



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0810384-4 B1



(22) Data do Depósito: 18/04/2008

(45) Data de Concessão: 02/02/2021

(54) Título: TERAPIA ENZIMÁTICA ANTICÂNCER

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 20/04/2007 US 60/913,039.

(73) Titular(es): LEADIANT BIOSCIENCES LIMITED.

(72) Inventor(es): DAVID R. FILPULA; PUJA SAPRA.

(86) Pedido PCT: PCT US2008060733 de 18/04/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/131163 de 30/10/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/10/2009

(57) Resumo: TERAPIA ENZIMÁTICA ANTICÂNCER O que é proporcionado é um método para tratar um paciente que tem um tumor compreendendo administrar uma quantidade eficaz de adenosina deaminase, preferencialmente conjugada com óxido de polialquileno, a um paciente que necessita do mesmo.

TERAPIA ENZIMÁTICA ANTICÂNCER

REFERÊNCIA CRUZADA AO PEDIDO RELACIONADO

Este pedido reivindica o benefício da prioridade do Pedido de Patente Provisional dos Estados Unidos No. de série 60/913,039 depositado em 20 de Abril de 2007, os conteúdos do qual sendo incorporados aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção proporciona novos métodos de tratamento e inibição de tumores, e especificamente tumores sólidos malignos, pela administração de adenosina deaminase para reduzir níveis de tecido de adenosina e deoxiadenosina.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Um tumor é um crescimento maligno ou benigno de células ou tecidos que surgem a partir de proliferação celular descontrolada. Um tumor maligno é aquele que se espalha a partir do seu local de origem, e também é conhecido na técnica como um câncer. Desse modo, tumores e cânceres são uma família de doenças que dividem a propriedade comum de crescimento celular descontrolado e inadequado. Geralmente, tumores malignos ou são tumores originados no sangue, tais como leucemia, ou são tumores sólidos. Tumores malignos originados no sangue geralmente circulam no sangue, mas tumores sólidos se espalham através do corpo a partir de um tumor primário. As células de tumores distribuídas então têm o potencial para desenvolver múltiplos tumores secundários, em um processo de metástase. Para que um tumor sólido passe por um espalhamento metastático, as células de tumores sólidos precisam escapar do tumor primário ou original, entrar na corrente sanguínea ou sistema linfático e de lá invadir o tecido de outros órgãos, onde elas se multiplicam e formam novos tumores. A metástase é um processo complexo de etapas múltiplas que envolve alterações na adesão e motilidade da célula de tumor, secreção de enzimas proteolíticas, quimioatraentes, e proteoglicanos e outros fatores. Além disso, a angiogênese, ou a formação de novos vasos sanguíneos, também é uma etapa vital no processo metastático (Folcman, 1995, *Nature Medicine* 1:27-31).

O sistema imune também mostrou inibir a metástase de tais células de tumores malignos, e foi reportado que a adenosina, por sua vez, pode inibir tais reações imuno-protetoras. Por exemplo, Loshkin e colaboradores, (2006, *Cancer Res.* 66: 7758-7765) reportaram que adenosina inibe a ativação e produção de

citocina em células T assassinas. A adenosina impacta de forma negativa outra função imune, incluindo tanto elementos celulares quanto funções inflamatórias (vide, por exemplo, as análises de Spichala, 2000, *Farmacologi & Therapeutics* 87: 161-173 e de Sitkoveski e colaboradores, 2005 *Nature Reviews Immunologi* 5: 713-721). Sitkoveski e colaboradores, no WO 03/050241, publicado em 19 de junho de 2003, também foram descritos métodos para aumentar uma resposta imune para um antígeno e para tratar tumores, pela administração de um antagonista receptor de adenosina, que pode incluir adenosina deaminase.

Também foi mostrado que a adenosina promove angiogênese e migração de célula de tumor (Barez e colaboradores, 2000, *Oncol. Rep.* 7(6): 1285-91; Adair, 2005, *Am J Fisiol Regul Integr Comp Fisiol* 289: R283-R296) e que a adenosina estimula a proliferação de células de câncer do cólon (Mujoomdar e colaboradores 2003, *Biochemical Pharmacologi* 66 1737-1747). Também foi reportado por Asmar e colaboradores, 1996, *Proc. AM. Assoc. Cancer Res.* (Resumo No. 73) que o crescimento de certas células de tumor foi inibido pela injeção de ADA, com excesso de 50% em um modelo de ascites de rato. Estas eram leucemias linfáticas L1210 e L4946, linfosarcoma 6C3HED, adenocarcinoma TA3 mamário e carcinoma E2 de Ehrlich. No mesmo resumo, um adenocarcinoma 755 foi reportado ser duas vezes resistente ao efeito e um sarcoma 180 foi completamente resistente ao efeito. O WO 03050241 A2 descreve os efeitos de um inibidor de receptores de adenosina em células de melanoma B16, Enquanto o WO 030502241 A2 menciona ADA como um inibidor de adenosina, não existe descrição específica para aplicar ADA para o tratamento de cânceres específicos e, particularmente, câncer de ovário e câncer de próstata.

Desse modo, parece que para alguns tumores, a presença de adenosina proporciona um sinal de "vá" para a proliferação de tumor e para a angiogênese de tumor, e um sinal de "pare" para as células T assassinas que normalmente matariam estes tumores.

Em contraste com as verificações discutidas acima, Lind e colaboradores (Patente Norte Americana No. 6,579,857) reportou que a adenosina, em combinação com um inibidor de enzima adenosina deaminase, e/ou em combinação com um agente anticâncer, tal como, coformicina, é útil em um método para potencializar células mortas em células neoplásticas de origem epitelial. Desse

modo, esta referência sugere que o papel de adenosina em cânceres é mais complexo e duvidoso.

Como observado acima, um agente para reduzir níveis endógenos de adenosina é a enzima adenosina deaminase. A adenosina deaminase (“ADA”),
5 designada como EC 3.5.4.4, é uma enzima importante da via de salvação de purina. A ADA converte a adenosina ou deoxiadenosina, na presença de água, em inosina ou deoxiinosina e amônia. É sabido que indivíduos que abñgam mutações danosas no gene ADA podem desenvolver graus variáveis de um distúrbio de imunodeficiência, de suave a severa, isto é, distúrbio de imunodeficiência
10 combinada severa (“SCID”). A SCID foi confirmada resultar da acumulação tóxica de substratos de enzimas, adenosina e deoxiadenosina, em células linfóides imaturas. O ataque do distúrbio pode variar desde a primeira infância a adultos, dependendo da mutação herdada. As deficiências de ADA são uma das causas principais de SCID, em crianças, e é um dos alvos principais para abordagens de
15 terapia de gene (R. Parkman e colaboradores, 2000, “Gene terapi for adenisine deaminase deficienci”, *Ann. Rev. Med.*, 51:33-47).

Previamente, a ADA foi comercialmente isolada a partir de fonte bovina e empregada no tratamento de vários distúrbios, incluindo SCID, na forma de um ADA bovina conjugada a polímero de polietilenoglicol (“PEG”). A ADA PEGilada
20 para uso médico é comercialmente disponibilizada por Enzon Pharmaceuticals, Inc. como ADAGEN[®], ADA PEGilada. A conjugação de um grupamento PEG com ADA permite que a enzima alcance seu efeito terapêutico completo pelo aumento da vida de circulação e retribuição de ADA substancialmente não antigênica, para minimizar o potencial para reações imunogênicas. Também é possível produzir
25 enzimas de ADA recombinantes humana ou bovina para uso na forma conjugada, como descrito pelo do Pedido de Patente Norte-americano No. de série 11/738,012 de co-propriedade, intitulado “Stabilized Proteins”, e o Pedido de Patente Norte-americano N^o. de Série _____, de co-propriedade, intitulado “Stable Recombinant Adenosine Deaminase”, depositado na mesma data inclusa e reivindicando o
30 benefício da prioridade do Pedido de Patente dos Estados Unidos No. de Série 60/913,009, e ambos incorporados aqui como referência na sua totalidade.

Desse modo, existe uma necessidade de muito tempo na técnica por métodos novos e melhorados para tratar ou inibir o crescimento, espalhamento e desenvolvimento de cânceres.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 Conseqüentemente, a invenção proporciona um método para tratar um paciente tendo um tumor que compreende administrar uma quantidade efetiva de ADA ao paciente que necessita do mesmo. Uma quantidade eficaz é aquela que é prontamente determinada por um versado na técnica de costume para reduzir níveis de tecidos de adenosina ou deoxiadenosina no paciente, e em que o
10 crescimento ou espalhamento do tumor é inibido pelos níveis de tecido substancialmente reduzido de adenosina no paciente. A via de administração é uma via, tal como, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intrarectal, intraperitoneal, inalação e transuretral.

 O tumor pode ser maligno ou não maligno e é preferencialmente um tumor
15 sólido, por exemplo, um tumor tal como um tumor de próstata, um câncer de ovário e/ou um câncer coloretal.

 A adenosina deaminase é preferencialmente conjugada com um polímero substancialmente não antigênico, tal como um óxido de polialquileno (PAO). O PAO preferencialmente varia em tamanho a partir de aproximadamente 4.000 a
20 aproximadamente 45.000 Daltons. O PAO é preferencialmente um polietileno glicol ("PEG"). A razão molar de ADA para polímero pode ser de 1:1, ou pode ser duas ou mais moléculas de ADA por polímero, ou mais preferencialmente, proporcionar de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 moléculas de polímeros (isto é, 11-18 filamentos de PEG) por molécula de ADA.

25 A ADA conjugada a polímero é preferencialmente administrada em uma dose que varia na faixa de aproximadamente 10.U a aproximadamente 30.U por Kg ou mais e para um período suficiente de tempo para manter a inibição do tumor, por exemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 dias, ou mais.

 A quantidade de adenosina deaminase que é administrada é efetiva para
30 reduzir substancialmente níveis de tecido de adenosina ou deoxiadenosina no paciente, e em que o crescimento ou espalhamento do tumor é inibido por níveis de tecido substancialmente reduzidos de adenosina no dito paciente. Isto é, por exemplo, uma dose de adenosina deaminase que varia de aproximadamente 10.U

a aproximadamente 30.U por Kg. A dose é repetida por um período de tempo para manter a inibição de tumor, por exemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 dias ou mais. A dose é administrada por qualquer via conveniente, tais como, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intrarretal, intraperitoneal, inalação e transuretral.

A adenosina deaminase é opcionalmente purificada a partir de uma fonte bovina ou é uma adenosina deaminase recombinante. A adenosina deaminase recombinante é, por exemplo, adenosina deaminase bovina recombinante (Ser74-rbADA) compreendendo SEQ ID NO: 1, adenosina deaminase humana recombinante (Ser74-rhADA) compreendendo SEQ ID NO: 3 e adenosina deaminase bovina recombinante compreendendo SEQ ID NO: 5 e/ou variações ou polimorfismos da mesma. A adenosina deaminase bovina produzida de forma recombinante, por exemplo, SEQ ID NO: 5, é opcionalmente nivelada em Cis 74 para estabilidade em um meio aquoso.

Para propósitos da presente invenção, o termo "resíduo" deve ser entendido para significar aquela parte de um composto, a qual o mesmo se refere, por exemplo, PEG, ADA, aminoácido, etc., que resta após o mesmo ter passado por uma reação de substituição com outro composto.

Para propósitos da presente invenção, o termo "resíduo polimérico", por exemplo, "resíduo de PEG" deve cada um ser entendido para significar a parte do polímero ou PEG que permanece após o mesmo ter passado por uma reação com outros compostos, grupamentos, etc.

Para propósitos da presente invenção, o termo "alquila" como usado aqui se refere a um hidrocarboneto alifático saturado, que inclui cadeia normal, cadeia ramificada, e grupos cíclicos de alquila. O termo "alquila" também inclui grupos alquil-tio-alquila, alcóxialquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, e alquilcarbonilalquila-C₁₋₆. Preferencialmente, o grupo alquila tem de 1 a 12 carbonos. Mais preferencialmente, este é uma alquila inferior de aproximadamente 1 a 7 carbonos, ainda mais preferencialmente aproximadamente 1 a 4 carbonos. O grupo alquila pode ser substituído ou não substituído. Quando substituído, o(s) grupo(s) substituído(s) preferencialmente inclui(em) grupos halo, óxi, azido, nitro, ciano, alquila, alcóxi, alquil-tio, alquil-tio-alquila, alcóxialquila, alquilamino, triahalometil, hidroxila, mercapto, hidróxi, ciano, alquilsilila, cicloalquila,

cicloalquilalquila, heterocicloalquila, heteroarila, alquenila, alquinila, hidrocarbonila-C₁₋₆, arila e amino.

5 Para propósitos da presente invenção, o termo "substituído" como usado aqui se refere à adição ou substituição de um ou mais átomos contidos em um grupo funcional, ou composto com um dos grupamentos a partir do grupo de halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquila, alcoxila, alquil-tio, alquil-tio-alquila, alcoxialquila, alquilamino, trihalometila, hidroxila, mercapto, hidróxi, ciano, alquilsilila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, heteroarila, alquenila, alquinila, alquilcarbonilalquila-C₁₋₆, arila, e grupos amino.

10 Para propósitos da presente invenção, o termo "alquenila" se refere a grupos contendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono, incluindo cadeia normal, cadeia ramificada, e grupos cíclicos. Preferencialmente, o grupo alquenila tem aproximadamente 2 a 12 carbonos. Mais preferencialmente, o mesmo é uma alquenila inferior de aproximadamente 2 a 7 carbonos, ainda mais preferencialmente de 2 a 4 carbonos. O grupo alquenila pode ser substituído ou não substituído. Quando substituído, o(s) grupo(s) substituído(s) inclui(em) preferencialmente halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquila, alcoxila, alquil-tio, alquil-tio-alquila, alcoxialquila, alquilamino, trihalometila, hidroxila, mercapto, hidróxi, ciano, alquilsilila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, heteroarila, alquenila, alquinila, hidrocarbonila-C₁₋₆, arila, e grupos amino.

20 Para propósitos da presente invenção, o termo "alquinila" se refere a grupos que contém pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono, incluindo cadeia normal, cadeia ramificada e grupos cíclicos. Preferencialmente o grupo alquinila tem aproximadamente 2 a 12 carbonos. Mais preferencialmente, o mesmo é uma alquinila inferior de aproximadamente 2 a 7 carbonos, ainda mais preferencialmente de 2 a 4 carbonos. O grupo alquinila pode ser substituído ou não substituído. Quando substituído, o(s) grupo(s) substituídos inclui(em) preferencialmente grupos halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquila, alcóxi, alquil-tio, alquil-tio-alquila, alcoxialquila, alquilamino, trihalometila, hidroxila, mercapto, hidróxi, ciano, alquilsilila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, heteroarila, alquenila, alquinila, hidrocarbonila-C₁₋₆, arila, e amino. Exemplos de "alquinila" incluem propargila, propino e 3-hexino.

Para propósitos da presente invenção, o termo "arila" se refere a um sistema de anel de hidrocarboneto aromático contendo pelo menos um anel aromático. O anel aromático pode opcionalmente ser fundido ou, de outro modo, preso a outros anéis de hidrocarbonetos aromáticos ou anéis de hidrocarbonetos não aromáticos.

5 Exemplos de grupos arila incluem, por exemplo, fenila, naftila, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno e bifenila. Exemplos preferidos de grupos arila incluem fenila e naftila.

Para propósitos da presente invenção, o termo "cicloalquila" se refere a um hidrocarboneto cíclico-C₃₋₈. Exemplos de cicloalquila incluem ciclopropila,

10 ciclobutila, ciclopentila, ciclohexila, cicloheptila e ciclooctila.

Para propósitos da presente invenção, o termo "cicloalquenila" se refere a um hidrocarboneto cíclico C₃₋₈ contendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. Exemplos de cicloalquenila incluem ciclopentenila, ciclopentadienila, ciclohexenila, 1,3-ciclohexadienila, cicloheptenila, cicloheptatrienila, e ciclooctenila.

15 Para propósitos da presente invenção, o termo "cicloalquilalquila" se refere a um grupo alquila substituído com um grupo cicloalquila C₃₋₈. Exemplos de grupos cicloalquilalquila incluem ciclopropilmetil e ciclopentiletila.

Para propósitos da presente invenção, o termo "alcóxi" se refere a um grupo alquila de número indicado de átomos de carbono preso ao grupamento molecular original através de uma ponte de oxigênio. Exemplos de grupos alcóxi incluem, por

20 exemplo, metóxi, etóxi, propóxi e isopropóxi.

Para propósitos da presente invenção, um grupo "alquilarila" se refere a um grupo arila substituído com um grupo alquila.

