricante; Tris HCl 50 mM, pH 4,0, adenosina 10 mM, EHSPT 2 mM) a las mezclas. A continuación, se midió el cambio en la absorbancia ( $\Delta A$ ) a 556 nm a lo largo del tiempo a 37°C. Una unidad de ADA es la cantidad de ADA que genera un  $\mu$ mol de inosina a partir de adenosina por minuto a 37°C. La actividad adenosina desaminasa en mU/ml se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$1 \text{ mU/mL} = (\Delta A / \text{min} \times T_v) / (S_v \times \epsilon \times l)$$

donde  $T_v$  = volumen total (185  $\mu$ L),  $S_v$  = volumen de muestra (5  $\mu$ L),  $\epsilon$  =  $32,2 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $l$  = 0,5 cm.

## EJEMPLO 5

### ESTABILIDAD EN PLASMA *IN VITRO* DE ADA1 VERSUS ADA2

Se analizó la actividad enzimática de la preparación purificada de rHuADA1 WT, rHuADA1-C74S y rHuADA2, antes y después de la incubación en plasma de mamífero durante un período de 24 horas, para someter a prueba la estabilidad de las preparaciones de proteínas recombinantes. La variante rHuADA1-C74S también se sometió a prueba para determinar si la estabilidad en plasma se puede mejorar mediante la sustitución del residuo de cisteína expuesto al disolvente.

#### A. Incubación de preparaciones purificadas de rHuADA1 y rHuADA2 en plasma

Las preparaciones purificadas de rHuADA1, rHuADA2 y rHuADA1-C74S se añadieron individualmente a plasma de ratón BALB/c *ex vivo* al 25% a una concentración final de 0,17 mg/ml (correspondiente a una dosis equivalente aproximada de 10 mg/kg equivalentes en un ratón). Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 horas. Como control, las proteínas se incubaron individualmente a una concentración de 0,17 mg/ml en PBS que contenía BSA al 0,2% (como estabilizador). A las 0, 4 y 24 horas de la incubación, se extrajeron 3 pequeñas alícuotas de cada muestra incubada de plasma y cada control incubado con PBS y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

La estabilidad de las proteínas en plasma *ex vivo* después de la incubación se determinó comparando los cambios en la actividad enzimática de la adenosina desaminasa utilizando el método descrito en el Ejemplo 4. El peso molecular y la estabilidad de la proteína también se examinaron mediante transferencia Western para detectar cualquier posible degradación de la proteína. Se analizaron aproximadamente 200 ng de proteína individualmente utilizando la transferencia Western y las bandas de proteína se detectaron utilizando ECL (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se utilizaron anti-ADA1 humana de conejo (Abcam, Cambridge, MA) y anti-peroxidasa de rábano picante de conejo de cabra (HRP) (EMD Millipore, Billerica, MA) como anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente, para rHuADA1. Se utilizó anti-FLAG-HRP (Abcam) para detectar rHuADA2.

#### B. Resultados

##### 1. Estabilidad de rHuADA1

La Tabla 13 muestra la media y la desviación típica (desv tip) de la prueba de actividad de adenosina desaminasa de rHuADA1 WY y rHuADA1-C74S. Los resultados muestran que hubo una reducción significativa de la actividad de rHuADA1 después de una incubación de 24 horas en plasma a 37°C. Por ejemplo, se conservó menos de 1% de la actividad después del tratamiento con plasma durante 24 horas, mientras que se conservó más de 80% de la actividad cuando se encontraba en el control de PBS/BSA durante el mismo período de tiempo. La disminución observada en la actividad no fue causada por la degradación de la proteína, ya que el nivel de proteína fue relativamente constante en todos los puntos temporales, medida por transferencia Western.

Los resultados también muestran que el residuo de cisteína expuesto al disolvente (C74) no tiene en cuenta el impacto negativo sobre la actividad enzimática en plasma, ya que se obtuvieron resultados similares para la variante C74S. Por ejemplo, a pesar de no poseer el tiol expuesto en la posición 74, la variante todavía mostró una fuerte disminución de la actividad después de una incubación de 24 horas en plasma. Los resultados mostraron que

después de 24 horas, aproximadamente 1% de la actividad de la enzima variante se conservó después del tratamiento con plasma, mientras que se retuvo más de 80% de la actividad cuando estaba en el control de PBS/BSA.

- 5 Normalmente, ADA1 se expresa de manera intracelular y se sabe que se transloca y se asocia con dipeptidil peptidasa-4 extracelular (DPPIV). Estos resultados demuestran que fuera de este entorno, ADA1 se inactiva rápidamente por exposición al plasma, y que la mutación de la cisteína 74 expuesta a la superficie no evitó la inactivación.

**Tabla 13. Actividad de rHuADA1 y rHuADA1-C74S después de la incubación con suero**

	Tiempo (hr)	Media incubada con PBS (mU/mL)	Media incubada con plasma (mU/mL)	Desv tip incubada con PBS	Desv tip incubada con plasma
rHuADA1	0	61.077.0	71.663.6	2.352,2	2.461,4
	4	59.544.8	46.772.1	3.352,5	4.645,3
	24	50.287.9	673,6	700,5	135,7
rHuADA1-C74S	0	43.031.9	59.632,4	2.695,6	4.890,5
	4	44.682.4	39.636,7	3.739,6	1.671,4
	24	37.492.2	616,6	751,4	44,7

10

## 2. Estabilidad de rHuADA2

La Tabla 14 a continuación muestra la media y la desviación típica (desv tip) de la prueba de actividad adenosina desaminasa de rHuADA2 después de una incubación de 24 horas con plasma. En contraste con los resultados para ADA1, los resultados muestran que ADA2 era sustancialmente más estable en plasma después de una incubación de 24 horas a 37°C. Por ejemplo, se conservó aproximadamente 65% de la actividad después del tratamiento con plasma durante 24 horas, mientras que no se observó ningún cambio en la actividad cuando se trató con control de PBS/BSA durante el mismo período de tiempo.

15

**Tabla 14. Actividad de rHuADA2 después de la incubación con suero**

Tiempo (hr)	Media incubada con PBS (mU/mL)	Media incubada con plasma (mU/mL)	Desv tip incubada con PBS	Desv tip incubada con plasma
0	9.140,5	10.988,4	1.058,8	1.827,9
4	9.584,6	10.936,1	1.697,8	1.784,5
24	9.832,1	7.147,8	1.310,6	1.014,8

20

## EJEMPLO 6

### EFFECTO DE ADA2 SOBRE LA MODULACIÓN MEDIDA POR ADENOSINA DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

- 25 La adenosina extracelular es un modulador inflamatorio de las respuestas inmunitarias, y los niveles elevados de adenosina en el microentorno tumoral podrían reducir y/o inhibir la función efectora de las células T y NK, favoreciendo así el crecimiento tumoral. Para evaluar si los efectos de la adenosina se pueden controlar evaluando la proliferación de células inmunitarias, se realizaron experimentos de proliferación con una mezcla de células NK y T (NK/T). Además, se realizaron experimentos para evaluar si rHuADA2, a través de su conversión enzimática de adenosina en inosina, puede rescatar las células inmunitarias de la inhibición de la proliferación mediada por adenosina.

30

#### A. Evaluación de los efectos de la adenosina sobre la proliferación de células NK/T

- 35 Se preparó una mezcla de células NK y T (NK/T) a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano. Brevemente, se cultivaron  $10 \times 10^7$  PBMC humanas durante 6-7 días en medio de crecimiento de células madre (SCGM; Núm. de pedido 20802-0500, CellGenix, Friburgo, Alemania) con suero humano al 5% de donantes con sangre tipo AB (suero AB humano; Núm. de Cat. 35-060-CI, Mediatech, Mannassas, VA) en presencia de 20 ng/mL de anti-CD3 eBioscience, San Diego, CA; Núm. de Cat. 16-0039) y 500 UI/mL de interleucina 2 humana recombinante (rhIL-2; Núm. de Cat. 200-02, PeproTech, Rocky Hill, NJ). Las células se cultivaron a continuación durante 2-3 semanas adicionales en SCGM en presencia de 500 UI/mL de rhIL-2. Las células NK/T cultivadas

40

durante 2-4 semanas se utilizaron en los experimentos.

Para someter a prueba la inhibición de la proliferación de células NK/T mediada por adenosina, se cultivaron en placa células NK/T (10.000 células/pocillo) en una placa de color blanco de 96 pocillos con fondo transparente en un volumen de 200  $\mu$ L. Las células se trataron con 20  $\mu$ L de adenosina (SKU Núm. A925, Sigma Aldrich) a concentraciones resultantes de una serie de dilución de 3 veces que comienza en 1 mM, es decir, 1 mM, 300  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M. Las células NK/T se dejaron crecer durante 5 días en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 5 días de tratamiento, las células se centrifugaron en una placa de 96 pocillos a 12.000 rpm durante 5 min. Se eliminaron 100  $\mu$ L de medio de cada pocillo de células, seguido de la adición de 100  $\mu$ L de reactivo Cell Titer Glow (CTG) (Núm. de Cat. G7570, Promega, Madison, WI) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de medir la luminiscencia en el lector de placas SpectraMax M3 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La supervivencia celular media (%) se determinó mediante la comparación de la luminiscencia medida con respecto a las células de control no tratadas con adenosina.

Los resultados se exponen en la Tabla 15. Los resultados mostraron que el tratamiento de las células NK/T con adenosina durante 5 días dio como resultado una inhibición de la proliferación de células NK/T dependiente de la dosis de adenosina. La CI<sub>50</sub>, la concentración de adenosina donde la respuesta se reduce a la mitad, fue de 16,2  $\mu$ M.

Concentración de adenosina ( $\mu$ M)	Supervivencia celular media (%)	Desviación típica
1000	15,82	0,44
300	13,65	1,04
100	26,01	1,51
30	36,84	0,96
10	70,33	1,33
3	110,07	2,07
1	121,11	1,8
0,3	101,19	1,14
0,1	106,67	1,21

#### **B. Evaluación de los efectos de ADA2 sobre la inhibición de la proliferación de células NK/T mediada por adenosina**

Se sometió a prueba rHuADA2 para evaluar si podía revertir la inhibición mediada por adenosina de la proliferación de células NK/T a adenosina 1 mM. Las células NK/T (10.000 células/pocillo) se cultivaron en placas de color blanco de 96 pocillos con fondo transparente en un volumen total de 180  $\mu$ L. Las células se trataron con 20  $\mu$ L de rHuADA2 a concentraciones resultantes de series de dilución de 3 veces, para proporcionar una concentración final de rHuADA2 de 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM, 0,1 nM y 0,03 nM, y después cada pocillo también se trató con 20  $\mu$ L de adenosina a 1 mM. Después del tratamiento, las células NK/T se cultivaron, se procesaron y se midió la luminiscencia como se describió anteriormente. La supervivencia celular media (%) se determinó mediante la comparación de la luminiscencia medida con respecto a las células de control no tratadas con adenosina o rHuADA2.

Los resultados se exponen en la Tabla 16. Los resultados mostraron que rHuADA2 rescataba la inhibición mediada por adenosina de la proliferación de células NK/T, de una manera dependiente de la dosis. La CE<sub>50</sub>, la concentración de rHuADA2 que induce una respuesta a medio camino entre el momento inicial y la máxima, fue de 8,5 nM.

Conc. rHuADA2 (nM)	Supervivencia celular media (%)	Desviación típica
100 nM	120,6	2,76
30 nM	105,5	2,86

**Tabla 16. Rescate de ADA2 de la inhibición de la proliferación mediada por adenosina (adenosina 1 mM)**

Conc. rHuADA2 (nM)	Supervivencia celular media (%)	Desviación típica
10 nM	83,82	2,17
3 nM	41,98	0,9
1 nM	25,73	0,3
0,3 nM	18,33	0,12
0,1 nM	18,4	0,72
0,03 nM	16,03	0,47

5 También se realizaron experimentos para evaluar el efecto de rHuADA2 para revertir la inhibición de la proliferación de células NK/T mediada por adenosina a diversas concentraciones de adenosina. Los experimentos se realizaron de manera similar a la descrita anteriormente, con una concentración final de adenosina de 1 mM, 100, 50 o 25 µM y una concentración final de rHuADA2 de 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM, 0,1 nM y 0,03 nM.

10 Los resultados se exponen en la Tabla 17. De manera similar a los resultados anteriores, se observó un rescate dependiente de la dosis de la proliferación de células NK/T por rHuADA2 a concentraciones variables de adenosina. Los valores de CE<sub>50</sub> para rHuADA2 a diferentes concentraciones fijas de adenosina se exponen en la Tabla 18. Los resultados muestran que la adenosina inhibe la proliferación de células NK/T y que la adición de rHuADA2 puede rescatar las células NK/T humanas de la inhibición de la proliferación mediada por adenosina.

**Tabla 17. Rescate de ADA2 de la inhibición de la proliferación mediada por adenosina a concentraciones variables de adenosina y ADA2**

ADA2 (nM)	Adenosina 1 mM		100 Adenosina µM		50 Adenosina µM		25 Adenosina µM	
	SM%	DT	SM%	DT	SM%	DT	SM%	DT
100 nM	96,3	1,2	109	2,3	116,9	1,5	120,6	2,5
30 nM	79,1	1,5	114,4	2,6	114,7	2,3	117,2	1,3
10 nM	67,1	1,4	108,3	2,1	105,9	1,2	121,2	1,1
3 nM	41,4	1	91,6	2,3	94	0,9	107,4	1,1
1 nM	22,6	0,5	71,7	1,7	80,2	0,6	99,3	1,5
0,3 nM	18,3	0,1	57,8	0,7	64,8	0,8	90,5	1
0,1 nM	16,3	0,2	43,8	0,8	76,6	0,9	89,6	0,9
0,03 nM	15,6	0,2	45,9	1,6	71,2	0,5	81,7	1

SM% = supervivencia media (%)  
DT - desviación típica

**Tabla 18. Valores de CE<sub>50</sub> para ADA2 y varias concentraciones de adenosina**

Concentración de adenosina	CE <sub>50</sub> para rHuADA2
1 mM	7,2 nM
100 µM	1,5 nM
50 µM	3,8 nM
25 µM	1,5 nM

**EJEMPLO 7****IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DEL SITIO DE UNIÓN A HEPARINA DE ADA2 QUE MUESTRAN UNA REDUCCIÓN DE LA UNIÓN A HEPARINA**

5 Las variantes candidatas seleccionadas descritas en la Tabla 7 anterior, que tienen una sustitución de aminoácidos en un residuo que participa en la unión a heparina, se seleccionaron para evaluar si alguna presentaba una unión a heparina atenuada. La Tabla 19 enumera las variantes que se sometieron a prueba. La unión a heparina se evaluó mediante cromatografía de afinidad por heparina y/o utilizando un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA). Además, también se evaluó la actividad adenosina desaminasa de las variantes. Para realizar los experimentos, se prepararon WT rHuADA2 purificada y las variantes sometidas a prueba a una concentración de 0,3 mg/mL para normalizar la cantidad de proteína en cada experimento.

**A. Unión a heparina****1. Cromatografía de afinidad-heparina**

20 Para evaluar la unión de las variantes a heparina, se empleó la cromatografía de afinidad para heparina para identificar las variantes unidas a heparina. La unión a heparina se sometió a prueba mezclando 35 µL de rHuADA2 WT y variantes con 20 µL de resina de heparina-Sepharose™ (GE Healthcare, Pittsburgh, PA; Núm. de Cat. 17-0998-01), seguido de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó a continuación a través de un filtro de centrifuga de 0,22 µm y se recogió el flujo directo que contenía la proteína no unida para su análisis en un gel de SDS-PAGE. Se añadieron 35 µL de NaCl 1,5 M a la resina de heparina-Sepharose y se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 10 minutos para hacer eluir la proteína unida a heparina restante de la heparina-Sepharose. Las muestras de rHuADA2 WT purificada y las variantes sometidas a prueba, antes y después de mezclar con la resina de heparina-Sepharose, se analizaron mediante SDS-PAGE para comparar el grado de unión a heparina.

30 Los resultados se exponen en la Tabla 19. Los resultados muestran que se logró una elución reducida de proteína para 16 de las 25 variantes sometidas a prueba, lo que indica que estas variantes muestran unión a heparina atenuada en comparación con rHuADA2 WT. Las otras variantes mostraron una elución similar a la de rHuADA2 WT.

<b>Tabla 19. Unión a columna de heparina de variantes de HBP de ADA2</b>		
<b>Sustitución (numeración de Zavialov)</b>	<b>Sustitución (numeración madura)</b>	<b>Unión a columna de heparina</b>
K14A	K11A	Similar a WT
K14D	K11D	Similar a WT
K14E	K11E	Similar a WT
K16A	K13A	Similar a WT
K16D	K13D	Similar a WT
K16E	K13E	Similar a WT
K374A	K371A	Reducida
K374D	K371D	Reducida
K374E	K371E	Reducida
K375A	K372A	Reducida
K375D	K372D	Reducida
K375E	K372E	Reducida
K455A	K452A	Similar a WT
K455D	K452D	Similar a WT
K455E	K452E	Reducida
R23A	R20A	Reducida
R23D	R20D	Reducida



Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	Unión a columna de heparina
R23E	R20E	Reducida
R369A	R366A	Reducida
R369D	R366D	Reducida
R369E	R366E	Reducida
K14A/R23A	K11A/R20A	Reducida
K14A/R23A/K374A	K11A/R20A/K371A	Reducida
R23A/K374A	R20A/K371A	Reducida
K14A/K374A	K11A/K371A	Reducida

## 2. Ensayo ELISA para determinar las propiedades de unión a heparina

Se realizó un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) utilizando una placa de microtitulación recubierta con heparina para confirmar las propiedades de unión a heparina atenuada de las variantes HBP de rHuADA2 escrutadas anteriormente. Se recubrió una placa de 96 pocillos con 100 µl de sal de sodio de heparina de 200 µg/ml (Calbiochem, EMD Milipore, Billerica, MA; Núm. de Cat. 375095) en tampón Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,6), durante la noche a 4°C. Los pocillos se bloquearon con leche al 5% en PBS y se lavaron 6 veces con PBS. Se añadieron 3 µM de las variantes de rHuADA2 seleccionadas (véase la Tabla 20), rHuADA2 WT (control positivo) y rHuADA1 WT (control negativo) individualmente a los pocillos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de lavado 6 veces con PBS. Se añadieron a los pocillos 100 µL de anticuerpo anti-FLAG-peroxidasa e rábano picante (HRP) diluido 1:1000 (Abcam, Cambridge, Reino Unido; Núm. de Cat. Ab1238) para detectar la unión y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las reacciones ELISA se desarrollaron añadiendo la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y leyendo la densidad óptica a 450 nm (DO<sub>450</sub>) en un lector de placas.

Los resultados se exponen en la Tabla 20, que expone las lecturas de DO<sub>450</sub> media y la desviación típica (Desv tip) para las variantes sometidas a prueba. Los resultados mostraron que ADA2 WT tenía la DO más alta medida de cualquier proteína sometida a prueba, indicando la unión a la heparina, mientras que el control negativo ADA1 no dio como resultado una señal detectable. Los resultados mostraron que todas las variantes sometidas a prueba, que son variantes identificadas anteriormente que muestran una reducción de la unión a heparina, muestran una lectura de DO medida más baja que ADA2 WT y, por lo tanto, una reducción de la unión a las placas recubiertas con heparina. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados anteriores, los resultados mostraron una unión atenuada a la heparina, en comparación con la rHuADA2 humana de tipo salvaje.

	Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	DO <sub>450</sub> Media	Desv tip
Conjunto 1	K374D	K371D	0,15	0,02
	K374E	K371E	0,11	0,01
	K375D	K372D	0,2	0,07
	K375E	K372E	0,21	0,05
	ADA2 WT	ADA2 WT	0,49	0,02
	ADA1 WT	ADA1 WT	0,07	0,01
Conjunto 2	K455E	K452E	0,26	1
	R23E	R20E	0,2	0
	R369E	R366E	0,18	0,04
	R23A/R374A	R20A/R371A	0,17	0,08
	ADA2 WT	ADA2 WT	0,55	0,15
	ADA1 WT	ADA1 WT	0,06	0,01

**B. Ensayo de actividad adenosina desaminasa**

5 La actividad adenosina desaminasa de rHuADA2 WT y las variantes sometidas a prueba anteriormente se determinaron utilizando el ensayo de actividad adenosina desaminasa (ADA) descrito en el Ejemplo 4. La actividad se evaluó en rHuADA2 WT purificada y variantes que se diluyeron a 5 µg/mL, y a continuación se diluyeron en serie 2 veces para generar 4 mediciones.

La Tabla 21 expone los resultados. La última columna expone la actividad enzimática relativa (% de actividad frente a WT) en comparación con la rHuADA2 WT.

10 Los resultados muestran que la mayoría de las variantes que muestran una reducción de la unión a heparina muestran una actividad adenosina desaminasa similar o aumentada en comparación con ADA2 WT. En particular, las variantes R23E, K374D, K374E, K375D, K375E, K455D, K455E y R369E por numeración de Zavialov (R20E, K371D, K371E, K372D, K372E, K452D, K452E y R366E, respectivamente, por numeración madura) no solamente mostraron una atenuación de la unión a heparina, sino que también mostraron una mayor actividad enzimática.

15 En contraste, las variantes R23A, R23D y R369A (R20A, R20D y R366A, respectivamente, por numeración madura) muestran una reducción de la unión a heparina, pero también muestran una reducción de la actividad adenosina desaminasa.

20 Los resultados muestran que la variante K14E (K11E por numeración madura) y la variante K455D (K452D por numeración madura) muestran una mayor actividad enzimática con respecto a rHuADA2 WT, mientras que la propiedad de unión a heparina no se atenuó.

**Tabla 21. Actividad adenosina desaminasa de variantes de ADA2**

Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	ΔA/min	mU/mL	desv tip	% de actividad frente a WT
K14A	K11A	4,9	11,4	1,2	14,6
K14D	K11D	8,1	18,7	0,2	24
K14E	K11E	38,8	89,1	2,8	114,2
K16A	K13A	12,2	28	1,8	35,9
K16D	K13D	29,3	67,3	18,1	86,3
K16E	K13E	7,1	16,3	2,4	20,9
K374A	K371A	25,8	59,2	16,3	75,9
K374D	K371D	117,3	269,8	6,4	345,9
K374E	K371E	136,5	313,8	17	402,3
K375A	K372A	35,5	81,8	15,4	104,8
K375D	K372D	53,7	123,5	10,9	158,3
K375E	K372E	47	108,1	10	138,6
K455A	K452A	6,1	14	2,8	18
K455D	K452D	42,6	97,9	12,6	125,5
K455E	K452E	55,4	127,3	6,1	163,2
R23A	R20A	23,2	53,3	4,8	68,4
R23D	R20D	6,9	15,9	4,2	20,3
R23E	R20E	70,2	161,6	26,3	207,1
R369A	R366A	14,9	34,3	5,5	44
R369D	R366D	34,9	80,2	3,6	102,8
R369E	R366E	50,4	115,9	28,9	148,5
K14A/R23A	K11A/R20A	42,1	96,9	0,7	124,2
K14A/R23A/K374A	K11A/R20A/K371A	31,7	72,8	10,1	93,3

Tabla 21. Actividad adenosina desaminasa de variantes de ADA2

Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	$\Delta A/\text{min}$	mU/mL	desv tip	% de actividad frente a WT
R23A/K374A	R20A/K371A	51,1	117,6	7,1	150,7
K14A/K374A	K11A/K371A	34,1	78,4	2,2	100,5
ADA2 WT	ADA2 WT	33,9	78	1,2	100

**EJEMPLO 8****PEGILACIÓN DE rHuADA2 Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADENOSINA DESAMINASA Y LA UNIÓN A HEPARINA**

Se PEGilaron rHuADA2, la variante K374D-ADA2 (K371D por numeración madura) o la variante R23E-ADA2 (R20E por numeración madura) en las lisinas expuestas en superficie por reacción con PEG-20K lineal. Se evaluaron la rHuADA2-PEGilada o las variantes para determinar la unión a heparina y la actividad adenosina desaminasa.

**A. PEGilación**

Para PEGilar la enzima, se mezclaron individualmente 3 mg/ml WT rHuADA2, rHuADA2-K374D (K371D por numeración madura) o rHuADA2-R23E (R20E por numeración madura) individualmente con PEG-20K lineal (JenKem Technology, Plano, TX; Núm. de Cat. M-SCM-20K) a una razón molar de 1:15 y se incubó a 4°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se centrifugó a través de un filtro de centrifuga de 0,22  $\mu\text{m}$  y se recogió el flujo que contenía la enzima PEGilada.

El grado de PEGilación se evaluó mediante análisis SDS-PAGE. Los resultados muestran que al menos 80% de rHuADA2 WT, rHuADA2-K374D (K371D por numeración madura) y rHuADA2-R23E (R20E por numeración madura) se PEGilaron en las condiciones de reacción, como indica una disminución en la intensidad de la banda de rHuADA2 no modificada acompañada por la aparición de múltiples bandas más grandes que representan las moléculas de rHuADA2 PEGiladas.

**B. ELISA de unión a heparina**

La unión a heparina de rHuADA2 PEGilada o las variantes se evaluó mediante ELISA de captura. La unión de rHuADA1 se evaluó como un control negativo. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de biotina-heparina de 0,2 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Núm. de Cat. B9806-10MG) a una placa de 96 pocillos recubierta con estreptavidina (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL; Núm. de Cat. 15520), y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó 6 veces con PBS. A continuación, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de rHuADA2 PEGilada 1  $\mu\text{M}$  a la placa recubierta con heparina, se tituló en diluciones en serie 3X y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lavó después 6 veces con PBS. Se añadió una dilución 1000 x de anti-FLAG.HRP de cabra pAb (Abcam, Cambridge, Reino Unido; Núm. de Cat. Ab1238) a la placa de ELISA y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa de ELISA se lavó 6 veces con solución salina tamponada con fosfato con Tween (PBST) y se desarrolló con la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) según las instrucciones del fabricante y lectura de la densidad óptica a 450 nm ( $\text{DO}_{450}$ ) en un lector de placas.

La Tabla 22 expone la lectura de  $\text{DO}_{450}$  media y la desviación estándar (Desv tip) del ensayo ELISA de captura de unión a heparina de rHuADA2 PEGilada de tipo salvaje y variantes. Los resultados muestran que rHuADA2 PEGilada y sus variantes presentan una reducción significativa en la unión de heparina. Para las variantes de rHuADA2-K374D (K371D por numeración madura) y rHuADA2-R23E (R20E por numeración madura) PEGiladas, la PEGilación confirió una reducción adicional en la propiedad de unión a heparina en comparación con las formas no PEGiladas con una unión a heparina reducida. Por lo tanto, estos resultados indican que la modificación de la proteína rHuADA2 con el radical PEG reduce la unión a heparina por bloqueo estérico y/o alteración de las cargas electrostáticas sobre la superficie de rHuADA2.

Tabla 22. Ensayo ELISA de unión a heparina de ADA2 WT y variantes PEGiladas

Variante (numeración de Zavialov)	Variante (numeración madura)	$\text{DO}_{450}$ media	Desv tip
K374D	K371D	0,87	0,03
PEG-K374D	PEG-K371D	0,15	0,05
R23E	R20E	0,71	0,04

**Tabla 22. Ensayo ELISA de unión a heparina de ADA2 WT y variantes PEGiladas**

Variante (numeración de Zavialov)	Variante (numeración madura)	DO <sub>450</sub> media	Desv tip
PEG-R23E	PEG-R20E	0,55	0,02
ADA2 WT	ADA2 WT	2,31	0,01
PEG-ADA2 WT	PEG-ADA2 WT	0,75	0,04
ADA1 WT	ADA1 WT	-0,02	0

**C. Ensayo de actividad adenosina desaminasa**

5 La actividad adenosina desaminasa de rHuADA2 PEGilada y variantes se evaluó utilizando el método descrito en el Ejemplo 4, y se comparó con la actividad de la forma no PEGilada correspondiente.

10 Los resultados se exponen en la Tabla 23. Los resultados muestran que rHuADA2 WT PEGilada tenía una actividad adenosina desaminasa comparable en comparación con la forma no PEGilada. De manera similar, las variantes rHuADA2-K374D (K371D por numeración madura) y rHuADA2-R23E (R20E por numeración madura) PEGiladas también mostraron una actividad adenosina desaminasa comparable en comparación con las formas no PEGiladas. Aunque rHuADA2 WT contiene 32 residuos de lisina como monómero y 64 residuos de lisina como dímero, la PEGilación en los residuos de lisina no tuvo impacto en la actividad adenosina desaminasa de rHuADA2.

**Tabla 23: Actividad de adenosina desaminasa de ADA2 WT PEGilado y variantes**

Variante (numeración de Zavialov)	Variante (numeración madura)	mU/mL	desv tip	% de WT
K374D	K371D	162,9	2,2	134
R23E	R20E	129,9	0,4	106,8
WT	WT	121,6	2,3	100
PEG-K374D	PEG-K371D	142	7,1	116,8
PEG-R23E	PEG-R20E	115,6	3,9	95,1
PEG-WT	PEG-WT	124,2	5,5	102,2

**D. Conclusión**

15 Los resultados de los experimentos demuestran que la PEGilación de las variantes de rHuADA2 reduce la unión a heparina además de la unión atenuada a heparina resultante de la sustitución de aminoácidos, pero sin pérdida de actividad adenosina desaminasa. Por lo tanto, los resultados muestran que la PEGilación de variantes de unión a heparina puede mejorar las propiedades farmacocinéticas de las variantes de rHuADA2 sin afectar a la actividad adenosina desaminasa. La PEGilación se puede utilizar en lugar de la mutación para atenuar la unión a heparina.

**EJEMPLO 9****25 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO *IN VIVO* DE rHuADA2, VARIANTES DE ADA2 Y FORMAS PEGILADAS**

La farmacocinética (PK) de las formas no PEGiladas y PEGiladas de rHuADA2 WT, ADA2-K374D y ADA2-R23E por numeración de Zavialov (K371D y R20E, respectivamente, por numeración madura) se analizaron en un modelo de ratón inmunocompetente.

**A. Diseño del estudio.**

35 Se dividieron cincuenta y cuatro (54) ratones BALB/c macho en seis (6) grupos de dosificación, y se dividieron adicionalmente en tres (3) grupos cada uno para tomar muestras de sangre en diferentes puntos temporales. Por lo tanto, los ratones fueron aleatorizados en dieciocho (18) grupos en total. Los ratones se pesaron antes del inicio del estudio y se asignaron al azar a los 18 grupos en función de su peso corporal. En cada grupo de muestreo, se utilizaron tres grupos de (3) ratones para dosificar cada artículo de prueba para evitar el sobremuestreo de la sangre de los animales. Para la medición de los niveles de ADA2 en el momento inicial, se obtuvo una muestra de sangre de 12 ratones elegidos al azar y se preparó plasma utilizando el anticoagulante potasio (K<sub>3</sub>) - ácido etilendiaminotetraacético (K<sub>3</sub>-EDTA). Toda la sangre fue recolectada por venopunción submandibular.

Se inyectó a cada ratón mediante inyección intravenosa de la vena de la cola una dosis de 7,5 mg/kg de uno de los

seis artículos de prueba de ADA2 como se expone en la Tabla 24, es decir rHuADA2-K374D (K371D por numeración madura), PEG-rHuADA2-K374D (PEG-K371D por numeración madura), rHuADA2-R23E (R20E por numeración madura), PEG-rHuADA2-R23E (PEG-R20E por numeración madura) o ADA2 WT y PEG-ADA2 WT. Las variantes de ADA2 PEGiladas se prepararon utilizando el método de PEGilación como se describe en el Ejemplo 8.A. La concentración de cada artículo de prueba fue de 1,5 mg/mL, lo que dio como resultado un intervalo de volumen de dosis de 93-119 µL dependiendo del peso corporal (PC) del ratón. Los volúmenes de las dosis y los pesos corporales para los animales individuales se proporcionan en la Tabla 25.

Se recogió sangre en los puntos temporales de muestreo designados de grupos apropiados de ratones como se indica a continuación en la Tabla 24 y se mantuvo en hielo hasta la preparación de plasma. El plasma se preparó centrifugando la sangre (500 x g durante 5 minutos a 4°C), transfiriendo el plasma a un tubo nuevo y congelando inmediatamente a -80°C hasta el ensayo de actividad adenosina desaminasa. La actividad adenosina desaminasa se determinó como se describe en el Ejemplo 4. Se calculó la semivida o el tiempo necesario para que la actividad de las proteínas ADA2 se redujera a la mitad. Además, la exposición total se midió calculando el Área bajo la Curva de Concentración-tiempo (AUC).

**Tabla 24. Diseño del estudio de farmacocinética para ADA2 WT PEGilada y variantes**

Grupo Núm.	Artículo de prueba		Núm. de animales	Dosis	Puntos temporales de recolección de sangre después de la dosificación (horas)
	(Núm. Zavialov)	(Núm. madura)			
1	K374D	K371D	3	7,5 mg/kg	0,25, 2
2			3		1, 8
3			3		4, 24
4	PEG-K374D	PEG-K371D	3	7,5 mg/kg	0,25, 2
5			3		1, 8
6			3		4, 24
7	R23E	R20E	3	7,5 mg/kg	0,25, 2
8			3		1, 8
9			3		4, 24
10	PEG-R23E	PEG-R20E	3	7,5 mg/kg	0,25, 2
11			3		1, 8
12			3		4, 24
13	ADA2 WT	ADA2 WT	3	7,5 mg/kg	0,25, 2
14			3		1, 8
15			3		4, 24
16	PEG-ADA2 WT	PEG-ADA2 WT	3	7,5 mg/kg	0,25, 2
17			3		1, 8
18			3		4, 24

**Tabla 25. Peso corporal y dosificación para el análisis farmacocinético de ADA2 WT PEGilada y variantes**

Artículo de prueba		Grupo Núm.	ID de animal Núm.	PC	mg de artículo de prueba	vol (µL)
(Numeración de Zavialov)	(Numeración madura)					
K374D	K371D	1	817	17,7	0,1328	89
			850	21	0,1575	105
			832	23,7	0,1778	119
		2	822	18,6	0,1395	93
			830	21	0,1575	105

**Tabla 25, Peso corporal y dosificación para el análisis farmacocinético de ADA2 WT PEGilada y variantes**

Artículo de prueba		Grupo Núm.	ID de animal Núm.	PC	mg de artículo de prueba	vol (µL)
(Numeración de Zavialov)	(Numeración madura)					
		3	819	23,7	0,1778	119
			821	18,9	0,1418	95
			812	21,1	0,1583	106
			844	23,3	0,1748	117
PEG-K374D	PEG-K371D	4	823	19,2	0,144	96
			801	20,9	0,1568	105
			848	22,8	0,171	114
		5	841	19,3	0,1448	97
			836	21,1	0,1583	106
			837	22,8	0,171	114
		6	826	19,7	0,1478	99
			835	20,8	0,156	104
853	22,6		0,1695	113		
R23E	R20E	7	828	19,8	0,1485	99
			807	21,2	0,159	106
			834	22,4	0,168	112
		8	820	19,9	0,1493	100
			840	20,7	0,1553	104
			839	22,3	0,1673	112
		9	810	20	0,15	100
			809	21,2	0,159	106
			842	22,2	0,1665	111
PEG-R23E	PEG-R20E	10	815	20	0,15	100
			813	20,6	0,1545	103
			827	22,2	0,1665	111
		11	824	20	0,15	100
			852	21,2	0,159	106
			833	22,1	0,1658	111
		12	825	20	0,15	100
			808	20,6	0,1545	103
845	22		0,165	110		
ADA2 WT	ADA2 WT	13	838	20	0,15	100
			818	21,3	0,1598	107
			843	21,9	0,1643	110
		14	846	20	0,15	100
			814	20,5	0,1538	103
			805	21,8	0,1635	109

Artículo de prueba		Grupo Núm.	ID de animal Núm.	PC	mg de artículo de prueba	vol (µL)	
(Numeración de Zavialov)	(Numeración madura)						
PEG-ADA2 WT	PEG-ADA2 WT	15	849	20	0,15	100	
			851	21,3	0,1598	107	
			803	21,8	0,1635	109	
		16	811	20,2	0,1515	101	
			829	20,4	0,153	102	
			831	21,7	0,1628	109	
			17	802	20,3	0,1523	102
				854	21,4	0,1605	107
				804	21,7	0,1628	109
18	806	20,3	0,1523	102			
	847	20,3	0,1523	102			
			816	21,5	0,1613	108	

## B. Resultados

### 1. Farmacocinética de rHuADA2 WT no PEGilada y variantes

5 Las propiedades farmacocinéticas (PK) de rHuADA2 WT en comparación con las variantes ADA2-K374D y ADA2-R23E por numeración de Zavialov (K371D y R20E, respectivamente, por numeración madura) se exponen en las Tablas 26 y 27. La Tabla 26 expone la exposición total medida utilizando un cálculo de Área bajo la Curva (AUC) y la Tabla 27 establece la semivida ( $t_{1/2}$ ). Los resultados muestran que cada una de las variantes mostraba mejores parámetros farmacocinéticos en comparación con la ADA2 de tipo salvaje. Por ejemplo, la variante rHuADA2-R23E (R20E por numeración madura) mostró un AUC que fue 19% mayor que para rHuADA2 WT y una semivida que fue 119% más larga que la de rHuADA2 WT. La variante rHuADA2-K374D mostró un AUC que fue 128% más alta que para rHuADA2 WT y una semivida que fue 230% más larga que para rHuADA2 WT.

**Tabla 26. Comparación de la exposición total: área bajo la curva (AUC): variantes ADA2 WT y HBP**

Artículo de prueba (numeración de Zavialov)	Artículo de prueba (numeración madura)	AUC (mU*h)/mL	Porcentaje de aumento en AUC en comparación con ADA2 WT
WT	WT	32,883	---
R23E	R20E	39,033	19
K374D	K371D	74,983	128

**Tabla 27. Comparación de la semivida ( $t_{1/2}$ ): Variantes ADA2 WT y HBP**

Artículo de prueba (numeración de Zavialov)	Artículo de prueba (numeración madura)	Semivida lenta ( $t_{1/2}$ ) (min)	Incremento porcentual en $t_{1/2}$ en comparación con ADA2 WT
WT	WT	69	---
R23E	R20E	151	119
K374D	K371D	228	230

### 2. Farmacocinética de rHuADA2 WT PEGilada y variantes

20 Las propiedades farmacocinéticas (PK) de rHuADA2 WT nativa y PEGilada en comparación con las formas PEGiladas de las variantes, PEG-R23E (R20E por numeración madura) y PEG-K374D (K371D por numeración madura), se exponen en las Tablas 28 y 29. La Tabla 28 expone la exposición total medida utilizando un cálculo de Área bajo la Curva (AUC) y la Tabla 29 expone la semivida ( $t_{1/2}$ ).

Para ADA2 de tipo salvaje, los resultados muestran que la PEGilación mejora sustancialmente el perfil farmacocinético. Los resultados muestran que PEG-ADA2 WT mostraba un AUC que era 4291% más alta que la de ADA2 WT no PEGilada y una semivida que era 1078% más larga que la de ADA2 WT no PEGilada. Asimismo, la PEGilación de las formas variantes también dio como resultado una farmacocinética mejorada en comparación con las formas no PEGiladas. Por lo tanto, para los dos componentes PK medidos, AUC y  $t_{1/2}$ , la PEGilación condujo a valores PK mejorados en comparación con las formas no PEGiladas.

Los resultados también muestran que las formas PEGiladas de las variantes de ADA2 también muestran mejoras en uno o ambos componentes PK en comparación con PEG-ADA2 WT, aunque estas mejoras eran mayores para la variante PEG-K374D (K371D por numeración madura) que para PEG-R23E (R20E por numeración madura). Por ejemplo, PEG-R23E (R20E por numeración madura), mostró un AUC que 4271% mayor (en comparación con 4291% para PEG-ADA2 WT) que la de ADA2 WT no PEGilada y una semivida que fue 1420% más larga (en comparación con 1078% para PEG-ADA2 WT) que la de ADA2 WT no PEGilada. En contraste, PEG-K374D (K371D por numeración madura), mostró un AUC que fue 8187% mayor (en comparación con 4291% para PEG-ADA2 WT) que la de ADA2 WT no PEGilada y una semivida que fue 1791% más larga (en comparación con 1078% para PEG-ADA2 WT) que la de ADA2 WT no PEGilada.

**Tabla 28. Comparación de la exposición total - Área bajo la Curva (AUC): variantes de ADA2 WT y HBP PEGiladas**

Artículo de prueba (numeración de Zavialov)	Artículo de prueba (numeración madura)	AUC (mU*h)/mL	Incremento porcentual en AUC en comparación con ADA2 WT
ADA2 WT	ADA2 WT	32.883	---
PEG-ADA2 WT	PEG-ADA2 WT	1.444,000	4291
PEG-R23E	PEG-R20E	1.437,333	4271
PEG-K374D	PEG-K371D	2.725,000	8187

**Tabla 29. Comparación de la semivida ( $t_{1/2}$ ): Variantes de ADA2 WT y HBP PEGiladas**

Artículo de prueba (numeración de Zavialov)	Artículo de prueba (numeración madura)	Semivida lenta ( $t_{1/2}$ ) (min)	Incremento porcentual en $t_{1/2}$ en comparación con ADA2 WT
ADA2 WT	ADA2 WT	69	---
PEG-ADA2 WT	PEG-ADA2 WT	813	1078
PEG-R23E	PEG-R20E	1049	1420
PEG-K374D	PEG-K371D	1305	1791

## 20 EJEMPLO 10

### IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DE SITIO ACTIVOS DE ADA2 CON MAYOR ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las variantes candidatas seleccionadas descritas en la Tabla 8 anterior, que contienen una sustitución de aminoácidos en un residuo que juega un papel en la actividad enzimática, se evaluaron para determinar su actividad adenosina desaminasa utilizando el método descrito en el Ejemplo 4. La Tabla 30 enumera las variantes que se sometieron a prueba. Para realizar los experimentos, se prepararon rHuADA2 WY purificado y variantes sometidas a prueba a una concentración de 5  $\mu$ g/mL para normalizar la cantidad de proteína en cada experimento.

Los resultados del ensayo de actividad adenosina desaminasa se exponen en la Tabla 30 a continuación. Se indica el porcentaje (%) de actividad de cada variante en comparación con ADA2 WT. Los resultados muestran que la actividad de todas las variantes sometidas a prueba que contienen una sustitución en la posición 182 (posición 179 por numeración madura) se redujo sustancialmente, lo que indica que el residuo de ácido glutámico (E) es importante para la actividad enzimática.

En contraste, otras sustituciones conservan o muestran una mayor actividad enzimática. En particular, las variantes identificadas con mayor actividad incluyeron: la variante R222Q (R219Q por numeración madura) con 170% de la actividad de WT, la variante H267Q (H264Q por numeración madura) con 114% de la actividad de WT, H267G (H264G por numeración madura) con 153% de la actividad de WT, R222K (R219K por numeración madura) con 152% de la actividad de WT, L224A (L221A por numeración madura) con 128% de la actividad de WT, L224V (L221V por numeración madura) con 123% de la actividad de WT, L224G (L221G por numeración madura) con 113% de la actividad de WT, y S265N (S262N por numeración madura) con 211% de la actividad con respecto a WT.



**Tabla 30. Actividad de adenosina desaminasa de variantes diseñadas para mejorar la actividad de rHuADA2**

Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	$\Delta A/\text{min}$	mU/ml	Desv tip	% de la actividad WT
H267A	H264A	30,8	70,9	8,6	91
H267Q	H264Q	38,8	89,3	16,2	114
H267N	H264N	21,9	50,4	8	65
H267G	H264G	51,8	119,1	10,9	153
R222K	R219K	51,5	118,5	6,9	152
R222Q	R219Q	57,8	132,9	11,6	170
R222N	R219N	35,4	81,5	10,7	104
R222A	R219A	13,6	31,2	5,7	40
L224A	L221A	43,5	100,1	10,9	128
L224V	L221V	41,8	96,1	13,3	123
L224G	L221G	38,3	88,2	1,6	113
E182D	E179D	7,8	18,1	2,1	23
E182A	E179A	3,7	8,6	0,8	11
E182S	E179S	4,1	9,5	0,1	12
E182T	E179T	2,7	6,2	0,2	8
E182V	E179V	3,5	8	0,7	10
E182G	E179G	3	6,9	0,7	9
S265A	S262A	20,5	47,1	2,5	60
S265V	S262V	28,8	66,1	6,8	85
S265M	S262M	35,5	81,6	3,4	105
S265N	S262N	71,7	164,8	21,4	211
ADA2 WT	ADA2 WT	33,9	78	1,2	100

**EJEMPLO 11****5 GENERACIÓN DE VARIANTES COMBINADAS**

Se generaron variantes combinadas que contenían sustituciones de aminoácidos que aumentaban la actividad enzimática y atenuaron la unión a heparina. En particular, las sustituciones de aminoácidos S265N y/o R222Q (S262N y/o R219Q, por numeración madura) que confieren los mayores incrementos en la actividad enzimática como se describe en el Ejemplo 10, se combinaron con una o más sustituciones de aminoácidos K374D, K374E y/o R23E (K371D, K371E y/o R20E, respectivamente, por numeración madura) identificadas en el Ejemplo 7. Las variantes se generaron como se describe anteriormente en el Ejemplo 1 utilizando el QuikChange Lightning Multi-Site-Directed Mutagenesis Kit. Las variantes combinadas generadas se exponen en la Tabla 31. Las variantes combinadas y las sustituciones de aminoácidos individuales correspondientes se evaluaron para determinar los parámetros cinéticos de la actividad adenosina desaminasa y unión a heparina.

<b>Tabla 31. Variantes de combinación de sitio activo y unión a heparina atenuada</b>		
Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
S265N/K374D	S262N/K371D	59
S265N/K374E	S262N/K371E	60
S265N/R23E	S262N/R20E	61
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	62
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	63
R222Q/K374E	R219Q/K371E	263
R222Q/K374D	R219Q/K371D	264
R222Q/R23E	R219Q/R20E	265
R222Q/K374E/R23E	R219Q/K371E/R20E	266
R222Q/K374D/R23E	R219Q/K371D/R20E	267
R222Q/S265N/K374E	R219Q/S262N/K371E	268
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	269
R222Q/S265N/R23E	R219Q/S262N/R20E	270
R222Q/S265N/K374E/R23E	R219Q/S262N/K371E/R20E	271
R222Q/S265N/K374D/R23E	R219Q/S262N/K371D/R20E	272
R222Q/S265N	R219Q/S262N	273

Las variantes combinadas que contienen las mutaciones S265N (S262N por numeración madura), expuestas en SEQ ID NO: 59-63, y/o R222Q (R219Q por numeración madura), expuestas en SEQ ID NO: 263-273, y las correspondientes sustituciones de aminoácidos, se evaluaron para determinar los parámetros cinéticos de la actividad adenosina desaminasa. Las variantes combinadas que contienen la mutación S265N (S262N por numeración madura), expuestas en SEQ ID NO: 59-63 y las sustituciones de aminoácidos individuales correspondientes, se evaluaron para determinar las actividades de unión a heparina.

## 10 A. Evaluación cinética de la actividad adenosina desaminasa

### 1. Método de ensayo

La actividad adenosina desaminasa se determinó midiendo el amoníaco liberado de la adenosina cuando se descompone a inosina. El amoníaco se midió utilizando un kit de Ensayo de Amoníaco disponible en el mercado (Núm. de Cat. AA0100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El kit contiene reactivos secos que contienen ácido  $\alpha$ -cetoglutarico y NADPH, que se reconstituyeron con 5 mL de agua antes de su uso en el ensayo. El amoníaco reacciona con ácido  $\alpha$ -cetoglutarico (KGA) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH) en presencia de L-glutamato deshidrogenasa (GDH). La disminución de la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación de NADPH, es proporcional a la concentración de amoníaco y, por lo tanto, a la actividad adenosina desaminasa.

Los parámetros cinéticos de rHuADA2 WT y las variantes se compararon utilizando este ensayo a diferentes concentraciones de adenosina a pH 7,6 y 6,5. Se utilizaron concentraciones de adenosina que variaban de 20  $\mu$ M a 20 mM. La concentración submolar de la provisión de partida de adenosina se preparó en NaOH 1N.

Para los ensayos enzimáticos a pH 7,6, la adenosina se diluyó en serie con acetato de sodio (NaOAc) 100 mM, pH 4,9. Se preparó una mezcla de reacción 2X, que contenía reactivo de ensayo de amoníaco reconstituido (que contenía aproximadamente  $\alpha$ -cetoglutarato 4 mM y NADPH aproximadamente 300  $\mu$ M), rHuADA2 WT o variantes a 1  $\mu$ g/mL (17 nM) y glutamato deshidrogenasa (GDH, dilución 1:50). Se añadieron 85  $\mu$ L de adenosina a 85  $\mu$ L de 2X mezcla por duplicado en una placa de media superficie transparente a los rayos UV. Se controló el cambio en la absorbancia ( $\Delta A$ ) a 340 nm a lo largo del tiempo a temperatura ambiente.

Para el ensayo enzimático a pH 6,5, la adenosina se diluyó en serie con ácido piperazino-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES) 200 mM, pH 6,5. Se preparó una mezcla de reacción 2X en PIPES 200 mM, pH 6,5, que contenía  $\alpha$ -cetoglutarato 4 mM, NADPH 300  $\mu$ M, 1Hg/mL (17 nM) rHuADA2 o variantes y 50 U/mL GDH (Núm. de Cat. G2626,

Sigma- Aldrich). La reacción enzimática se inició añadiendo un volumen igual de adenosina a la mezcla 2X en una placa de media superficie transparente a los rayos UV como se describió anteriormente, y se controló el cambio en la absorbancia ( $\Delta A$ ) a 340 nm a lo largo del tiempo a temperatura ambiente.

5 Se calculó la actividad adenosina desaminasa en mU/mL (equivalente  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) utilizando la siguiente fórmula:

$$1 \text{ mU/mL} = -(\Delta A/\text{min} \times T_v) / (S_v \times \epsilon \times l)$$

10 donde  $T_v$  = volumen total (170  $\mu\text{L}$ ),  $S_v$  = volumen de muestra (85  $\mu\text{L}$ ),  $\epsilon = 6,22 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ .

Los datos de actividad se ajustaron con una regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el soporte lógico Graphpad Prism para obtener  $K_m$  y  $V_{max}$ . También se determinaron otros parámetros cinéticos tales como  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$ .

$$15 \quad k_{cat} \text{ (1/s)} = V_{max}/[E]_0$$

$$\text{Unidad } V_{max} = \mu\text{M}/\text{min}$$

$$20 \quad [E]_0 = 8,5 \text{ nM o } 0,0085 \mu\text{M}$$

$$K_{cat} = V_{max}/0,0085/60$$

$$25 \quad \text{Unidad } K_{cat}/K_m = 1/\text{Ms}$$

## 2. Resultados

30 Las Tablas 32 y 33 establecen los parámetros cinéticos del tipo salvaje y las variantes de rHuADA2, a pH 7,6 y pH 6,5, respectivamente. La  $K_m$  de rHuADA2 WT fue de 5,25 mM a pH 7,6 y 3,66 mM a pH 6,5, y la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) de rHuADA2 WT fue de 9,753 a pH 7,6 y 17.060 a pH 6,5. Por lo tanto, estos resultados muestran que rHuADA2 WT muestra una mayor actividad a pH 6,5. Todas las variantes sometidas a prueba mostraron una cinética enzimática mejorada en comparación con ADA2 WT. En general, la cinética enzimática mejorada para las variantes diseñadas se observó de manera más prominente a pH 6,5 que a pH 7,6.

35 Por ejemplo, S265N (S262N por numeración madura) había mejorado significativamente las propiedades cinéticas en comparación con WT. La sustitución del residuo de serina 265 (262 por numeración madura) por una asparragina en el sitio activo de rHuADA2 redujo el valor de  $K_m$  a 3,02 mM a pH 7,6 y 1,49 mM a pH 6,5, y aumentó la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) de 9,753 a 52,208 (1/Ms) a pH 7,6, y de 17.060 a 60.339 (1/Ms) a pH 6,5. R222Q (R219Q por numeración madura) también tenía propiedades cinéticas significativamente mejoradas en comparación con WT. La sustitución del residuo de lisina 222 (219 por numeración madura) por una glutamina redujo el valor de  $K_m$  a 1,92 mM a pH 7,6 y 0,994 mM a pH 6,5, y aumentó la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) de 9.753 a 60.697 (1/Ms) a pH 7,6, y de 17.060 a 83.146 (1/Ms) a pH 6,5.

45 Las variantes de ADA2 K374D, K374E y R23E en la numeración de Zavialov (K371D, K371E y R20E, respectivamente, por numeración madura), identificadas por conferir una atenuación de la unión a heparina, también mostraron propiedades cinéticas mejoradas en comparación con WT, que fue mayor a pH 6,5. Las variantes combinadas que contenían S265N (S262N por numeración madura) mostraron además una actividad catalítica mejorada en comparación con WT. En particular, las variantes combinadas S265N/K374E, S265N/R23E y S265N/R23E/K374E mostraron las mayores mejoras en la actividad catalítica a pH 6,5 entre las variantes sometidas a prueba.

50 Los resultados también muestran que las variantes combinadas que contienen R222Q (R219Q por numeración madura) tienen propiedades cinéticas significativamente mejoradas en comparación con ADA2 WT y R222Q (R219Q por numeración madura). Entre las variantes combinadas de ADA2 sometidas a prueba, el doble mutante R222Q/S265N (R219Q/S262N por numeración madura) mostró la mayor mejora en las propiedades cinéticas, mostrando una  $K_m$  4,7 veces menor y una eficacia catalítica 15 veces mayor ( $k_{cat}/K_m$ ) a un pH de 7,6 y una  $K_m$  5,0 veces menor y una eficacia catalítica 8,2 veces mayor ( $k_{cat}/K_m$ ) a pH 6,5, en comparación con ADA2 WT. Los resultados también muestran que ADA2 WT y todas las variantes que contienen R222Q sometidas a prueba (R219Q por numeración madura) tienen menores  $K_m$  a pH 6,5 que a pH 7,6.