Para propósitos da presente invenção, um grupo "aralquila" se refere a um

25 grupo alquila substituído com um grupo arila.

Para propósitos da presente invenção, o termo grupo "alcoxialquila" se refere a um grupo alquila substituído com um grupo alcóxi.

Para propósitos da presente invenção, o termo "alquil-tio-alquila" se refere a um tioéter de alquil-S-alquila, por exemplo, metiltioetil ou metiltioetil.

30 Para propósitos da presente invenção, o termo "amino" se refere a um grupo contendo nitrogênio como é conhecido na técnica derivado de amônia pela substituição de um ou mais radicais de hidrogênio por radicais orgânicos. Por exemplo, os termos "acilamino" e "alquilamino" se referem a radicais orgânicos

específicos substituídos com N com os grupos substituintes acila e alquila, respectivamente.

Para propósitos da presente invenção, o termo "alquilcarbonila" se refere a um grupo carbonila substituído com grupo alquila.

5 Para propósitos da presente invenção, os termos "halogênio" ou "halo" se referem a flúor, cloro, bromo e iodo.

Para propósitos da presente invenção, o termo "heterocicloalquil" se refere a um sistema de anel não aromático contendo pelo menos um heteroátomo selecionado a partir de oxigênio, nitrogênio e enxofre. O anel de heterocicloalquila
10 pode ser opcionalmente fundido ou, de outro modo, preso a outros anéis de heterocicloalquila e/ou anéis de hidrocarboneto não aromático. Os grupos de heterocicloalquila preferidos têm de 3 a 7 membros. Exemplos de grupos de heterocicloalquila incluem, por exemplo, piperazino, morfolino, piperidino, tetrahydrofurano, pirrolidino, e pirazolo. Os grupos de heterocicloalquila preferidos
15 incluem piperidinila, piperazinila, morfolinila, e pirrolidinila.

Para propósitos da presente invenção, o termo "heteroarila" se refere a um sistema de anel aromático contendo pelo menos um heteroátomo selecionado a partir de nitrogênio, oxigênio e enxofre. O anel de heteroarila pode ser fundido ou, de outro modo, preso a um ou mais anéis de heteroarila, anéis de hidrocarboneto
20 aromático ou não aromático ou anéis de heterocicloalquila. Exemplos de grupos heteroarila incluem, por exemplo, piridino, furano, tiofene, 5,6,7,8-tetrahydroisoquinolino e pirimidino. Exemplos preferidos de grupos heteroarila incluem tienila, benzotienila, piridila, quinolila, pirazinil, pirimidila, imidazolila, benzimidazolila, furanila, benzofuranila, tiazolila, benzotiazolila, isoxazolila,
25 oxadiazolila, isotiazolila, benzisotiazolila, triazolila, tetrazolila, pirazolila, indolila, pirazolila e benzopirazolila.

Para propósitos da presente invenção, o termo "heteroátomo" se refere a nitrogênio, oxigênio e enxofre.

Em algumas modalidades, alquilas substituídas incluem carboxialquilas,
30 aminoalquilas, dialquilaminos, hidroxialquilas e mercaptoalquilas; alquenilas substituídas incluem carboxialquenilas, aminoalquenilas dialquenilaminos, hidroxialquenilas e mercaptoalquenilas; alquinilas substituídas incluem carboxialquinilas, aminoalquinilas, dialquinilaminos, hidroxialquinilas e

mercaptoalquililas; cicloalquilas substituídas incluem grupamentos, tais como, 4-clorociclohexila; arilas incluem grupamentos, tais como, naftila; arilas substituídas incluem grupamentos, tais como, 3-bromo fenil; aralquilas incluem grupamentos, tais como, tolila; heteroalquilas incluem grupamentos, tais como, etiltiofeno;

5 heteroalquilas substituídas incluem grupamentos, tais como, 3-metóxi-tiofene; alcóxi inclui grupamentos, tais como metóxi; e fenóxi inclui grupamentos, tais como, 3-nitrofenóxi. Halo deve ser entendido incluir flúor, cloro, iodo e bromo.

Para propósitos da presente invenção, "inteiro positivo" deve ser entendido incluir um inteiro igual a, ou maior que, 1 e, como será entendido por aqueles

10 versados na técnica, para estar dentro do domínio de razoabilidade pelo versado na técnica.

Para propósitos da presente invenção, o termo "ligados" deve ser entendido incluir adesões covalentes (preferencialmente) ou não-covalentes, de um grupo para outro, ou seja, como resultado de uma reação química.

15 Os termos "quantidades efetivas" e "quantidades suficientes", para propósitos da presente invenção, significam uma quantidade que atinge um efeito desejado ou efeito terapêutico, tal efeito sendo entendido por aqueles versados na técnica.

Para propósitos da presente invenção, o termo "adenosina" deve ser

20 entendido incluir nucleosídeos adenosina e deoxiadenosina. A adenosina também inclui adenosina e deoxiadenosina presentes na forma de AMP, ADP, ATP, dAMP, dADP ou dATP.

Para propósitos da presente invenção, "tumor mediado por adenosina" ou "tumor responsivo a adenosina deaminase" deve ser entendido com incluindo

25 amplamente quaisquer tipos de tumores que se beneficiam da administração de ADA, ou fração ativa da mesma, etc. sem considerar a via de administração.

Para propósitos da presente invenção, "tratamento de tumor mediado por adenosina" ou "tratamento de tumor responsivo a adenosina deaminase" ou "inibição de crescimento de tumor mediado por adenosina" ou "inibição de

30 crescimento de tumor responsivo a adenosina deaminase" deve ser entendido significar que sintomas ou condições são minimizados ou atenuados quando comparados a aqueles observados na ausência de tratamento com ADA. As condições tratadas podem ser confirmadas, por exemplo, pela inibição de

crescimento de tumor e/ou diminuição de níveis de adenosina em tecidos ou células cancerosas.

Amplamente dizendo, o tratamento bem sucedido será considerado como tendo ocorrido quando a resposta clínica desejada for obtida. Por exemplo, o
5 tratamento bem sucedido pode ser definido pela obtenção de, por exemplo, inibição de crescimento de tumor de 10% ou maior (ou seja, 20% 30%, 40%). Alternativamente, o tratamento bem sucedido pode ser definido pela obtenção de pelo menos 20% ou preferencialmente 30%, mais preferencialmente 40% ou maior (ou seja, 50% ou 80%) de diminuição dos níveis de adenosina em tecidos ou
10 células cancerosas, incluindo outros marcadores clínicos contemplados pelos técnicos da área, quando comparado a aqueles observados na ausência de tratamento com ADA descrito aqui.

Além disso, o uso de termos singulares para conveniência da descrição não é de modo algum para serem limitantes. Desse modo, por exemplo, referência a
15 uma composição compreendendo uma enzima se refere a uma ou mais moléculas daquela enzima. Também deve ser entendido que esta invenção não está limitada a configurações particulares, etapas de processo e materiais descritos aqui, já que tais configurações, etapas de processo e materiais podem variar um pouco.

Também deve ser entendido que a terminologia empregada aqui é usada
20 para o propósito de descrever apenas modalidades particulares e não pretende ser limitante, uma vez que o escopo da presente invenção será limitado pelas reivindicações apensas e equivalentes das mesmas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conseqüentemente, a invenção proporciona novos métodos para tratar
25 tumores, incluindo cânceres, pela administração de enzima ADA a um paciente que necessita do mesmo, em uma quantidade, e por uma duração suficiente para reduzir a quantidade de adenosina presente nos tecidos e/ou fluidos do corpo do paciente. Preferencialmente, a enzima ADA é conjugada a polímero. Para aqueles tumores que dependem da presença de adenosina para crescer, o espalhamento
30 metastático e/ou para proteção do sistema imune do paciente, uma redução suficiente de adenosina endógena irá limitar ou impedir o crescimento de câncer, espalhamento metastático e/ou permitir a operação normal de atividade antitumor pelo sistema imunológico do paciente.

Também é contemplado que o tratamento inventivo de tumores com ADA é opcionalmente conduzido em combinação ou coordenação com um ou mais outros agentes e métodos de tratamento de anticâncer apropriados conhecidos na técnica, como discutido em maiores detalhes aqui a seguir. O tratamento de combinação da presente invenção inclui administrar uma quantidade eficaz dos compostos descritos aqui individualmente ou em combinação, simultaneamente ou sequencialmente, com um segundo agente quimioterápico.

Agentes anticancer exemplares conhecidos na arte para tais tratamentos de combinação incluem, por exemplo, Taxol(TM), bevacizumabe (Avastin®), vincristina, vinblastina, neomicina, combretastatina(s), podofilotoxina(s), TNF-alfa, angiostatina, endostatina, vasculostatina, antagonistas alfa_v.beta₃, cálcio ionóforo, agentes incluindo fluxo de cálcio, qualquer derivado ou pró-droga dos mesmos.

Agentes anticancer adicionais também incluem agentes quimioterápicos, agentes radioterapêuticos, citocinas, agentes antiangiogênicos, agentes que induzem apoptose ou imunotoxinas anticancer ou coaguligantes. Tal imunotoxina é, por exemplo, Erbitux® (cetuximabe). "Agentes quimioterápicos", como usados aqui, se referem a agentes quimioterápicos clássicos ou drogas usadas no tratamento de malignidades. Este termo é usado para simplicidade não obstante o fato de que outros compostos podem ser tecnicamente descritos como agentes quimioterápicos pelo fato de eles exercem um efeito anticancer. Entretanto, "quimioterápico" veio a ter um significado distinto na técnica e esta sendo usado de acordo com estes significados padrões.

Desse modo, o método inventivo pode ser empregado em combinação com um ou mais agentes quimioterápicos conhecidos por serem eficazes no tratamento do câncer incluindo, mas não limitados a, 5-azacitidina, 5-fluorouracila, opcionalmente em combinação com leucovorino, 5-fluorodeoxiuridina, 6-mercaptopurina, 6-fioguanina, mitoxantrona, aziridinilbenzoquinona (AZQ), Carmustina (BCNU ou BiCNU® da Bristol-Miers Squibb), bleomicina, carboplatina (CBDCA), Lomustina (CCNU), metil-CCNU ou MeCCNU, clorambucila, clorodeoxiadenosina, cisplatina, ciclofosfamida, citarabina, dactinomicina, daunorabicina, deoxicoformicina, doxorubicina, doxicoformicina, DTIC (dacarbazinae), epirubicina, etoposidae (VP-16), fludarabina, hexametilmelamina, hidroxiuréea, idarubicina, ifosfamida, ifosfamida e mesna, levamisol, N-acetilcisteína

("NAC"), 1-fenilalanina mostarda, 4'-(9-acridinilamino)metanossulfon-m-anisidida ("mAMSA"), inibidores conhecidos na técnica de resistência a múltiplas drogas (isto é., inibidores MDR), melfalana, metotrexato, opcionalmente em combinação com leucovorina, mitramicina, mitomicina-c, inibidores de resistência a múltiplas drogas relacionados com proteína (inibidores "MRP"), paclitaxel, procarbazona, streptozotocina, N,N',N'-trietilenotiofosforamida ("tioTEPA"), inibidores de topoisomerase I e/ou topoisomerase II, taxol, vimblastina, vincristeina, vincristina, vindesina, teniposida (VM-26[®]), e outros muito numerosos para mencionar.

Outros métodos para o tratamento de câncer contemplados para serem empregados em combinação com os métodos da invenção incluem irradiação com raios-X, raios gama ou diretamente ou com alvo tomográfico, tratamento de tecidos cancerosos com "sementes" ou péletes radioativos implantados, irradiação por feixe de nêutrons de tecidos preparados com compostos de boro, e/ou outros tipos de terapias com feixes de partículas conhecidas na técnica.

Agentes antitumor ou anticâncer (agentes antineoplásticos) adicionais que são opcionalmente administrados em combinação ou coordenação com os presentes métodos inventivos incluem aqueles descritos por "GOODMAN AND OILMAN'S, THE FARMACOLOGICAL BASIS OF TERAPEUTICS". DÉCIMA EDIÇÃO, Eds. Hardman e Limbird, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Para melhor apreciar a invenção, os seguintes termos são definidos.

Referência a "adenosina" aqui também abrange deoxiadenosina, e variações conhecidas na técnica e derivados dos mesmos presentes *in vivo*, a menos que especificado de outro modo.

Referência a adenosina deaminase ou ADA inclui qualquer forma conhecida na técnica de enzima, incluindo enzima natural purificada, por exemplo, ADA natural modificada, ADA bovina ou humana recombinante, polimorfismo, e derivados dos mesmos. A enzima ADA purificada a partir de fonte bovina possui uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 5, com resíduo Cis 74 naturalmente nivelado ou protegido por uma cisteína, e os seis resíduos C-terminais previstos a partir do gene que codifica a ADA de SEQ ID NO: 5 não estão presentes. Entretanto, é contemplado que a invenção pode ser praticada com variações alternativas na ADA bovina natural, incluindo alelos e polimorfismos alternativos,

ambos produzidos de forma natural e de forma recombinante, com e sem os seis resíduos C-terminais previstos. O polimorfismo de ADA bovina inclui, por exemplo, glutamina na posição 198 no lugar de lisina; alanina na posição 245 no lugar de treonina; arginina na posição 351 ao invés de glicina.

5 Os derivados preferidos de enzima ADA incluem enzima ADA produzida de forma recombinante que foi mutada para intensificar estabilidade com relação a enzima ADA recombinante não mutada. Estes incluem, por exemplo, enzimas ADA recombinante modificadas a partir de SEQ ID NO: 5 com um ou mais dos polimorfismos observados acima, para substituir um resíduo Cis oxidável que é
10 exposto a solvente com um resíduo adequado de aminoácido não oxidável. Tal resíduo não oxidável inclui qualquer resíduo de aminoácido natural conhecido na arte e/ou quaisquer derivados dos mesmos conhecidos na arte. Por exemplo, a ADA recombinante madura expressa a partir de um primeiro gene isolado a partir de uma fonte bovina ou humana possui um resíduo de Cis₇₄ instável que é
15 preferencialmente substituído com um resíduo de aminoácido não oxidável, por exemplo, por um Ser₇₄. Tais enzimas ADA recombinantes são ilustradas por SEQ ID NO: 1 (estrutura de ADA bovina) e SEQ ID NO: 3 (estrutura de ADA humana). As SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4 ilustram moléculas de DNA úteis para expressar o mesmo, que foi o códon otimizado para expressão de *E. coli*. Detalhes adicionais
20 a respeito de tais muteínas de ADA recombinante, e produção e purificação destas proteínas, são proporcionadas pelo Pedido de Patente Norte-Americano N°. de Série _____, de co-propriedade, que reivindica prioridade do Pedido de Patente U.S. No. 60/913,009, intitulado "Stable Recombinant Adenosine Deaminase" depositado na mesma data desta, e incorporado aqui por referência em sua
25 totalidade. Detalhes específicos nos vetores e métodos de purificação são encontrados aqui, particularmente nas seções exemplares, e mais particularmente nos exemplos 1-4,

Alternativamente, as enzimas ADA podem ser estabilizadas, quando necessário, pelo revestimento de um resíduo de Cis oxidável exposto a solvente,
30 pelo tratamento de enzima ADA com uma quantidade suficiente de um agente de revestimento, sob condições reacionais suficientes para revestir a cisteína reativa, sem inativar substancialmente a proteína ADA. Este processo é preferencialmente

empregado com ADA produzida de forma recombinante, também muteína ou enzimas de ADA tipo selvagem.

Por exemplo, agentes de revestimento incluem, sem limitação, glutatona oxidada (preferida), iodoacetamida, ácido iodoacético, cisteína e outros dióis conhecidos por aqueles versados na técnica e misturas dos mesmos. A quantidade e a concentração de agente de revestimento incluído durante a fase de reação dos métodos descritos aqui dependerão um pouco do agente de revestimento específico usado e das necessidades do técnico no assunto, mas não estarão sujeitos a experimentação inadequada. Usando glutatona oxidada como um protótipo, a concentração do usado quando reagido com a proteína recombinante tal como rhADA pode variar de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 100 Mm . Preferencialmente, a glutatona oxidada é reagida com a proteína recombinante em uma concentração de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 25 mM .

As condições reacionais empregadas durante a reação do agente de revestimento e da proteína recombinante incluem adicionalmente o uso de uma solução aquosa que tem um pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,4, preferencialmente de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,8. Além disso, a solução aquosa preferencialmente inclui um tampão adequado tal como fosfato de sódio, fosfato de potássio, Tris, e Hepes e misturas dos mesmos em concentrações que variam de 10 a 150 mM (opcionalmente, o revestimento pode ocorrer fora desta faixa de tampão, menor que 10 ou maior que 150 mM). As condições reacionais incluem adicionalmente deixar a reação acontecer em temperaturas que não contribuirão para a degradação de proteína, ou seja, de aproximadamente 4 - 37° C. Opcionalmente, o revestimento pode ocorrer fora desta faixa de temperatura, por exemplo, em uma faixa de temperatura menor que 0-4°C ou maior que 37°C. A reação é conduzida por um tempo suficiente para alcançar a estabilização necessária da cisteína reativa. Simplesmente por meio de exemplo, a reação é conduzida por um tempo que varia de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 8 horas (por exemplo, durante a noite).