**Tabla 32. Parámetros cinéticos de ADA2 WT y variantes a pH 7,6; [E] = 8,5 nM**

Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	V <sub>máx</sub> (μM/min)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (1/s)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (1/Ms)
WT	WT	26,09	5,25	51,16	9.753
K374D	K371D	28,25	4,88	55,39	11.349
K374E	K371E	35,13	4,77	68,88	14.438
R23E	R20E	29,08	5,06	57,02	11.275
S265N	S262N	80,49	3,02	157,82	52.208
R222Q	R219Q	59,28	1,92	116,24	60.697
S265N/K374D	S262N/K371D	78,29	2,86	153,51	53.637
S265N/K374E	S262N/K371E	87,44	2,54	171,45	67.554
S265N/R23E	S262N/R20E	63,13	2,9	123,78	42.743
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	72,78	3,13	142,71	45.564
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	82,38	2,87	161,53	56.262
R222Q/K374E	R219Q/K371E	87,27	1,58	171,12	108.508
R222Q/K374D	R219Q/K371D	77,01	1,71	151,00	88.252
R222Q/R23E	R219Q/R20E	84,71	1,46	166,10	114.078
R222Q/K374E/R23E	R219Q/K371E/R20E	78,42	1,92	153,76	80.086
R222Q/K374D/R23E	R219Q/K371D/R20E	88,43	1,34	173,39	129.687
R222Q/S265N/K374E	R219Q/S262N/K371E	65,43	1,35	128,29	95.103
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	70,96	1,19	139,14	117.218
R222Q/S265N/R23E	R219Q/S262N/R20E	67,24	1,29	131,84	102.602
R222Q/S265N/K374E/R23E	R219Q/S262N/K371E/R20E	90,91	1,24	178,25	143.407
R222Q/S265N/K374D/R23E	R219Q/S262N/K371D/R20E	72,58	1,23	142,31	115.514
R222Q/S265N	R219Q/S262N	87,79	1,10	172,14	157.203

**Tabla 33. Parámetros cinéticos de ADA2 WT y variantes a pH 6,5; [E] = 8,5 nM**

Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	V <sub>máx</sub> (μM/min)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (1/s)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (1/Ms)
WT	WT	31,81	3,66	62,37	17.060
K374D	K371D	42,98	3,16	84,27	26.635
K374E	K371E	41,93	3,18	82,22	25.895
R23E	R20E	37,16	3,29	72,86	22.167
S265N	S262N	45,79	1,49	89,78	60.339
R222Q	R219Q	42,15	0,994	82,65	83.146
S265N/K374D	S262N/K371D	43,85	1,51	85,98	56.978
S265N/K374E	S262N/K371E	57,13	1,41	112,02	79.390
S265N/R23E	S262N/R20E	53,25	1,43	104,41	72.812
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	43,42	1,50	85,14	56.948
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	63,74	1,29	124,98	96.585
R222Q/K374E	R219Q/K371E	58,56	0,99	114,82	115.937

**Tabla 33. Parámetros cinéticos de ADA2 WT y variantes a pH 6,5; [E] = 8,5 nM**

Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	V <sub>máx</sub> (μM/min)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (1/s)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (1/Ms)
R222Q/K374D	R219Q/K371D	60,87	0,79	119,35	150,584
R222Q/R23E	R219Q/R20E	60,47	0,84	118,57	141,778
R222Q/K374E/R23E	R219Q/K371E/R20E	54,48	0,86	106,82	124,474
R222Q/K374D/R23E	R219Q/K371D/R20E	60,68	0,67	118,98	177,795
R222Q/S265N/K374E	R219Q/S262N/K371E	45,53	0,80	89,27	111,985
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	50,89	0,76	99,78	131,054
R222Q/S265N/R23E	R219Q/S262N/R20E	40,59	1,01	79,59	79,192
R222Q/S265N/K374E/R23E	R219Q/S262N/K371E/R20E	54,82	0,77	107,49	140,199
R222Q/S265N/K374D/R23E	R219Q/S262N/K371D/R20E	45,78	0,81	89,76	111,150
R222Q/S265N	R219Q/S262N	56,75	0,80	111,27	139,775

### B. Unión a heparina de variantes combinadas

5 La actividad de unión a heparina de mutantes individuales y variantes combinadas que contenían S265N (S262N por numeración madura) se evaluó utilizando el ensayo de unión a heparina basado en ELISA descrito en el Ejemplo 7.A anterior. Los resultados se exponen en la Tabla 34. Los resultados confirmaron que las variantes K374D, K374E y R23E muestran una unión atenuada a heparina en comparación con ADA2 WT. Además, la variante S265N (S262N por numeración madura), diseñada para mejorar la actividad enzimática mediante la modificación de un residuo del sitio activo, también poseía una unión atenuada a las placas recubiertas de heparina, lo que indica que las modificaciones del sitio activo de la enzima pueden afectar a la unión de la heparina de una manera alostérica. Adicionalmente, todas las variantes combinadas sometidas a prueba mostraron una unión significativamente atenuada a la heparina, lo que ilustra que se pueden crear combinaciones de variantes que muestren una actividad enzimática mejorada hacia la adenosina y una unión atenuada a la heparina.

**Tabla 34. Ensayo ELISA de unión a heparina de ADA2 WT y variantes combinadas**

Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	ELISA de unión a heparina DO <sub>450</sub> media	desv tip.
K374D	K371D	0,87	0,03
K374E	K371E	0,03	0,01
R23E	R20E	0,71	0,04
S265N	S262N	0,88	0,19
S265N/K374D	S262N/K371D	0,92	0,13
S265N/K374E	S262N/K371E	0,6	0,12
S265N/R23E	S262N/R20E	1,03	0,02
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	0,69	0,07
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	0,93	0,11
ADA2 WT	ADA2 WT	2,31	0,01
ADA1 WT	ADA1 WT	-0,02	0

### 15 EJEMPLO 12

#### ESTABILIDAD TÉRMICA DE rHuADA2 WT Y VARIANTES

20 La estabilidad de rHuADA2 WT y sus variantes se midió por fluorimetría de barrido diferencial (DSF) a temperaturas crecientes. La DSF mide la estabilidad conformacional, que se correlaciona con la estabilidad térmica. La temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) en DSF se define como el punto medio de la transición de desplegamiento de las

proteínas.

Se prepararon rHuADA2 WT no PEGilada, variantes de rHuADA2 no PEGilada y formas PEGiladas de variantes de rHuADA2 WT y rHuADA2 a concentraciones de 0,1-1 mg/mL y se mezclaron con el colorante de cambio térmico de proteína ROX™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; Núm. de Cat. 4461146) a una concentración final de colorante que correspondía a una dilución de 125 veces de la solución de partida de ROX™. A continuación, se cargaron muestras de proteínas en una placa de 96 pocillos a un volumen de 20 µl/pocillo por triplicado. Se utilizó un sistema ViiA7 RT-PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) para medir el cambio en la fluorescencia a medida que aumentaba la temperatura de las muestras. Las reacciones se sometieron a las siguientes etapas: incubación a 25°C durante 2 min; aumento de temperatura de 25 a 99°C a una velocidad de 0,05°C por segundo; seguido de una incubación a 99°C durante 2 min. Las longitudes de onda utilizadas para la emisión y la excitación fueron 623 nanómetros (nm) y 580 nm, respectivamente.

La Tabla 35 expone la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) determinada a partir del análisis DSF. Los resultados muestran que la T<sub>m</sub> de la variante K374E (K371E por numeración madura) es 1,4°C más alta que la de ADA2 WT, lo que indica una mejora en la estabilidad térmica de la variante. Las otras variantes sometidas a prueba muestran una T<sub>m</sub> comparable o ligeramente inferior a la de ADA2 WT. Los resultados muestran que todas las formas PEGiladas mostraron una T<sub>m</sub> más alta que la correspondiente forma no PEGilada, lo que también indica que la PEGilación mejora la estabilidad térmica de las enzimas.

Tabla 35. Temperatura de fusión (T <sub>m</sub> ) de ADA2 WT, variantes y formas PEGiladas		
Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	T <sub>m</sub> (°C)
ADA2 WT	ADA2 WT	67,1
K374D	K371D	66,8
K374E	K371E	69,7
R23E	R20E	65,2
S265N	S262N	60,8
S265N/K374D	S262N/K371D	60,8
S265N/K374E	S262N/K371E	61,3
S265N/R23E	S262N/R20E	59,6
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	59,8
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	60,4
PEG-ADA2 WT	PEG-ADA2 WT	68,81
PEG-K374D	PEG-K371D	67,81
PEG-R23E	PEG-R20E	66,4

### EJEMPLO 13

#### pH ÓPTIMO DE rHuADA2 WT Y VARIANTES

Se evaluó la actividad adenosina desaminasa de rHuADA2 y las variantes a pH variable para determinar el óptimo de pH de cada una. La actividad adenosina desaminasa se determinó por espectrofotometría mediante la medición directa de los cambios en la absorbancia de la adenosina. Los espectros de absorción de UV de adenosina (ADO) e inosina (INO) son muy similares y se solapan significativamente, con picos de absorbancia respectivos a 261 nm y 249 nm. Durante la reacción de desaminación, la absorbancia de ADO disminuye mientras que la de INO aumenta con el tiempo. Dado que los cambios dinámicos en la absorbancia dificultan el seguimiento de la actividad en una sola longitud de onda, la actividad relativa de ADO se determinó como una razón del pico de ADO con respecto al punto isobéptico (es decir, la longitud de onda donde ADO e INO tienen el mismo coeficiente de extinción). El punto isobéptico, que es 253 nm, permanece sin cambios y es independiente de la concentración, por lo que es el punto de referencia para corregir las discrepancias de volumen o intensidad. Por lo tanto, los cambios en la concentración de adenosina y, por consiguiente, la actividad adenosina desaminasa, se evaluaron como la razón de absorbancia a 261 nm/absorbancia a 253 nm ( $A_{261}/A_{253}$ ), basándose en una curva patrón.

**A. Curva patrón**

5 Para construir la curva patrón para ADO e INO, se preparó una serie de mezclas de soluciones en Tween-20 al 0,001% que contenían diferentes concentraciones de ADO e INO. La concentración total de ADO e INO fue de 50  $\mu\text{M}$ , en 1X PBS (fosfato 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), pH 7,4. Las muestras se escanearon con las longitudes de onda entre 220 nm y 300 nm para determinar el punto isobéptico, donde se cruzan todos los espectros. La Tabla 36 expone las medidas para la curva patrón. La razón  $A_{261}/A_{253}$  se trazó frente a la concentración de ADO y el ajuste lineal dio como resultado una curva patrón de  $A_{261}/A_{253} = 0,0249 [\text{ADO}] - 0,0152$  ( $R^2 = 0,999$ ).

[ADO] ( $\mu\text{M}$ )	$A_{261}$	$A_{253}$	$A_{261}/A_{253}$
50	0,669	0,5455	1,2264
49,5	0,6543	0,5366	1,2193
49	0,6493	0,5388	1,2051
48,5	0,6418	0,5378	1,1934
48	0,6352	0,5386	1,1794
47,5	0,6306	0,5406	1,1665
47	0,6244	0,5406	1,1550
46,5	0,6134	0,5363	1,1438
46	0,6108	0,5402	1,1307
45,5	0,6026	0,5395	1,1170
45	0,5965	0,5404	1,1038

**B. Ensayo espectrofotométrico de actividad adenosina desaminasa**

10 Para realizar el ensayo espectrofotométrico de adenosina desaminasa de ADA2 y variantes, se preparó una solución 2X que contenía ADO 10 mM en tampón de fosfato de potasio (KPB) 100 mM, Tween-20 al 0,1% a diferentes pH (es decir, 5,5, 6, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,4, 7,75 y 8). Se preparó una solución 2X separada que contenía 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de rHuADA2 WT o variantes en el mismo tampón fosfato de potasio (KPB) 100 mM, Tween-20 al 0,1% al pH respectivo

15 (es decir, 5,5, 6, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,4, 7,75 y 8). Se mezclaron un volumen igual de la solución de ADO y la solución de ADA2 (tipo salvaje o variantes) para iniciar la reacción. En cada punto temporal (es decir, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 min), se extrajo una pequeña alícuota (4  $\mu\text{l}$ ) y se diluyó 50 veces mediante la adición a 196  $\mu\text{l}$  de 1X PBS, pH 7,4. Las muestras diluidas se diluyeron adicionalmente 2 veces (por duplicado) mediante la adición de 85  $\mu\text{l}$  de muestra a 85  $\mu\text{l}$  de PBS 1X en una placa con media superficie transparente a los rayos UV. Se midió la absorbancia a 253 nm y

20 261 nm de cada muestra diluida.

La concentración de adenosina se determinó utilizando la razón  $A_{261}/A_{253}$  y la curva patrón. La actividad adenosina desaminasa se midió mediante un cambio negativo en la concentración de ADO por minuto x 100.

25 La Tabla 37 expone los resultados de la actividad adenosina desaminasa, medida por el ensayo espectrofotométrico, a varios pH. Los resultados mostraron que el óptimo de pH (actividad desaminasa más alta) para la actividad de rHuADA2 WT era aproximadamente 6,5. Las variantes de ADA2 K374D (K371D por numeración madura) y K374E (K371E por numeración madura) tienen un perfil de pH de actividad similar al de rHuADA2 WT.

30 En contraste, la variante de ADA2 S265N (S262N por numeración madura) tiene un óptimo de pH a un pH más alto de 7,25. Las variantes dobles y triples que contienen la mutación S265N (S262N por numeración madura) también dan como resultado un óptimo de pH similar a 7,25.

**Tabla 37. Actividad adenosina desaminasa de ADA2 y variantes a pH variable**

Reemplazo (Núm. Z a vialov)	Reemplazo (Núm. madura)	Actividad adenosina desaminasa $\Delta$ [ADO]/min x (-100) a pH								
		5,5	6	6,5	6,75	7	7,25	7,4	7,75	8
WT ADA2	WT ADA2	21,11	22,06	33,77	29,76	28,70	24,47	21,77	6,65	3,58
K374D	K371D	12,19	10,68	14,22	12,90	13,22	12,86	10,55	1,55	3,46
K374E	K371E	15,76	19,15	27,09	25,72	24,63	21,88	18,32	5,98	4,25
R23E	R20E	22,84	25,64	29,18	29,47	28,53	21,71	19,37	7,41	5,33
S265N	S262N	24,61	31,59	41,30	44,46	45,16	50,99	45,81	25,16	3,70
S265N/K374D	S262N/K371D	22,89	33,51	39,06	41,58	45,98	42,69	43,37	22,29	4,36
S265N/K374E	S262N/K371E	31,84	44,31	50,23	54,55	59,68	60,07	57,15	28,28	1,77
S265N/R23E	S262N/R20E	27,34	38,26	45,58	48,49	51,90	56,12	50,44	24,42	4,63
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	20,27	28,16	35,51	33,24	40,08	42,28	34,66	18,46	4,94
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	37,94	52,70	66,08	67,95	74,68	77,81	67,77	35,97	2,04



**EJEMPLO 14****ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO *IN VIVO* DE VARIANTES COMBINADAS DE rHuADA2 PEGILADA**

5 La farmacocinética (PK) de las variantes ADA2-K374D PEGilada, ADA2-R222Q/S265N PEGilada y ADA2-R222Q/S265N/K374D PEGilada por la numeración de Zavialov (K371D, R219Q/S262N y R219Q/S262N/KK371/D, respectivamente, por la numeración madura) se analizó en un modelo de ratón inmunocompetente.

**A. Diseño del estudio.**

10 Se dividieron veintisiete (27) ratones BALB/c macho en tres (3) grupos de dosificación, y se dividieron adicionalmente en tres (3) grupos cada uno para tomar muestras de sangre en diferentes momentos. Por lo tanto, los ratones se aleatorizaron en nueve (9) grupos en total. Los ratones se pesaron antes del inicio del estudio y se asignaron al azar a los 9 grupos según su peso corporal. En cada grupo de muestreo, se utilizaron tres grupos de (3) ratones para dosificar cada artículo de prueba para evitar el sobremuestreo de la sangre de los animales. Para la medición de los niveles de ADA2 en el momento inicial, se obtuvo una muestra de sangre de 12 ratones elegidos al azar y se preparó plasma utilizando el anticoagulante potasio (K<sub>3</sub>)-ácido etilendiaminotetraacético (K<sub>3</sub>-EDTA). Toda la sangre fue recolectada por venopunción submandibular.

20 A cada ratón se le inyectó por inyección intravenosa en la vena de la cola una dosis de 3 mg/kg de uno de los tres artículos de prueba de variante de ADA2 PEGilada como se expone en la Tabla 38, es decir, PEG-rHuADA2-K374D (K371D por numeración madura), PEG- rHuADA2-R222Q/S265N (R219Q/S262N por numeración madura) o PEG-rHuADA2-R222Q/S265N/K374D (R219Q/S262N/K371D por numeración madura). Las variantes de ADA2 PEGiladas se prepararon utilizando el método de PEGilación como se describe en el Ejemplo 8.A, con modificaciones menores. Brevemente, todas las variantes de ADA2 a 10 mg/mL se PEGilaron con PEG-20K lineal (JenKem Technology, Plano, TX; Núm. de Cat. M-SCM-20K) a una razón molar de 1:15 y se incubaron primero a 37° durante 30 min., después a 4°C durante 16 horas. SDS-PAGE y los resultados analíticos de la SEC muestran que 100% de las variantes de ADA2 se PEGilaron bajo la condición de PEGilación optimizada y todas las variantes de ADA2 PEGiladas conservaron 100% de la actividad enzimática.

30 Se recogieron aproximadamente 200 µL de sangre completa en los puntos temporales de muestreo designados de los grupos apropiados de ratones como se indica a continuación en la Tabla 38 y se mantuvieron sobre hielo hasta la preparación de plasma. Las dos (2) muestras de sangre iniciales se recogieron por punción venosa submandibular. La muestra final se recogió de un sangrado terminal. El plasma se preparó centrifugando la sangre (500 x g durante 5 minutos a 4°C), transfiriendo el plasma a un tubo nuevo y congelando inmediatamente a -80°C hasta el ensayo de actividad adenosina desaminasa. La actividad adenosina desaminasa se determinó como se describe en el Ejemplo 4.

40 El análisis no compartimental (NCA) se realizó utilizando Phoenix WinNonlin versión 6.3 (Pharsight Corp, St. Louis, MO 63101). Se calculó la semivida, o el tiempo necesario para que la actividad de las proteínas ADA2 se redujera a la mitad. Asimismo, se midió la exposición total calculando el Área bajo la Curva de Concentración-tiempo (AUC). Los valores de AUC y de la semivida se obtuvieron del promedio no ponderado de cada grupo de artículos de prueba. Se utilizaron las siguientes opciones en el programa Phoenix WinNonlin para el análisis de datos: (i) la opción de interpolación lineal trapezoidal/lineal para AUC; (ii) la opción de selección de pendiente con mejor ajuste para la pendiente terminal; y (iii) la ponderación uniforme de los datos.

**Tabla 38. Diseño del estudio farmacocinético para ADA2 WT PEGilada y variantes**

Grupo Núm.	Artículo de prueba		Núm. de animales	Dosis	Puntos temporales de recolección de sangre después de la dosificación (horas)
	(Núm. Zavialov)	(Núm. madura)			
1	PEG-K374D	PEG-K371D	3	3 mg/kg	0,25, 8, 48
2			3		1, 4, 72
3			3		2, 24, 168
4	PEG-R222Q/S265N	PEG-R219Q/S262N	3	3 mg/kg	0,25, 8, 48
5			3		1, 4, 72
6			3		2,24, 168
7	PEG-R222Q/S265N/K374D	PEG-R219Q/S262N/K371D	3	3 mg/kg	0,25, 8, 48
8			3		1, 4, 72

**Tabla 38. Diseño del estudio farmacocinético para ADA2 WT PEGilada y variantes**

Grupo Núm.	Artículo de prueba		Núm. de animales	Dosis	Puntos temporales de recolección de sangre después de la dosificación (horas)
	(Núm. Zavialov)	(Núm. madura)			
9			3		2, 24, 168

**B. Resultados****1. Farmacocinética de rHuADA2 WT no PEGilada y variantes**

Las propiedades farmacocinéticas (PK) de las variantes de ADA2 PEGiladas PEG-K374D (K371D por numeración madura), PEG-R222Q/S265N (R219Q/S262N por numeración madura) y PEG-R222Q/S265N/K374D (R219Q/S262N/K371D por numeración madura) se exponen en las Tablas 39 y 40. La Tabla 39 establece la exposición total medida utilizando un cálculo de Área bajo la Curva (AUC) y la Tabla 40 establece la semivida ( $t_{1/2}$ ) de las variantes de rHuADA2 PEGilada sometidas a prueba.

Los resultados muestran que la PEGilación mejora sustancialmente el perfil farmacocinético de ADA2 y todas las variantes de ADA2 PEGiladas sometidas a prueba mostraron un AUC significativamente mayor y una semivida más larga que la rHuADA2 WT no PEGilada (véanse el Ejemplo 9 y Tablas 26 y 27). PEG-R222Q/S265N (R219Q/S262N por numeración madura) mostró la mayor mejora, con un AUC que es 49661% más alta que la de rHuADA2 WT no PEGilada, y una semivida que fue 4043% más larga que la de rHuADA2 el WT no PEGilada. PEG-K374D (K371D por numeración madura) mostró una mayor mejora de las propiedades PK en comparación con el mismo grupo de artículos de prueba en el Ejemplo 9 y las Tablas 26 y 27, lo que puede atribuirse a las condiciones optimizadas de PEGilación utilizadas en la preparación de los artículos de prueba.

**Tabla 39. Comparación de la exposición total - Área bajo la Curva (AUC): variantes combinadas de ADA2 PEGiladas**

Artículo de prueba (numeración de Zavialov)	Artículo de prueba (numeración madura)	AUC (U*h)/mL	Incremento porcentual en AUC en comparación con ADA2 WT
PEG-K374D	PEG-K371D	4,662	14,177
PEG-R222Q/S265N	PEG-R219Q/S262N	16,330	49,661
PEG-K374D/R222Q/S265N	PEG-K371D/R219Q/S262N	9,340	28,404

**Tabla 40. Comparación de la semivida ( $t_{1/2}$ ): Variantes de ADA2 PEGiladas**

Artículo de prueba (numeración de Zavialov)	Artículo de prueba (numeración madura)	Vida media lenta ( $t_{1/2}$ ) (min)	Incremento porcentual en $t_{1/2}$ en comparación con ADA2 WT
PEG-K374D	PEG-K371D	2,256	3,269
PEG-R222Q/S265N	PEG-R219Q/S262N	2,790	4,043
PEG-K374D/R222Q/S265N	PEG-K371D/R219Q/S262N	2,364	3,426

**EJEMPLO 15****GENERACIÓN DE VARIANTES COMBINADAS ADICIONALES**

Se generaron variantes combinadas adicionales, combinando sustituciones de aminoácidos que aumentaban la actividad enzimática y/o sustituciones de aminoácidos que conferían una atenuación de la unión a heparina, con otras modificaciones, tales como delecciones/inserciones/sustituciones y reemplazos de aminoácidos que conferían otra actividad alterada. En particular, la sustitución de aminoácidos S265N y/o R222Q (S262N y/o R219Q, por numeración madura) que confieren los mayores aumentos en la actividad enzimática como se describe en el Ejemplo 10, se combinaron con otras modificaciones de ADA2 descritas en los Ejemplos anteriores. El reemplazo de aminoácidos K374D (K371D por numeración madura) también se combinó con otras modificaciones de ADA2 descritas en los Ejemplos anteriores. Las variantes combinadas se exponen en la Tabla 41.

**Tabla 41. Otras variantes combinadas**

ES 2 753 391 T3

Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>1</sub>	589
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>2</sub>	590
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>3</sub>	591
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>1</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	592
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>2</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	593
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>3</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	594
R222Q/S265N/S3_I4insNAS	R219Q/S262N/ins (NAS) I1	596
R222Q/S265N/R23N/V25S	R219Q/S262N/R20N/V22S	597
R222Q/S265N/K374N/D376S	R219Q/S262N/K371N/D373S	598
R222Q/S265N/K375N/I377S	R219Q/S262N/K372N/I374S	599
R222Q/S265N/T406N/H408S	R219Q/S262N/T403N/H405S	600
R222Q/S265N/G407N/P409S	R219Q/S262N/G404N/P406S	601
R222Q/S265N/C108_T150delins(G) <sub>15</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(G) <sub>15</sub>	602
R222Q/S265N/C108_T150delins(G) <sub>10</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(G) <sub>10</sub>	603
R222Q/S265N/C108_T150delins(G) <sub>7</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(G) <sub>7</sub>	604
R222Q/S265N/C108_T150delins(G) <sub>5</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(G) <sub>5</sub>	605
R222Q/S265N/C108_T150delins(G) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(G) <sub>3</sub>	606
R222Q/S265N/R128N/P129A	R219Q/S262N/R125N/P126A	607
R222Q/S265N/S130N/K132S	R219Q/S262N/S127N/K129S	608
R222Q/S265N/P129N/E131T	R219Q/S262N/P126N/E128T	609
R222Q/S265N/R115N/I117T	R219Q/S262N/R112N/I114T	610
R222Q/S265N/I1137N/L138C/L139T	R219Q/S262N/I1134N/L135C/L136T	611
R222Q/S265N/I1137N/L138S/L139T	R219Q/S262N/I1134N/L135S/L136T	612
R222Q/S265N/R145N/Q147S	R219Q/S262N/R142N/Q144S	613
R222Q/S265N/E140N/Y142T	R219Q/S262N/E137N/Y139T	614
R222Q/S265N/P114N/G116S	R219Q/S262N/P111N/G113S	615
R222Q/S265N/F122S	R219Q/S262N/F119S	616
R222Q/S265N/F122K	R219Q/S262N/F119K	617
R222Q/S265N/Y227R	R219Q/S262N/Y224R	618
R222Q/S265N/Y227N	R219Q/S262N/Y224N	619
R222Q/S265N/Y194S	R219Q/S262N/Y191S	620
R222Q/S265N/Y194D	R219Q/S262N/Y191D	621
R222Q/S265N/F186K	R219Q/S262N/F183K	622
R222Q/S265N/Y194D/Y227R	R219Q/S262N/Y191D/Y224R	623
R222Q/S265N/F112S	R219Q/S262N/F109S	624
R222Q/S265N/F112A	R219Q/S262N/F109A	625
R222Q/S265N/R121D	R219Q/S262N/R118D	626
R222Q/S265N/R121A	R219Q/S262N/R118A	627
R222Q/S265N/Y142T	R219Q/S262N/Y139T	628

Tabla 41. Otras variantes combinadas		
Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/Y142A	R219Q/S262N/Y139A	629
R222Q/S265N/W136S	R219Q/S262N/W133S	630
R222Q/S265N/W136T	R219Q/S262N/W133T	631
R222Q/S265N/P127A	R219Q/S262N/P124A	632
R222Q/S265N/P127S	R219Q/S262N/P124S	633
R222Q/S265N/V 102_Q147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	R219Q/S262N/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>1</sub>	634
R222Q/S265N/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	R219Q/S262N/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>2</sub>	635
R222Q/S265N/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>3</sub>	636
R222Q/S265N/C108_T150delins(GGGGS) <sub>1</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	637
R222Q/S265N/C108_T150delins(GGGGS) <sub>2</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	638
R222Q/S265N/C108_T150delins(GGGGS) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	639
R222Q/S265N/K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	R219Q/S262N/K371_D/V99_Q_144delins(GGGGS) <sub>1</sub>	640
R222Q/S265N/K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	R219Q/S262N/K371_D/V99_Q_144delins(GGGGS) <sub>2</sub>	641
R222Q/S265N/K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/K371_D/V99_Q_144delins(GGGGS) <sub>3</sub>	642
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>1</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	643
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>2</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	644
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	645
K374D/C108-T150delins(G) <sub>15</sub>	K371D/C105_T147delins(G) <sub>15</sub>	647
K374D/C108_T150delins(G) <sub>10</sub>	K371D/C105_T147delins(G) <sub>10</sub>	648
K374D/C108_T150delins(G) <sub>7</sub>	K371D/C105_T147delins(G) <sub>7</sub>	649
K374D/C108_T150delins(G) <sub>5</sub>	K371D/C105_T147delins(G) <sub>5</sub>	650
K374D/C108_T150delins(G) <sub>3</sub>	K371D/C105_T147delins(G) <sub>3</sub>	651
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>15</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>15</sub>	671
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>10</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>10</sub>	672
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>7</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>7</sub>	673
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>5</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>5</sub>	674
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>3</sub>	675
R222Q/S265N/K14A	R219Q/S262N/K11A	659
R222Q/S265N/K14D	R219Q/S262N/K11D	660
R222Q/S265N/K14E	R219Q/S262N/K11E	661
R222Q/S265N/K16A	R219Q/S262N/K13A	662
R222Q/S265N/K16D	R219Q/S262N/K13D	663
R222Q/S265N/K16E	R219Q/S262N/K13E	682
R222Q/S265N/K374A	R219Q/S262N/K371A	683
R222Q/S265N/K375A	R219Q/S262N/K372A	684
R222Q/S265N/K375D	R219Q/S262N/K372D	685
R222Q/S265N/K375E	R219Q/S262N/K372E	686
R222Q/S265N/K455A	R219Q/S262N/K452A	687