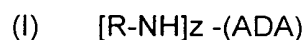
Detalhes adicionais com relação ao DNA recombinante estabilizado, revestido são proporcionados pelo Pedido de Patente Norte-Americano, de co-

propriedade, Nº de Série 11/738,012 intitulado "Stabilized Proteins", e particularmente na seção de exemplos, que é incorporado aqui por referência.

Adicionalmente, o uso de termos singulares para conveniência da descrição não é de modo algum pretendido ser tão limitantes. Desse modo, por exemplo, referênci
5 a uma composição compreendendo uma enzima se refere a uma ou mais moléculas daquela enzima. Também deve ser entendido que esta invenção não está limitada a configurações particulares, etapas de processos e materiais descritos aqui, tais como, configurações, etapas de processos, e os materiais podem variar um pouco.

10 **A. Conjugados de ADA-Polímeros**

Uma forma preferida de ADA está na forma de uma enzima conjugada a polímero. Os conjugados de ADA-polímeros da presente invenção geralmente correspondem a fórmula (I):



15

em que

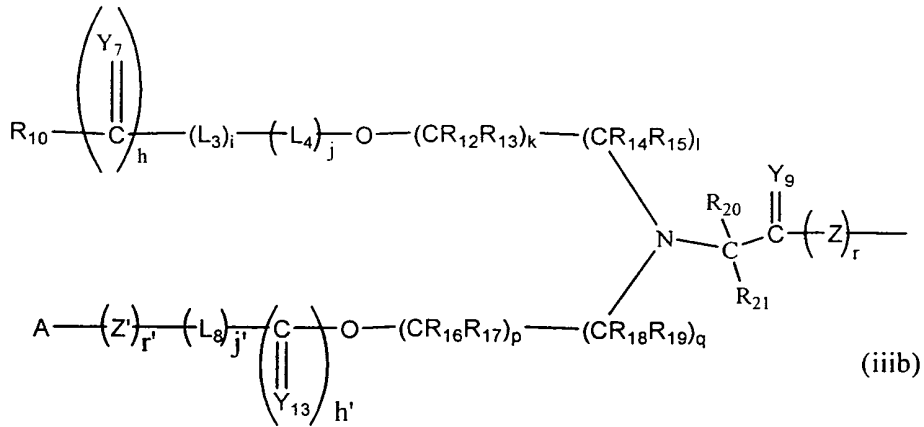
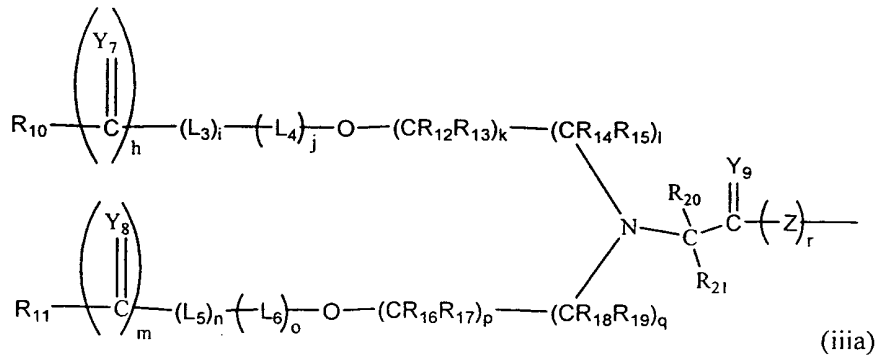
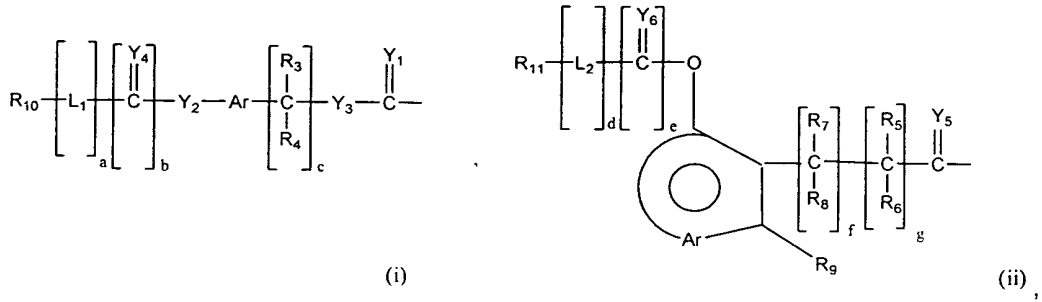
(ADA) representa a enzima adenosina deaminase ou opcionalmente, um derivado ou fragmento dos mesmos;

NH- é um grupo amino de um aminoácido encontrado na ADA, derivado ou
20 fragmento da mesma para adesão ao polímero;

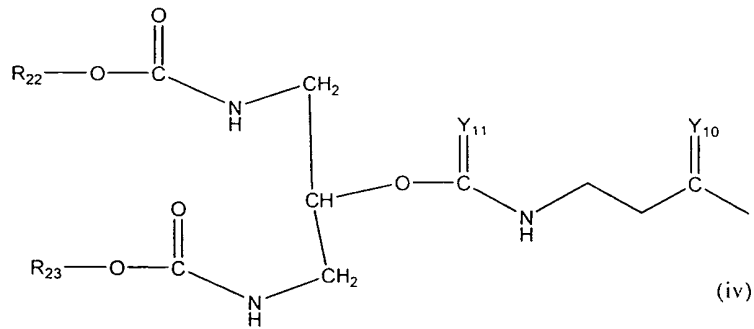
(z) é um inteiro positivo, preferencialmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 80, mais preferencialmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 80, ainda mais preferencialmente de aproximadamente 11 a aproximadamente 18; e

25 R é um resíduo de polímero substancialmente não antigênico que é preso à ADA de forma liberável ou não liberável.

A porção de resíduo de polímero não antigênico de conjugado (R) pode ser selecionada dentre uma lista não limitante de sistemas baseados em polímeros tais como:



5



R_{3-9} , R_{12-21} e R_{24} (vide abaixo) são os mesmos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados dentre hidrogênio, alquilas C_{1-6} , alquilas ramificadas C_{3-12} , cicloalquilas C_{3-8} , alquilas substituídas C_{1-6} , cicloalquilas substituídas C_{3-8} , arilas, arilas substituídas, aralquilas, heteroalquilas C_{1-6} ,
 5 heteroalquilas C_{1-6} substituídas, alcóxi C_{1-6} , fenóxi e heteroalcóxis C_{1-6} ;

Ar é um grupamento que forma um hidrocarboneto aromático multissubstituído ou um grupo heterocíclico multi-substituído; —

Y_{1-11} e Y_{13} podem ser os mesmos ou diferentes e são independentemente selecionados a partir de O, S e NR_{24} ;

10 A é selecionado dentre grupos alquilas, grupamentos alvos, agentes de diagnóstico e grupamentos biologicamente ativos;

X é O, NQ, S, SO ou SO_2 ; onde Q é H, alquila C_{1-8} , alquila ramificada C_{1-8} , alquila substituída C_{1-8} , arila ou aralquila;

15 Z e Z' são independentemente selecionados dentre grupamentos transportados de forma ativa em uma célula alvo, grupamentos hidrofílicos, grupamentos de ligação bifuncionais e combinações dos mesmos;

L_{1-6} e L_8 podem ser os mesmos ou diferentes e são independentemente selecionados dentre grupos ligadores (“ligantes” é melhor) bifuncionais;

20 (a), (c), (d), (f), (g), (i), (j), (j'), (k), (l), (n), (o), (p), (q) e (t) podem ser os mesmos ou diferentes e são independentemente 0 ou um inteiro positivo, preferencialmente, na maioria dos aspectos;

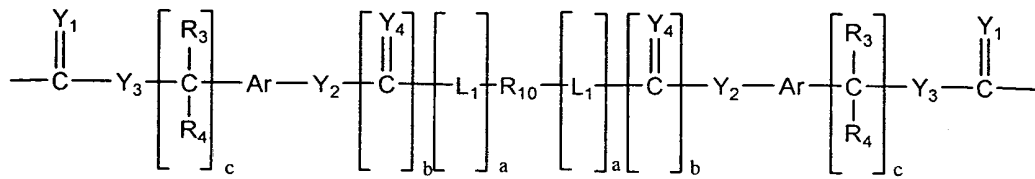
(b), (e), (r), (r'), (s), (h), (h') e (m) podem ser os mesmos ou diferentes e são independentemente 0 ou 1;

mPEG é metóxi PEG e

25 (u) é um inteiro positivo para proporcionar polímeros tendo um peso molecular total de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 100,000 Da, preferencialmente de aproximadamente 4,000 a aproximadamente 45,000 Da.

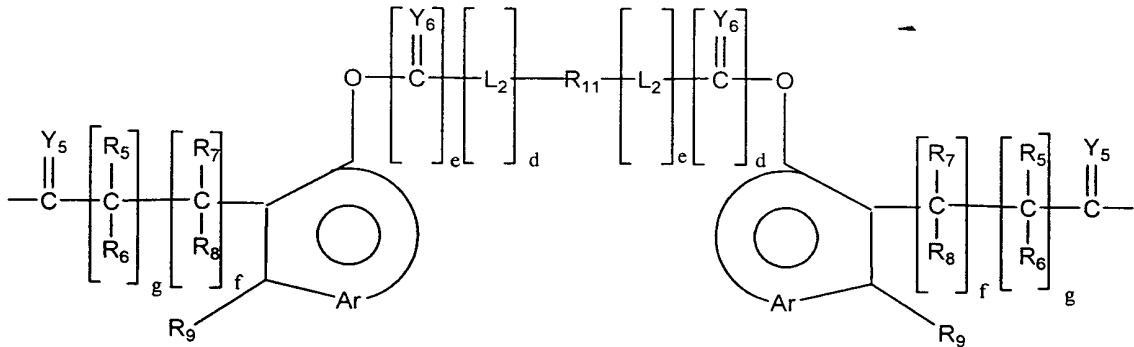
30 Dentro do especificado acima, é preferível que Y_{1-11} e Y_{13} sejam O; R_{3-8} , R_{12-21} e R_{24} são, cada um, independentemente hidrogênio ou alquilas C_{1-6} , com metilas e alquilas sendo as alquilas mais preferidas e R_{7-9} são preferencialmente CH_3 ,

Em um aspecto adicional da invenção, a porção de polímero do conjugado pode ser uma que produza múltiplos pontos de fixação para ADA. Uma lista não limitante de tais sistemas inclui:



(xii)

e



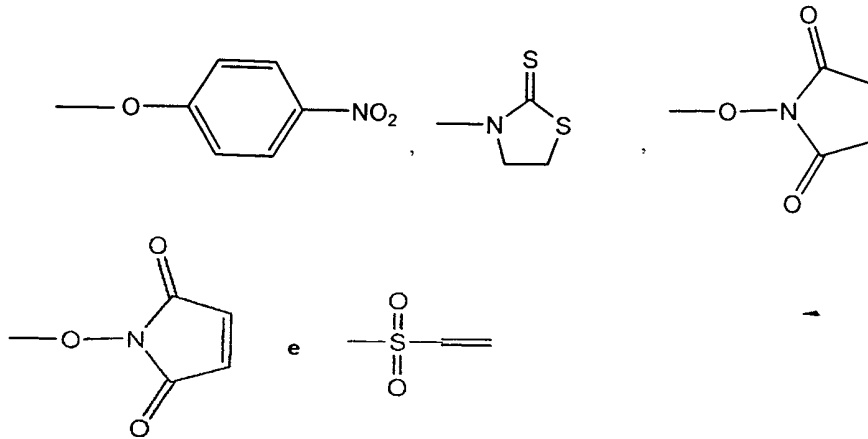
(xiii)

5 em que todas as variáveis são as mesmas que aquelas determinadas acima.

Alternativamente e/ou preferencialmente, filamentos múltiplos de PEG são presos a ADA. Neste aspecto, os conjugados de polímero ADA podem incluir pelo menos 5 filamentos de polietileno glicol até 80 filamentos presos aos grupos epsilon amino de Lys na enzima, mas preferencialmente, podem incluir aproximadamente 10 11-18 filamentos de PEG presos a grupos amino de Lys na enzima.

Embora a ADA seja conjugada de aproximadamente 11 a aproximadamente 18 moléculas de PEG por molécula de enzima, via ligações de lisina, a razão de PEG para ADA pode ser variada para modificar as propriedades cinéticas e físicas do conjugado combinado para ajustar alguma situação clínica particular.

15 Os polímeros ativados que podem ser empregados para preparar conjugados de ADA corresponderão naturalmente de forma direta com as porções de polímero descritas acima. A principal diferença é a presença de um grupo de ativação ou abandonador, algumas vezes designados aqui como B1, que facilitam a fixação do sistema de polímero a um grupo amino (por exemplo, grupo épsilon amino de lisina) encontrado na ADA. Desse modo, compostos (i) - (xiii) incluem um 20 grupo de ativação ou abandonador tal como:



ou outros grupos de ativação ou abandonadores, tais como, N-
 5 hidroxibenzotriazolila, halogênio, N-hidróxiftalimidila, imidazolila, uréias O-acila,
 pentafluorofenol ou 2,4,6-tri-clorofenol ou outros grupos abandonadores adequados
 familiares para aqueles com habilidade comum, encontrados no lugar onde a ADA
 se prende após a reação de conjugação.

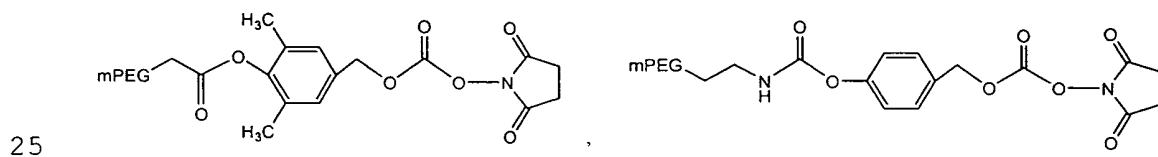
Alguns PEGs ativados preferidos incluem aqueles descritos nas patentes
 10 Norte-Americanas N^{os} 5,122,614, 5,324,844, 5,612,460 e 5,808,096 comumente
 designadas (Polietileno glicol ativado por carbonato de succinimidila (SC-PEG) e
 PEGs ativadas relacionadas), e patente Norte-Americana. No. 5,349,001 (PEGs
 ativadas por tiona imida cíclica), os conteúdos das quais sendo incorporados aqui
 por referência. Como será apreciado por aqueles de habilidade ordinária tais
 15 reações de conjugação tipicamente são realizadas em um tampão adequado
 usando um excesso molar de muitas vezes de PEG ativada. Alguns conjugados
 preferidos feitos com PEGs lineares como as SC-PEG mencionadas acima podem
 conter, em média, de aproximadamente 1 a aproximadamente 80 filamentos de
 PEG por enzima. Consequentemente, para estes, excessos molares de centenas
 20 de muitas vezes, por exemplo, 200-1000x podem ser empregados. O excesso
 molar usado para polímeros ramificados e polímeros presos a enzimas serão
 menores e poderão ser determinados usando as técnicas descritas nas patentes e
 pedidos de patentes que descrevem os mesmos que são mencionadas aqui abaixo.

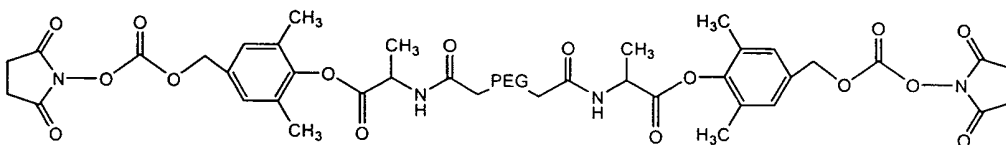
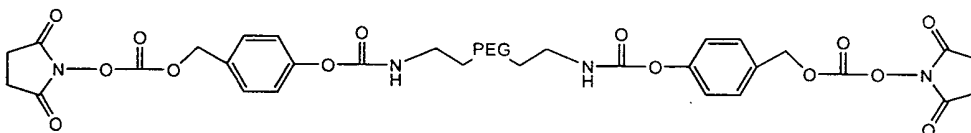
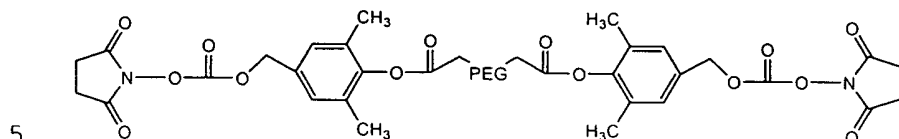
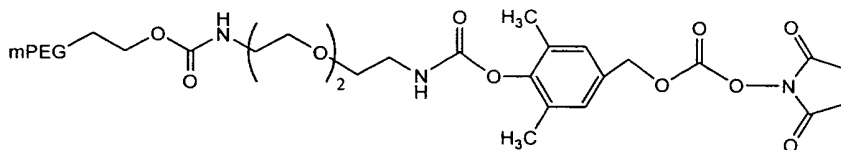
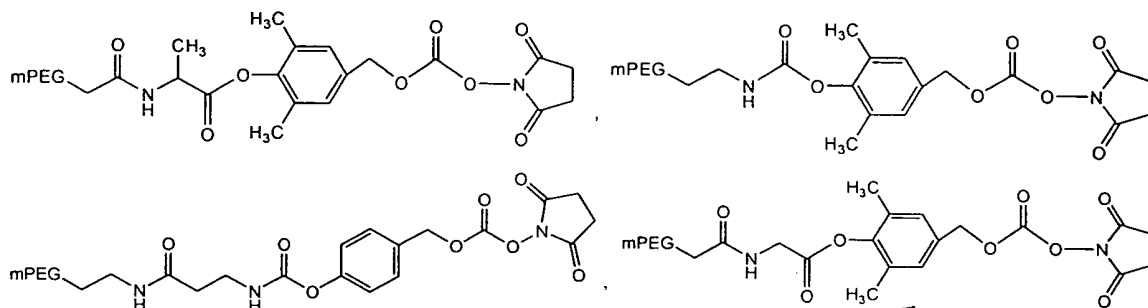
Para propósitos da presente invenção, grupos ativados devem ser entendidos como aqueles grupos que são capazes de reagir com um grupo amina (nucleófilo) encontrado em uma ADA, por exemplo, em uma Lys.

Para propósitos da presente invenção, os antecedentes são também referidos como ligantes de polímero ativado. Os resíduos de polímero são preferencialmente à base de óxido de polialquileno e mais preferencialmente à base de polietileno glicol (PEG) em que o PEG é linear, ramificado ou multiestruturado.

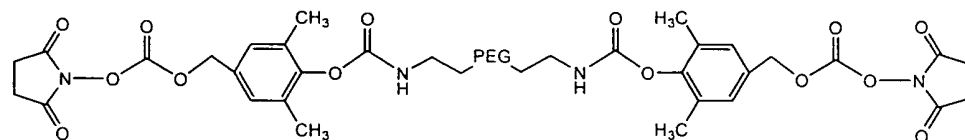
Fazendo referência agora aos polímeros descritos acima, pode ser visto que o Ar é um grupamento que forma um grupo de hidrocarboneto aromático multissubstituído ou de heterocíclico multissubstituído. Um aspecto chave é que o grupamento Ar é aromático por natureza. Geralmente, para ser aromático, os elétrons pi precisam ser compartilhados em uma "nuvem" tanto acima quanto abaixo do plano de uma molécula cíclica. Além disso, o número de elétrons pi precisa satisfazer a condição da regra de Huckle ($4n+2$). Aqueles de habilidade ordinária perceberão que um grande número de grupamentos satisfará a necessidade do grupamento e, desse modo, são adequados para uso aqui.

Em alguns aspectos preferidos da invenção, os ligantes de polímeros ativados de sistemas poliméricos com base na eliminação de benzila ou lactonização via bloqueio de trimetila são preparados de acordo com as Patentes Norte-Americanas N^os. 6,180,095, 6,720,306, 5,965,119, 6,624,142 e 6,303,569, comumente designadas, os conteúdos das quais sendo incorporados aqui por referência. Dentro deste contexto, os seguintes ligantes de polímero ativados são preferidos:

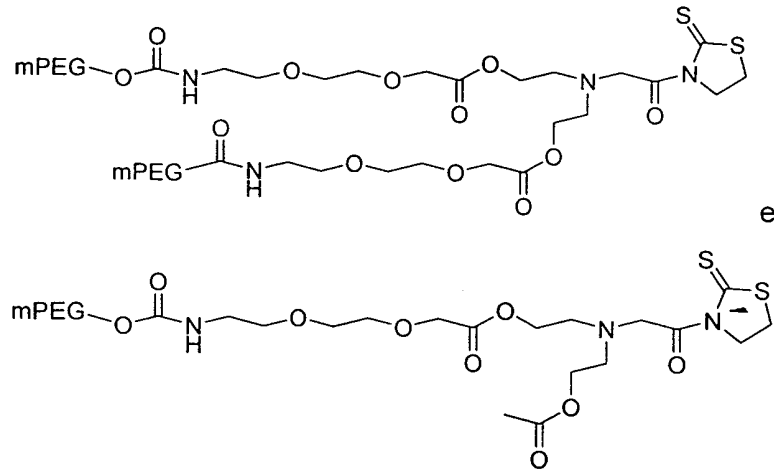




e

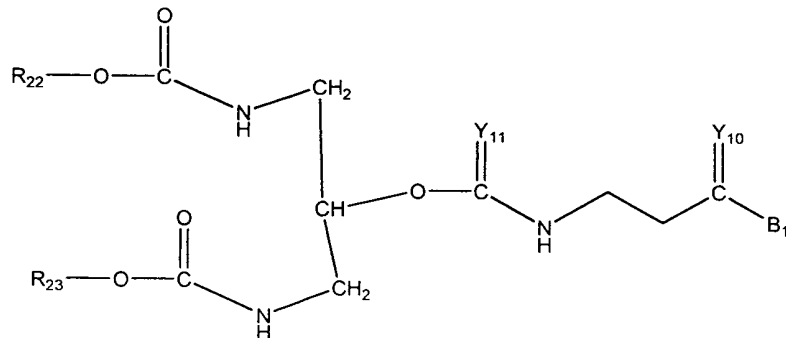


10 Em um aspecto alternativo da invenção, os conjugados de polímero de ADA
são preparados usando certos resíduos de polímero de bicina, tais como aqueles
descritos nas Patentes Norte-Americanas N^os. 7,122,189 e 7,087,229 comumente
designadas e Pedidos de Patente Norte-Americanos N^os de série Nos. 10/557,522,
11/502,108 e 11/011,818, A descrição de cada um destes pedidos de patente
15 sendo incorporados por referência. Alguns dos polímeros ativados preferidos
incluem:



Também deve ser entendido que o grupo de ativação ou abandonador
mostrado acima é apenas um dos grupos adequados e que os outros mencionados
5 aqui também podem ser também usados sem experimentação desnecessária

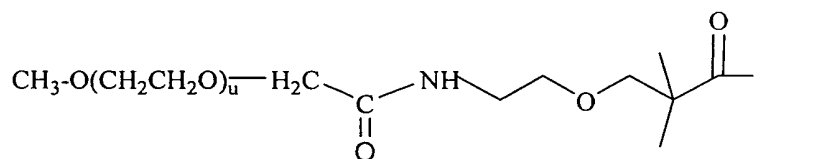
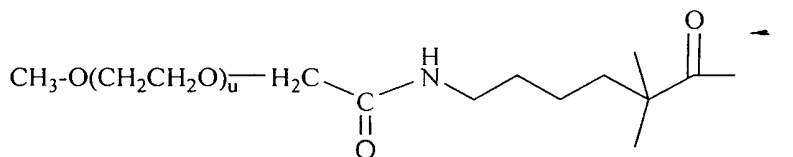
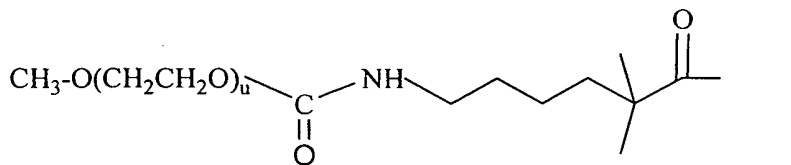
Em aspectos alternativos, os ligantes de polímeros ativados são preparados
usando resíduos de polímeros ramificados tais como aqueles descritos nas
Patentes Norte-Americanas N^os. 5,681,567, 5,756,593, 5,643,575, 5,919,455,
6,113,906, 6,153,655, 6,395,266 e 6,638,499, 6,251,382 e 6,824,766, comumente
10 designadas, a descrição de cada uma sendo incorporada aqui por referência. Tais
polímeros ativados correspondem aos sistemas de polímeros (iv) - (ix) com o
seguinte sendo o representativo:



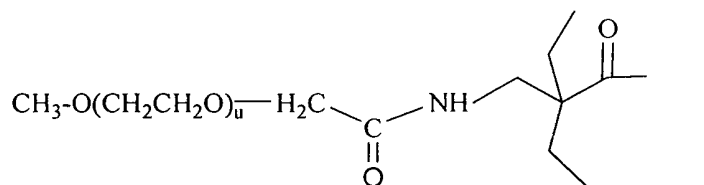
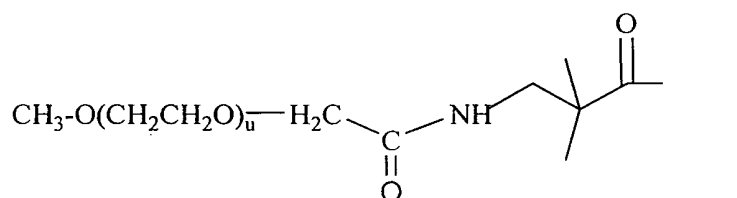
em que B₁ é um grupo de ativação e todas as variáveis são como previamente
15 definida.

Ainda em outro aspecto alternativo, os polímeros de ativação podem
empregar um ligante à base de éster na parte de trás. Vide PCT/US07/78593
intitulado "Polyalkylene Oxides Having Hindered Ester-Based Biodegradable

Linkers", o conteúdo do qual sendo incorporado aqui por referência. Por exemplo, uma lista não limitante de tais compostos inclui:

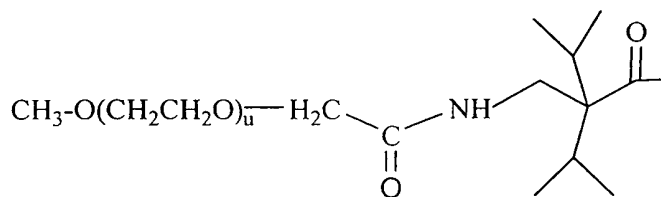


5



10

e



15

em que (u) é um inteiro positivo que varia de aproximadamente 10 a aproximadamente 2.300, para preferencialmente proporcionar polímeros que tenham um peso molecular total de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 45.000,

Em uma modalidade preferida, o polietileno glicol ativado é um que proporciona uma ligação de uretano ou ligação de amida com a proteína.

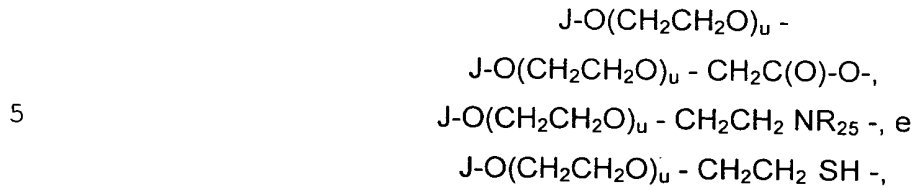
Métodos para preparação de polímeros que tem ácidos carboxílicos terminais em alta pureza são descritos no Pedido de Patente Norte-Americano N^o 11/328,662, os conteúdos do qual sendo incorporados aqui por referência. Os métodos incluem primeiramente a preparação de um éster de alquila terciário de um óxido de polialquileno seguido pela conversão ao ácido carboxílico do mesmo. A primeira etapa de preparação dos ácidos carboxílicos PAO do processo incluem formar um intermediário tal como éster de t-butila de ácido carboxílico de óxido de polialquileno. Este intermediário é formado pela reação de um PAO com um haloacetato de t-butila na presença de uma base tal como t-butóxido de potássio. Uma vez que o intermediário éster de t-butila foi formado, o derivado de ácido carboxílico do óxido de polietileno pode ser prontamente proporcionado em purezas excedendo 92%, preferencialmente excedendo 97%, mais preferencialmente excedendo 99% e mais preferencialmente excedendo 99,5% de pureza.

Ainda em aspectos alternativos, polímeros que têm grupos amina terminais podem ser empregados para preparar os conjugados de ADA. Os métodos de preparação de polímeros que contêm aminas terminais em alta pureza são descritos nos Pedidos de Patente Norte-Americanos N^{os} 11/508,507 e 11/537,172, os conteúdos dos quais sendo incorporados aqui por referência. Por exemplo, polímeros que têm azidas reagem com agentes redutores à base de fosfinas, tais como, trifenilfosfina ou um agente redutor de borohidreto de metal alcali, tal como NaBH₄. Alternativamente, os polímeros que incluem grupos abandonadores reagem com sais de amina protegido, tais como, sal de potássio de metil-terc-butila imidodicarbonato (KNMeBoc) ou o sal de potássio de di-terc-butil imidodicarbonato (KNBoc₂) seguido de desproteção do grupo amino protegido. A pureza dos polímeros que contêm as aminas terminais formadas por estes processos é maior que aproximadamente 95% e, preferencialmente, maior que 99%.

1, Polímeros Substancialmente Não-Antigênicos

Como determinado acima, R₁₀₋₁₂ e R₂₂₋₂₃ são, cada um, preferencialmente resíduos de polímeros solúveis em água que são preferencialmente substancialmente não-antigênicos, tal como, óxidos de polialquileno (PAOs) e mais preferencialmente polietileno glicóis, tal como, mPEG. Para propósitos de ilustração

e não para limitação, a porção de resíduo de polietileno glicol (PEG) de R₁₀₋₁₁ e R₂₂₋₂₃ podem ser selecionadas dentre:



em que:

(u) é o grau da polimerização, isto é, de aproximadamente 10 a aproximadamente 2.300;

10 R₂₅ é selecionado dentre hidrogênio, alquilas C₁₋₆, alquenilas C₂₋₆, alquinilas C₂₋₆, alquilas ramificadas C₃₋₁₂, cicloalquilas C₃₋₈, alquilas substituídas C₁₋₆, alquenilas substituídas C₂₋₆, alquinilas substituídas C₂₋₆, cicloalquilas substituídas C₃₋₈, arilas, arilas substituídas, aralquilas, heteroalquilas C₁₋₆, heteroalquilas C₁₋₆ substituídas, alcóxi C₁₋₆, fenóxi e heteroalcóxio C₁₋₆,

15 e

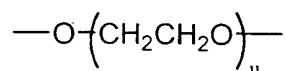
J é um grupo de revestimento, isto é, um grupo que é encontrado no terminal do polímero e, em alguns aspectos, pode ser selecionado de qualquer dentre NH₂ (ou CH₂CH₂NH₂), H, SH (ou CH₂CH₂SH), CO₂H (ou CH₂CO₂H), alquilas C₁₋₆, preferencialmente metila, ou outros grupos de ativação terminais de PEG, tais grupos sendo entendidos por aqueles com habilidade ordinária.

20 Em uma modalidade particularmente preferida, R₁₀₋₁₂, e R₂₂₋₂₃ são selecionados dentre, CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-, CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂C(O)-O-, CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂CH₃ NH- e CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂CH₂ SH-, onde (u) é um inteiro positivo, preferencialmente selecionado de modo que o peso molecular médio total das porções de polímero varia de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 100.000 Da. Mais preferencialmente, R₁₀₋₁₁ e R₂₂₋₂₃ independentemente possuem um peso molecular médio total de aproximadamente 4.000 Da a aproximadamente 4.5000 Da, com um peso molecular médio ponderal de aproximadamente 5.000 Da sendo mais preferido. Outros pesos moleculares

25

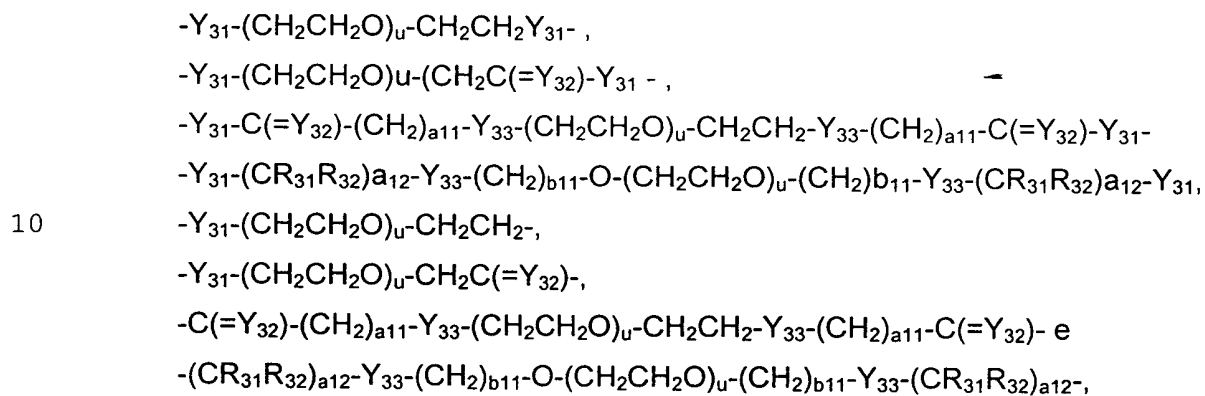
30 também são contemplados de modo a satisfazer as necessidades do técnico.