<b>Tabla 41. Otras variantes combinadas</b>		
Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/K455D	R219Q/S262N/K452D	688
R222Q/S265N/K455E	R219Q/S262N/K452E	689
R222Q/S265N/R23A	R219Q/S262N/R20A	690
R222Q/S265N/R23D	R219Q/S262N/R20D	691
R222Q/S265N/R369A	R219Q/S262N/R366A	692
R222Q/S265N/R369D	R219Q/S262N/R366D	693
R222Q/S265N/R369E	R219Q/S262N/R366E	694
R222Q/S265N/H267A	R219Q/S262N/H264A	695
R222Q/S265N/H267Q	R219Q/S262N/H264Q	696
R222Q/S265N/H267N	R219Q/S262N/H264N	697
R222Q/S265N/H267G	R219Q/S262N/H264G	698
R222K/S265N	R219K/S262N	699
R222N/S265N	R219N/S262N	700
R222A/S265N	R219A/S262N	701
R222Q/S265N/L224A	R219Q/S262N/L221A	702
R222Q/S265N/L224V	R219Q/S262N/L221V	703
R222Q/S265N/L224G	R219Q/S262N/L221G	704
R222Q/S265N/E182D	R219Q/S262N/E179D	705
R222Q/S265N/E182A	R219Q/S262N/E179A	706
R222Q/S265N/E182S	R219Q/S262N/E179S	707
R222Q/S265N/E182T	R219Q/S262N/E179T	708
R222Q/S265N/E182V	R219Q/S262N/E179V	709
R222Q/S265N/E182G	R219Q/S262N/E179G	710
R222Q/S265A	R219Q/S262A	711
R222Q/S265V	R219Q/S262V	712
R222Q/S265M	R219Q/S262M	713
R222Q/S265N/K14A/R23A	R219Q/S262N/K11A/R20A	714
R222Q/S265N/K14A/R23A/K374A	R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A	715
R222Q/S265N/R23A/K374A	R219Q/S262N/R20A/K371A	716
R222Q/S265N/K14A/K374A	R219Q/S262N/K11A/K371A	717
R222Q/S265N/K29A	R219Q/S262N/K26A	718
R222Q/S265N/K29D	R219Q/S262N/K26D	719
R222Q/S265N/K29E	R219Q/S262N/K26E	720
R222Q/S265N/R220A	R219Q/S262N/R217A	721
R222Q/S265N/R220D	R219Q/S262N/R217D	722
R222Q/S265N/R220E	R219Q/S262N/R217E	723
R222Q/S265N/K261A	R219Q/S262N/K258A	724
R222Q/S265N/K261D	R219Q/S262N/K258D	725

<b>Tabla 41. Otras variantes combinadas</b>		
Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/K261E	R219Q/S262N/K258E	726
R222Q/S265N/R280A	R219Q/S262N/R277A	727
R222Q/S265N/R280D	R219Q/S262N/R277D	728
R222Q/S265N/R280E	R219Q/S262N/R277E	729
R222Q/S265N/R286A	R219Q/S262N/R283A	730
R222Q/S265N/R286D	R219Q/S262N/R283D	731
R222Q/S265N/R286E	R219Q/S262N/R283E	732
R222Q/S265N/K312A	R219Q/S262N/K309A	733
R222Q/S265N/K312D	R219Q/S262N/K309D	734
R222Q/S265N/K312E	R219Q/S262N/K309E	735
R222Q/S265N/K320A	R219Q/S262N/K317A	736
R222Q/S265N/K320D	R219Q/S262N/K317D	737
R222Q/S265N/K320E	R219Q/S262N/K317E	738
R222Q/S265N/K324A	R219Q/S262N/K321A	739
R222Q/S265N/K324D	R219Q/S262N/K321D	740
R222Q/S265N/K324E	R219Q/S262N/K321E	741
R222Q/S265N/R355A	R219Q/S262N/R352A	742
R222Q/S265N/R355D	R219Q/S262N/R352D	743
R222Q/S265N/R355E	R219Q/S262N/R352E	744
R222Q/S265N/R444A	R219Q/S262N/R441A	745
R222Q/S265N/R444D	R219Q/S262N/R441D	746
R222Q/S265N/R444E	R219Q/S262N/R441E	747
R222Q/S265N/K447A	R219Q/S262N/K444A	748
R222Q/S265N/K447D	R219Q/S262N/K444D	749
R222Q/S265N/K447E	R219Q/S262N/K444E	750
R222Q/S265N/K464A	R219Q/S262N/K461A	751
R222Q/S265N/K464D	R219Q/S262N/K461D	752
R222Q/S265N/K464E	R219Q/S262N/K461E	753
R222Q/S265N/K472A	R219Q/S262N/K469A	754
R222Q/S265N/K472D	R219Q/S262N/K469D	755
R222Q/S265N/K472E	R219Q/S262N/K469E	756
R222Q/S265N/K473A	R219Q/S262N/K470A	757
R222Q/S265N/K473D	R219Q/S262N/K470D	758
R222Q/S265N/K473E	R219Q/S262N/K470E	759
R222Q/S265N/D89A	R219Q/S262N/D86A	760
R222Q/S265N/D89C	R219Q/S262N/D86C	761
R222Q/S265N/D89E	R219Q/S262N/D86E	762
R222Q/S265N/D89F	R219Q/S262N/D86F	763

<b>Tabla 41. Otras variantes combinadas</b>		
Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/D89G	R219Q/S262N/D86G	764
R222Q/S265N/D89H	R219Q/S262N/D86H	765
R222Q/S265N/D89I	R219Q/S262N/D86I	766
R222Q/S265N/D89K	R219Q/S262N/D86K	767
R222Q/S265N/D89L	R219Q/S262N/D86L	768
R222Q/S265N/D89M	R219Q/S262N/D86M	769
R222Q/S265N/D89N	R219Q/S262N/D86N	770
R222Q/S265N/D89P	R219Q/S262N/D86P	771
R222Q/S265N/D89Q	R219Q/S262N/D86Q	772
R222Q/S265N/D89R	R219Q/S262N/D86R	773
R222Q/S265N/D89S	R219Q/S262N/D86S	774
R222Q/S265N/D89T	R219Q/S262N/D86T	775
R222Q/S265N/D89V	R219Q/S262N/D86V	776
R222Q/S265N/D89W	R219Q/S262N/D86W	777
R222Q/S265N/D89Y	R219Q/S262N/D86Y	778
R222Q/S265N/E182C	R219Q/S262N/E179C	779
R222Q/S265N/E182F	R219Q/S262N/E179F	780
R222Q/S265N/E182H	R219Q/S262N/E179H	781
R222Q/S265N/E182I	R219Q/S262N/E179I	782
R222Q/S265N/E182K	R219Q/S262N/E179K	783
R222Q/S265N/E182L	R219Q/S262N/E179L	784
R222Q/S265N/E182M	R219Q/S262N/E179M	785
R222Q/S265N/E182N	R219Q/S262N/E179N	786
R222Q/S265N/E182P	R219Q/S262N/E179P	787
R222Q/S265N/E182Q	R219Q/S262N/E179Q	788
R222Q/S265N/E182R	R219Q/S262N/E179R	789
R222Q/S265N/E182W	R219Q/S262N/E179W	790
R222Q/S265N/E182Y	R219Q/S262N/E179Y	791
R222C/S265N	R219C/S262N	792
R222D/S265N	R219D/S262N	793
R222E/S265N	R219E/S262N	794
R222F/S265N	R219F/S262N	795
R222G/S265N	R219G/S262N	796
R222H/S265N	R219H/S262N	797
R222I/S265N	R219I/S262N	798
R222L/S265N	R219L/S262N	799
R222M/S265N	R219M/S262N	800
R222P/S265N	R219P/S262N	801

<b>Tabla 41. Otras variantes combinadas</b>		
Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
R222S/S265N	R219S/S262N	802
R222T/S265N	R219T/S262N	803
R222V/S265N	R219V/S262N	804
R222W/S265N	R219W/S262N	805
R222Y/S265N	R219Y/S262N	806
R222Q/S265N/L224C	R219Q/S262N/L221C	807
R222Q/S265N/L224D	R219Q/S262N/L221D	808
R222Q/S265N/L224E	R219Q/S262N/L221E	809
R222Q/S265N/L224F	R219Q/S262N/L221F	810
R222Q/S265N/L224H	R219Q/S262N/L221H	811
R222Q/S265N/L224I	R219Q/S262N/L221I	812
R222Q/S265N/L224K	R219Q/S262N/L221K	813
R222Q/S265N/L224M	R219Q/S262N/L221M	814
R222Q/S265N/L224N	R219Q/S262N/L221N	815
R222Q/S265N/L224P	R219Q/S262N/L221P	816
R222Q/S265N/L224Q	R219Q/S262N/L221Q	817
R222Q/S265N/L224R	R219Q/S262N/L221R	818
R222Q/S265N/L224S	R219Q/S262N/L221S	819
R222Q/S265N/L224T	R219Q/S262N/L221T	820
R222Q/S265N/L224W	R219Q/S262N/L221W	821
R222Q/S265N/L224Y	R219Q/S262N/L221Y	822
R222Q/S265C	R219Q/S262C	823
R222Q/S265D	R219Q/S262D	824
R222Q/S265E	R219Q/S262E	825
R222Q/S265F	R219Q/S262F	826
R222Q/S265G	R219Q/S262G	827
R222Q/S265H	R219Q/S262H	828
R222Q/S265I	R219Q/S262I	829
R222Q/S265K	R219Q/S262K	830
R222Q/S265L	R219Q/S262L	831
R222Q/S265P	R219Q/S262P	832
R222Q/S265Q	R219Q/S262Q	833
R222Q/S265R	R219Q/S262R	834
R222Q/S265T	R219Q/S262T	835
R222Q/S265W	R219Q/S262W	836
R222Q/S265Y	R219Q/S262Y	837
R222Q/S265N/H267C	R219Q/S262N/H264C	838
R222Q/S265N/H267D	R219Q/S262N/H264D	839



<b>Tabla 41. Otras variantes combinadas</b>		
Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/H267E	R219Q/S262N/H264E	840
R222Q/S265N/H267F	R219Q/S262N/H264F	841
R222Q/S265N/H267I	R219Q/S262N/H264I	842
R222Q/S265N/H267K	R219Q/S262N/H264K	843
R222Q/S265N/H267L	R219Q/S262N/H264L	844
R222Q/S265N/H267M	R219Q/S262N/H264M	845
R222Q/S265N/H267P	R219Q/S262N/H264P	846
R222Q/S265N/H267R	R219Q/S262N/H264R	847
R222Q/S265N/H267S	R219Q/S262N/H264S	848
R222Q/S265N/H267T	R219Q/S262N/H264T	849
R222Q/S265N/H267V	R219Q/S262N/H264V	850
R222Q/S265N/H267W	R219Q/S262N/H264W	851
R222Q/S265N/H267Y	R219Q/S262N/H264Y	852
R222Q/S265N/S269A	R219Q/S262N/S266A	853
R222Q/S265N/S269C	R219Q/S262N/S266C	854
R222Q/S265N/S269D	R219Q/S262N/S266D	855
R222Q/S265N/S269E	R219Q/S262N/S266E	856
R222Q/S265N/S269F	R219Q/S262N/S266F	857
R222Q/S265N/S269G	R219Q/S262N/S266G	858
R222Q/S265N/S269H	R219Q/S262N/S266H	859
R222Q/S265N/S269I	R219Q/S262N/S266I	860
R222Q/S265N/S269K	R219Q/S262N/S266K	861
R222Q/S265N/S269L	R219Q/S262N/S266L	862
R222Q/S265N/S269M	R219Q/S262N/S266M	863
R222Q/S265N/S269N	R219Q/S262N/S266N	864
R222Q/S265N/S269P	R219Q/S262N/S266P	865
R222Q/S265N/S269Q	R219Q/S262N/S266Q	866
R222Q/S265N/S269R	R219Q/S262N/S266R	867
R222Q/S265N/S269T	R219Q/S262N/S266T	868
R222Q/S265N/S269V	R219Q/S262N/S266V	869
R222Q/S265N/S269W	R219Q/S262N/S266W	870
R222Q/S265N/S269Y	R219Q/S262N/S266Y	871
R222Q/S265N/K270A	R219Q/S262N/K267A	872
R222Q/S265N/K270C	R219Q/S262N/K267C	873
R222Q/S265N/K270D	R219Q/S262N/K267D	874
R222Q/S265N/K270E	R219Q/S262N/K267E	875
R222Q/S265N/K270F	R219Q/S262N/K267F	876
R222Q/S265N/K270G	R219Q/S262N/K267G	877

<b>Tabla 41. Otras variantes combinadas</b>		
Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/K270H	R219Q/S262N/K267H	878
R222Q/S265N/K270I	R219Q/S262N/K267I	879
R222Q/S265N/K270L	R219Q/S262N/K267L	880
R222Q/S265N/K270M	R219Q/S262N/K267M	881
R222Q/S265N/K270N	R219Q/S262N/K267N	882
R222Q/S265N/K270P	R219Q/S262N/K267P	883
R222Q/S265N/K270Q	R219Q/S262N/K267Q	884
R222Q/S265N/K270R	R219Q/S262N/K267R	885
R222Q/S265N/K270S	R219Q/S262N/K267S	886
R222Q/S265N/K270T	R219Q/S262N/K267T	887
R222Q/S265N/K270V	R219Q/S262N/K267V	888
R222Q/S265N/K270W	R219Q/S262N/K267W	889
R222Q/S265N/K270Y	R219Q/S262N/K267Y	890
R222Q/S265N/V299A	R219Q/S262N/V296A	891
R222Q/S265N/V299C	R219Q/S262N/V296C	892
R222Q/S265N/V299D	R219Q/S262N/V296D	893
R222Q/S265N/V299E	R219Q/S262N/V296E	894
R222Q/S265N/V299F	R219Q/S262N/V296F	895
R222Q/S265N/V299G	R219Q/S262N/V296G	896
R222Q/S265N/V299H	R219Q/S262N/V296H	897
R222Q/S265N/V299I	R219Q/S262N/V296I	898
R222Q/S265N/V299K	R219Q/S262N/V296K	899
R222Q/S265N/V299L	R219Q/S262N/V296L	900
R222Q/S265N/V299M	R219Q/S262N/V296M	901
R222Q/S265N/V299N	R219Q/S262N/V296N	902
R222Q/S265N/V299P	R219Q/S262N/V296P	903
R222Q/S265N/V299Q	R219Q/S262N/V296Q	904
R222Q/S265N/V299R	R219Q/S262N/V296R	905
R222Q/S265N/V299S	R219Q/S262N/V296S	906
R222Q/S265N/V299T	R219Q/S262N/V296T	907
R222Q/S265N/V299W	R219Q/S262N/V296W	908
R222Q/S265N/V299Y	R219Q/S262N/V296Y	909
R222Q/K14A/R23A	R219Q/K11A/R20A	910
R222Q/K14A/R23A/K374A	R219Q/K11A/R20A/K371A	911
R222Q/R23A/K374A	R219Q/R20A/K371A	912
R222Q/K14A/K374A	R219Q/K11A/K371A	913
S265N/K14A/R23A	S262N/K11A/R20A	914
S265N/K14A/R23A/K374A	S262N/K11A/R20A/K371A	915

**Tabla 41. Otras variantes combinadas**

Sustitución (numeración de Zavialov)	Sustitución (numeración madura)	SEQ ID NO:
S265N/R23A/K374A	S262N/R20A/K371A	916
S265N/K14A/K374A	S262N/K11A/K371A	917

**EJEMPLO 16****EVALUACIÓN CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD ADENOSINA DEAMINASA DE VARIANTES COMBINADAS CON DELECCIÓN DEL DOMINIO PRB DE RHuADA2**

Las variantes combinadas que contenían la mutación K374D (K371D por numeración madura) y deleciones de PRB reemplazadas por el conector (GGGGS)<sub>n</sub>, expuesto en SEQ ID NO: 588-593, se evaluaron para determinar los parámetros cinéticos de la actividad adenosina desaminasa, utilizando el método de ensayo descrito en el Ejemplo 11.A anterior. El primer conjunto de variantes contiene una delección de residuos V102-Q147 (V99-Q144, por numeración madura), reemplazado por el conector (GGGGS)<sub>n</sub> de diversas longitudes (p. ej., n = 1, 2 o 3; expuestas en SEQ ID NO: 588-590), y el segundo conjunto de variantes contiene una delección de los residuos C108-T150 (C105-T147, por numeración madura), reemplazado por el conector (GGGGS)<sub>n</sub> de diversas longitudes (p. ej., n = 1, 2 o 3; expuestas en SEQ ID NO: 591-593). Los parámetros cinéticos se sometieron a prueba a pH 7,6 y los resultados se exponen en la Tabla 42.

Los resultados indican que todos los mutantes de delección del dominio PRB de ADA2 sometidos a prueba siguen teniendo actividad enzimática, y generalmente muestran una  $K_m$  aproximadamente de 5 a 7 veces menor y una eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) 8 a 11 veces mayor a pH 7,6, en comparación con ADA2 WT.

**Tabla 42. Parámetros cinéticos de ADA2 WT y variantes a pH 7.6; [E] = 8.5nM**

Reemplazo (numeración de Zavialov)	Reemplazo (numeración madura)	V <sub>máx</sub> (μM/min)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (1/s)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (1/Ms)
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>1</sub>	43,46	0,89	85,22	95.748
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>2</sub>	44,52	0,87	87,29	100.338
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>3</sub>	43,01	0,82	84,33	102.846
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>1</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	43,1	0,91	84,51	92.532
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>2</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	36,92	0,85	72,39	85.167
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>3</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	38,12	0,77	74,75	97.223

**EJEMPLO 17****EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL (TGI) DE rHuADA2-K374D PEGILADA UTILIZANDO EL MODELO DE TUMOR SINGÉNICO CT26**

Se utilizó el modelo de tumor singénico murino CT26 para evaluar la actividad antitumoral de ADA2.

**A. Modelo de tumor singénico y tratamiento**

A cuarenta y cuatro (44) ratones BALB/c macho se les inocularon por vía subcutánea 5 x 10<sup>6</sup> células tumorales de cáncer de colon murino (CT26, ATCC CRL-2638) a un volumen de inyección de 0,1 mL por animal. El volumen del tumor se determinó utilizando calibradores digitales mediante la medición de la longitud (L) y la anchura (W) de las masas tumorales sólidas. El volumen tumoral (TV) se calculó como:  $(L \times W^2)/2$ . Se permitió que los tumores crecieran y se clasificaron los ratones portadores de tumores hasta que los tumores fueron palpables y se midió que tenían aproximadamente 50-100 mm<sup>3</sup>.

Se preparó rHuADA2-K374D PEGilada (K371D por numeración madura) como se describe en el Ejemplo 8.A, con modificaciones menores para generar una preparación en la que aproximadamente 100% de las moléculas se PEGilaron según lo evaluado por SDS-PAGE. Brevemente, se mezcló una preparación de rHuADA2-K374D (K371D por numeración madura) a 10 mg/mL con PEG-20K lineal (JenKem Technology, Plano, TX; Núm. de Cat. M-SCM-20K) a una razón molar de 1:15 y se incubó primero a 4°C durante 16 horas, y después a 30°C durante 60 min.

Para el tratamiento, los animales se aleatorizaron en cuatro grupos (n = 8/grupo). A continuación, se inyectaron por vía intravenosa (IV) a los ratones que portaban tumores CT26 cada dos días, dosis de 3 mg/kg de peso corporal, 10

mg/kg de peso corporal o 30 mg/kg de peso corporal de PEG-K374D (PEG-K371D por numeración madura) o control del vehículo (solo tampón) cada dos días. El volumen tumoral se midió los días 0 y 8 utilizando la medición con un calibre como se ha descrito anteriormente. El Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Tumoral (TGI) para cada modelo de tumor respectivo se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ TGI} = [1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$$

donde "T<sub>n</sub>" es el volumen tumoral promedio para el grupo de tratamiento el día "n" después de la dosis final de PEG-K374D o control; "T<sub>0</sub>" es el volumen tumoral promedio en ese grupo de tratamiento el día 0, antes del tratamiento; "C<sub>n</sub>" es el volumen tumoral promedio para el grupo de control correspondiente el día "n"; y "C<sub>0</sub>" es el volumen tumoral promedio en el grupo de control el día 0, antes del tratamiento. Se excluyó un ratón del grupo con vehículo debido a una inhibición significativa del crecimiento tumoral.

## B. Resultados

La Tabla 43 presenta los resultados del volumen tumoral promedio y la inhibición del crecimiento tumoral el día 8 en los ratones a los que se había administrado PEG-K374D en comparación con el control con vehículo inyectado. El día 8, el volumen tumoral promedio para el grupo de control con vehículo fue de 446,67 mm<sup>3</sup> (n = 7). Para el grupo al que se habían inyectado 3 mg/kg de PEG-K374D, el volumen tumoral promedio fue de 257,72 mm<sup>3</sup>, lo que indica una inhibición del crecimiento tumoral (TGI) de 50% (n = 8; valor de p = 0,037). Para el grupo al que se habían inyectado 10 mg/kg de PEG-K374D, el volumen tumoral promedio fue de 207,84 mm<sup>3</sup>, que indica un TGI de 63% (n = 8; valor p = 0,0056). Para el grupo al que se habían inyectado 30 mg/kg de PEG-K374D, el volumen tumoral promedio fue de 187,32 mm<sup>3</sup>, que indica un TGI de 68% (n = 8; valor de p = 0,0085). Los resultados muestran que la administración de PEG-K374D produce una inhibición significativa del crecimiento tumoral.

**Tabla 43, Volumen tumoral e inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en ratones administrados con PEG-K374D**

Dosis	Núm. de ratones por grupo	Volumen tumoral promedio (mm <sup>3</sup> )	Inhibición del crecimiento tumoral	Valor p (Prueba t) en comparación con el vehículo
Vehículo	7	446,67	0%	
3 mg/kg	8	257,72	50%	0,037
10 mg/kg	8	207,84	63%	0,0056
30 mg/kg	8	187,32	68%	0,0085

## EJEMPLO 18

### EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL (TGI) DE LA TERAPIA COMBINADA CON rHuADA2 PEGILADA, anti-PD-1 Y anti-CTLA4

El modelo de tumor singénico CT26 murino se utilizó para comparar la actividad antitumoral de la terapia combinada utilizando ADA2 PEGilada con anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA4 inhibidores de punto de control. Los tumores singénicos CT26 se produjeron inyectando 2 x 10<sup>5</sup> células CT26 en un volumen de inyección de 0,05 mL por animal en el músculo peritibial derecho de ratones Balb/C macho. Los ratones portadores de tumores se clasificaron en grupos de tratamiento cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó 150 mm<sup>3</sup>.

Para el tratamiento, los animales se aleatorizaron en 8 grupos (n = 8/grupo) de la siguiente manera: 1) control de vehículo salino, 2) PEG-ADA2-K374D, 3) anticuerpo contra α-CTLA4 (Clon 9D9, Núm. de Cat. BE0164; BioXCell, West Lebanon, NH), 4) anticuerpo contra α-PD-1 (Clon RMP1-14, Núm. de Cat. BE0146; BioXCell, West Lebanon, NH), 5) PEG-ADA2-K374D + α-CTLA4; 6) PEG-K374D + α-PD-1; 7) α-CTLA4 + α-PD-1, u 8) Combo triple (PEG-ADA2-K374D + α-CTLA4 + α-PD-1). PEG-ADA2-K374D se dosificó por vía intravenosa 3 veces por semana a 10 mg/kg, α-CTLA4 se dosificó por vía intraperitoneal quincenal a 4 mg/kg, y α-PD-1 se dosificó por vía intraperitoneal quincenal a 4 mg/kg. La secuencia de dosificación en los grupos combinados fue la siguiente: PEG-ADA2-K374D seguido de α-CTLA4 seguido de α-PD-1.

El volumen del tumor se evaluó dos veces por semana mediante obtención de imágenes por ultrasonido utilizando Vevo2100 (Visual Sonics, Toronto, Canadá) para determinar la inhibición del crecimiento tumoral (TGI). Se anestesiaron los animales utilizando anestesia ligera con isoflurano mientras se medían los volúmenes del tumor. Para la medición del tumor, la región de interés se cubrió con gel de ultrasonido (Parker Laboratories, Fairfield, NJ),

y el cabezal de exploración RMV-716 (profundidad focal = 17,5 mm) se colocó directamente sobre la región de interés. Mientras estaba en modo 2D, se localizó el centro aproximado del tumor, y posteriormente se capturó una imagen (~150 - 200 fotogramas) utilizando el modo 3D. Se analizaron aproximadamente 15-30 fotogramas de 150-200 fotogramas y se calculó el volumen tumoral y se expresó en mm<sup>3</sup>. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó como se describió anteriormente.

Los resultados se presentan en la Tabla 44. La Tabla 44 representa el volumen tumoral promedio por grupo, el día 10 del estudio (SD10), 48 horas después de PEG-ADA2-K374D y 72 horas después de  $\alpha$ -CTLA4 y  $\alpha$ -PD-1, y el intervalo de volumen tumoral de todos los animales en el grupo. También se representa el TGI en comparación con el control con vehículo. Los resultados muestran que PEG-ADA2-K374D,  $\alpha$ -CTLA4 y  $\alpha$ -PD-1 mostraban individualmente actividad de inhibición del crecimiento tumoral, mostrando  $\alpha$ -CTLA4 una mayor reducción del crecimiento tumoral que los otros tratamientos individuales. Los resultados muestran un ligero efecto sinérgico de la terapia combinada de PEG-ADA2-K374D con  $\alpha$ -CTLA4 o  $\alpha$ -PD-1. Se observó un aumento adicional en la inhibición del crecimiento tumoral en la terapia combinada triple. En contraste, la terapia combinada de  $\alpha$ -CTLA4 y  $\alpha$ -PD-1 solo aumentó ligeramente la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento con  $\alpha$ -CTLA4.

Tabla 44. Inhibición del crecimiento tumoral de la terapia combinada			
Tratamiento	Volumen tumoral de grupos promedio, SD10	Intervalo de volumen	TGI
Vehículo	1567,53	1389-1890	---
PEG-ADA2-K374D	1499,11	1213-1594	5%
$\alpha$ -CTLA4	1050,78	860-1232	37%
$\alpha$ -PD-1	1359,2	1131-1616	15%
PEG-ADA2-K374D + $\alpha$ -CTLA4	965,21	731-1207	43%
PEG-ADA2-K374D + $\alpha$ -PD-1	1244,43	687-1539	23%
$\alpha$ -CTLA4 + $\alpha$ -PD-1	993,97	763-1252	41%
Triple Combo	835,77	687-989	52%

## EJEMPLO 19

### DISTRIBUCIÓN DE PEG-ADA2 EN TUMORES PERITIBIALES CT26 U ÓRGANOS NORMALES

Para evaluar la distribución y eliminación de PEG-ADA2-K374D administrada en el microentorno tumoral o en órganos normales, se utilizó la inmunofluorescencia para evaluar la presencia de PEG-ADA2-K374D administrada a ratones. Se marcó PEG-ADA2-K374D a temperatura ambiente durante 60 minutos con DyLight755 Sulfydryl-Reactive Dye (DL755), un flúor cercano al IR, utilizando DyLight 755 Antibody Labelling Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL). Se adquirió albúmina de suero bovino (BSA, 1 mg/ml) marcada con Alexa Fluor 750 (AF 750) de (Life Technology, Carlsbad, CA).

#### A. Distribución en los tumores peritibiales CT26

Los tumores singénicos CT26 se produjeron inyectando  $2 \times 10^5$  células a un volumen de inyección de 0,05 mL por animal en el músculo peritibial derecho de ratones Balb/C macho. Cuando el tamaño tumoral promedio alcanzó 600 mm<sup>3</sup>, los ratones que portaban tumores se clasificaron en 2 grupos (n = 4/grupo) para recibir PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup> a 0,5 mg/kg o BSA<sup>AF750</sup> a 0,5 mg/kg por vía intravenosa. La distribución de PEG-ADA2-K374D marcada con DL755 (PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup>) y BSA marcada con AF 750 (BSA<sup>AF750</sup>) en tumores de ratón se evaluó utilizando el sistema de obtención de imágenes fluorescentes IVIS Caliper con una longitud de onda de excitación de 745 nm y una longitud de onda de emisión de 800 nm (Caliper Life Sciences, Alameda, CA) y se midió la intensidad de la señal con el soporte lógico LivingImage. Las imágenes se capturaron antes de la administración de proteínas marcadas y a los 10 minutos, 2, 6 horas y diariamente después de la administración de las proteínas marcadas.