A PEG é preferencialmente representada pela estrutura:



e R₁₀₋₁₁ e R₂₂₋₂₃ preferencialmente compreendem resíduos desta fórmula. O grau de polimerização para o polímero representa o número de unidades de repetição na cadeia do polímero e é dependente do peso molecular do polímero.

Alternativamente, a porção de resíduo de polietileno glicol (PEG) da
5 invenção pode ser pela estrutura:



em que:

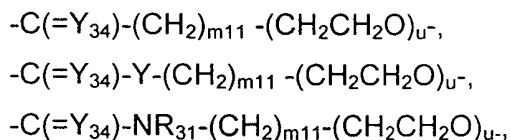
15 Y₃₁ e Y₃₃ são independentemente O, S, SO, SO₂, NR₃₃ ou uma ligação;
Y₃₂ é O, S, ou NR₃₄;

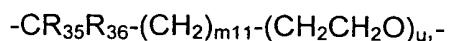
R₃₁₋₃₄ são independentemente selecionados dentre hidrogênio, alquila C₁₋₆,
alquenila C₂₋₆, alquinila C₂₋₆, alquila C₃₋₁₉ ramificada, cicloalquila C₃₋₈, alquila C₁₋₆
substituída, alquenila C₂₋₆ substituída, alquinila C₂₋₆ substituída, cicloalquila C₃₋₈
20 substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroalquila
C₁₋₆, heteroalquila C₁₋₆ substituída, alcóxi C₁₋₆, arilóxi, heteroalcóxi C₁₋₆, heteroarilóxi,
alcanolila C₂₋₆, arilcarbonila, alcóxicarbonila C₂₋₆, arilóxicarbonila, alcanoilóxi C₂₋₆,
arilcarbonilóxi, alcanolila C₂₋₆ substituída, arilcarbonila substituída, alcanoilóxi C₂₋₆
substituído e arilóxicarbonila substituída, alcanoilóxi C₁₋₆ substituído e
25 arilcarbonilóxi substituído;

(a₁₁), (a₁₂) e (b₁₁) são independentemente zero ou um inteiro positivo,
preferencialmente 0-6, e mais preferencialmente 0, 1 ou 2; e

(u) é um inteiro de aproximadamente 10 a aproximadamente 2300,

Como um exemplo, o PEG pode ser funcionalizado da seguinte maneira não
30 limitante:





em que

R_{31} , R_{35} e R_{36} são independentemente selecionados dentre H, alquilas C_{1-6} , arilas, arilas substituídas, aralquilas, heteroalquilas, heteroalquilas substituídas e alquilas C_{1-6} substituídas;

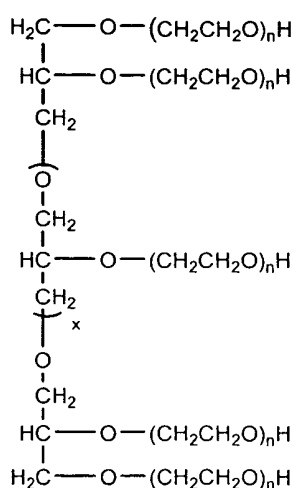
(m11) é zero ou um inteiro positivo, e preferencialmente 1 ou 2;

Y_{34} é O ou S; e

(u) representa o grau de polimerização.

Neste aspecto, o grupo de revestimento (J) tal como metila é preso ao terminal do PEG.

Por exemplo, os conjugados da presente invenção podem ser preparados por métodos que incluem converter o produto PEG-OH de multi-braços ou "PEG-estrela" tais como aqueles descritos no NOF Corp. Drug Delivery System catalog, Ver. 8 de Abril de 2006, a descrição do qual sendo incorporada aqui por referência, em um polímero ativado adequadamente, usando as técnicas de ativação descritas nas patentes Norte-Americanas N^os 5,122,614 ou 5,808,096, comumente designadas mencionadas anteriormente. Vide também Shearwater Corporation's 2001 catalog "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Application", incorporados aqui por referência. Os polímeros de múltiplos braços contêm quatro ou mais polímeros de braços e, preferencialmente, de quatro a oito polímeros de braços. Para propósitos de ilustração e não limitação, o resíduo de polietileno glicol de multibraços pode ser de fórmula:

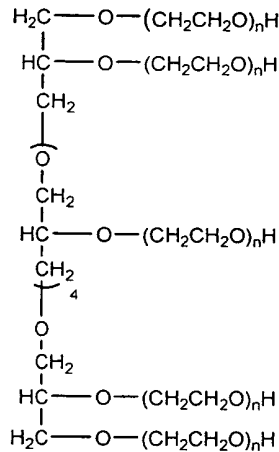


em que:

(x) is 0 ou um inteiro positivo, isto é, de aproximadamente 0 a aproximadamente 28; e

(n) é um grau de polimerização.

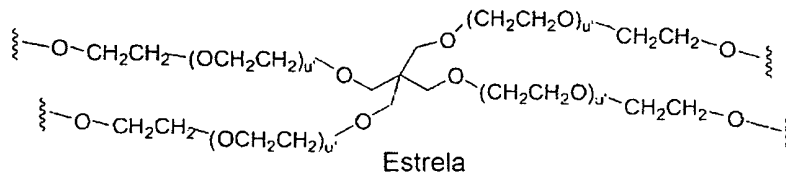
- 5 Em uma modalidade particular da presente invenção o PEG de multibraços possui a estrutura:



em que

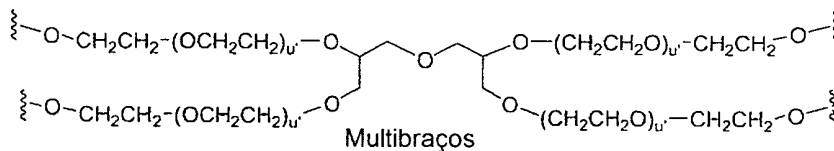
- 10 (n) é um inteiro positivo. Em uma modalidade preferida, os polímeros possuem um peso molecular total de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 100.000 Da, e preferencialmente de 4.000 Da a 45.000 Da.

Especificamente, o PEG pode ser de fórmula:



ou

15

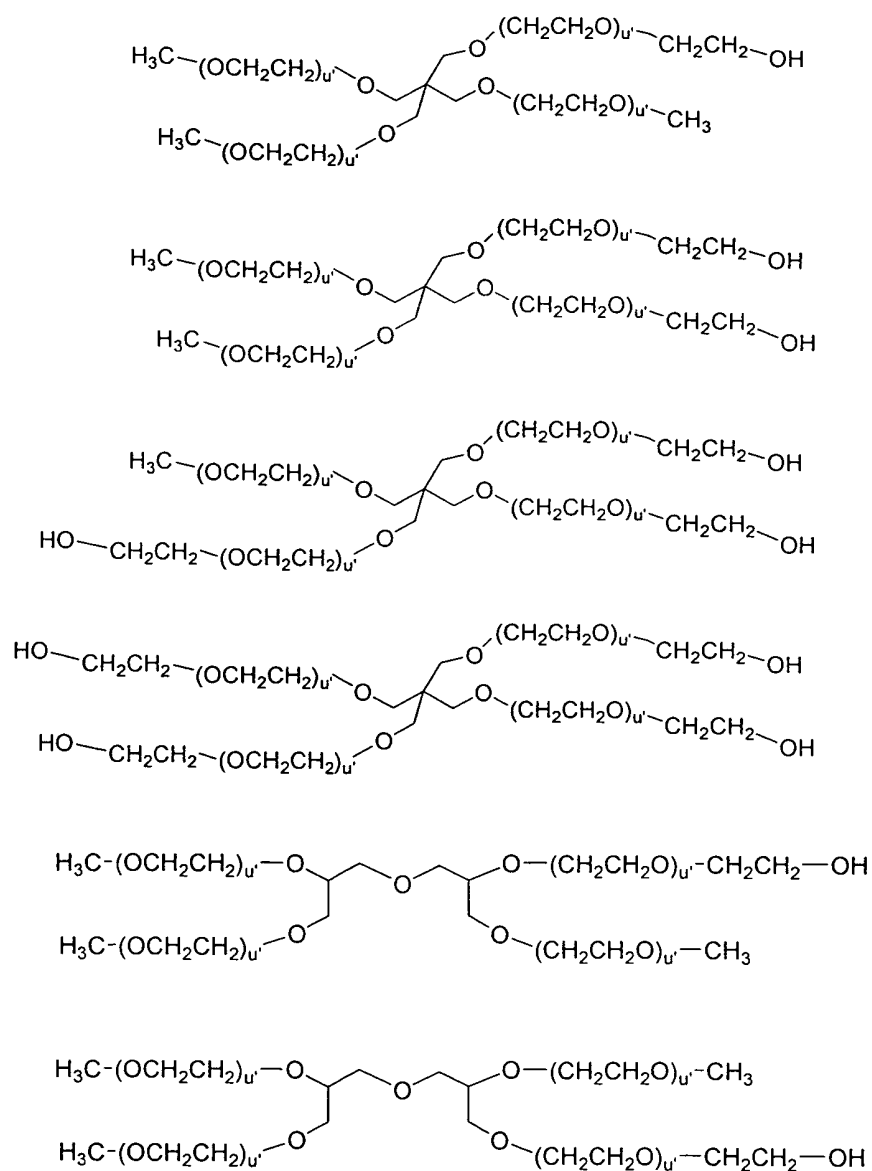


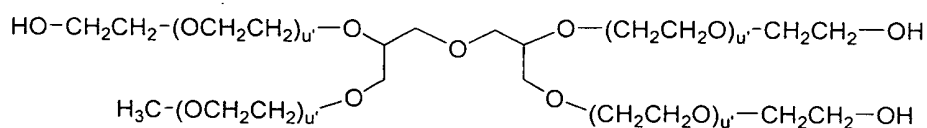
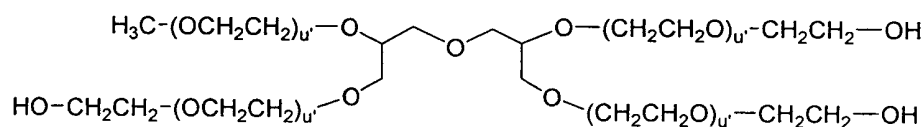
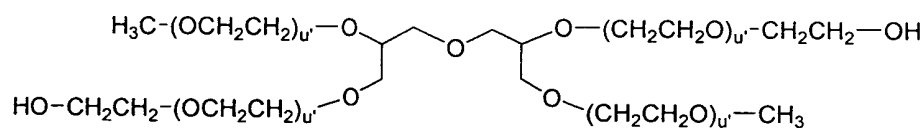
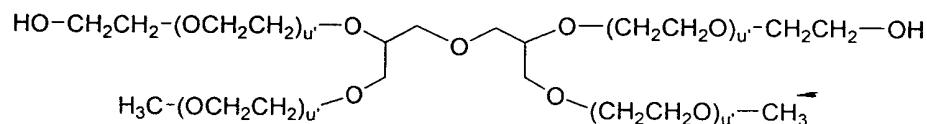
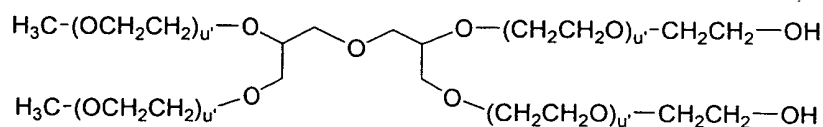
em que:

(u') é um inteiro de aproximadamente 10 a aproximadamente 570, para preferencialmente proporcionar polímeros tendo um peso molecular total de aproximadamente 4,000 a aproximadamente 45,000; e até 3 porções terminais de resíduo(s) é/são revestida(s) com uma metila ou outra alquila inferior.

- 5 Em algumas modalidades preferidas, todos os 4 braços de PEG são convertidos para grupos funcionais adequados, isto é, SC, etc., para facilitar a fixação a proteína recombinante. Tais compostos antes da conversão incluem:

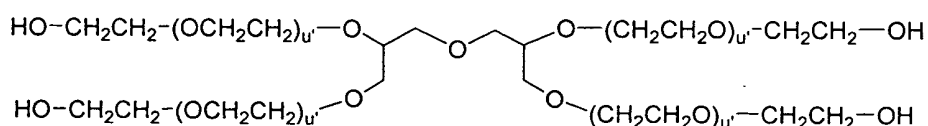
10





5

e



- As substâncias poliméricas incluídas aqui são preferencialmente solúveis em água a temperatura ambiente. Uma lista não limitante de tais polímeros inclui homopolímeros de óxido de polialquileno, tais como, polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenatado, copolímeros dos mesmos e copolímeros de bloqueio dos mesmos, contanto que a solubilidade em água de copolímeros de bloqueio seja mantida.

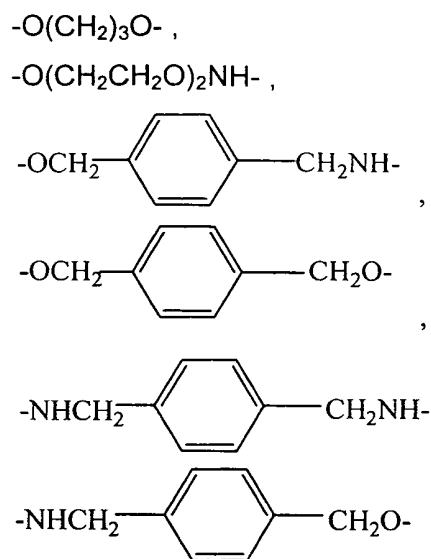
10

Em uma modalidade adicional, e como uma alternativa para polímeros a base de PAO, R₁₀₋₁₁, e R₂₂₋₂₃ são, cada um, opcionalmente selecionados dentre um ou mais materiais não antigênicos tais como dextrana, alcoóis polivinílicos, polímeros à base de carboidratos, hidroxipropilmetil-acrilamida (HPMA), óxidos de polialquilenos, e/ou copolímeros dos mesmos. Vide também a Patente Norte-Americana Nº 6,153,655 comumente designada, os conteúdos da qual sendo aqui incorporados por referência. Será entendido por aqueles com habilidade ordinária que o mesmo tipo de ativação é empregado como descrito aqui como para os PAOs, tal como PEG. Aqueles de habilidade ordinária na técnica perceberão adicionalmente que a lista antecedente é meramente ilustrativa e que todos os materiais poliméricos que têm as qualidades descritas aqui são contemplados e que outros derivados de óxido de polietileno, tais como, polietileno glicóis, etc. são também contemplados.

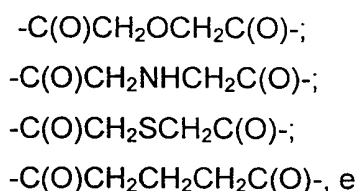
2, Grupos de Ligantes Bifuncionais

Em muitos aspectos da invenção, L₁₋₆ e L₈ são grupos de ligação que facilitam a fixação de filamentos de polímeros, por exemplo, R₁₀₋₁₁, e/ou R₂₂₋₂₃, a ligação proporcionada pode ser proporcionada diretamente ou através de grupos de acoplamento conhecidos por aqueles com habilidade ordinária. Nestes aspectos da invenção, L₁₋₆ e L₈ podem ser os mesmos ou diferentes e podem ser selecionados a partir de uma variedade ampla de grupos bem conhecidos por aqueles com habilidade ordinária, tais como, grupos alifáticos aromáticos e alifáticos bifuncionais e heterobifuncionais, aminoácidos, etc. Desse modo, L₁₋₆ e L₈ podem ser os mesmos ou diferentes e incluem grupos, tais como:

- NH(CH₂CH₂)₂O-
- NH(CH₂CH₂)(CH₂CH₂O)NH-
- O(CH₂CH₂)NH-
- O(CH₂CH₂)O-
- NH(CH₂CH₂)NH-
- NH(CH₂CH₂)(CH₂CH₂O)-
- NH(CH₂CH₂O)-
- NH(CH₂CH₂O)(CH₂)NH-
- NH(CH₂CH₂O)₂-
- O(CH₂)₃NH-



5 Preferencialmente, L_{1-6} e L_8 são selecionados dentre:



10 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$.