Los resultados se exponen en la Tabla 45. Las imágenes mostraron una fuerte intensidad fluorescente en el sitio del tumor en todos los grupos de tratamiento. La intensidad fluorescente de las imágenes demostró que PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup> accedía rápidamente al tumor CT26 y alcanzaba la meseta a las 48 horas. Solo 30% de PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup> fue eliminado de los tumores el día 6 después de la inyección de PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup>. En contraste, menos agente de control BSA<sup>AF750</sup> accedió a los tumores, y la intensidad fluorescente se redujo rápidamente. Casi 100% de BSA<sup>AF750</sup> fue eliminado de los tumores el día 6. Por lo tanto, los resultados demuestran que PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup> tiene una alta afinidad por los tumores CT26.

**Tabla 45. Distribución tumoral**

Hora	BSA <sup>AF750</sup> (Intensidad fluorescente)		PEG-ADA2-K374D <sup>DL755</sup> (Intensidad fluorescente)	
-1	7,86E + 08	± 6,92E7	7,80E + 08	± 5,67E7
0,2	2,95E + 09	± 9,69E7	4,52E + 09	± 5,72E8
2	3,92E + 09	± 2,93E8	4,64E + 09	± 6,06E8
6	4,64E + 09	± 7,81E8	6,54E + 09	± 6,44E8
24	3,18E + 09	± 4,88E8	9,48E + 09	± 1,30E9
48	1,94E + 09	± 7,70E7	1,12E + 10	± 8,26E8
72	1,30E + 09	± 1,40E8	8,95E + 09	± 7,40E8
96	9,86E + 08	± 2,98E7	1,07E + 10	± 8,26E8
144	7,78E + 08	± 3,45E7	4,83E + 09	± 5,80E8
168	6,39E + 08	± 7,03E7	3,64E + 09	± 3,10E8
196	6,59E + 08	± 3,42E7	2,68E + 09	± 4,09E8

**B. Comparación de la distribución en ratones que portan tumores CT26 o ratones Balb/C no sometidos a tratamiento previo**

- 5 Para comparar la distribución en ratones no sometidos a tratamiento previo, se generaron ratones portadores de tumores CT26 como se describió anteriormente, y se les administró por vía intravenosa PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup> a 0,5 mg/kg (n = 3). Por separado, los ratones Balb/c no sometidos a tratamiento previo también recibieron PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup> por vía intravenosa a 0,5 mg/kg (n = 4). Los ratones se sacrificaron y se sometieron a perfusión transcardíaca con solución salina normal con heparina 24 horas después de la inyección de PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup>.
- 10 Los tumores de ratones con tumores y los órganos de ratones no sometidos a tratamiento previo se recogieron y se tomaron imágenes con el sistema de obtención de imágenes IVIS, y se midió la intensidad de la señal DL755 con el soporte lógico LivingImage como se describió anteriormente. La intensidad de la señal se normalizó por el peso del órgano tisular.
- 15 Los resultados se exponen en la Tabla 46. La intensidad de la señal de cada órgano se comparó con la intensidad de la señal del tumor, y se estableció como una razón (tumor/órgano). Los resultados mostraron que, en comparación con los otros órganos, la mayor intensidad de señal se observó en el tumor. El hígado y el bazo mostraron una alta intensidad fluorescente, que fue 1,5 veces y 2,1 veces menor, respectivamente, que en el tumor. Otros órganos, tales como el cerebro y el corazón, mostraron baja intensidad de señal con una intensidad de señal 29 y 11 veces menor, respectivamente que el tumor. Por lo tanto, los resultados muestran que PEG-ADA2-K374D<sup>DL755</sup> tiene una menor afinidad por los órganos normales.
- 20

**Tabla 46. Distribución en órganos normales versus tumores**

Órgano	PEG-ADA2-K374D, 24 h (intensidad fluorescente/peso del tejido) - Momento inicial		Intensidad de señal (Tumor versus Órgano)
Pulmón	1,22E + 06	± 1,11E6	5,1
Corazón	5,55E + 05	± 1,88E5	11,2
Hígado	4,02E + 06	± 5,17E5	1,5
Bazo	2,98E + 06	± 7,44E5	2,1
Riñón	8,61E + 05	± 8,23E5	7,2
Colon	9,13E + 05	± 3,01E5	6,8
Cerebro	2,11E + 05	± 1,86E5	29,5
Hueso	1,82E + 06	± 7,04E5	3,4
Tumor	6,22E + 06	± 2,29E6	-

**EJEMPLO 20**

**INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL (TGI) Y EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE rHuADA2-R222Q/S265N PEGILADA UTILIZANDO EL MODELO DE TUMOR SINGÉNICO MH194 + PSC4**

Se utilizó el modelo de tumor singénico MH194 + PSC4 murino para evaluar la eficacia antitumoral de una adenosina desaminasa 2 recombinante PEGilada (ADA2), rHuADA2-R222Q/S265N PEGilada (PEG-R222Q/S265N; PEG-R219Q/S262N por numeración madura). Las células de carcinoma pancreático de ratón MH194 derivan del modelo de ratón genéticamente modificado KrasLSL.G12D/+ p53R172H/+ PdxCretg/+. Las células PSC4 son células estrelladas pancreáticas aisladas e inmortalizadas.

**A. Modelo de tumor singénico**

Se utilizó el modelo de tumor singénico MH194 + PSC4 murino para evaluar la eficacia antitumoral de una adenosina desaminasa 2 recombinante PEGilada (ADA2), rHuADA2-R222Q/S265N PEGilada (PEG-R222Q/S265N; PEG-R219Q/S262N por numeración madura).

Las células PSC4 son células estrelladas pancreáticas aisladas e inmortalizadas. Para generar las células PSC4, se picaron páncreas de ratones C57BL/6 con cuchillas de afeitar y se colocaron en 2 mL de un tampón de digestión que contenía colagenasa P al 0,05%, ADNsa al 0,1% y Pronasa al 0,02% en solución salina equilibrada de Gey (GBSS). Después de dos incubaciones de digestión de 15 minutos a 37°C mezclando cuidadosamente después de cada incubación, la suspensión celular resultante se filtró a través de una malla de nailon de 100 µm, se lavó dos veces en GBSS con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,3% y se resuspendió en 10 ml de GBSS/BSA. Se añadieron ocho mL de Histodenz (Sigma, Núm. de Cat. D2158) a la suspensión celular, y se pipeteó todo el volumen en 6 mL de GBSS/BSA para generar un gradiente de densidad discontinuo. Después de la centrifugación durante 20 minutos a 1.400 g con el freno puesto a cero, las células deseadas se cosecharon de la interfase entre los dos volúmenes de densidad y se lavaron una vez con PBS y una vez con medio DMEM con un suplemento de L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10% y anfotericina B al 1% (DMEM completo). Las células se inmortalizaron utilizando Lenti-SV40 (Capital Biosciences, Núm. de Cat. CIP-0011) empleando el protocolo del fabricante. La línea celular resultante, designada PSC4, se mantuvo en cultivo de tejidos como una monocapa adherente en DMEM completa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células de carcinoma pancreático de ratón MH194 derivan del modelo de ratón genéticamente modificado KrasLSL.G12D/+ p53R172H/+ PdxCretg/+.

Para generar el modelo de tumor singénico MH194 + PSC4, a los ratones (ratones C57BL/6 macho obtenidos a las 4-6 semanas de Taconic Farms y alojados 4/jaula) se les inyectaron 50 µL de suspensión celular que contenía células MH194 parentales junto con 5 x 10<sup>5</sup> PSC4 (5 x 10<sup>6</sup> células totales) intramuscularmente, adyacentes al perostio tibial derecho.

Con posterioridad se inocularon conjuntamente por vía subcutánea a los treinta y nueve (39) ratones macho C57BL/6 5 x 10<sup>6</sup> de una mezcla de células tumorales de cáncer pancreático MH194 murino y células estrelladas pancreáticas PSC4 murinas a 0,1 mL de volumen de inyección por animal. El volumen del tumor se determinó utilizando calibradores digitales mediante la medición de la longitud (L) y la anchura (W) de las masas tumorales sólidas. El volumen tumoral (TV) se calculó como: (L x W<sup>2</sup>)/2. Se permitió que los tumores crecieran y los ratones portadores de tumor se clasificaron para la administración del artículo de prueba cuando los tumores eran palpables y su medida era de aproximadamente 50-100 mm<sup>3</sup>.

Se preparó PEG-R222Q/S265N utilizando métodos similares a los descritos en el Ejemplo 8.A, con modificaciones menores para generar una preparación en la que aproximadamente 100% de las moléculas se PEGilaron según lo evaluado por SDS-PAGE. Brevemente, se mezcló una preparación de rHuADA2-R222Q/S265N (R219Q/S262N por numeración madura) a 10 mg/mL con PEG-20K lineal (JenKem Technology, Plano, TX; Núm. de Cat. M-SCM-20K) a una razón molar 1:15 y se incubó primero a 4°C durante 16 horas, y después a 30°C durante 60 min.

Para el tratamiento, los ratones portadores de tumores MH194 + PSC4 se aleatorizaron en cinco grupos de tratamiento (n = ≤8): control con vehículo (solo tampón) o PEG-R222Q/S265N a cuatro dosis de tratamiento. A los ratones portadores de tumores MH194 + PSC4 se les inyectaron por vía intravenosa (IV) cada dos días, a 0,003 mg/kg de peso corporal, 0,03 mg/kg de peso corporal, 0,3 mg/kg de peso corporal y 3 mg/kg de peso corporal PEG-R222Q/S265N, o vehículo. El volumen tumoral se midió los días 0 y 8 utilizando la medición de calibre como se ha descrito anteriormente. El porcentaje de Inhibición del Crecimiento Tumoral (TGI) para cada modelo de tumor respectivo se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ TGI} = [1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$$

donde "T<sub>n</sub>" es el volumen tumoral promedio para el grupo de tratamiento el día "n" después de la dosis final de PEG-R222Q/S265N o control; "T<sub>0</sub>" es el volumen tumoral promedio en ese grupo de tratamiento el día 0, antes del tratamiento; "C<sub>n</sub>" es el volumen tumoral promedio para el grupo de control correspondiente el día "n"; y "C<sub>0</sub>" es el volumen tumoral promedio en el grupo de control el día 0, antes del tratamiento. El tiempo medio de supervivencia

(MST) (en días) se calculó como el tiempo en el que 50% de los ratones de los grupos individuales alcanzaron uno de los siguientes puntos finales: (1) el volumen tumoral alcanza 2000 mm<sup>3</sup>, (2) el animal pierde > 25% de su peso corporal, o (3) el animal parece moribundo.

5 **B. Resultados**

10 La Tabla 47 expone los resultados del volumen tumoral promedio y la inhibición del crecimiento tumoral el día 11 en los ratones a los que se administrados PEG-R222Q/S265N en comparación con el control con vehículo. El día 11, el volumen tumoral promedio para el grupo de control con vehículo fue de aproximadamente 840 mm<sup>3</sup>. Para el grupo tratado con PEG-R222Q/S265N (0,003 mg/kg), el volumen tumoral promedio fue de aproximadamente 324 mm<sup>3</sup>, una inhibición del crecimiento tumoral (TGI) de aproximadamente 72% (n = 8; p = 0,036), con respecto al grupo de control, lo que demuestra que la administración de PEG-R222Q/S265N produce una inhibición significativa del crecimiento tumoral.

15 La Tabla 48 expone los resultados del tiempo medio de supervivencia de los ratones a los que se administró PEG-R222Q/S265N, con respecto al grupo de control con vehículo. Todos los ratones del grupo de control murieron entre el día 13 y el día 36, lo que dio como resultado una mediana de tiempo de supervivencia (MST) de 27 días. Cinco de los ocho ratones a los que se había inyectado PEG-R222Q/S265N (a la dosis de 0,003 mg/kg) sobrevivieron más de 41 días, con un MST de 46 días para los ratones tratados con PEG-R222Q/S265N, a la dosis de 0,003 mg/kg. Los resultados indican que la administración de PEG-R222Q/S265N prolonga significativamente la supervivencia en ratones con tumores MH194 + PSC4.

**Tabla 47. Volumen tumoral e inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en ratones a los que se ha administrado PEG-R222Q/S265N**

Dosis (mg/kg)	Núm. de ratones por grupo	Volumen tumoral promedio (mm <sup>3</sup> )	Inhibición del crecimiento tumoral	Valor p (Prueba t) en comparación con el vehículo
Vehículo	7	840,1	0%	
0,003	8	323,9	72%	0,0357
0,03	8	680,45	21%	0,56
0,3	8	700,59	20%	0,6
3	8	678,58	22%	0,53

**Tabla 48, Tiempo medio de supervivencia (MST) en ratones administrados con PEG-R222Q/S265N**

Dosis (mg/kg)	Núm. de ratones por grupo	Tiempo de supervivencia (días)	MST (días)	Aumento de MST	** valor p (Log-rang) en comparación con el vehículo
Vehículo	7	13 - 36	27	-	
0,003	8	22 - 48+	46	70%	0,041
0,03	8	13 - 48+	26	0%	0,72
0,3	8	13 - 41	32,5	20%	0,49
3	8	13 - 48+	23,5	0%	0,83

\*\* Prueba de log-rang (Mantel-Cox)

25 **EJEMPLO 21**

**EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL (TGI) DE LA TERAPIA COMBINADA CON rHuADA2 PEGILADA Y anti-PD-1**

30 Se utilizó el modelo de tumor singénico KLN205 de cáncer de pulmón murino para comparar la actividad antitumoral de ADA2-K374D PEGilada (PEG-K374D; PEG-K371D por numeración madura) combinada con el anticuerpo anti-PD-1 inhibidor de punto de control.

35 Los modelos tumorales singénicos KLN205 se produjeron inyectando en ratones DBA/2 5 x 10<sup>5</sup> células tumorales de cáncer de pulmón murino KLN205 (ATCC CRL-1453), en 0,1 mL de volumen de inyección por animal, por vía subcutánea. Los ratones portadores de tumores se clasificaron en grupos de tratamiento cuando el tamaño tumoral promedio alcanzó aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>.



Para el tratamiento, los animales se aleatorizaron en 4 grupos (n = 8/grupo): 1) control con vehículo salino, 2) PEG-K374D, 3) anticuerpo contra  $\alpha$ -PD-1 (Clon RMP1-14, Núm. de Cat. BE0146; BioXCell, West Lebanon, NH), o 4) PEG-K374D +  $\alpha$ -PD-1. PEG-K374D se dosificó por vía intravenosa quincenal a 0,3 mg/kg, y  $\alpha$ -PD-1 se dosificó por vía intraperitoneal quincenal a 2 mg/kg). La secuencia de dosificación en el grupo combinado fue PEG-K374D seguida inmediatamente por  $\alpha$ -PD-1.

El volumen tumoral se midió dos veces a la semana utilizando la medición con calibre como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 17.A. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) para cada modelo de tumor respectivo se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ TGI} = [1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$$

donde " $T_n$ " es el volumen tumoral promedio para el grupo de tratamiento el día "n" después de la dosis final de PEG-K374D y  $\alpha$ -PD-1 o control; " $T_0$ " es el volumen tumoral promedio en ese grupo de tratamiento el día 0, antes del tratamiento; " $C_n$ " es el volumen tumoral promedio para el grupo de control correspondiente el día "n"; y " $C_0$ " es el volumen tumoral promedio en el grupo de control el día 0, antes del tratamiento.

Los resultados se presentan en la Tabla 49. La Tabla 49 representa el volumen tumoral promedio por grupo, el día 14 del estudio (SD14). Los resultados muestran que PEG-K374D sola,  $\alpha$ -PD-1 sola y la combinación de PEG-K374D +  $\alpha$ -PD-1 inhibieron el crecimiento tumoral, en comparación con el grupo control. PEG-K374D sola mostró una mayor inhibición del crecimiento tumoral que el tratamiento con  $\alpha$ -PD-1 sola o la terapia combinada PEG-K374D +  $\alpha$ -PD-1.

**Tabla 49. Inhibición del crecimiento tumoral de la terapia combinada en el modelo de tumor KLN205**

Dosis	Núm. de ratones por grupo	Volumen tumoral promedio (mm <sup>3</sup> )	Inhibición del crecimiento tumoral	Valor p (Prueba t) en comparación con el vehículo
Vehículo	8	899,41	0%	
PEG-K374D, 0,3 mg/kg	8	264,56	78%	0,013
$\alpha$ -PD-1, 2 mg/kg	8	545,73	43%	0,16
PEG-K374D + $\alpha$ -PD-1	8	417,79	59%	0,053

## EJEMPLO 22

### ELIMINACIÓN DE RADICALES DE PEGILACIÓN LIBRES

Los radicales de PEGilación libres no conjugados se retiraron de las reacciones para variantes de ADA2 PEGiladas utilizando las columnas de resina de Capto Phenyl. El PEG libre se eliminó de las preparaciones de ADA2-K374D PEGilada (PEG-K374D; PEG-K371D por numeración madura) y rHuADA2-R222Q/S265N PEGilada (PEG-R222Q/S265N; PEG-R219Q/S262N por numeración madura), preparadas utilizando el método de PEGilación como se describe en los Ejemplos 8.A y 20.A.

Para eliminar el PEG libre de la preparación de PEG-K374D, se añadió sulfato de amonio 3,5 M a PEG-K374D en PBS para lograr una concentración final de sulfato de amonio 0,70 M en PBS. La PEG-K374D con sulfato de amonio se aplicó a continuación a una columna de resina Capto Phenyl (GE Healthcare) previamente equilibrada con sulfato de amonio 0,70 M en PBS, en una proporción de 5 mg de proteína PEGilada por ml de resina. La resina Capto Phenyl cargada se lavó con 10 volúmenes la columna de sulfato de amonio 0,70 M en PBS. La PEG-K374D se hizo eluir con un gradiente decreciente de sulfato de amonio 0,70 M en PBS a sulfato de amonio 0 M en PBS. Las fracciones eluidas después de una elución en gradiente de 40% (sulfato de amonio 0,42 M en PBS) se agruparon. La fracción de elución agrupada se concentró a una concentración de 1 a 2 mg/mL y se analizó por SDS-PAGE. Se detectó PEG libre utilizando Corona<sup>TM</sup> Charged Aerosol Detector (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA).

Para eliminar el PEG libre de PEG-R222Q/S265N, se añadió sulfato de amonio 3,5 M a PEG-R222Q/S265N en PBS para lograr una concentración final de sulfato de amonio 0,64 M en PBS. La PEG-R222Q/S265N con sulfato de amonio se aplicó a continuación a una columna de resina Capto Phenyl (GE Healthcare) pre-equilibrada con sulfato de amonio 0,64 M en PBS, a una razón de 5 mg de proteína PEGilada por mL de resina. La resina de Capto Phenyl cargada se lavó con 10 volúmenes de columna de sulfato de amonio 0,64 M en PBS. La PEG-R222Q/S265N se hizo eluir con un gradiente decreciente de sulfato de amonio 0,64 M en PBS a sulfato de amonio 0 M en PBS. Las

fracciones eluidas después de un gradiente de elución de 60% (sulfato de amonio 0,256 M en PBS) se agruparon. Una elución adicional con 20 volúmenes de columna de fosfato de sodio 15 mM, pH 7,0 también se agrupó con la primera fracción de elución agrupada. Las fracciones de elución agrupadas se concentraron a una concentración de 1 a 2 mg/mL y se analizaron por SDS-PAGE. Se detectó PEG libre utilizando Corona™ Charged Aerosol Detector (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA).

Los resultados de la eliminación de PEG libre se presentan en la Tabla 50. Los resultados muestran que la cantidad de PEG libre disminuyó de aproximadamente 3,7 mg de PEG libre/mg de proteína, a 0,13 mg de PEG libre/mg de proteína para la preparación de PEG-K374D, y de 3,8 mg de PEG libre/mg de proteína a 0,2 mg de PEG libre/mg de proteína para la preparación de PEG-R222Q/S265N.

<b>Tabla 50. Eliminación de PEG libre de preparaciones de variantes de ADA2 PEGiladas</b>		
	<b>PEG-K374D</b>	<b>PEG-R222Q/S265N</b>
Cantidad de proteína inicial	6 mg	50 mg
PEG libre antes de la columna de resina de Capto Phenyl	3,7 mg de PEG libre/mg de proteína	3,8 mg de PEG libre/mg de proteína
PEG libre después de la columna de resina de Capto Phenyl	0,13 mg de PEG libre/mg de proteína	0,2 mg de PEG libre/mg de proteína
Cantidad de proteína recuperada después de la eliminación de PEG libre	4,5 mg	28,5 mg
Rendimiento de recuperación de proteína después de la eliminación de PEG libre	75%	57%

### **EJEMPLO 23**

#### **FORMULACIONES DE PH20 EN LIPOSOMAS MULTIVESICULARES (MVL)**

Para la administración sistémica, las hialuronidasas, incluidas las hialuronidasas solubles, se pueden preparar en vesículas lipídicas, tales como los liposomas. Son ejemplos de estos los liposomas multivesiculares (MVL). Se prepararon varias formulaciones de liposomas multivesiculares de liberación prolongada de PH20 (MVL-PH20) utilizando el siguiente procedimiento general, véase también la Publicación PCT Internacional Núm. WO 2012/109387 y la Patente de Estados Unidos Núm. 2013/0251786. Las soluciones lipídicas contenían mezclas de varios lípidos neutros, incluyendo triglicéridos (TG), trioleína (C<sub>18:1</sub>), tricaprilina (C<sub>8:0</sub>) y colesterol, y lípidos con cargas positivas y negativas, incluyendo fosfatidilcolinas (PC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC, C<sub>18:1</sub>), dierucoil fosfatidilcolina (DEPC, C<sub>22:1</sub>) y dipalmitoilfosforilglicerol (DPPG, C<sub>16:1</sub>). La concentración total de PC fue hasta 19,8 mM, la concentración de colesterol fue de 30 mM, la concentración de TG fue hasta 3,9 mM y la concentración de DPPG fue 4,2 mM.

#### **A. Generación de formulaciones MVL-PH20**

Se prepararon formulaciones de MVL que contenían un porcentaje en moles variable de DEPC y DOPC (0-100%) y un porcentaje en moles variable de trioleína y tricaprilina (0-100%), DPPG, colesterol y 0,1, 0,25, 0,5, 1 o 2 mg/mL de PH20. En la primera etapa, se combinaron los lípidos en cloroformo (fase oleosa) y PH20 en una primera solución acuosa (fase acuosa) y se emulsionaron para formar una emulsión de agua en aceite, por lo que la PH20 se encapsuló en la monocapa de fosfolípidos. En la segunda etapa, se añadió una segunda solución acuosa y se emulsionó, por lo que se formó una emulsión de agua en aceite en agua. Después de la adición de una segunda alícuota de la segunda solución acuosa, el solvente de cloroformo se evaporó y el producto resultante que contenía liposomas multivesiculares se lavó varias veces en una tercera solución acuosa y se resuspendió a aproximadamente 50% de lipocrito (volumen de partículas empaquetadas) y se almacenó a 2- 8°C.

Las formulaciones ilustrativas se prepararon utilizando un mezclador Mini Vortex o se prepararon a mayor escala utilizando un mezclador Omni (Omni Macro ES, Omni International, Kennesaw, GA). En el último método del mezclador Omni, se emulsionó la solución lipídica en cloroformo (6 mL) a 7.000 rpm durante 8 minutos con un Mezclador Omni con 6 mL de la primera solución acuosa (His-HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5% que contenía concentraciones variables de PH20) produciendo una emulsión de agua en aceite. Una emulsión posterior a 4500 rpm durante 1-3 minutos con 20 mL de una segunda solución acuosa de glucosa al 3,2% que contenía lisina 40 mM, pH 10,0, dio como resultado una segunda emulsión de agua en aceite en agua. La segunda emulsión se transfirió por igual a dos matraces Erlenmeyer y se añadieron otros alícuotas de 50 mL de la segunda solución acuosa a ambos matraces. El cloroformo se eliminó mediante la descarga de nitrógeno sobre la superficie de la emulsión a 35°C. Las partículas MVL que contenían PH20 se lavaron tres veces con 50 mL de una tercera solución acuosa

5 (tampón His-HCl 25 mM, pH 6,0 que contenía NaCl 120 mM) mediante la adición de la solución, mezclando el tubo de centrifuga por inversión y centrifugación a 3500 rpm durante 10 min. a 4°C en una centrifuga de mesa refrigerada. Finalmente, las partículas de MVL se resuspendieron en la tercera solución acuosa para formar una formulación de lipocrito a aproximadamente 50% y se almacenaron refrigeradas a 2-8°C. El procedimiento de Mini Vortex fue similar, utilizando los parámetros establecidos en la Tabla 30.

La Tabla 51 a continuación resume la primera, segunda y tercera soluciones acuosas. La Tabla 51 también resume los volúmenes, las concentraciones de reactivos y otros parámetros de cada etapa del procedimiento de MVL.

<b>Tabla 51. Formulación MVL-PH20 y parámetros del procedimiento</b>					
1ª Solución acuosa	His-HCl 10mM, pH 6,5 con sacarosa al 5%				
2ª Solución acuosa	glucosa al 3,2% que contiene lisina 40 mM, pH 10,0				
3ª Solución acuosa	Tampón His-HCl 25 mM, pH 6,0 que contiene NaCl 120 mM				
1ª Mezcla de emulsión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
PH20 en la 1ª solución acuosa	600 µL		6 mL		
Solución lipídica en cloroformo	600 µL		6 mL		
Volumen total	1,2 mL		12 mL		
1ª Velocidad de emulsión	RPM máximas		7000 RPM		
Hora	8 min		8 min		
Inicio de la concentración de proteína PH20 (actividad)	0,25 mg/ml (30.000 U/ml)	0,5 mg/ml (60.000 U/ml)	0,5 mg/ml (60.000 U/ml)	1,0 mg/ml (120.000 U/ml)	2,0 mg/ml (240.000 U/ml)
PC	15,8-19,8 mM		15,8-19,8 mM		
Colesterol	30 mM		30 mM		
TG	3,75-3,9 mM		3,75-3,9 mM		
DPPG	4,2 mM		4,2 mM		
Pala Tipo 1	No aplicable		Afilada en los laterales		
Pala Tipo 2	No aplicable		Afilada en los laterales y en el interior		
Pala Tipo 3	No aplicable		Plano por todas partes, no afilada		
2ª Mezcla de emulsión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
2ª Solución acuosa	2,5 mL		20 mL		
Volumen total	3,7 mL		32 mL		
Velocidad	RPM máximas		4500 RPM		
Tiempo	15 seg		1-3 min		
Evaporación de solvente	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
2ª Solución acuosa	10 mL		100 mL		
Volumen total	13,7 mL		132 mL		
Velocidad del baño de agua con agitación	100-130 RPM		100-130 RPM		
Tiempo	11 min		15 min		
Temperatura	35°C		35°C		
Lavado, cambio de tampón y resuspensión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
Muestra	Muestra completa		17 mL		
3ª Solución acuosa	50 mL		50 mL		
Volumen total	50 mL		200 mL		

Velocidad de centrifugación	3500 RPM	3500 RPM
Tiempo	10 min	10 min
Numero de lavados	3	3
Volumen de resuspensión	0,3-0,5 ml	3-5 ml
LIPOCRITO	Mezclador Vortex	Mezclador Omni
Volumen de los sedimentos	Varía	Varía
3ª Solución acuosa	Varía	Varía
Velocidad	3500 rpm	3500 rpm
Tiempo (min)	10 min	10 min
Solución + volumen de sedimento	Varía	Varía
% Lipocrito ajustado a	~50%	~50%

### B. Resumen de formulaciones de MVL-PH20 ilustrativas

5 Se prepararon varias formulaciones de MVL-PH20 que contenían razones molares variables de lípidos, PH20 y otros aditivos utilizando los mismos procedimientos generales que se describieron anteriormente. Los diversos aditivos adicionales se incluyeron en la primera solución acuosa para mejorar y preservar la estabilidad de la PH20 encapsulada. Por ejemplo, las formulaciones F68 y F69 contenían cloruro de calcio. La formulación F82 contenía 150 µL de glicerol como una interfase que separaba la fase de cloroformo de 600 µL y la primera fase de solución acuosa de 600 µL. La formulación F83 contenía dextrano 40.000 al 0,1% y PEG-6000 al 0,1%. Las formulaciones 10 F85-F87 contenían oligómeros de ácido hialurónico (HA). Varias formulaciones variaron en sus procedimientos de mezcla/emulsión. Por ejemplo, para la formulación F66, la primera etapa de emulsión se llevó a cabo durante 4 minutos, en lugar de 8 minutos, dando como resultado sedimentos liposomales más pequeños. La formulación F67 se mezcló con una hélice de rotor, en lugar de un Mini Vortex para generar un cizallamiento menor durante el mezclado.

15 La Tabla 52 a continuación expone varias formulaciones de MVL-PH20, que incluyen el número de formulación, las proporciones en % en moles de la formulación de PC (fosfatidilcolina) y TG (triglicérido), la concentración inicial de PH20 en mg/mL, el mezclador utilizado para preparar las emulsiones y cualquier aditivo que se incluyera en la primera solución acuosa.

Formulación	Formulación de PC y TG razón % en moles	Concentración inicial de PH20 mg/mL	Mezclador	Aditivos en la primera solución acuosa
F40	DEPC con trioleína	0,25	Mini Vortex	N/A
F41	DEPC con Trioleína	0	Mini Vortex	N/A
F42	DEPC con Trioleína	0,25 marcada fluorescente	Mini Vortex	PH20 marcada con AlexaFluor 488
F53	DEPC/DOPC 25/75; Trioleína/Tricap 25/75	0,25	Mini Vortex	N/A
F54	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex	N/A
F55	DEPC/DOPC 75/25; Trioleína/Tricap 75/25	0,25	Mini Vortex	N/A
F56	DEPC/DOPC 90/10; Trioleína/Tricap 90/10	0,25	Mini Vortex	N/A
F61	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Omni	N/A

<b>Tabla 52. Formulaciones de MVL con PH20</b>				
Formulación	Formulación de PC y TG razón % en moles	Concentración inicial de PH20 mg/mL	Mezclador	Aditivos en la primera solución acuosa
F66	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex <sup>1</sup>	N/A
F67	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Rueda de rotor	N/A
F68	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex	20 mM CaCl <sub>2</sub>
F69	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex	10 mM CaCl <sub>2</sub>
F70	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,0	Omni	N/A
F71	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Omni	N/A
F72	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Omni	N/A
F73	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Omni	N/A
F74	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	N/A
F75	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	2,0	Omni	N/A
F77 <sup>2</sup>	DEPC/DOPC50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	
F78	DEPC con trioleína	1,0	Omni	N/A
F79	DEPC con trioleína	1,0	Omni	N/A
F80	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	N/A
F81	DEPC con Trioleína	0,5	Omni	N/A
F82	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Mini Vortex	150 µL de Glicerol como interfase
F83	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Dextrano 40.000 al 0.1% PEG-6000 al 0,1%
F84	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni <sup>3</sup>	N/A
F85	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	15 mg/ml HA 74.000
F85R1	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	15 mg/ml HA 74.000
F86	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	50 mg/ml HA 74.000
F87	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Prolina 100 mM
F88	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Arg-HCl 100 mM, pH 6,44
F89	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Sorbitol al 6%

<b>Tabla 52. Formulaciones de MVL con PH20</b>				
Formulación	Formulación de PC y TG razón % en moles	Concentración inicial de PH20 mg/mL	Mezclador	Aditivos en la primera solución acuosa
F90	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Trehalosa al 6%

<sup>1</sup>Tiempo de mezcla de la primera emulsión más corto (4 min)  
<sup>2</sup>Se utiliza colesterol derivado de animales en lugar de colesterol derivado de plantas en la solución lipídica  
<sup>3</sup>Tiempo de mezcla de la primera emulsión más corto (4 min) y tiempo de mezcla de la segunda emulsión más corto (30 segundos)

**EJEMPLO 24****5 RESUMEN TABULAR DE VARIANTES DE ADA2 ILUSTRATIVAS Y REGIÓN DE LA PROTEÍNA MODIFICADA**

La Tabla 53 proporciona un resumen de los polipéptidos de ADA2 variantes ilustrados en la presente memoria. La tabla proporciona la posición de modificación basada en la numeración de secuencias de Zavialov y maduras, y un SEQ ID NO: ilustrativo de una proteína variante de ADA2 que contiene tal modificación. Se entiende que se pueden combinar modificaciones y que se contemplan variantes adicionales. Los residuos de aminoácido indicados generalmente se pueden reemplazar por sustituciones conservativas de aminoácidos (véase, p. ej., la Tabla 3), excepto en casos, tales como la hiperglicosilación en la que una sustitución conservativa no creará un sitio de glicosilación. Por lo tanto, por ejemplo, se puede reemplazar N por Q o H. Se proporcionan polipéptidos de ADA2 variantes que comprenden cada una de las modificaciones indicadas. Entre estos se incluyen los polipéptidos cuya secuencia es referida con un identificador de secuencia. También se proporcionan combinaciones de cualquiera de las modificaciones. También se proporcionan dímeros de variantes de ADA2 modificados, que incluyen homodímeros y heterodímeros. También se proporcionan multímeros de las variantes. También se proporcionan productos conjugados que contienen las variantes y multímeros y dímeros, como son los métodos de tratamiento, los usos para el tratamiento, las combinaciones y las composiciones farmacéuticas como se describe en la presente memoria. La última columna identifica la región o dominio de la modificación, o la actividad que confiere la modificación. En general, las mutaciones, por ejemplo, aumentan la actividad, disminuyen la unión a la heparina, introducen la glicosilación para interferir en interacciones no deseables y/o aumentar la semivida en suero, interferir o disminuir las interacciones del dominio PRB con las porciones catalíticamente activas de ADA y/o disminuir actividades distintas de la actividad desaminasa, tales como la actividad del factor de crecimiento de ADA2 al interferir en la unión a los receptores que median tales actividades.

Tabla 53. Polipéptidos de ADA2 variantes que comprenden las mutaciones enumeradas			
Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
K14A	K11A	13	Unión a Heparina
K14D	K11D	14	Unión a Heparina
K14E	K11E	15	Unión a Heparina
K16A	K13A	16	Unión a Heparina
K16D	K13D	17	Unión a Heparina
K16E	K13E	18	Unión a Heparina
K374A	K371A	19	Unión a Heparina
K374D	K371D	20	Unión a Heparina
K374E	K371E	21	Unión a Heparina
K375A	K372A	22	Unión a Heparina
K375D	K372D	23	Unión a Heparina
K375E	K372E	24	Unión a Heparina
K455A	K452A	25	Unión a Heparina
K455D	K452D	26	Unión a Heparina
K455E	K452E	27	Unión a Heparina
R23A	R20A	28	Unión a Heparina
R23D	R20D	29	Unión a Heparina
R23E	R20E	30	Unión a Heparina
R369A	R366A	31	Unión a Heparina
R369D	R366D	32	Unión a Heparina
R369E	R366E	33	Unión a Heparina
H267A	H264A	34	Sitio Activo
H267Q	H264Q	35	Sitio Activo
H267N	H264N	36	Sitio Activo

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
H267G	H264G	37	Sitio Activo
R222K	R219K	38	Sitio Activo
R222Q	R219Q	39	Sitio Activo
R222N	R219N	40	Sitio Activo
R222A	R219A	41	Sitio Activo
L224A	L221A	42	Sitio Activo
L224V	L221V	43	Sitio Activo
L224G	L221G	44	Sitio Activo
E182D	E179D	45	Sitio Activo
E182A	E179A	46	Sitio Activo
E182S	E179S	47	Sitio Activo
E182T	E179T	48	Sitio Activo
E182V	E179V	49	Sitio Activo
E182G	E179G	50	Sitio Activo
S265A	S262A	51	Sitio Activo
S265V	S262V	52	Sitio Activo
S265M	S262M	53	Sitio Activo
S265N	S262N	54	Sitio Activo
K14A/R23A	K11A/R20A	55	Combinación
K14A/R23A/K374A	K11A/R20A/K371A	56	Combinación
R23A/K374A	R20A/K371A	57	Combinación
K14A/K374A	K11A/K371A	58	Combinación
S265N/K374D	S262N/K371D	59	Combinación
S265N/K374E	S262N/K371E	60	Combinación



(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
S265N/R23E	S262N/R20E	61	Combinación
S265N/R23E /K374D	S262N/R20E /K371D	62	Combinación
S265N/R23E /K374E	S262N/R20E /K371E	63	Combinación
K29A	K26A	71	Unión a Heparina
K29D	K26D	72	Unión a Heparina
K29E	K26E	73	Unión a Heparina
R220A	R217A	74	Unión a Heparina
R220D	R217D	75	Unión a Heparina
R220E	R217E	76	Unión a Heparina
K261A	K258A	77	Unión a Heparina
K261D	K258D	78	Unión a Heparina
K261E	K258E	79	Unión a Heparina
R280A	R277A	80	Unión a Heparina
R280D	R277D	81	Unión a Heparina
R280E	R277E	82	Unión a Heparina
R286A	R283A	83	Unión a Heparina
R286D	R283D	84	Unión a Heparina
R286E	R283E	85	Unión a Heparina
K312A	K309A	86	Unión a Heparina
K312D	K309D	87	Unión a Heparina
K312E	K309E	88	Unión a Heparina
K320A	K317A	89	Unión a Heparina
K320D	K317D	90	Unión a Heparina
K320E	K317E	91	Unión a Heparina

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
K324A	K321A	92	Unión a Heparina
K324D	K321D	93	Unión a Heparina
K324E	K321E	94	Unión a Heparina
R355A	R352A	95	Unión a Heparina
R355D	R352D	96	Unión a Heparina
R355E	R352E	97	Unión a Heparina
R444A	R441A	98	Unión a Heparina
R444D	R441D	99	Unión a Heparina
R444E	R441E	100	Unión a Heparina
K447A	K444A	101	Unión a Heparina
K447D	K444D	102	Unión a Heparina
K447E	K444E	103	Unión a Heparina
K464A	K461A	104	Unión a Heparina
K464D	K461D	105	Unión a Heparina
K464E	K461E	106	Unión a Heparina
K472A	K469A	107	Unión a Heparina
K472D	K469D	108	Unión a Heparina
K472E	K469E	109	Unión a Heparina
K473A	K470A	110	Unión a Heparina
K473D	K470D	111	Unión a Heparina
K473E	K470E	112	Unión a Heparina
D89A	D86A	113	Sitio Activo
D89C	D86C	114	Sitio Activo
D89E	D86E	115	Sitio Activo

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
D89F	D86F	116	Sitio Activo
D89G	D86G	117	Sitio Activo
D89H	D86H	118	Sitio Activo
D89I	D86I	119	Sitio Activo
D89K	D86K	120	Sitio Activo
D89L	D86L	121	Sitio Activo
D89M	D86M	122	Sitio Activo
D89N	D86N	123	Sitio Activo
D89P	D86P	124	Sitio Activo
D89Q	D86Q	125	Sitio Activo
D89R	D86R	126	Sitio Activo
D89S	D86S	127	Sitio Activo
D89T	D86T	128	Sitio Activo
D89V	D86V	129	Sitio Activo
D89W	D86W	130	Sitio Activo
D89Y	D86Y	131	Sitio Activo
E182C	E179C	132	Sitio Activo
E182F	E179F	133	Sitio Activo
E182H	E179H	134	Sitio Activo
E182I	E179I	135	Sitio Activo
E182K	E179K	136	Sitio Activo
E182L	E179L	137	Sitio Activo
E182M	E179M	138	Sitio Activo
E182N	E179N	139	Sitio Activo

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
E 182P	E 179P	140	Sitio Activo
E 182Q	E 179Q	141	Sitio Activo
E 182R	E 179R	142	Sitio Activo
E 182W	E 179W	143	Sitio Activo
E 182Y	E 179Y	144	Sitio Activo
R 222C	R 219C	145	Sitio Activo
R 222D	R 219D	146	Sitio Activo
R 222E	R 219E	147	Sitio Activo
R 222F	R 219F	148	Sitio Activo
R 222G	R 219G	149	Sitio Activo
R 222H	R 219H	150	Sitio Activo
R 222I	R 219I	151	Sitio Activo
R 222L	R 219L	152	Sitio Activo
R 222M	R 219M	153	Sitio Activo
R 222P	R 219P	154	Sitio Activo
R 222S	R 219S	155	Sitio Activo
R 222T	R 219T	156	Sitio Activo
R 222V	R 219V	157	Sitio Activo
R 222W	R 219W	158	Sitio Activo
R 222Y	R 219Y	159	Sitio Activo
L 224C	L 221C	160	Sitio Activo
L 224D	L 221D	161	Sitio Activo
L 224E	L 221E	162	Sitio Activo
L 224F	L 221F	163	Sitio Activo

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
L224H	L221H	164	Sitio Activo
L224I	L221I	165	Sitio Activo
L224K	L221K	166	Sitio Activo
L224M	L221M	167	Sitio Activo
L224N	L221N	168	Sitio Activo
L224P	L221P	169	Sitio Activo
L224Q	L221Q	170	Sitio Activo
L224R	L221R	171	Sitio Activo
L224S	L221S	172	Sitio Activo
L224T	L221T	173	Sitio Activo
L224W	L221W	174	Sitio Activo
L224Y	L221Y	175	Sitio Activo
S265C	S262C	176	Sitio Activo
S265D	S262D	177	Sitio Activo
S265E	S262E	178	Sitio Activo
S265F	S262F	179	Sitio Activo
S265G	S262G	180	Sitio Activo
S265H	S262H	181	Sitio Activo
S265I	S262I	182	Sitio Activo
S265K	S262K	183	Sitio Activo
S265L	S262L	184	Sitio Activo
S265P	S262P	185	Sitio Activo
S265Q	S262Q	186	Sitio Activo
S265R	S262R	187	Sitio Activo

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
S265T	S262T	188	Sitio Activo
S265W	S262W	189	Sitio Activo
S265Y	S262Y	190	Sitio Activo
H267C	H264C	191	Sitio Activo
H267D	H264D	192	Sitio Activo
H267E	H264E	193	Sitio Activo
H267F	H264F	194	Sitio Activo
H267I	H264I	195	Sitio Activo
H267K	H264K	196	Sitio Activo
H267L	H264L	197	Sitio Activo
H267M	H264M	198	Sitio Activo
H267P	H264P	199	Sitio Activo
H267R	H264R	200	Sitio Activo
H267S	H264S	201	Sitio Activo
H267T	H264T	202	Sitio Activo
H267V	H264V	203	Sitio Activo
H267W	H264W	204	Sitio Activo
H267Y	H264Y	205	Sitio Activo
S269A	S266A	206	Sitio Activo
S269C	S266C	207	Sitio Activo
S269D	S266D	208	Sitio Activo
S269E	S266E	209	Sitio Activo
S269F	S266F	210	Sitio Activo
S269G	S266G	211	Sitio Activo

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
S269H	S266H	212	Sitio Activo
S269I	S266I	213	Sitio Activo
S269K	S266K	214	Sitio Activo
S269L	S266L	215	Sitio Activo
S269M	S266M	216	Sitio Activo
S269N	S266N	217	Sitio Activo
S269P	S266P	218	Sitio Activo
S269Q	S266Q	219	Sitio Activo
S269R	S266R	220	Sitio Activo
S269T	S266T	221	Sitio Activo
S269V	S266V	222	Sitio Activo
S269W	S266W	223	Sitio Activo
S269Y	S266Y	224	Sitio Activo
K270A	K267A	225	Sitio Activo
K270C	K267C	226	Sitio Activo
K270D	K267D	227	Sitio Activo
K270E	K267E	228	Sitio Activo
K270F	K267F	229	Sitio Activo
K270G	K267G	230	Sitio Activo
K270H	K267H	231	Sitio Activo
K270I	K267I	232	Sitio Activo
K270L	K267L	233	Sitio Activo
K270M	K267M	234	Sitio Activo
K270N	K267N	235	Sitio Activo

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
K270P	K267P	236	Sitio Activo
K270Q	K267Q	237	Sitio Activo
K270R	K267R	238	Sitio Activo
K270S	K267S	239	Sitio Activo
K270T	K267T	240	Sitio Activo
K270V	K267V	241	Sitio Activo
K270W	K267W	242	Sitio Activo
K270Y	K267Y	243	Sitio Activo
V299A	V296A	244	Sitio Activo
V299C	V296C	245	Sitio Activo
V299D	V296D	246	Sitio Activo
V299E	V296E	247	Sitio Activo
V299F	V296F	248	Sitio Activo
V299G	V296G	249	Sitio Activo
V299H	V296H	250	Sitio Activo
V299I	V296I	251	Sitio Activo
V299K	V296K	252	Sitio Activo
V299L	V296L	253	Sitio Activo
V299M	V296M	254	Sitio Activo
V299N	V296N	255	Sitio Activo
V299P	V296P	256	Sitio Activo
V299Q	V296Q	257	Sitio Activo
V299R	V296R	258	Sitio Activo
V299S	V296S	259	Sitio Activo



(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
V299T	V296T	260	Sitio Activo
V299W	V296W	261	Sitio Activo
V299Y	V296Y	262	Sitio Activo
R222Q/K374E	R219Q/K371E	263	Combinación
R222Q/K374D	R219Q/K371D	264	Combinación
R222Q/R23E	R219Q/R20E	265	Combinación
R222Q/K374E/R23E	R219Q/K371E/R20E	266	Combinación
R222Q/K374D/R23E	R219Q/K371D/R20E	267	Combinación
R222Q/S265N/K374E	R219Q/S262N/K371E	268	Combinación
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	269	Combinación
R222Q/S265N/R23E	R219Q/S262N/R20E	270	Combinación
R222Q/S265N/K374E/R23E	R219Q/S262N/K371E/R20E	271	Combinación
R222Q/S265N/K374D/R23E	R219Q/S262N/K371D/R20E	272	Combinación
R222Q/S265N	R219Q/S262N	273	Combinación
S3_I4insNAS	Ins(NAS) <sub>1</sub>	274	Hiperglicosilación
R23N/V25S	R20N/V22S	275	Hiperglicosilación
K374N/D376S	K371N/D373S	276	Hiperglicosilación
K375N/I377S	K372N/I374S	277	Hiperglicosilación
T406N/H408S	T403N/H405S	278	Hiperglicosilación
G407N/P409S	G404N/P406S	279	Hiperglicosilación
C108_T150delins(G) <sub>h</sub>	C105_T147delins(G) <sub>h</sub>	280	Delección PRB
C108_T150delins(G) <sub>h</sub> s	C105_T147delins(G) <sub>h</sub> s	281	Delección PRB
C108_T150delins(G) <sub>h</sub> o	C105_T147delins(G) <sub>h</sub> o	282	Delección PRB
C108_T150delins(G) <sub>h</sub> r	C105_T147delins(G) <sub>h</sub> r	283	Delección PRB

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
C108_T150delins(G) <sub>3</sub>	C105_T147delins(G) <sub>3</sub>	284	Delección PRB
C108_T150delins(G) <sub>3</sub>	C105_T147delins(G) <sub>3</sub>	285	Delección PRB
N101_N159del	N98_N156del	548	Delección PRB
C108_E151del	C105_E148del	549	Delección PRB
C108_T150del	C105_T147del	550	Delección PRB
R128N/P129A	R125N/P126A	552	Hiperglicosilación PRB
S130N/K132S	S127N/K129S	553	Hiperglicosilación PRB
P129N/E131T	P126N/E128T	554	Hiperglicosilación PRB
R115N/I17T	R112N/I14T	555	Hiperglicosilación PRB
I137N/L138C/L139T	I134N/L135C/L136T	556	Hiperglicosilación PRB
I137N/L138S/L139T	I134N/L135S/L136T	557	Hiperglicosilación PRB
R145N/Q147S	R142N/Q144S	558	Hiperglicosilación PRB
E140N/Y142T	E137N/Y139T	559	Hiperglicosilación PRB
P114N/G116S	P111N/G113S	560	Hiperglicosilación PRB
F122S	F119S	561	Interacción PRB-ADA
F122K	F119K	562	Interacción PRB-ADA
Y227R	Y224R	563	Interacción PRB-ADA
Y227N	Y224N	564	Interacción PRB-ADA

(continuación)

numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
Y194S	Y191S	565	Interacción PRB-ADA
Y194D	Y191D	566	Interacción PRB-ADA
F186K	F183K	567	Interacción PRB-ADA
Y194D/Y227R	Y191D/Y224R	568	Interacción PRB-ADA
F112S	F109S	569	Interacción PRB-ADA
F112A	F109A	570	Interacción PRB-ADA
R121D	R118D	571	Interacción PRB-ADA
R121A	R118A	572	Interacción PRB-ADA
Y142T	Y139T	573	PRB-ADA
			Interacción
Y142A	Y139A	574	Interacción PRB-ADA
W136S	W133S	575	Interacción PRB-ADA
W136T	W133T	576	Interacción PRB-ADA
P127A	P124A	577	Interacción PRB-ADA
P127S	P124S	578	Interacción PRB-ADA
V102_Q147del	V99_Q144del	579	Delección PRB
V102_Q147delins(GGGGS) <sub>n</sub>	V99_Q144delins(GGGGS) <sub>n</sub>	581	Delección PRB
C108_T150delins(GGGGS) <sub>n</sub>	C105_T147delins(GGGGS) <sub>n</sub>	582	Delección PRB
V102_Q147delins(GGGGS) <sub>h</sub>	V99_Q144delins(GGGGS) <sub>h</sub>	583	Delección PRB
V102_Q147delins(GGGGS) <sub>z</sub>	V99_Q144delins(GGGGS) <sub>z</sub>	584	Delección PRB
V102_Q147delins(GGGGS) <sub>z</sub>	V99_Q144delins(GGGGS) <sub>z</sub>	585	Delección PRB
C108_T150delins(GGGGS) <sub>h</sub>	C105_T147delins(GGGGS) <sub>h</sub>	586	Delección PRB
C108_T150delins(GGGGS) <sub>z</sub>	C105_T147delins(GGGGS) <sub>z</sub>	587	Delección PRB
C108_T150delins(GGGGS) <sub>z</sub>	C105_T147delins(GGGGS) <sub>z</sub>	588	Delección PRB

(continuación)

Numera ción de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numera ción ma dura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	K371D/V99_Q144delins(GCGGS) <sub>1</sub>	589	Combinación con Delección PRB
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>2</sub>	590	Combinación con Delección PRB
K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>3</sub>	591	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>1</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	592	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>2</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	593	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>3</sub>	K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	594	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/S3_I4insNAS	R219Q/S262N/ins(NAS) <sub>1</sub>	596	Combinación con hiperglicosilación
R222Q/S265N/R23N/V25S	R219Q/S262N/R20N/V22S	597	Combinación con hiperglicosilación
R222Q/S265N/K374N/D376S	R219Q/S262N/K371N/D373S	598	Combinación con hiperglicosilación
R222Q/S265N/K375N/I377S	R219Q/S262N/K372N/I374S	599	Combinación con hiperglicosilación
R222Q/S265N/T406N/H408S	R219Q/S262N/T403N/H405S	600	Combinación con hiperglicosilación
R222Q/S265N/G407N/P409S	R219Q/S262N/G404N/P406S	601	Combinación con hiperglicosilación
R222Q/S265N/C108_T150del? 4(GI) <sub>1</sub> s	R219Q/S262N/C105_T147delins(G) <sub>1</sub> s	602	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/C108_T150delins(G) <sub>10</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(G) <sub>10</sub>	603	Combinación con Delección PRB

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R 222Q/S265N/C 108_T15_0delins(G)7	R 219Q/S262N/C 105_T147delins(G)7	604	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/C 108_T15_0delins(G)5	R 219Q/S262N/C 105_T147delins(G)5	605	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/C 108_T15_0delins(G)3	R 219Q/S262N/C 105_T147delins(G)3	606	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/R 128N/P129A	R 219Q/S262N/R 125N/P 126A	607	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/S 130N/K132S	R 219Q/S262N/S 127N/K 129S	608	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/P 129N/E 131T	R 219Q/S262N/P126N/E 128T	609	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/R 115N/I117T	R 219Q/S262N/R 112N/I 114T	610	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/I137N/L138C/L139T	R 219Q/S262N/I134N/L135C/L136T	611	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/I137N/L138S/L139T	R 219Q/S262N/I134N/L135S/L136T	612	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/R 145N/Q147S	R 219Q/S262N/R 142N/Q 144S	613	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/E 140N/Y142T	R 219Q/S262N/E 137N/Y139T	614	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/P 114N/G116S	R 219Q/S262N/P111N/G 113S	615	Combinación con Hiperglicosilación PRB
R 222Q/S265N/F 122S	R 219Q/S262N/F 119 S	616	Combinación con Interacción PRB-ADA
R 222Q/S265N/F 122K	R 219Q/S262N/F 119 K	617	Combinación con Interacción PRB-ADA

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/Y227R	R219Q/S262N/Y224R	618	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/Y227N	R219Q/S262N/Y224N	619	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/Y194S	R219Q/S262N/Y191S	620	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/Y194D	R219Q/S262N/Y191D	621	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/F188K	R219Q/S262N/F183K	622	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/Y194D/Y227R	R219Q/S262N/Y191D/Y224R	623	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/F112S	R219Q/S262N/F109S	624	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/F112A	R219Q/S262N/F109A	625	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/R121D	R219Q/S262N/R118D	626	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/R121A	R219Q/S262N/R118A	627	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/Y142T	R219Q/S262N/Y139T	628	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/Y142A	R219Q/S262N/Y139A	629	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/W136S	R219Q/S262N/W133S	630	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/W136T	R219Q/S262N/W133T	631	Combinación con Interacción PRB-ADA

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/P127A	R219Q/S262N/P124A	632	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/P127S	R219Q/S262N/P124S	633	Combinación con Interacción PRB-ADA
R222Q/S265N/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	R219Q/S262N/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>1</sub>	634	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	R219Q/S262N/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>2</sub>	635	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>3</sub>	636	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/C108_T150delins(GGGGS) <sub>1</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	637	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/C108_T150delins(GGGGS) <sub>2</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	638	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/C108_T150delins(GGGGS) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	639	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	R219Q/S262N/K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>1</sub>	640	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	R219Q/S262N/K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>2</sub>	641	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>3</sub>	642	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>1</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>1</sub>	643	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>2</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>2</sub>	644	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>3</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>3</sub>	645	Combinación con Delección PRB

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
K374D/C108_T150delins(G)n	K371D/C105_T147delins(G)n	646	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(G)hs	K371D/C105_T147delins(G)hs	647	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(G)ho	K371D/C105_T147delins(G)ho	648	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(G)hr	K371D/C105_T147delins(G)hr	649	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(G)js	K371D/C105_T147delins(G)js	650	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(G)ks	K371D/C105_T147delins(G)ks	651	Combinación con Delección PRB
K374D/M102_Q147delins(GGGGS)n	K371D/M99_Q144delins(GGGGS)n	652	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150delins(GGGGS)n	K371D/C105_T147delins(GGGGS)n	653	Combinación con Delección PRB
K374D/N101_N159del	K371D/N98_N156del	654	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_E151del	K371D/C105_E148del	655	Combinación con Delección PRB
K374D/C108_T150del	K371D/C105_T147del	656	Combinación con Delección PRB
K374D/M102_Q147del	K371D/M99_Q144del	657	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/C108_T150delins(G)n	R219Q/S262N/C105_T147delins(G)n	658	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K14A	R219Q/S262N/K11A	659	Combinación
R222Q/S265N/K14D	R219Q/S262N/K11D	660	Combinación



(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R 222Q/S265N/K14E	R219Q/S262N/K11E	661	Combinación
R 222Q/S265N/K16A	R219Q/S262N/K13A	662	Combinación
R 222Q/S265N/K16D	R219Q/S262N/K13D	663	Combinación
R 222Q/S265N/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>n</sub>	R219Q/S262N/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>n</sub>	664	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/C108_T150delins(GGGGS) <sub>n</sub>	R219Q/S262N/C105_T147delins(GGGGS) <sub>n</sub>	665	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/N101_N159del	R219Q/S262N/N98_N156del	666	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/C108_E151del	R219Q/S262N/C105_E148del	667	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/C108_T150del	R219Q/S262N/C105_T147del	668	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/V102_Q147del	R219Q/S262N/V99_Q144del	669	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>n</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>n</sub>	670	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>h</sub> s	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>h</sub> s	671	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>h</sub> o	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>h</sub> o	672	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>h</sub> r	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>h</sub> r	673	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>h</sub> s	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>h</sub> s	674	Combinación con Delección PRB
R 222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(G) <sub>h</sub> o	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(G) <sub>h</sub> o	675	Combinación con Delección PRB