Alternativamente, resíduos de aminoácidos adequados podem se selecionados a partir de qualquer um dos aminoácidos-L de ocorrência natural, por exemplo, alanina, valina, leucina, etc. e/ou uma combinação dos mesmos, para nomear alguns. L_{1-6} e L_8 também pode incluir um peptídeo que varia em tamanho, por exemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 resíduos de aminoácidos.

Derivados e análogos de aminoácidos de ocorrência natural, bem como vários aminoácidos de ocorrência natural conhecidos na arte (D ou L), hidrofóbicos ou não hidrofóbicos, são também contemplados para estarem dentro do escopo da invenção.

3. Grupamentos Z e suas Funções

Em um aspecto da invenção, Z e Z' são $L_7\text{-C}(=\text{Y}_{12})$ em que L_7 é um ligante bifuncional selecionado dentre o grupo que define L_{1-6} , e Y_{12} é selecionado dentre os mesmos grupos como aqueles que definem Y_1 . Neste aspecto da invenção, o grupo Z serve como uma ligação entre a ADA e o restante do sistema de liberação

de polímero. Em outros aspectos da invenção, Z é um grupamento que é ativamente transportado em uma célula alvo, um grupamento hidrofóbico, e combinações dos mesmos. O Z' quando presente pode servir de um ligante funcional, um grupamento que é transportado ativamente em uma célula alvo, um grupamento hidrofóbico, e combinações dos mesmos.

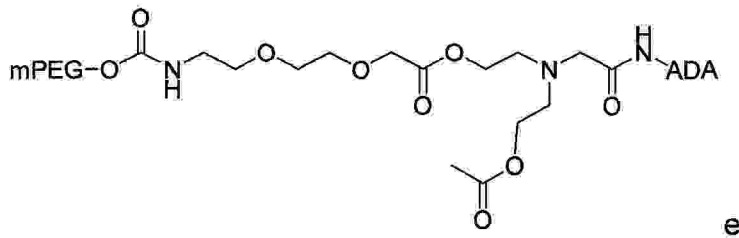
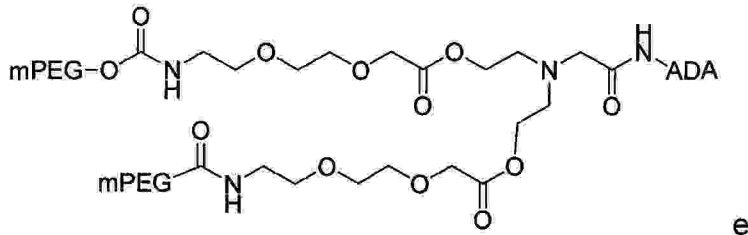
Neste aspecto da invenção, os sistemas de polímero liberados são preparados de modo que cliva a hidrólise in vivo do polímero a partir de ADA e libera a enzima em fluido extracelular, enquanto ainda ligado ao grupamento Z. Por exemplo, algumas combinações potenciais Z-B são leucina-ADA e Gly-Phe-Leu-Gly-ADA.

B. Preparação de Conjugados de ADA

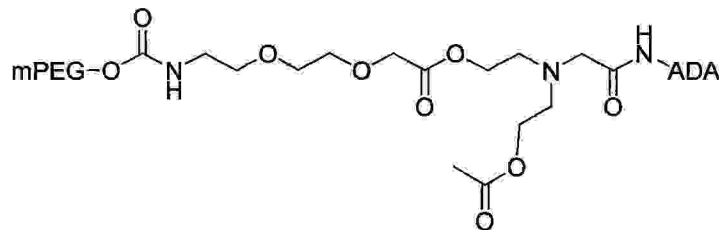
Para propósitos de ilustração, reações de conjugação adequadas incluem reagir ADA com um sistema de polímero ativado de forma adequada descrito aqui. A reação é preferencialmente realizada usando condições bem conhecidas por aqueles de habilidade ordinária para modificação de proteína, incluindo o uso de um sistema tamponado por PBS, etc. com o pH na faixa de 6,5-8,5. É contemplado que na maioria dos exemplos, um excesso de polímero ativado será reagido com a ADA.

Reações deste tipo frequentemente resultarão na formação de conjugados que contém um ou mais polímeros presos a ADA. Como será apreciado, será frequentemente desejável isolar as várias frações e proporcionar um produto mais homogêneo. Na maioria dos aspectos da invenção, a mistura reacional é coletada, carregada em uma resina de coluna adequada e as frações desejadas são sequencialmente eluídas com níveis aumentados de tampão. As frações são analisadas com ferramentas analíticas adequadas para determinar a pureza da proteína conjugada antes de serem processadas mais tarde. Sem considerar a rota de síntese e o polímero ativado selecionado, os conjugados corresponderão a Fórmula (I) como definida aqui. Alguns dos conjugados preferidos que resultam das técnicas sintéticas descritas aqui incluem:

Quando os sistemas de polímeros a base de bicina são usados, os dois conjugados preferidos são:



5



em que os pesos moleculares de mPEG são os mesmos acima.

Os conjugados mais preferidos incluem

10



15

Observa-se que a PEGuilação de ADA será empiricamente otimizada para fixações de PEG total por proteína, tamanho de polímero PEG, e modelo de ligante de PEG. As características chave da ADA PEGuilada para avaliação de otimização de PEGuilação inclui tanto ensaios *in vitro* (por exemplo, atividade enzimática e estabilidade) e ensaios *in vivo* (por exemplo, farmacocinéticos e farmacodinâmicos).

Deve ser entendido que a adenosina deaminase aqui revelada pode ser usada para a preparação de um medicamento para o tratamento de um tumor.

C. Tumores a serem Tratados

Os métodos inventivos são aplicáveis para tratar todos os tipos de tumores, incluindo cânceres, que são suscetíveis de uma redução nos níveis de adenosina ou deoxiadenosina no sangue e/ou tecidos de um humano ou animal a ser tratado.

5 Amplamente, estes incluem tumores de sangue bem como tumores sólidos. Entre os tumores sólidos estão incluídos aqueles que são suprimidos por quando níveis reduzidos de adenosina permitem que o sistema imune do paciente suprima de forma mais eficaz o tumor e/ou tumores que são suprimidos quando níveis reduzidos de adenosina inibem o suprimento sanguíneo, por exemplo, já em
10 tumores hipóxicos.

Mais preferencialmente, tumores suscetíveis de tratamento pelos métodos inventivos são tumores sólidos, que se beneficiam do efeito adicional de uma redução na estimulação angiogênica, que acompanha uma redução nos níveis de tecido de adenosina.

15 Tumores a serem tratados incluem, simplesmente por meio de exemplo, aqueles que se originam no sistema imune, sistema esquelético, músculos e coração, mama, trato gastrointestinal, central e sistema nervoso periférico, sistema renal, sistema reprodutivo, sistema respiratório, pele, sistemas de tecido conectivo, incluindo articulações, tecidos graxos, sistemas circulatórios, incluindo paredes de
20 vasos sanguíneos, e semelhantes.

Tumores do sistema esquelético incluem, por exemplo, sarcomas e blastomas tais como osteosarcoma, condrosarcoma, condroblastoma, etc. Tumores do músculo e coração incluem tumores do esqueleto e músculo leve, por exemplo, leiomiomas (tumores benignos de músculo leve), leiomiosarcomas, rabdomiomas
25 (tumores benignos do músculo esquelético), rabdomiosarcomas, sarcoma cardíaco, etc. Tumores do trato gastrointestinal incluem, por exemplo, tumores de boca, esôfago, estômago, intestino delgado, colón e tumores coloretais, bem como tumores de órgãos secretórios do trato gastrointestinal, tais como glândulas salivares, fígado, pâncreas, o trato biliar e semelhante.

30 Tumores do sistema nervoso central incluem tumores do cérebro, retina, e cordão espinhal, e podem também se originar em tecido conectivo associado, osso, vasos sanguíneos ou tecido nervoso. Tumores do sistema nervoso periférico são também contemplados para serem tratados. Além disso, tumores malignos do

sistema nervoso periférico incluem tumores malignos que envolvem nervos periféricos.

5 Tumores do sistema renal incluem aqueles dos rins, por exemplo, carcinoma de células renais, bem como tumores de uretra e bexiga. Tumores do sistema reprodutivo incluem tumores do colo do útero, útero, ovário, próstata, testículos e glândulas secretórias relacionadas. Tumores de sistema imune incluem tumores sólidos e à base de sangue, incluindo linfomas, por exemplo, o Hodgkin e não-Hodgkin

10 Tumores do sistema respiratório incluem tumores de passagens nasais, brônquios e pulmões. Tumores de mama incluem, por exemplo, carcinoma lobular e do canal.

15 Tipos particularmente comuns de tumores malignos a serem tratados incluem, simplesmente por meio de exemplo, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer colorctal, câncer de bexiga, câncer pancreático, câncer endometrial, câncer de ovário, melanoma cutâneo, linfomas, linfoma não Hodgkin, câncer pancreático, neuroblastoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma (surgindo do músculo), retinoblastoma, osteoblastoma e sarcoma de Ewing, para citar apenas alguns.

D. Seleção de Dose

20 Um técnico apreciará que, em um ajuste clínico, a dosagem de Adagen® é individualizada dependendo da resposta clínica do tumor e perfil de efeitos colaterais de um paciente individual, seja animal ou humano. No estudo de exemplo proporcionado aqui abaixo, a dose mais elevada é a dose máxima possível que é tolerada. O Adagen® é comercialmente fornecido como 250 U/mL. Isto se traduz para 2000 U/kg para uma aproximação de camundongo de 25g injetado com 0,2 mL de Adagen®. A dose mais baixa empregada nos estudos do exemplo proporcionado aqui abaixo se aproxima da dose humana clínica. O esquema de dose recomendado no tratamento de pacientes humanos com SCID é 10 U/kg para a primeira dose, 15 U/kg para a segunda dose e 20 U/kg para a terceira dose. 25 Aumentos adicionais de 5 U/kg/semana são permitidos, até uma dose única máxima de 30 U/kg. A dose no protocolo exemplificado abaixo (100 U/kg) é a dose equivalente a de camundongo de aproximadamente 12 U/kg dose por criança em tratamento. 30

A dose com base na quantidade de enzima variará de, por exemplo, aproximadamente 0,10U/kg até aproximadamente 30 U/kg, ou mais, preferencialmente de aproximadamente 0,5 U/kg até aproximadamente 20 U/kg, e mais preferencialmente de 0,5 U/kg até aproximadamente 12 U/kg (isto é, por kg de peso de corpo do paciente) tal como, de 0,5 U/kg até aproximadamente 5 U/kg. Um dose semanal total pode ser até 40 U/kg, ou maior, como tolerada pelo receptor. Aumentos adicionais a 5U/kg por semana são permitidos, até uma dosagem máxima única de 30 U/kg, ou maior, como tolerado pelo receptor. Em geral, após injeções semanais de ADAGEN® a 15U/kg, a média através do nível de atividade de ADA no plasma está entre 20 e 25 $\mu\text{mol/h/mL}$.

Sem dúvida, o técnico apreciará que a dose de ADA conjugada a polímero também pode ser ajustada para o tamanho de polímero particular, ligante químico e valência. Por exemplo, o regime de dosagem para um conjugado de polímero que compreende de duas a quatro enzimas ADA por polímero será ajustado de acordo com as unidades de ADA por mL de solução de qualquer conjugado de polímero particular de ADA.

Ao prover o conjugado-PEG ADA ou ADA por injeção, a faixa de dose ótima pode ser ajustada pela monitoração dos níveis de adenosina no plasma. É geralmente desejável proporcionar ao receptor uma dosagem que manterá a atividade de ADA do plasma (níveis baixos) na faixa de aproximadamente 10 a 100 $\mu\text{mol/h/mL}$, preferencialmente de 15 a aproximadamente 35 $\mu\text{mol/h/mL}$ (testado a 37°C), e demonstra um declínio em adenosina por eritrócito, isto é, dATP a \leq aproximadamente 0,001- 0,057 $\mu\text{mol/mL}$, preferencialmente de aproximadamente 0,005- a aproximadamente 0,015 $\mu\text{mol/mL}$ em eritrócitos empacotados, ou \leq 1% de adenosina por eritrócito total (isto é, conteúdo de ATP + dATP), com um nível de adenosina normal, como medido em uma amostra de pré-injeção. O valor normal de dATP está abaixo de aproximadamente 0,001 $\mu\text{mol/mL}$.

Detalhes de informação de dosagem de ADA são descritos na prescrição inserida para ADAGEN® (Enzon, Inc.), os conteúdos dos quais sendo incorporados aqui.

EXEMPLOS

Os exemplos que seguem servem para proporcionar apreciação adicional da invenção, mas não significam, de modo algum, uma forma de restringir o escopo eficaz da invenção.

5

EXEMPLO 1

EFICÁCIA ANTITUMOR DE ADAGEN® EM MODELO DE XENOENXERTO DE TUMOR DE PRÓSTATA HUMANO

DU145

A) SISTEMA DE TESTE

10

Espécies: Camundongos, *Mus musculus*

Cepa: Nu Atímico

Fornecedor: Harlan-Sprague Dawley

Sexo: Feminino

Peso Médio Inicial: 27,2 g

15

No. em Estudo: 40

Período de Aclimação: 7 dias após a chegada

Identificação: Número da Gaiola e Furador para Marcar Orelhas

B) MÉTODOS

20

Modelo Experimental:

Células de câncer de próstata humano DU 145 foram obtidas do American Type Culture Collection (ATTC), Manassas, VA. Os tumores foram estabelecidos em camundongos nus por injeção subcutânea de $2,0 \times 10^6$ de células DU 145/camundongo no flanco auxiliar direito. O crescimento de tumor foi monitorado duas vezes por semana e medido uma vez que palpável. Quando os tumores alcançaram um volume médio de 78 mm^3 , os camundongos foram divididos em grupos experimentais (8/grupo). Os camundongos foram tratados com Adagen® a 2000, 500, ou 100 IU/kg duas vezes por semana por 5 semanas. Como um controle positivo, os camundongos receberam Avastin® (Bevacizumabe, um anticorpo monoclonal anti-VEGF) a uma dose de 5mg/kg na mesma frequência que Adagen®. Os grupos experimentais foram determinados como na Tabela 1, abaixo. O primeiro dia de dosagem foi designado Dia 1, O volume de tumor para cada camundongo foi determinado pela medição de duas dimensões com compasso de

30

calibre e calculado usando a fórmula: $(\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$. O Peso do camundongo e o tamanho do tumor foram medidos no começo do estudo e duas vezes por semana por todo o período de 8 semanas.

Grupo #	Grupo	# animais (n)	Dose (IU/kg)	Rota de injeção	Esquema de dosagem
1	Controle	8	Salina	i.p.	Duas vezes por semana x 5
2	Adagen®	8	2000	i.p.	Duas vezes por semana x 5
3	Adagen®	8	500	i.p.	Duas vezes por semana x 5
4	Adagen®	8	100	i.p.	Duas vezes por semana x 5
5	Avastin®	8	5mg/kg	i.p.	Duas vezes por semana x 5

5 Seleção de Dose:

Adagen® ou Avastin® foi administrado pela rota intraperitoneal ("i.p.") duas vezes por semana por 5 semanas (total: 10 doses).

Adagen®: Lote Número: NV0604, Concentração: 229 IU/mL

Avastin®: Lote Número: M66781, Concentração: 25 mg/mL

10 Os cálculos de dose foram baseados no peso do corpo tomado no Dia 1

Exames Clínicos:

Os camundongos foram examinados na chegada. Depois disso, os camundongos foram examinados individualmente duas vezes por semana após a palpação de tumor inicial, para sinais clínicos, mudanças comportamentais gerais, e monitoradas pelo peso do corpo. Qualquer morte e sinal clínico foram registrados. O consumo de água e alimento não foi monitorado. Camundongos apresentando tumores que mostraram lesões necróticas abertas foram sacrificados. Camundongos perdendo mais que 20% do peso do corpo também foram humanamente sacrificados.

20 Análises Estatísticas

As diferenças em mudança de % no volume de tumor entre vários tratamentos foram comparadas usando um modo de análise de variância. Todas as comparações de múltiplos de combinação dupla ("pairwise") foram feitas usando o método de Holm-Sidak.