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/K374D/V102_Q147delins(GGGGS) <sub>n</sub>	R219Q/S262N/K371D/V99_Q144delins(GGGGS) <sub>n</sub>	676	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/C108_T150delins(GGGGS) <sub>n</sub>	R219Q/S262N/K371D/C105_T147delins(GGGGS) <sub>n</sub>	677	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/N101_N159del	R219Q/S262N/K371D/N98_N156del	678	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/C108_E151del	R219Q/S262N/K371D/C105_E148del	679	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del	R219Q/S262N/K371D/C105_T147del	680	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K374D/V102_Q147del	R219Q/S262N/K371D/V99_Q144del	681	Combinación con Delección PRB
R222Q/S265N/K16E	R219Q/S262N/K13E	682	Combinación
R222Q/S265N/K374A	R219Q/S262N/K371A	683	Combinación
R222Q/S265N/K375A	R219Q/S262N/K372A	684	Combinación
R222Q/S265N/K375D	R219Q/S262N/K372D	685	Combinación
R222Q/S265N/K375E	R219Q/S262N/K372E	686	Combinación
R222Q/S265N/K455A	R219Q/S262N/K452A	687	Combinación
R222Q/S265N/K455D	R219Q/S262N/K452D	688	Combinación
R222Q/S265N/K455E	R219Q/S262N/K452E	689	Combinación
R222Q/S265N/R23A	R219Q/S262N/R20A	690	Combinación
R222Q/S265N/R23D	R219Q/S262N/R20D	691	Combinación
R222Q/S265N/R369A	R219Q/S262N/R366A	692	Combinación
R222Q/S265N/R369D	R219Q/S262N/R366D	693	Combinación
R222Q/S265N/R369E	R219Q/S262N/R366E	694	Combinación
R222Q/S265N/H267A	R219Q/S262N/H264A	695	Combinación

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R 222Q/S265N/H267Q	R 219Q/S262N/H264Q	696	Combinación
R 222Q/S265N/H267N	R 219Q/S262N/H264N	697	Combinación
R 222Q/S265N/H267G	R 219Q/S262N/H264G	698	Combinación
R 222K/S265N	R 219K/S262N	699	Combinación
R 222N/S265N	R 219N/S262N	700	Combinación
R 222A/S265N	R 219A/S262N	701	Combinación
R 222Q/S265N/L224A	R 219Q/S262N/L221A	702	Combinación
R 222Q/S265N/L224V	R 219Q/S262N/L221V	703	Combinación
R 222Q/S265N/L224G	R 219Q/S262N/L221G	704	Combinación
R 222Q/S265N/E182D	R 219Q/S262N/E179D	705	Combinación
R 222Q/S265N/E182A	R 219Q/S262N/E179A	706	Combinación
R 222Q/S265N/E182S	R 219Q/S262N/E179S	707	Combinación
R 222Q/S265N/E182T	R 219Q/S262N/E179T	708	Combinación
R 222Q/S265N/E182V	R 219Q/S262N/E179V	709	Combinación
R 222Q/S265N/E182G	R 219Q/S262N/E179G	710	Combinación
R 222Q/S265A	R 219Q/S262A	711	Combinación
R 222Q/S265V	R 219Q/S262V	712	Combinación
R 222Q/S265M	R 219Q/S262M	713	Combinación
R 222Q/S265N/K14A/R23A	R 219Q/S262N/K11A/R20A	714	Combinación
R 222Q/S265N/K14A/R23A/K374A	R 219Q/S262N/K11A/R20A/K371A	715	Combinación
R 222Q/S265N/R23A/K374A	R 219Q/S262N/R20A/K371A	716	Combinación
R 222Q/S265N/K14A/K374A	R 219Q/S262N/K11A/K371A	717	Combinación
R 222Q/S265N/K29A	R 219Q/S262N/K26A	718	Combinación
R 222Q/S265N/K29D	R 219Q/S262N/K26D	719	Combinación

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/K29E	R219Q/S262N/K26E	720	C om binación
R222Q/S265N/R220A	R219Q/S262N/R217A	721	C om binación
R222Q/S265N/R220D	R219Q/S262N/R217D	722	C om binación
R222Q/S265N/R220E	R219Q/S262N/R217E	723	C om binación
R222Q/S265N/K261A	R219Q/S262N/K258A	724	C om binación
R222Q/S265N/K261D	R219Q/S262N/K258D	725	C om binación
R222Q/S265N/K261E	R219Q/S262N/K258E	726	C om binación
R222Q/S265N/R280A	R219Q/S262N/R277A	727	C om binación
R222Q/S265N/R280D	R219Q/S262N/R277D	728	C om binación
R222Q/S265N/R280E	R219Q/S262N/R277E	729	C om binación
R222Q/S265N/R286A	R219Q/S262N/R283A	730	C om binación
R222Q/S265N/R286D	R219Q/S262N/R283D	731	C om binación
R222Q/S265N/R286E	R219Q/S262N/R283E	732	C om binación
R222Q/S265N/K312A	R219Q/S262N/K309A	733	C om binación
R222Q/S265N/K312D	R219Q/S262N/K309D	734	C om binación
R222Q/S265N/K312E	R219Q/S262N/K309E	735	C om binación
R222Q/S265N/K320A	R219Q/S262N/K317A	736	C om binación
R222Q/S265N/K320D	R219Q/S262N/K317D	737	C om binación
R222Q/S265N/K320E	R219Q/S262N/K317E	738	C om binación
R222Q/S265N/K324A	R219Q/S262N/K321A	739	C om binación
R222Q/S265N/K324D	R219Q/S262N/K321D	740	C om binación
R222Q/S265N/K324E	R219Q/S262N/K321E	741	C om binación
R222Q/S265N/R355A	R219Q/S262N/R352A	742	C om binación
R222Q/S265N/R355D	R219Q/S262N/R352D	743	C om binación

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/R355E	R219Q/S262N/R352E	744	Combinación
R222Q/S265N/R444A	R219Q/S262N/R441A	745	Combinación
R222Q/S265N/R444D	R219Q/S262N/R441D	746	Combinación
R222Q/S265N/R444E	R219Q/S262N/R441E	747	Combinación
R222Q/S265N/K447A	R219Q/S262N/K444A	748	Combinación
R222Q/S265N/K447D	R219Q/S262N/K444D	749	Combinación
R222Q/S265N/K447E	R219Q/S262N/K444E	750	Combinación
R222Q/S265N/K464A	R219Q/S262N/K461A	751	Combinación
R222Q/S265N/K464D	R219Q/S262N/K461D	752	Combinación
R222Q/S265N/K464E	R219Q/S262N/K461E	753	Combinación
R222Q/S265N/K472A	R219Q/S262N/K469A	754	Combinación
R222Q/S265N/K472D	R219Q/S262N/K469D	755	Combinación
R222Q/S265N/K472E	R219Q/S262N/K469E	756	Combinación
R222Q/S265N/K473A	R219Q/S262N/K470A	757	Combinación
R222Q/S265N/K473D	R219Q/S262N/K470D	758	Combinación
R222Q/S265N/K473E	R219Q/S262N/K470E	759	Combinación
R222Q/S265N/D89A	R219Q/S262N/D86A	760	Combinación
R222Q/S265N/D89C	R219Q/S262N/D86C	761	Combinación
R222Q/S265N/D89E	R219Q/S262N/D86E	762	Combinación
R222Q/S265N/D89F	R219Q/S262N/D86F	763	Combinación
R222Q/S265N/D89G	R219Q/S262N/D86G	764	Combinación
R222Q/S265N/D89H	R219Q/S262N/D86H	765	Combinación
R222Q/S265N/D89I	R219Q/S262N/D86I	766	Combinación
R222Q/S265N/D89K	R219Q/S262N/D86K	767	Combinación

(continuación)

numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/D89L	R219Q/S262N/D86L	768	C ombinación
R222Q/S265N/D89M	R219Q/S262N/D86M	769	C ombinación
R222Q/S265N/D89N	R219Q/S262N/D86N	770	C ombinación
R222Q/S265N/D89P	R219Q/S262N/D86P	771	C ombinación
R222Q/S265N/D89Q	R219Q/S262N/D86Q	772	C ombinación
R222Q/S265N/D89R	R219Q/S262N/D86R	773	C ombinación
R222Q/S265N/D89S	R219Q/S262N/D86S	774	C ombinación
R222Q/S265N/D89T	R219Q/S262N/D86T	775	C ombinación
R222Q/S265N/D89V	R219Q/S262N/D86V	776	C ombinación
R222Q/S265N/D89W	R219Q/S262N/D86W	777	C ombinación
R222Q/S265N/D89Y	R219Q/S262N/D86Y	778	C ombinación
R222Q/S265N/E182C	R219Q/S262N/E179C	779	C ombinación
R222Q/S265N/E182F	R219Q/S262N/E179F	780	C ombinación
R222Q/S265N/E182H	R219Q/S262N/E179H	781	C ombinación
R222Q/S265N/E182I	R219Q/S262N/E179I	782	C ombinación
R222Q/S265N/E182K	R219Q/S262N/E179K	783	C ombinación
R222Q/S265N/E182L	R219Q/S262N/E179L	784	C ombinación
R222Q/S265N/E182M	R219Q/S262N/E179M	785	C ombinación
R222Q/S265N/E182N	R219Q/S262N/E179N	786	C ombinación
R222Q/S265N/E182P	R219Q/S262N/E179P	787	C ombinación
R222Q/S265N/E182Q	R219Q/S262N/E179Q	788	C ombinación
R222Q/S265N/E182R	R219Q/S262N/E179R	789	C ombinación
R222Q/S265N/E182W	R219Q/S262N/E179W	790	C ombinación
R222Q/S265N/E182Y	R219Q/S262N/E179Y	791	C ombinación

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R 222C/S 265N	R 219C/S262N	792	C ombinación
R 222D/S 265N	R 219D/S262N	793	C ombinación
R 222E/S 265N	R 219E /S262N	794	C ombinación
R 222F/S2 65N	R 219F/S262N	795	C ombinación
R 222G/S265N	R 219G/S262N	796	C ombinación
R 222H/S 265N	R 219H/S262N	797	C ombinación
R 222I/S265N	R 219I/S262N	798	C ombinación
R 222L/S265N	R 219L/S262N	799	C ombinación
R 222M/S265N	R 219M/S262N	800	C ombinación
R 222P/S 265N	R 219P/S262N	801	C ombinación
R 222S/S 265N	R 219S/S262N	802	C ombinación
R 222T/S2 65N	R 219T/S262N	803	C ombinación
R 222V/S 265N	R 219V/S262N	804	C ombinación
R 222W/S265N	R 219W/S262N	805	C ombinación
R 222Y/S2 65N	R 219Y/S262N	806	C ombinación
R 222Q/S265N/L224C	R 219Q/S262N/L221C	807	C ombinación
R 222Q/S265N/L224D	R 219Q/S262N/L221D	808	C ombinación
R 222Q/S265N/L224E	R 219Q/S262N/L221E	809	C ombinación
R 222Q/S265 N/L224F	R 219Q/S262N/L221 F	810	C ombinación
R 222Q/S265N/L224H	R 219Q/S262N/L221H	811	C ombinación
R 222Q/S265 N/L224I	R 219Q/S262N/L221 I	812	C ombinación
R 222Q/S265N/L224K	R 219Q/S262N/L221 K	813	C ombinación
R 222Q/S265N/L224M	R 219Q/S262N/L221 M	814	C ombinación
R 222Q/S265N/L224N	R 219Q/S262N/L221 N	815	C ombinación

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/L224P	R219Q/S262N/L221P	816	Combinación
R222Q/S265N/L224Q	R219Q/S262N/L221Q	817	Combinación
R222Q/S265N/L224R	R219Q/S262N/L221R	818	Combinación
R222Q/S265N/L224S	R219Q/S262N/L221S	819	Combinación
R222Q/S265N/L224T	R219Q/S262N/L221T	820	Combinación
R222Q/S265N/L224W	R219Q/S262N/L221W	821	Combinación
R222Q/S265N/L224Y	R219Q/S262N/L221Y	822	Combinación
R222Q/S265C	R219Q/S262C	823	Combinación
R222Q/S265D	R219Q/S262D	824	Combinación
R222Q/S265E	R219Q/S262E	825	Combinación
R222Q/S265F	R219Q/S262F	826	Combinación
R222Q/S265G	R219Q/S262G	827	Combinación
R222Q/S265H	R219Q/S262H	828	Combinación
R222Q/S265I	R219Q/S262I	829	Combinación
R222Q/S265K	R219Q/S262K	830	Combinación
R222Q/S265L	R219Q/S262L	831	Combinación
R222Q/S265P	R219Q/S262P	832	Combinación
R222Q/S265Q	R219Q/S262Q	833	Combinación
R222Q/S265R	R219Q/S262R	834	Combinación
R222Q/S265T	R219Q/S262T	835	Combinación
R222Q/S265W	R219Q/S262W	836	Combinación
R222Q/S265Y	R219Q/S262Y	837	Combinación
R222Q/S265N/H267C	R219Q/S262N/H264C	838	Combinación
R222Q/S265N/H267D	R219Q/S262N/H264D	839	Combinación



(continuación)

numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/H267E	R219Q/S262N/H264E	840	C ombinación
R222Q/S265N/H267F	R219Q/S262N/H264F	841	C ombinación
R222Q/S265N/H267I	R219Q/S262N/H264I	842	C ombinación
R222Q/S265N/H267K	R219Q/S262N/H264K	843	C ombinación
R222Q/S265N/H267L	R219Q/S262N/H264L	844	C ombinación
R222Q/S265N/H267M	R219Q/S262N/H264M	845	C ombinación
R222Q/S265N/H267P	R219Q/S262N/H264P	846	C ombinación
R222Q/S265N/H267R	R219Q/S262N/H264R	847	C ombinación
R222Q/S265N/H267S	R219Q/S262N/H264S	848	C ombinación
R222Q/S265N/H267T	R219Q/S262N/H264T	849	C ombinación
R222Q/S265N/H267V	R219Q/S262N/H264V	850	C ombinación
R222Q/S265N/H267W	R219Q/S262N/H264W	851	C ombinación
R222Q/S265N/H267Y	R219Q/S262N/H264Y	852	C ombinación
R222Q/S265N/S269A	R219Q/S262N/S266A	853	C ombinación
R222Q/S265N/S269C	R219Q/S262N/S266C	854	C ombinación
R222Q/S265N/S269D	R219Q/S262N/S266D	855	C ombinación
R222Q/S265N/S269E	R219Q/S262N/S266E	856	C ombinación
R222Q/S265N/S269F	R219Q/S262N/S266F	857	C ombinación
R222Q/S265N/S269G	R219Q/S262N/S266G	858	C ombinación
R222Q/S265N/S269H	R219Q/S262N/S266H	859	C ombinación
R222Q/S265N/S269I	R219Q/S262N/S266I	860	C ombinación
R222Q/S265N/S269K	R219Q/S262N/S266K	861	C ombinación
R222Q/S265N/S269L	R219Q/S262N/S266L	862	C ombinación
R222Q/S265N/S269M	R219Q/S262N/S266M	863	C ombinación

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/S269N	R219Q/S262N/S266N	864	Combinación
R222Q/S265N/S269P	R219Q/S262N/S266P	865	Combinación
R222Q/S265N/S269Q	R219Q/S262N/S266Q	866	Combinación
R222Q/S265N/S269R	R219Q/S262N/S266R	867	Combinación
R222Q/S265N/S269T	R219Q/S262N/S266T	868	Combinación
R222Q/S265N/S269V	R219Q/S262N/S266V	869	Combinación
R222Q/S265N/S269W	R219Q/S262N/S266W	870	Combinación
R222Q/S265N/S269Y	R219Q/S262N/S266Y	871	Combinación
R222Q/S265N/K270A	R219Q/S262N/K267A	872	Combinación
R222Q/S265N/K270C	R219Q/S262N/K267C	873	Combinación
R222Q/S265N/K270D	R219Q/S262N/K267D	874	Combinación
R222Q/S265N/K270E	R219Q/S262N/K267E	875	Combinación
R222Q/S265N/K270F	R219Q/S262N/K267F	876	Combinación
R222Q/S265N/K270G	R219Q/S262N/K267G	877	Combinación
R222Q/S265N/K270H	R219Q/S262N/K267H	878	Combinación
R222Q/S265N/K270I	R219Q/S262N/K267I	879	Combinación
R222Q/S265N/K270L	R219Q/S262N/K267L	880	Combinación
R222Q/S265N/K270M	R219Q/S262N/K267M	881	Combinación
R222Q/S265N/K270N	R219Q/S262N/K267N	882	Combinación
R222Q/S265N/K270P	R219Q/S262N/K267P	883	Combinación
R222Q/S265N/K270Q	R219Q/S262N/K267Q	884	Combinación
R222Q/S265N/K270R	R219Q/S262N/K267R	885	Combinación
R222Q/S265N/K270S	R219Q/S262N/K267S	886	Combinación
R222Q/S265N/K270T	R219Q/S262N/K267T	887	Combinación

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/S265N/K270V	R219Q/S262N/K267V	888	Combinación
R222Q/S265N/K270W	R219Q/S262N/K267W	889	Combinación
R222Q/S265N/K270Y	R219Q/S262N/K267Y	890	Combinación
R222Q/S265N/V299A	R219Q/S262N/V296A	891	Combinación
R222Q/S265N/V299C	R219Q/S262N/V296C	892	Combinación
R222Q/S265N/V299D	R219Q/S262N/V296D	893	Combinación
R222Q/S265N/V299E	R219Q/S262N/V296E	894	Combinación
R222Q/S265N/V299F	R219Q/S262N/V296F	895	Combinación
R222Q/S265N/V299G	R219Q/S262N/V296G	896	Combinación
R222Q/S265N/V299H	R219Q/S262N/V296H	897	Combinación
R222Q/S265N/V299I	R219Q/S262N/V296I	898	Combinación
R222Q/S265N/V299K	R219Q/S262N/V296K	899	Combinación
R222Q/S265N/V299L	R219Q/S262N/V296L	900	Combinación
R222Q/S265N/V299M	R219Q/S262N/V296M	901	Combinación
R222Q/S265N/V299N	R219Q/S262N/V296N	902	Combinación
R222Q/S265N/V299P	R219Q/S262N/V296P	903	Combinación
R222Q/S265N/V299Q	R219Q/S262N/V296Q	904	Combinación
R222Q/S265N/V299R	R219Q/S262N/V296R	905	Combinación
R222Q/S265N/V299S	R219Q/S262N/V296S	906	Combinación
R222Q/S265N/V299T	R219Q/S262N/V296T	907	Combinación
R222Q/S265N/V299W	R219Q/S262N/V296W	908	Combinación
R222Q/S265N/V299Y	R219Q/S262N/V296Y	909	Combinación
R222Q/K14A/R23A	R219Q/K11A/R20A	910	Combinación
R222Q/K14A/R23A/K374A	R219Q/K11A/R20A/K371A	911	Combinación

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
R222Q/R23A/K374A	R219Q/R20A/K371A	912	Combinación
R222Q/K14A/K374A	R219Q/K11A/K371A	913	Combinación
S265N/K14A/R23A	S262N/K11A/R20A	914	Combinación
S265N/K14A/R23A/K374A	S262N/K11A/R20A/K371A	915	Combinación
S265N/R23A/K374A	S262N/R20A/K371A	916	Combinación
S265N/K14A/K374A	S262N/K11A/K371A	917	Combinación
R222Q/C108_T150delins(G)n	R219Q/C105_T147delins(G)n	918	Combinación con Delección PRB
R222Q/V102_Q147delins(GGGGS)n	R219Q/V99_Q144delins(GGGGS)n	919	Combinación con Delección PRB
R222Q/C108_T150delins(GGGGS)n	R219Q/C105_T147delins(GGGGS)n	920	Combinación con Delección PRB
R222Q/N101_N159del	R219Q/N98_N156del	921	Combinación con Delección PRB
R222Q/C108_E151del	R219Q/C105_E148del	922	Combinación con Delección PRB
R222Q/C108_T150del	R219Q/C105_T147del	923	Combinación con Delección PRB
R222Q/V102_Q147del	R219Q/V99_Q144del	924	Combinación con Delección PRB
S265N/C108_T150delins(G)n	S262N/C105_T147delins(G)n	925	Combinación con Delección PRB
S265N/V102_Q147del? (GGGGS)n	S262N/V99_Q144del? (GGGGS)n	926	Combinación con Delección PRB
S265N/C108_T150delins(GGGGS)n	S262N/C105_T147delins(GGGGS)n	927	Combinación con Delección PRB
S265N/N101_N159del	S262N/N98_N156del	928	Combinación con Delección PRB

(continuación)

Numeración de Zavialov (SEQ ID NO:4)	Numeración madura (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO. de polipéptidos ilustrativos	Tipo
S265N/C108_E151del	S262N/C105_E148del	929	Combinación con Delección PRB
S265N/C108_T150del	S262N/C105_T147del	930	Combinación con Delección PRB
S265N/V102_Q147del	S262N/V99_Q144del	931	Combinación con Delección PRB

Como las modificaciones serán evidentes para los expertos en la técnica, se pretende que esta invención esté limitada solo por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína de adenosina desaminasa 2 (ADA2) variante o una porción catalíticamente activa de la misma, que comprende una o varias modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ADA2 no modificado o una porción catalíticamente activa de la misma, en donde:
- 5 la proteína ADA2 no modificada se selecciona entre una proteína ADA que comprende:
- 10 la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o es una porción catalíticamente activa de la secuencia de aminoácidos que muestra al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; o comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 y 380-383 o es una porción catalíticamente activa de la misma;
- 15 la proteína ADA2 modificada tiene hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con la proteína ADA2 no modificada; las modificaciones de aminoácidos se seleccionan entre uno o varios reemplazos, deleciones e inserciones de aminoácidos;
- 20 la proteína ADA2 variante comprende un reemplazo de aminoácidos en una o ambas posiciones correspondientes al residuo de aminoácido 219 y 262 con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5; la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, muestra una mayor actividad adenosina desaminasa o una mayor actividad adenosina desaminasa y una reducción de la unión a heparina en comparación con la forma de dímero de la proteína ADA2 no modificada de SEQ ID NO: 5 o la forma de dímero de la porción catalíticamente activa de la misma; y
- 25 la proteína ADA2 variante, cuando está en forma de dímero, muestra actividad adenosina desaminasa para convertir la adenosina en inosina.
- 30 2. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de la reivindicación 1, en donde la proteína ADA2 no modificada es un homodímero, y la forma de monómero comprende la secuencia de residuos de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 5.
- 35 3. Una porción catalíticamente activa de la proteína ADA2 variante de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteína ADA2 no modificada es un homodímero de las porciones catalíticamente activas correspondientes del polipéptido cuya secuencia se expone en SEQ ID NO: 5, en donde las porciones correspondientes están determinadas por alineamiento.
- 40 4. Una proteína ADA2 variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína ADA2 no modificada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 5, 326-330 y 380-383 o es una porción catalíticamente activa de la misma.
- 45 5. La proteína ADA2 variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína ADA2 no modificada consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 5, 326-330 y 380-383 o es una porción catalíticamente activa de la misma.
- 50 6. La proteína ADA2 variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína ADA2 no modificada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o una porción catalíticamente activa de la misma.
- 55 7. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la proteína ADA2 variante comprenden uno o más reemplazos de aminoácidos seleccionados entre los reemplazos correspondientes a R219K; R219Q; R219N; R219A; S262A; S262V; S262M; S262N; S262C; S262D; S262E; S262F; S262G; S262H; S262I; S262K; S262L; S262P; S262Q; S262R; S262T; S262W y S262Y.
- 60 8. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprenden el reemplazo correspondiente a S262N o S262Q.
9. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprenden el reemplazo correspondiente a R219K, R219Q, R219N o R219A.
10. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprenden el reemplazo correspondiente a R219Q/S262N.

11. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de la reivindicación 10, en donde la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma comprenden modificaciones seleccionadas entre cualquiera de R219Q/S262N/R20N/V22S, R219Q/S262N/K371N/D373S, R219Q/S262N/K372N/I374S, R219Q/S262N/T403N/H405S, R219Q/S262N/G404N/P406S, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>,  
5 R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/R125N/P126A, R219Q/S262N/S127N/K129S, R219Q/S262N/P126N/E128T, R219Q/S262N/R112N/I114T, R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T, R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T, R219Q/S262N/R142N/Q144S, R219Q/S262N/E137N/Y139T, R219Q/S262N/P111N/G113S, R219Q/S262N/F119S, R219Q/S262N/F119K, R219Q/S262N/Y224R,  
10 R219Q/S262N/Y224N, R219Q/S262N/Y191S, R219Q/S262N/Y191D, R219Q/S262N/F183K, R219Q/S262N/Y191D/Y224R, R219Q/S262N/F109S, R219Q/S262N/F109A, R219Q/S262N/R118D, R219Q/S262N/R118A, R219Q/S262N/Y139T, R219Q/S262N/Y139A, R219Q/S262N/W133S, R219Q/S262N/W133T, R219Q/S262N/P124A, R219Q/S262N/P124S, R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>, R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>,  
15 R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>2</sub>, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>1</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>2</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub> en donde n es de 2 a 20,  
20 R219Q/S262N/K11A, R219Q/S262N/K11D, R219Q/S262N/K11E, R219Q/S262N/K13A, R219Q/S262N/K13D, R219Q/S262N/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub> en donde n es de 1 a 5, R219Q/S262N/C105\_E148del, R219Q/S262N/C105\_T147del, R219Q/S262N/V99\_Q144del, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>n</sub> en donde n es de 2 a 20, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>15</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>10</sub>,  
25 R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>7</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>5</sub>, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(G)<sub>3</sub>, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144delins(GGGGS)<sub>n</sub> en donde n es de 1 a 5, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147delins(GGGGS)<sub>n</sub> en donde n es de 1 a 5, R219Q/S262N/K371D/C105\_E148del, R219Q/S262N/K371D/C105\_T147del, R219Q/S262N/K371D/V99\_Q144del, R219Q/S262N/K13E, R219Q/S262N/K371A, R219Q/S262N/K372A,  
30 R219Q/S262N/K372D, R219Q/S262N/K372E, R219Q/S262N/K452A, R219Q/S262N/K452D, R219Q/S262N/K452E, R219Q/S262N/R20A, R219Q/S262N/R20D, R219Q/S262N/R366A, R219Q/S262N/R366D, R219Q/S262N/R366E, R219Q/S262N/H264A, R219Q/S262N/H264Q, R219Q/S262N/H264N, R219Q/S262N/H264G, R219Q/S262N, R219A/S262N, R219Q/S262N/L221A, R219Q/S262N/L221V, R219Q/S262N/L221G, R219Q/S262N/E179D, R219Q/S262N/E179A, R219Q/S262N/E179S, R219Q/S262N/E179T, R219Q/S262N/E179V, R219Q/S262N/E179G, R219Q/S262A, R219Q/S262V, R219Q/S262M, R219Q/S262N/K11A/R20A,  
35 R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A, R219Q/S262N/R20A/K371A, R219Q/S262N/K11A/K371A, R219Q/S262N/K26A, R219Q/S262N/K26D, R219Q/S262N/K26E, R219Q/S262N/R217A, R219Q/S262N/R217D, R219Q/S262N/R217E, R219Q/S262N/K258A, R219Q/S262N/K258D, R219Q/S262N/K258E, R219Q/S262N/R277A, R219Q/S262N/R277D, R219Q/S262N/R277E, R219Q/S262N/R283A, R219Q/S262N/R283D, R219Q/S262N/R283E, R219Q/S262N/K309A, R219Q/S262N/K309D, R219Q/S262N/K309E, R219Q/S262N/K317A, R219Q/S262N/K317D, R219Q/S262N/K317E, R219Q/S262N/K321A, R219Q/S262N/K321D, R219Q/S262N/K321E, R219Q/S262N/R352A, R219Q/S262N/R352D, R219Q/S262N/R352E, R219Q/S262N/R441A, R219Q/S262N/R441D, R219Q/S262N/R441E, R219Q/S262N/K444A, R219Q/S262N/K444D, R219Q/S262N/K444E, R219Q/S262N/K461A, R219Q/S262N/K461D, R219Q/S262N/K461E, R219Q/S262N/K469A, R219Q/S262N/K469D, R219Q/S262N/K469E, R219Q/S262N/K470A, R219Q/S262N/K470D,  
45 R219Q/S262N/K470E, R219Q/S262N/D86A, R219Q/S262N/D86C, R219Q/S262N/D86E, R219Q/S262N/D86F, R219Q/S262N/D86G, R219Q/S262N/D86H, R219Q/S262N/D86I, R219Q/S262N/D86K, R219Q/S262N/D86L, R219Q/S262N/D86M, R219Q/S262N/D86N, R219Q/S262N/D86P, R219Q/S262N/D86Q, R219Q/S262N/D86R, R219Q/S262N/D86S, R219Q/S262N/D86T, R219Q/S262N/D86V, R219Q/S262N/D86W, R219Q/S262N/D86Y, R219Q/S262N/E179C, R219Q/S262N/E179F, R219Q/S262N/E179H, R219Q/S262N/E179I, R219Q/S262N/E179K, R219Q/S262N/E179L, R219Q/S262N/E179M, R219Q/S262N/E179N, R219Q/S262N/E179P, R219Q/S262N/E179Q, R219Q/S262N/E179R, R219Q/S262N/E179W, R219Q/S262N/E179Y, R219C/S262N, R219D/S262N, R219E/S262N, R219F/S262N, R219G/S262N, R219H/S262N, R219I/S262N, R219L/S262N, R219M/S262N, R219P/S262N, R219S/S262N, R219T/S262N, R219V/S262N, R219W/S262N, R219Y/S262N, R219Q/S262N/L221C, R219Q/S262N/L221D, R219Q/S262N/L221E, R219Q/S262N/L221F, R219Q/S262N/L221H, R219Q/S262N/L221I, R219Q/S262N/L221K, R219Q/S262N/L221M, R219Q/S262N/L221N, R219Q/S262N/L221P, R219Q/S262N/L221Q, R219Q/S262N/L221R, R219Q/S262N/L221S, R219Q/S262N/L221T, R219Q/S262N/L221W, R219Q/S262N/L221X, R219Q/S262N/L221Y, R219Q/S262C, R219Q/S262D, R219Q/S262E, R219Q/S262F, R219Q/S262G, R219Q/S262H, R219Q/S262I, R219Q/S262J, R219Q/S262K, R219Q/S262L, R219Q/S262P, R219Q/S262Q, R219Q/S262R, R219Q/S262T, R219Q/S262W, R219Q/S262Y, R219Q/S262N/H264C, R219Q/S262N/H264D, R219Q/S262N/H264E, R219Q/S262N/H264F, R219Q/S262N/H264I, R219Q/S262N/H264K, R219Q/S262N/H264L, R219Q/S262N/H264M, R219Q/S262N/H264P, R219Q/S262N/H264R, R219Q/S262N/H264S, R219Q/S262N/H264T, R219Q/S262N/H264V, R219Q/S262N/H264W, R219Q/S262N/H264Y, R219Q/S262N/S266A, R219Q/S262N/S266C, R219Q/S262N/S266D, R219Q/S262N/S266E, R219Q/S262N/S266F, R219Q/S262N/S266G, R219Q/S262N/S266H, R219Q/S262N/S266I, R219Q/S262N/S266K, R219Q/S262N/S266L, R219Q/S262N/S266M, R219Q/S262N/S266N, R219Q/S262N/S266P,



R219Q/S262N/S266Q, R219Q/S262N/S266R, R219Q/S262N/S266T, R219Q/S262N/S266V, R219Q/S262N/S266W, R219Q/S262N/S266Y, R219Q/S262N/K267A, R219Q/S262N/K267C, R219Q/S262N/K267D, R219Q/S262N/K267E, R219Q/S262N/K267F, R219Q/S262N/K267G, R219Q/S262N/K267H, R219Q/S262N/K267I, R219Q/S262N/K267L, R219Q/S262N/K267M, R219Q/S262N/K267N, R219Q/S262N/K267P, R219Q/S262N/K267Q, R219Q/S262N/K267R, R219Q/S262N/K267S, R219Q/S262N/K267T, R219Q/S262N/K267V, R219Q/S262N/K267W, R219Q/S262N/K267Y, R219Q/S262N/V296A, R219Q/S262N/V296C, R219Q/S262N/V296D, R219Q/S262N/V296E, R219Q/S262N/V296F, R219Q/S262N/V296G, R219Q/S262N/V296H, R219Q/S262N/V296I, R219Q/S262N/V296K, R219Q/S262N/V296L, R219Q/S262N/V296M, R219Q/S262N/V296N, R219Q/S262N/V296P, R219Q/S262N/V296Q, R219Q/S262N/V296R, R219Q/S262N/V296S, R219Q/S262N/V296T, R219Q/S262N/V296W y R219Q/S262N/V296Y.

12. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma comprenden reemplazos de aminoácidos seleccionados entre R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E, R219Q/S262N y R219Q/S262N/K371D/R20E.

13. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprenden:

las modificaciones correspondientes a R219Q/S262N/ins(NAS)I1; R219Q/S262N/R20N/V22S; R219Q/S262N/K371N/D373S; R219Q/S262N/K372N/I374S; R219Q/S262N/T403N/H405S; o R219Q/S262N/G404N/P406S; o los reemplazos de aminoácidos correspondientes a R219Q/S262N/R125N/P126A; R219Q/S262N/S127N/K129S; R219Q/S262N/P126N/E128T; R219Q/S262N/R112N/I114T; R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T; R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T; R219Q/S262N/R142N/Q144S; R219Q/S262N/E137N/Y139T; o R219Q/S262N/P111N/G113S.

14. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende adicionalmente una modificación en el supuesto dominio de unión al receptor (PRB) correspondiente a una o más de las modificaciones seleccionadas entre: R125N/P126A; S127N/K129S; P126N/E128T; R112N/I114T; I134N/L135C/L136T; I134N/L135S/L136T; R142N/Q144S; E137N/Y139T; y P111N/G113S.

15. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende reemplazos de aminoácidos seleccionados entre los reemplazos correspondientes a R219Q/S262N/F119S; R219Q/S262N/F119K; R219Q/S262N/Y224R; R219Q/S262N/Y224N; R219Q/S262N/Y191S; R219Q/S262N/Y191D; R219Q/S262N/F183K; R219Q/S262N/Y191D/Y224R; R219Q/S262N/F109S; R219Q/S262N/F109A; R219Q/S262N/R118D; R219Q/S262N/R118A; R219Q/S262N/Y139T; R219Q/S262N/Y139A; R219Q/S262N/W133S; R219Q/S262N/W133T; R219Q/S262N/P124A; y R219Q/S262N/P124S.

16. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de la reivindicación 1, en donde la proteína ADA2 variante comprende:

la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 38-41, 51-54, 59-63, 145-159, 176-190 y 263-273 o una porción catalíticamente activa de la misma; o la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 596-645 y 658-931 o una porción catalíticamente activa de la misma.

17. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprenden reemplazos de aminoácidos seleccionados entre los reemplazos correspondientes a R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E; R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; R219Q/S262N; R219Q/K11A/R20A; R219Q/K11A/R20A/K371A; R219Q/R20A/K371A; R219Q/K11A/K371A; S262N/K11A/R20A; S262N/K11A/R20A/K371A; S262N/R20A/K371A; and S262N/K11A/K371A, con referencia a SEQ ID NO: 5.

18. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de la reivindicación 10, en donde la secuencia de la proteína ADA2 variante se expone en SEQ ID NO: 273.

19. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de la reivindicación 18, en donde la proteína ADA2 variante está PEGilada.

20. Una porción catalíticamente activa de la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde la porción catalíticamente activa comprende el dominio ADA.

21. Un multímero de ADA2 variante, que comprende una pluralidad de proteínas ADA2 variantes o porciones catalíticamente activas de las mismas de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma son iguales o diferentes.
- 5 22. Un dímero de ADA2 variante, que comprende una proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma según cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
23. Un dímero de ADA2 variante, que comprende una proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma de la reivindicación 10.
- 10 24. El dímero de ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de la reivindicación 22 o la reivindicación 23 que es un homodímero que comprende dos proteínas ADA2 variantes o porciones catalíticamente activas de las mismas que son iguales, o es un heterodímero que comprende dos proteínas ADA2 variantes o porciones catalíticamente activas de las mismas que son diferentes entre sí.
- 15 25. Un producto conjugado, que comprende la proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, o el multímero de la reivindicación 21, o el dímero de cualquiera de las reivindicaciones 22-24, unido directa o indirectamente a través de un conector a un radical heterólogo, en donde el radical heterólogo es un radical que prolonga la semivida.
- 20 26. La proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, o el multímero de la reivindicación 21, o el dímero de cualquiera de las reivindicaciones 22-24, o el producto conjugado de la reivindicación 25, que comprenden un radical que prolonga la semivida que es un radical PEG, y la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma están PEGiladas.
- 25 27. Un ácido nucleico que codifica una proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-24.
28. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 27.
- 30 29. Una célula aislada o un cultivo celular, que comprenden el vector de la reivindicación 28.
30. La célula o cultivo celular de la reivindicación 29, en donde la célula se selecciona entre un linfocito infiltrante de tumor (TIL), un linfocito T citotóxico (CTL), una célula asesina natural (NK) y una célula asesina activada por linfocina (LAK).
- 35 31. La célula o cultivo celular de la reivindicación 30, en donde la célula es una célula T que codifica y expresa el receptor de antígeno quimérico (CAR) y la proteína ADA2 variante o dímero, en donde el CAR es específico para un antígeno de células tumorales.
- 40 32. Un método para producir una proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma, que comprende cultivar una célula de la reivindicación 29 o la reivindicación 30, en condiciones por las cuales se expresa la proteína ADA2 variante.
- 45 33. Una composición farmacéutica, que comprende una proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, o el multímero de la reivindicación 21, o el dímero de cualquiera de las reivindicaciones 22-24, o el producto conjugado de la reivindicación 25, o la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma, o el multímero, o dímero o producto conjugado de la reivindicación 26.
- 50 34. La composición farmacéutica de la reivindicación 33, en donde la proteína ADA2 variante o su porción catalíticamente activa están PEGiladas.
- 55 35. La composición farmacéutica de la reivindicación 33 o la reivindicación 34, en donde la proteína ADA2 variante comprende la secuencia de residuos de aminoácido expuesta en SEQ ID NO: 273 o una porción catalíticamente activa de la misma.
- 60 36. Una proteína ADA2 variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, o el multímero de la reivindicación 21, o el dímero de cualquiera de las reivindicaciones 22-24, o el producto conjugado de la reivindicación 25, o la proteína ADA2 variante o porción catalíticamente activa de la misma, o multímero, o dímero o producto conjugado de la reivindicación 26, para su uso para el tratamiento de un tumor, cáncer, enfermedad hiperproliferativa no cancerosa, una enfermedad fibrótica, una enfermedad infecciosa, una vasculopatía o una enfermedad de inmunodeficiencia.
37. La variante de proteína ADA2 o producto conjugado para su uso de la reivindicación 36, en donde la proteína

ADA2 variante comprende la secuencia de residuos de aminoácido expuesta en SEQ ID NO: 273 o una porción catalíticamente activa de la misma.

5 38. La proteína ADA2 variante o producto conjugado para el uso de la reivindicación 36 o la reivindicación 37, en donde la proteína ADA2 variante o una porción catalíticamente activa de la misma están PEGiladas.

Ser humano	MLVDGPERPALCFLLLVAVMSFFGSALSI DETRAHLLLEKMMRLGGRLVLTNKEELAN 60
Chimpancé	MLVDGPERPALCFLLLVAVMSFFGSALSI DETRAHLLLEKMMRLGGRLVLTNKEELAN 60
	*****
Ser humano	ERLMTLKI AEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMPKGAALHLHDIGIVT 120
Chimpancé	ERLMTLKI AEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMPKGAALHLHDIGIVT 120
	*****
Ser humano	MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCKWILLEDYRKRQVNVTEFDD 180
Chimpancé	MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCKWILLEDYRKRQVNVTEFDD 180
	*****
Ser humano	SLLRNFTLVTQHPVIYTNQNVVWSKFEETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
Chimpancé	SLLRNFTLVTQHPVIYTNQNVVWSKFEETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
	*****
Ser humano	LYMEIRAKLPPVYELSGEHHDEWSVKTQYQVAQKVFETHPEFIGIKIISDHRSKDVAV 300
Chimpancé	LYMEIRAKLPPVYELSGEHHDEWSVKTQYQVAQKVFETHPEFIGIKIISDHRSKDVAV 300
	*****
Ser humano	IAESIRMAMGLRIKFFTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFFHAGET 360
Chimpancé	IAESIRTAMGLRTKFFTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKVGVKLPYFFFHAGET 360
	*****
Ser humano	DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSCKHPAVETYSMTKDIPIEVCPI SNQVLKLVSD 420
Chimpancé	DWQGTSIDRNILDALMLNTSRIGHGFALSCKHPAVETYSMTKDIPIEVCPI SNQVLKLVSD 420
	*****
Ser humano	LRNHPVATLMTATGHPMVISDDPFAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
Chimpancé	LRNHPVATLMTATGHPMVISDDPFAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
	*****
Ser humano	KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
Chimpancé	KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
	*****

Figura 1A

Ser humano	MLVDGPPSERPALCFLLI AVAMFFGSALS I DETRAHLLI LKMMRLGGRLVLTNTKEELAN	60
Gorila	MLVDGPPSERPALRFLI L AVAMFFGSALS I DETRAHLLI LKMMRLGGRLVLTNTKEELAN	60
	*****	
Ser humano	ERLMTLKIAEMKEAMRLLI PPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMPKGAALHLHDIGIVT	120
Gorila	ERIMTLKIAEMKEAMRLLI PPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMPKGAALHLHDIGIVT	120
	*****	
Ser humano	MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDIRKRVQNVTEFDD	180
Gorila	MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDIRKQVQNVTEFDD	180
	*****	
Ser humano	SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFFETIFFTISGLLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV	240
Gorila	SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFFENIFFTISGLLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV	240
	*****	
Ser humano	LYMEIRAKLIPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAKQFVETHPEFIGIKIYSDHRSKDVAV	300
Gorila	LYMEIRAKLIPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAKQFVETHPEFIGIKIYSDHRSKDVAV	300
	*****	
Ser humano	IAESIRAMAMGLRIKFFTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFFHAGET	360
Gorila	IAESIR TAMGLRTKFFTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFFHAGET	360
	*****	
Ser humano	DWQGTSIDRNILDALMLNTRIGHGFALS KHPAVETYSMFKDPIEVCPISNQVLKLVSD	420
Gorila	DWQGTSIDRNILDALMLNTRIGHGFALS KHPAVETYSMFKDPIEVCPISNQVLKLVSD	420
	*****	
Ser humano	LRNHPVATL MATGHPMVISDDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADRLTKQLAMNSI	480
Gorila	LRNHPVATL MATGHPMVISDDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADRLTKQLAMNSI	480
	*****	
Ser humano	RYSTLLESEKNTFMEIWKRRWDKFIADVATK	511
Gorila	RYSTLLESEKNTFMEIWKRRWDKFIADVATK	511
	*****	

Figura 1B

Ser humano	MLVDGPPSERPALCFLLAVAMFFGSALSIDETRAHLLLEKMMRLGGRLVLTNKEELAN	60
Chimp._pigmeo	MLVDGPPSERPALCFLLAVAMFFSSALSIDETRAHLLLEKMMRLGGRLVLTNKEELAN	60
	*****.*****	
Ser humano	ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFFPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT	120
Chimp._pigmeo	ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFFPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT	120
	*****.*****	
Ser humano	MDWLVNRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRQNVTEFDD	180
Chimp._pigmeo	MDWLVNRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRQNVTEFDD	180
	*****.*****	
Ser humano	SLLRNFTLVTOHQPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLLHYAPVFRDYVFRSMQEFFYEDNV	240
Chimp._pigmeo	SLLRNFTLVTOHQPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLLHYAPVFRDYVFRSMQEFFYEDNV	240
	*****.*****	
Ser humano	LYMEIRARLPPVYELSGEHHDEWSVKTYQEVAKFVETHPEFIGIKIISDHRSKDVAV	300
Chimp._pigmeo	LYMEIRARLPPVYELSGEHHDEWSVKTYQEVAKFVETHPEFIGIKIISDHRSKDVAV	300
	*****.*****	
Ser humano	IAESIRAMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPIYFFFHAGET	360
Chimp._pigmeo	IAESIRAMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPIYFFFHAGET	360
	*****.*****	
Ser humano	DWQGTSIDRNILDALMLNTRTICGHGFALSCKHPAVRTYSWTDIPIEVCPISNQVVKLVSD	420
Chimp._pigmeo	DWQGTSIDRNILDALMLNTRTICGHGFALSCKHPAVRTYSWTDIPIEVCPISNQVVKLVSD	420
	*****.*****	
Ser humano	LRNHPVATLMTGHPMVISDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGKADRLTKQLAMNSI	480
Chimp._pigmeo	LRNHPVATLMTGHPMVISDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGKADRLTKQLAMNSI	480
	*****.*****	
Ser humano	KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK	511
Chimp._pigmeo	KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK	511
	*****.*****	

Figura 1C

Ser humano	MLVDGPPSERPALCFLLIIVAMSAFFGSALSIDETRAHLLLEKMMRLGGRLVLTNTKEELAN	60
Orangután	MLVDGPPSEWPAALRFLIIVAMSAFFGSALSIDETRAHLLLEKMMRLGGRLVLTNTKEEQAN	60
	*****	
Ser humano	ERLMTLKI AEMKEAMRLLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMPKGAALHLHDIGIVT	120
Orangután	ERIMMLKI AEMKEAMRLLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMPKGAALHLHDIGIVT	120
	*****	
Ser humano	MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDIRKRVQNVTEFDD	180
Orangután	MDWLVRNVTYRPHCHICFTPKGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDIRKRVQNVTEFDD	180
	*****	
Ser humano	SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFFETIFFTISGLLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV	240
Orangután	SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFFETIFFTISGLLIHYAPVFRDYVFSMQEFYEDNV	240
	*****	
Ser humano	LYMEIRAKLIPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEAQKVFETHPEFIGIKIYSDHRSKDVAV	300
Orangután	LYMEIRAKLIPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEAQKVFETHPEFIGIKIYSDHRSKDVAV	300
	*****	
Ser humano	IAESIRMAMGLRIKFFTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFFHAGET	360
Orangután	IAESIRRTAMGLRTKFFTVVAGFDLVGREDTGHSLQDYKEALMIPAKGGVKLPYFFFHAGET	360
	*****	
Ser humano	DWQGTSIDRNILDALMLNTRIGHGFALS KHPAVETYSWFKDPIEVCPISNQVLKLVSD	420
Orangután	DWQGTSIDRNILDALMLNTRIGHGFALS KHPAVETYSWFKDPIEVCPISNQVLKLVSD	420
	*****	
Ser humano	LRNHPVATLMTGHPMVISDDDPAMFGAKGLSYDFYEFVFMGIGMMKADRLTLKQLAMNSI	480
Orangután	LRNHPVATLMTGHPMVISDDDPAMFGAKGLSYDFYEFVFMGIGMMKADRLTLKQLAMNSI	480
	*****	
Ser humano	RYSTLLESEKNTFMEIWKRRWDKFIADVATK	511
Orangután	RYSALLEIEKNTFMEIWKRRWDKFIADVATK	511
	*****	

Figura 1D

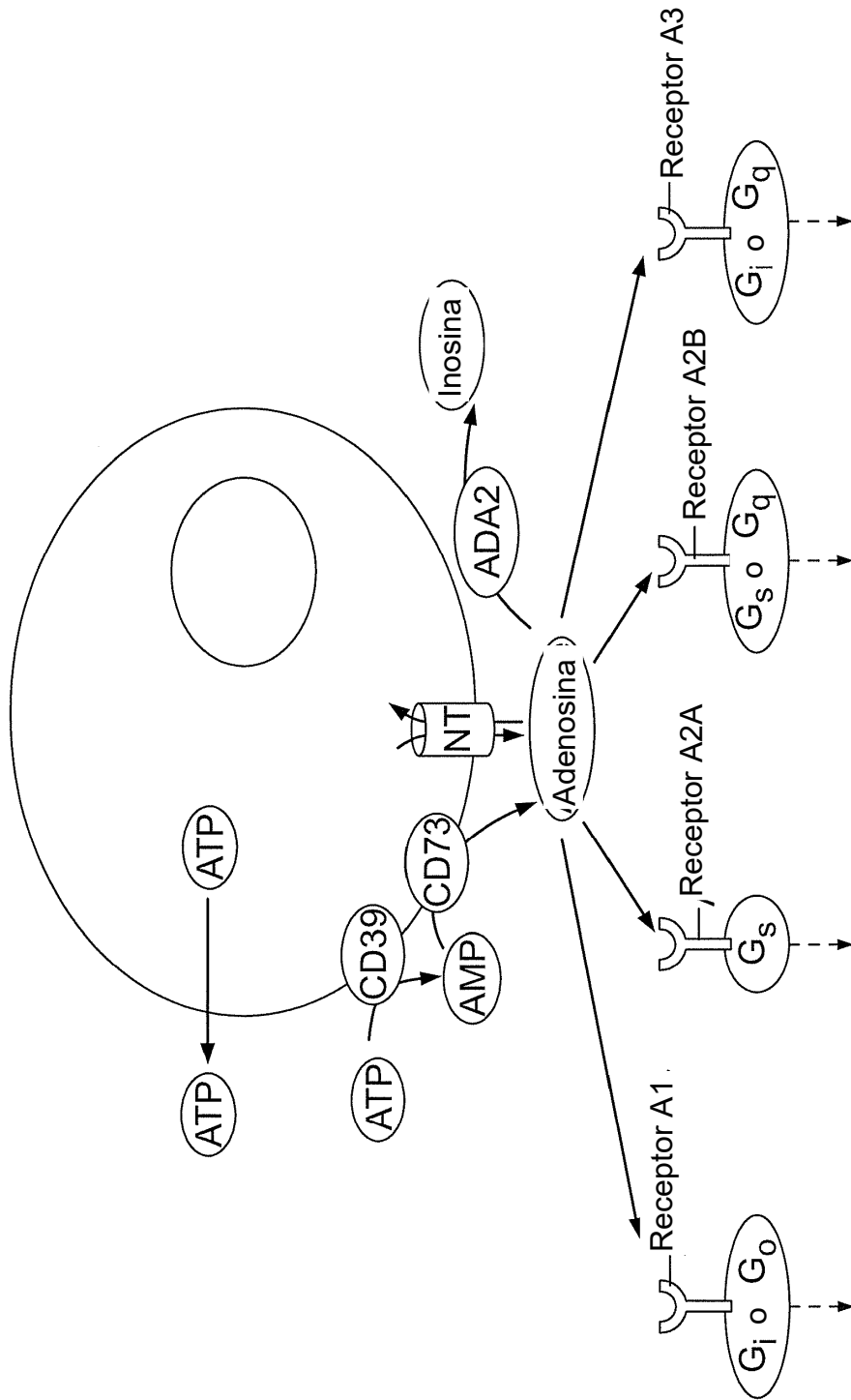
Ser humano Gibón	MLVDGPPSERPALCFLLAVAMFFGSALSIDETRAHLLLEKMMRLGGRLLVNTKEELAN 60 MLVDGPPSEWPALRFLLLAVAMFFGSALSIDETRAHLLLEKMMRLGGRLLVSTKEEQAN 60 *****
Ser humano Gibón	ERLMTLKI AEMKEAMRLLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVENILRMPKGAALHLHDIGIVT 120 ERIMTLKI TEMKEAMKTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVENILRMPKGAALHLHDIGIVT 120 *****
Ser humano Gibón	MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRQNVTEFDD 180 MDWLVRNVTYRPHCHICFTPKGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDYRKRQNVTEFDD 180 *****
Ser humano Gibón	SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLLHYAPVFRDYVFRSMQEFFEDNV 240 SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLLHYAPVFRDYVFX-----DNV 233 *****
Ser humano Gibón	LYMEIRAKLIPVYELSGEHHDEWSVKTYQEAQKFEVTHPEFIGIKIYSDHRSKDVAV 300 LYMEIRAKLIPVYELSGEHHDEWSVKTYQEAQKFEVTHPEFIGIKIYSDHRSKDVAV 293 *****
Ser humano Gibón	IAESIRMAMGLRIKFPVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 360 IAESIRTAMGLRAKFPVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 353 *****
Ser humano Gibón	DWQGTSIDRNILDALMLNTRIGHGFALSKHPAVETYSWFKDIPIEVCPI SNQVLKLVSD 420 DWQGTSIDKNILDALMLNTRIGHGFALSKHPAVETYSWFKDIPIEVCPI SNQVLKLVSD 413 *****
Ser humano Gibón	LRNHPVATLMA TGHPMVISDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGMKADLRTLKQLAMNSI 480 LRNHPVATLMA TGHPMVISDDPAIFGAKGLSYDFYEVFMGIGMKADLRTLKQLAMNSI 473 *****
Ser humano Gibón	RYSTLLESEKNTFMEIWKRWKDFIADVATK 511 RYSTLLETEKNTFMEIWKRWKDFIADVATK 504 *****

Figura 1E



Ser humano Macaco	MLVDGPERPALCFLLAVAMFFGSALSIDETRAHLLLEKMMRLGRLVLNTKEELAN 60 MLVDGPEWPAALRFLLLAVAMFFRSALSIDE--AHLLEKMMRLGRLVLTKEEQAN 58 *****
Ser humano Macaco	ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFFPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMPKGAALHLHDIGIVT 120 ERLMTLKIAEMKEAMKTLIFFPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMPKGAALHLHDIGIVT 118 *****
Ser humano Macaco	MDWLVNRNVTYRPHCHICFTTIRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRQNVTEFDD 180 MDWLVNRNVTYRPHCHICFTSKGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDYRKRQNVTEFDD 178 *****
Ser humano Macaco	SLLRNFTLVTOHQPEVIYTNQNVVWSKFFETIFFTISGLLIHYAPVFRDYFRSMQEFFYEDNV 240 SLLRNFTLVTOHQPEVIYTNQNVVWSKFFQTIFFTISGLIRYAPVFRDYFRSMQEFFYEDNV 238 *****
Ser humano Macaco	LYMEIRAKLIPVYELSGEHHDEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIYSDHRSKDVAV 300 LYMEIRAKLIPVYELSGEHHDEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIYSDHRSKDVTV 298 *****
Ser humano Macaco	IAESIRMAMGLRIKFPVVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFFHAGET 360 IAESIRTAMGLRTKFPVVVAGFDLVGHEDTGHSLHYKKEALMIPARDGGKLPYFFFHAGET 358 *****
Ser humano Macaco	DWQGTSIDRNLIDALMLNTRIGHGFALS KHPAVETYSMDIPIEVCPI SNQVLKLVSD 420 DWQGTSIDKNILDALMLNTRIGHGFALS KHPAAEAYSMDIPIEVCPI SNQVLKLVSD 418 *****
Ser humano Macaco	LRNHPVATLIMATGHPMVISDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADRLTLKQLAMNSI 480 LRNHPVAALMAIGHPMVISDDPAMFGAKGLSYDFYEAEMGIGGMKADRLTLKQLAMNSI 478 *****
Ser humano Macaco	KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511 KYSTLLETEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 509 *****

Figura 1F



Actividades mediadas por adenosina tales como inmunosupresión,  
proliferación de células cancerosas, migración de células cancerosas  
y/o metástasis, angiogenesis y otros efectos

Figura 2