C) RESULTADOS

Definições de Termos usados:

(a) % de volume de tumor inicial: $(\text{Volume de tumor em algum dia dado} / \text{Volume de tumor no Dia 1}) \times 100$

5 (b) % de mudança do volume de tumor: $[(\text{Volume de tumor em algum dia dado} - \text{Volume de tumor no Dia 1}) / \text{Volume de tumor no Dia 1}] \times 100$

(c) % de Inibição de Crescimento de Tumor (ICT): $[(\text{Volume médio de tumor do grupo de controle} - \text{Volume médio de tumor de grupo de tratamento}) / \text{Volume médio de tumor do grupo de controle}] \times 100$

10 (d) A regressão de tumor é definida como o volume de tumor negativo comparado ao Dia 1,

(e) A cura é definida como a ausência completa de tumor como observado a partir de olho nu humanos.

15 O tamanho médio de tumor no começo do estudo foi 78 mm^3 . O peso médio do corpo no começo do estudo foi 27,20g. Camundongos em todos os grupos ganharam peso e no final do estudo o peso dos camundongos nos vários grupos aumentou de 20 a 25% dos seus pesos de pré-tratamento. O estudo foi terminado no dia 57, quando a maioria dos animais também teve tumores ulcerados ou tiveram um volume de tumor de mais de 1500 mm^3 .

20 As Tabelas 2 e 3, abaixo, resumem os resultados finais vistos no dia 49 do estudo (último dia de 100% de sobreviventes de animais de controle), e proporcionam uma comparação de grupo de sobrevivência entre os animais tratados com Adagen® e os animais tratados com Avastin®. Os tumores do grupo de controle cresceram regularmente em todo o estudo. No dia 49, o tamanho de
25 volume médio de tumor era $783,1 (\pm 556,2) \text{ mm}^3$. A mudança percentual no crescimento do tumor foi 833,3 % ($\pm 622,7$). O tratamento com Adagen® em todos os três níveis de dose foi eficaz na inibição de crescimento de tumor. Deve-se observar que para todos os grupos de tratamento, os tumores cresceram em uma taxa lenta até o último dia de dosagem (dia 33), após o que os tumores tiveram
30 uma taxa rápida de crescimento (dados não mostrados). Em consistência com estas informações está o fato de que a % de mudança no volume de tumor em todos os três níveis de doses de Adagen® foi significativamente diferente daquela do grupo de controle até o dia 36 ($P < 0,05$) (dados não mostrados).

Isto sugere que Adagen® possui um efeito citostático no crescimento do tumor. Entretanto a mudança percentual no volume de tumor não foi estatisticamente diferente daquela dos controles após o dia 36 até o final do estudo, tratamento com Adagen® resultou em inibição de crescimento de tumor detectável.

5 Em particular, tumores tratados com 2000 IU/kg de Adagen® tiveram volume médio de tumor de 343,0 (\pm 249,8) mm³ no dia 49, A mudança média no volume de tumor foi 424,2 % (\pm 360,6). Adagen® a 2000 IU/kg mostrou 56% de inibição de crescimento de tumor.

10 Os tumores tratados com 500 IU/kg de Adagen® tiveram um volume médio de tumor de 696,3 (\pm 290,4) mm³ no dia 49, A mudança média no volume de tumor foi 797,6% (\pm 492,7), e a mudança a partir do tumor inicial foi 897,6% (\pm 492,7). A inibição de crescimento de tumor foi de 11,1%. Os tumores neste grupo tiveram taxas de crescimento de tumor similar como os outros grupos tratados com Adagen® até o dia 40 após o que eles cresceram em uma taxa muito mais rápida.

15 A razão para esta discrepância é desconhecida.

Os tumores tratados como 100 IU/kg de Adagen® tiveram um volume médio de tumor de 414,8 (\pm 219,0) mm³ no dia 49, A mudança média no volume de tumor foi 489,9% (\pm 307,0), e a mudança de porcentagem média a partir do tumor inicial foi 589,9% (\pm 307,0). A inibição de crescimento de tumor ou ICT foi 47,0%.

20 O efeito terapêutico de Adagen® alcançou um efeito máximo com uma dose inferior de 100 IU/kg. Deve ser observado que a dose de 100 IU/kg se aproxima da dose clínica humana de Adagen® (dose usada para tratar crianças com SCID). Avastin® mostrou a diminuição mais eficaz no tamanho do tumor com uma inibição de crescimento de tumor ou ICT de 92,5%.

25 Como conclusão, o tratamento com Adagen® em todos os três níveis de dose foi eficaz na inibição de crescimento de tumores DU145 *in vivo*.

TABELA 2: Resumo Final (Dia 49)

Grupo No.	Composto	Volume Médio Final de Tumor	Medianas de Volume Final de Tumor	% de Mudança no Volume de Tumor	% Inicial de Volume de Tumor	% Inicial de Volume de Tumor	# de Regressões	# Curados	% Sobreviventes
1	Salina	783,1 (556,2)	680,0	833,3 (622,7)	933,3 (622,7)	-	0	0	62,5
2	Adagen (2000 IU/kg)	343,0 (249,8)	283,8	424,2 (360,6)	524,2 (360,6)	56,2	0	0	75,0
3	Adagen (500 IU/kg)	696,3 (290,4)	766,2	797,6 (492,7)	897,6 (492,7)	11,1	0	0	75,0
4	Adagen (100 IU/kg)	414,8 (219,0)	349,8	489,9 (307,0)	589,9 (307,0)	47,0	0	0	75,0
5	Avastin (5 mg/kg)	58,5 (36,1)	49,3	-15,7 (59,6)	84,3 (59,6)	92,5	7/8	0	87,5

regressão, #curados e %sobreviventes são do dia 56
Volume medido de tumor, medianas, % de mudança no volume de tumor, % inicial de volume de tumor e % da inibição do crescimento de tumor são do dia 49

TABELA 3: Comparação com Grupos Sobreviventes (# Animal vivo)

Grupo	1	5	8	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	49	51	55	57
1:Salina	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	5 ^á	5	5	5
2:Adagen (2000U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 ^é	7	6 ^ñ	6	6	6
3:Adagen (500U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 ^é	7	6 ^ñ	6	5 ⁱ	5
4:Adagen (100U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6 ^ó	6	6	6	5 ⁱ	5
5:Avastin (5mg/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 ^ñ	7	7	7

^á Dois animais foram sacrificados devido a tamanhos de tumores em excesso de 1500mm³. Um animal sacrificado devido a um tumor ulcerado.
^é Animal sacrificado devido a um tumor ulcerado no dia 40,
^ñ Animal sacrificado devido a um tumor ulcerado no dia 49,
ⁱ Animal sacrificado devido a um tumor ulcerado no dia 55,
^ó Dois animais foram sacrificados devido a tumores ulcerados no dia 49,

EXEMPLO 2**EFICÁCIA ANTITUMOR DE ADAGEN® EM MODELO DE XENOENXERTO DE TUMOR DE OVÁRIO HUMANO****SK-OV-3****A) SISTEMA DE TESTE**

Espécies: Camundongos, Mus musculus

Cepa: Nu Atímico

10 Fornecedor: Harlan-Sprague Dawley

Sexo: Feminino

Peso Médio Inicial: 22,18 g

No. em Estudo: 54

Período de Aclimação: 7 dias após a chegada

15

B) MÉTODOS**Modelo Experimental:**

20 Tumores de adenocarcinoma de ovário humano SK-OV-3 foram estabelecidos em camundongos nus por injeção subcutânea de 3×10^6 células/camundongo no flanco auxiliar direito. O crescimento de tumor foi

monitorado duas vezes por semana e medido uma vez que palpável. O volume de tumor para cada camundongo foi determinado pela medição de duas dimensões com compasso de calibre e calculado usando a fórmula: volume de tumor = (comprimento x largura²)/2). Quando os tumores alcançaram um volume médio de 90 mm³, os camundongos foram divididos em grupos experimentais (9/grupo). Os grupos experimentais foram determinados como na Tabela abaixo. O primeiro dia de dosagem foi designado Dia 1, O Peso do camundongo e o tamanho do tumor foram medidos no começo do estudo e duas vezes por semana até o final do estudo. O estudo foi terminado a aproximadamente 7 semanas (52 dias), quando a maioria dos animais tiveram massas tumorais grandes ou ulceradas.

TABELA 4

Grupo #	Grupo	# camundongo (n)	Dose (U/kg)	Rota de injeção	Esquema de dosagem
1	Controle	9	salina	i.p	Duas vezes por semana x 5
2	Adagen®	9	2000	i.p	Duas vezes por semana x 5
3	Adagen®	9	500	i.p	Duas vezes por semana x 5
4	Adagen®	9	100	i.p	Duas vezes por semana x 5
5	Avastin®	9	100 ug/camundongo	i.p	Duas vezes por semana x 5
6	ADA Nativa	9	2000	i.p.	Duas vezes por semana x 5

Regime de dosagem

Adagen®, Avastin®, ou ADA Nativa foi administrada intravenosamente duas vezes ao dia por cinco semanas (Total: 10 doses).

Artigos de teste

Adagen®: Lote Número: NV0604, Concentração: 229 IU/mL

Avastin®: Lote Número: M66781, Concentração: 25 mg/mL

ADA Nativa: Lote Número: 06-0315-111

Cálculos de doses:

Com base no peso do corpo tomado no dia 1,

Exames Clínicos:

Os camundongos foram examinados na chegada. Depois disso, os camundongos foram examinados individualmente duas vezes por semana após a palpação de tumor inicial, para sinais clínicos, mudanças comportamentais gerais, e monitoradas pelo peso do corpo. Qualquer morte e sinal clínico foram registrados. O consumo de água e alimento não foi monitorado. Camundongos apresentando tumores que mostraram lesões necróticas abertas foram sacrificados. Camundongos perdendo mais que 20% do peso do corpo também foram humanamente sacrificados.

10 Análises Estatísticas

As diferenças em mudança de % no volume de tumor entre vários tratamentos foram comparadas usando um modo de análise de variância. Todas as comparações de múltiplos de combinação dupla ("pairwise") foram feitas usando o método de Tukey-Kramer.

15 **C) RESULTADOS**Definições de Termos usados:

(a) % de volume de tumor inicial: $(\text{Volume de tumor em algum dia dado} / \text{Volume de tumor no Dia 1}) \times 100$

20 (b) % de mudança do volume de tumor: $[(\text{Volume de tumor em algum dia dado} - \text{Volume de tumor no Dia 1}) / \text{Volume de tumor no Dia 1}] \times 100$

(c) % de Inibição de Crescimento de Tumor (ICT): $[(\text{Volume médio de tumor do grupo de controle} - \text{Volume médio de tumor de grupo de tratamento}) / \text{Volume médio de tumor do grupo de controle}] \times 100$

25 (d) A regressão de tumor é definida como o volume de tumor negativo comparado ao Dia 1,

(e) A cura é definida como a ausência completa de tumor como observado a partir de olho nu humano.

30 O tamanho médio de tumor no começo do estudo foi 90 mm^3 . O peso médio do corpo no começo do estudo foi 22,2g. O peso médio do corpo em todos os grupos não mudou significativamente em todo o estudo. O estudo foi terminado no dia 52, Quatro dos camundongos foram sacrificados devido ao crescimento de tumores acima de 1500 mm^3 .

A Tabela 5, abaixo, fornece o resumo final dos resultados no dia 32 (último dia de 66% de sobreviventes de animais de controle. Os tumores do grupo de controle cresceram regularmente em todo o estudo. No dia 32, o tamanho de volume médio de tumor era 754,9 (\pm 700,7) mm³. A mudança percentual no crescimento do tumor foi 693,2 % (\pm 673,6).

TABELA 5: Resumo Final (Dia 32)

Grupo No.	Composto	Volume Médio Final de Tumor	Medianas de Volume Final de Tumor	% de Mudança de Volume de Tumor	% Inicial de Volume de Tumor	% Inicial de Volume de Tumor	# de Regressões	# Curados	% Sobreviventes
1	Salina	754,9 (700,7)	485,5	693,2 (673,6)	793,2 (673,6)	-	0	0	66
2	Adagen® (2000 IU/kg)	437,7 (122,2)	446,4	402,1 (177,7)	502,1 (177,7)	42,0	0	0	100
3	Adagen® (500 IU/kg)	471,1 (60,0)	465,8	421,3 (102,2)	521,3 (102,2)	37,6	0	0	89
4	Adagen® (100 IU/kg)	497,7 (152,6)	478,9	450,7 (172,7)	550,7 (172,7)	34,1	0	0	100
5	Avastin® (5 mg/kg)	210,2 (65,9)	198,6	161,6 (88,3)	261,6 (88,3)	72,2	0	0	100
6	Native ADA (2000 IU/kg)	356,6 (213,0)	329,7	340,1 (239,1)	440,1 (239,1)	52,8	0	0	77

Tumores tratados com 2000 IU/kg de Adagen® tiveram volume médio de tumor de 437,7 (\pm 122,2) mm³ no dia 32. A mudança média no volume de tumor foi 402,1 % (\pm 177,7). Adagen® a 2000 IU/kg mostrou 42% de inibição de crescimento de tumor.

5 Os tumores tratados com 500 IU/kg de Adagen® tiveram um volume médio de tumor de 471,1 (\pm 60,0) mm³ no dia 32. A mudança média no volume de tumor foi 421,3% (\pm 102,2), e a mudança a partir do tumor inicial foi 521,3% (\pm 102,2). A inibição de crescimento de tumor foi de 37,6%.

10 Os tumores tratados como 100 IU/kg de Adagen® tiveram um volume médio de tumor de 497,7 (\pm 152,6) mm³ no dia 32. A mudança média no volume de tumor foi 450.7% (\pm 172.7), e a mudança de porcentagem média a partir do tumor inicial foi 550.7% (\pm 172.7). A inibição de crescimento de tumor ou ICT foi 34.1%.

15 Os tumores tratados com 2000 IU/kg de ADA Nativa tiveram um volume médio de tumor de 356.6 (213.0) mm³ no dia 32. A mudança média no volume de tumor foi 340.1% (\pm 210,0) e a mudança de porcentagem média a partir do tumor inicial foi 440.1% (239.1). A inibição de crescimento de tumor ou ICT foi 52.8%.

20 O tratamento com Adagen com qualquer nível de dose foi proporcional aos resultados do controle. Entretanto, Adagen em cada nível de dose produziu ICT como observado acima.

25 O efeito terapêutico de Adagen® alcançou um efeito máximo com uma dose inferior de 100 IU/kg. Deve ser observado que a dose de 100 IU/kg se aproxima da dose clínica humana de Adagen® (dose usada para tratar crianças com SCID). Avastin®, servindo de controle positivo neste estudo, mostrou a diminuição mais eficaz no tamanho do tumor com uma ICT de 72%.

Como conclusão, o tratamento com Adagen® a 100, 500 ou 2000 UI/kg resultou na inibição de crescimento de tumores variando de 34 - 42%.

30 As enzimas de ADA recombinantes alternativas para os métodos da invenção são descritas como segue.

EXEMPLO 3

**CONSTRUÇÃO DE CEPA DE EXPRESSÃO DE *E. COLI* QUE EXPRESSA
ADA HUMANA RECOMBINANTE COM UMA MUDANÇA CYS PARA SER
NA POSIÇÃO 74 DA PROTEÍNA MADURA**

5 A sequência de 363 aminoácidos reportada de adenosina deaminase humana (deaminase (GenBank NP_000013, incorporado aqui por referência) foi analisada para presença de códons de cisteína. Cinco posições no polipeptídeo maduro (Met N-terminal é clivado) codificam cisteína (C74, C152, C153, C168, C261). Na ADA humana que expressa gene modificado e modelado, apenas um destes cinco códons de cisteína (Cisteína 74, TGC) foi mudado para um códon de serina (TCC) (Esta é a posição 75 na proteína traduzida). A sequência de polipeptídeo definida vide SEQ ID NO: 3) foi proporcionada por Blue Heron Corporation (Bothell, Washington, U.S.A.) para síntese de gene completa de um gene novo tendo códons otimizados para expressão de *E. coli*, usando síntese química padrão de segmentos de oligonucleotídeos em sobreposição. Em resumo, a sequência foi otimizada para expressão de bactéria seguindo o uso de códon bacteriano padrão para *Escherichia coli* K12, usando os dados de códon descritos por Grantham R. et al.; 1981; "Codon catalogue usage in genome strategy modulated for gene expressivity," Nucleic Acid Res. 9:r43-r47, and Lathe, R. 1985; "Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data, Theoretical and practical considerations." J. Mol Biol; 183:1-12,

20 A sequência de RNA correspondente foi então analisada para a formação de estrutura de em grampo ("hairpin") ou formação de ciclo ("loop") e foi submetida a cálculos de energia livre mínima. Os locais de restrição flaqueamento, *NdeI* e *BamHI* foram incluídos no termino dos gene. Após a digestão de DNA sintético com enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, o gene quilobase 1,1 foi ligado via ligase T4 DNA no vetor de plasmídeo pET-28a (Novagen Corporation), que também foi digerido com estas duas enzimas. O plasmídeo recombinante foi introduzido na cepa de *E. coli* BLR (DE3) ou HMS174 (DE3) por eletroporação usando um Electro Cell Manipulator 600 (BTX) de acordo com as instruções do fabricante. A mistura de

transformação foi laminada em placas de Agar LB contendo canamicina (15 µg/mL) para permitir a seleção de colônias contendo o plasmídeo pET-28a/ADAcysSer (designado ADAc75s/pET28a: BLR(DE3) ou ADAc75s/pET28a:HMS174(DE3)). A sequência de nucleotídeo de gene variante de ADA foi verificada pela análise de sequência de DNA com um Analisador Genético ABI Prism 310 usando um Big Dye Terminator. A sequência de DNA que codifica a estrutura de leitura aberta de Ser74-rhADA está de acordo com a SEQ ID NO: 4,

As colônias isoladas foram adicionalmente purificadas por laminação e analisadas para expressão de gene induzível por IPTG em meio LB por métodos padrões tais como aqueles descritos no Manual de Sistema pET da Novagen Nona Edição, incorporado aqui por referência.

Vários parâmetros de indução foram examinados incluindo tempo, temperatura e concentração de indutor. Uma condição preferida foi indução com 50 µM IPTG por 12 horas a 25 °C, que permitiu a produção de níveis elevados de ADA dentro do citoplasma da bactéria hospedeira a aproximadamente 20% de proteína celular total. A proteína ADA expressa foi confirmada com análise de SDS PAGE para exibir o peso molecular correto de aproximadamente 40 kDa (dado não mostrado).

20

EXEMPLO 4

CONSTRUÇÃO DE CEPA DE EXPRESSÃO DE *E. COLI* QUE EXPRESSA ADA BOVINA RECOMBINANTE COM UMA MUDANÇA CYS PARA SER NA POSIÇÃO 74 DA PROTEÍNA MADURA

A proteína ADA madura purificada derivada de preparações intestinais bovinas é uma proteína com 356 aminoácidos sem a metionina N-terminal e também sem os seis resíduos C-terminais finais previstos da sequência de cDNA (Banco de gene NP_776312, incorporado aqui por referência). A sequência de aminoácido de ADA bovina foi analisada para presença de códons de cisteína. Cinco posições no polipeptídeo maduro codificam a cisteína (C74, C152, C153, C168, C261). No gene sintético de ADA bovina modificado e modelado, apenas uma destas cinco posições de cisteína (cisteína 74) foi mudada para um resíduo de serina. Isto foi realizado

30

pela inserção de um códon de serina (TCC) no lugar de um códon de cisteína normal na posição 74 do polipeptídeo maduro (ou posição 75 do produto de tradução). O gene também foi códon otimizado para expressão em *E. coli*.

5 Em resumo, a sequência de polinucleotídeo definida (vide SEQ ID NO: 1) foi fornecida à BioCatalytics Inc. para síntese completa de gene de um novo gene tendo códons otimizados para expressão de *E. coli*, usando seus métodos que incluem síntese química de segmentos de oligonucleotídeos em sobreposição. Os métodos da BioCatalytics são
10 descritos em maiores detalhes na Patente Norte-Americana Nº 6,366,860, os conteúdos da qual sendo incorporados aqui por referência em sua totalidade.

A expressão de ADA bovina foi investigada em vários sistemas de expressão. Por exemplo, locais de restrição de flanqueamento, *NdeI* e
15 *BamHI*, foram incluídos no término do gene. Após a digestão de DNA sintético com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, o gene quilobase 1,1 foi ligado via ligase T4 DNA no vetor de plasmídeo pET-9d (Novagen Corporation), que também foi digerido com estas duas enzimas. O plasmídeo recombinante foi introduzido na cepa de *E. coli* BLR (DE3) ou
20 HMS174 (DE3) por eletroporação usando um Electro Cell Manipulator 600 (BTX) de acordo com as instruções do fabricante. A mistura de transformação foi laminada em placas de Agar LB contendo canamicina (15 µg/mL) para permitir a seleção de colônias contendo o plasmídeo pET-9d/bADA (designado bADA/pET9d: BLR(DE3) ou
25 bADA/pET9d:HMS174(DE3)). A sequência de nucleotídeo de gene variante de ADA foi verificada pela análise de sequência de DNA com um Analisador Genético ABI Prism 310 usando Big Dye Terminators. A estrutura de leitura aberta de DNA é mostrada pela SEQ ID NO: 2,

As colônias isoladas foram adicionalmente purificadas por laminação
30 e analisadas para expressão de gene induzível por IPTG em meio LB por métodos padrões tais como aqueles descritos no Manual de Sistema pET da Novagen Nona Edição, incorporado aqui por referência. Vários parâmetros

de indução foram examinados incluindo tempo, temperatura e concentração de indutor. Uma condição preferida foi indução com 0,3% de lactose por 12 horas a 37 °C, que permitiu a produção de nível elevado de ADA dentro do citoplasma da bactéria hospedeira a aproximadamente 20% de proteína celular total. O produto de ADA foi confirmado com análise de SDS PAGE para exibir o peso molecular correto de aproximadamente 40 kDa.

EXEMPLO 5

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA ADA DE MUTEÍNA HUMANA

RECOMBINANTE

10 A purificação de rhADA foi realizada em um protocolo cromatográfico 3 desenvolvido por Enzon. A fermentação bacteriana foi conduzida por *E. coli* expressando a proteína rhADA a partir de um gene sintético em um plasmídeo pET28a (Novagen) na célula hospedeira HMS174(DE3). Rifampicina (200 µg/mL) e canamicina (30 µg/mL) foram incluídas em um 15 meio mínimo de glicerol suplementado com extrato de levedura (30 g/l) e as células foram crescidas a 28 °C para um OD₆₀₀ de 11 quando o indutor IPTG foi adicionado a 5 mM da concentração final. Após 40 horas (OD₆₀₀ ~ 110), as células foram colhidas por centrifugação e congelamento a -20 °C. Resumidamente, a pasta de células descongeladas (50 g) foi ressuspensa 20 em 1800 mL de tampão de Tris 10 mM, DTT 1mM, pH 8,0, e homogeneizadas a 1200 RPM por 10 segundos com Tempest Virtis (Sentry™, Microprocessador, Boston, MA). Esta suspensão foi passada através de uma malha de aço inoxidável (micrometro de abertura de 250µ, No.60, W.S Tyler) para remover partículas grandes. A suspensão de células 25 homogêneas foi microfluidizada por 3 ciclos a 15,000 psi (unidade foi banhada em gelo) (Micro Fluidizer, Microfluidics Corp., Model# 110Y, Boston, MA). No final da microfluidização, 200 mL do mesmo tampão tal como acima foi usado para rinsar a unidade e esta solução foi combinada com a suspensão acima. A proteína solúvel de células lisadas foi extraída 30 por centrifugação a 16,000 RPM por 40 minutos a 4°C (Sorvall RC 5C plus, rotor SLA-1000). O sobrenadante foi coletado cuidadosamente para evitar mistura indesejável. O pH foi ajustado para 8,0, e MgCl₂ 1 mM e DNase 20

mg/mL foram adicionados e incubados a temperatura ambiente por 2 horas. O pH foi então ajustado para 6,5 com HCl 1 N. A segunda centrifugação foi conduzida como acima, o sobrenadante foi coletado, e ajustado para EDTA 2 mM, seguido por filtração em Nalgene (unidade de filtro de 90 mm). O volume do sobrenadante filtrado foi de 500 mL, a concentração de proteína total por método de BCA foi 8,5 mg/mL.

O extrato celular (100 mL) foi ajustado para pH 7,2, 4,5 mS/cm e carregado em HiTrap DEAE ff a Bis-Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,5 e eluído com Bis-Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 6,5. As frações de pico foram identificadas por ensaio de enzima e SDS-PAGE e ajustadas com sulfato de amônio 1,5 M em NaHPO₄ 20 mM, pH 6,5 e carregadas em uma coluna de HiTrap fenil ff. A proteína foi eluída com um gradiente de tampão de carga e NaHPO₄ 20 mM, pH 6,5. A fração de pico (55 mL; 0,4 mg/mL) foi diafiltrada contra NaHPO₄ 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,5 e carregada em HiTrap SP-Sefarose ff e, a seguir, eluída com NaHPO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, 1 DTT mM, pH 6,5, A fração coletada continha proteína ADA purificada (77 mL; 0,1 mg/mL).

EXEMPLO 6

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA ADA BOVINA RECOMBINANTE

A purificação de rbADA expressa pelo clone do Exemplo 4 foi realizada em um protocolo cromatográfico 3 desenvolvido por Enzon. Resumidamente, a pasta de células descongeladas (obtida de Blue Hereon ou Biocatalytics, respectivamente) de 200 g que foi armazenada a -80°C foi ressuspensa em 1800 mL de tampão de Bis-Tris 20 mM, EDTA 1mM, pH 7,4, e homogeneizada a 1200 RPM por 5 minutos com Tempest Virtis (Sentry™, Microprocessador, Boston, MA). Esta suspensão foi passada através de uma malha de aço inoxidável (Micrometro de abertura de 250µ, No.60, W.S Tyler) para remover partículas grandes. A suspensão de células homogêneas foi microfluidizada por 3 ciclos a 15,000 psi (a unidade foi banhada em gelo) (Micro Fluidizer, Microfluidics Corp., Model# 110Y, Boston, MA). No final da microfluidização, 200 mL do mesmo tampão, tal como acima foi usado para rinsar a unidade e esta solução foi combinada

com a suspensão acima. A proteína solúvel de células lisadas foi extraída por centrifugação a 7100 RPM (12000 x g) por 60 minutos a 4°C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor# JLA8,1000). O sobrenadante foi coletado cuidadosamente para evitar mistura indesejável.

5 Para remover nucleotídeos neste extrato celular, polietilenoimina (PEI) foi adicionada ao sobrenadante acima (final 0,15%, p/v) e misturado completamente com agitação por 10 minutos. A seguir, este extrato celular foi deixado a 4°C durante a noite. O precipitado desta amostra que ficou em repouso durante a noite foi removido por uma centrifugação a 7100 RPM
10 (12000 x g), por 60 minutos a 4°C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor# JLA8,1000) antes de ser carregado na segunda coluna. Da mesma forma, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente para evitar qualquer mistura indesejável. Para auxiliar a ligação de ADA à primeira coluna PEG4600 10%, foi adicionada este extrato celular lentamente e o pH deste extrato
15 celular foi ajustado para 6,5 lentamente com NaOH 1N e HCl 1N. Este sobrenadante foi centrifugado novamente a 7100 RPM (12000 X G.), por 60 minutos a 4°C (AVANTI J-201, BECKMAN COULTER: ROTOR # JLA8.1000) antes de carregado para a próxima coluna.

O extrato celular foi carregado a uma coluna pré-equilibrada Capto Q
20 (Cat# 17-5316-01, GE Healthcare, Piscataway, NJ. Bed volume 350 mL pré-empacotada em uma coluna XK-50) com um tampão de Bis-Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5, Antes a ADA foi eluída da coluna em NaCl 80 mM no tampão de equilíbrio, eluições a NaCl 60 mM e 70 mM foram realizadas primeiramente pra remover impurezas. O perfil de eluição foi analisado por
25 atividade de ADA, análise de SDS-PAGE, Western Blots, e RP-HPLC.

Após a coluna Capto Q, 2 purificações cromatográficas de interação hidrofóbica foram usadas uma a uma para adicionalmente refinar a pureza da proteína. A primeira HIC foi Octil Sefarose 4FF (Cat# 17-0946-02, GE Healthcare, Piscataway, NJ). O pool de frações de ADA da coluna Capto Q
30 foi ajustada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M com pó de sulfato de amônio diretamente e o pH foi ajustado para 6,5. A amostra filtrada (Nalgene Nunc, CAT #540887, MEMB 0,2 PES, Rochester, NY) foi carregada em uma primeira

coluna HIC que foi pré-equilibrada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M, fosfato de potássio 20 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5 (Volume do leito de 150 mL, em XK-50, GE Healthcare, Piscataway, NJ). A ADA foi eluída com gradiente de sulfato de amônio e o perfil de pureza desta eluição foi determinado por SDS-PAGE e RP-HPLC. A proteína ADA nas frações da primeira coluna HIC foi colhida e ajustada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M e carregada diretamente na segunda coluna de HIC (volume do leito de 150 ML, XK-50, HIC fenil HP, CAT# 17-1082-01, PISCATAWAY, NJ) que foi pré-equilibrada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M, KH_2PO_4 - K_2HPO_4 20 mM, EDTA1 mM, pH 6.5. A ADA foi eluída com gradiente de sulfato de amônia de 1 M para 300 mM no KH_2PO_4 20 mM, EDTA 1mM, pH 6.5. A pureza de ADA destas frações foram analisadas por SDS-PAGE e RP-HPLC. A rbADA ou rhADA purificada foi adicionalmente dessalgada e concentrada em um LabScale™ TFF systems (Membrane BioMax 5, Bedford, MA) contra o tampão de armazenamento (por exemplo, fosfato de sódio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5).

EXEMPLO 7

PREPARAÇÃO DE SER_{74} -rbADA PEGUILADA VIA LIGAÇÃO URETANO

SC-PEG (polietilenoglicol ativado com carbonato de N-hidroxisuccinimidilal, 0,084 mmol) é adicionado a uma solução de Ser_{74} -rbADA (0,00027 mmol) em 3 mL de tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,8) com agitação suave. A solução é agitada a 30°C por 30 minutos. A coluna GPC (Zorbax GF-450) é usada para monitorar a conjugação de PEG. No final da reação (como evidenciado pela ausência de enzima nativa), a mistura é diluída com 12 mL de tampão de formulação (fosfato de sódio 0,05 M, cloreto de sódio 0,85%, pH 7,3) e diafiltrada com um concentrador Centriprep (Amicon) para remover o PEG não reagido. A diafiltração é continuada o quanto necessário a 4°C até que não mais PEG livre seja detectado pela mistura de quantidades iguais de filtrado e PMA 0,1% (ácido polimetacrílico em HCl 0,1 M).

EXEMPLO 8

PREPARAÇÃO DE SER_{74} -rhADA PEGUILADA VIA LIGAÇÃO URETANO

SC-PEG (0,084 mmol) é reagido com Ser₇₄-rbADA (0,00027 mmol) usando as mesmas condições descritas no Exemplo 7,

EXEMPLO 9

PREPARAÇÃO DE SER74-rbADA PEGUILADA VIA LIGAÇÃO AMIDA

- 5 SC-PEG (polietilenoglicol ativado com carbonato de N-hidroxisuccinimidilal, 0,084 mmol) é adicionado a uma solução de Ser₇₄-rbADA (0,00027 mmol) em 3 mL de tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,8) com agitação suave. A solução é agitada a 30°C por 30 minutos. A coluna GPC (Zorbax GF-450) é usada para monitorar a conjugação de PEG.
- 10 No final da reação (como evidenciado pela ausência de enzima nativa), a mistura é diluída com 12 mL de tampão de formulação (fosfato de sódio 0,05 M, cloreto de sódio 0,85%, pH 7,3) e diafiltrada com um concentrador Centriprep (Amicon) para remover o PEG não reagido. A diafiltração é
- 15 detectado pela mistura de quantidades iguais de filtrado e PMA 0,1% (ácido polimetacrílico em HCl 0,1 M).

EXEMPLO 10

PREPARAÇÃO DE MUTEINA rhADA VIA LIGAÇÃO DE AMIDA

- 20 SS-PEG (0,084 mmol) é reagido com muteínas rhADA (0,00027 mmol) usando as mesmas condições descritas no Exemplo 9.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma adenosina desaminase conjugada com um polímero substancialmente não antigênico caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratamento de um tumor de próstata ou câncer de ovário.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para redução substancial dos níveis de tecido de adenosina ou desoxiadenosina, e em que o crescimento ou disseminação do tumor é inibido por níveis reduzidos de adenosina nos tecidos.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polímero substancialmente não antigênico é um óxido de polialquileno.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o óxido de polialquileno é polietilenoglicol.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o polímero substancialmente não antigênico varia em tamanho de 4.000 a 45.000 Daltons.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o conjugado compreende duas ou mais moléculas de adenosina desaminase por polímero substancialmente não antigênico.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a adenosina-desaminase compreende de 11 a 18 cadeias de polietilenoglicol ligadas a grupos amino épsilon de um ou mais resíduos Lys da adenosina desaminase.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 7, caracterizado pelo fato de que a adenosina-desaminase é conjugada com o polietilenoglicol através de uma ligação de uretano.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a adenosina desaminase é a adenosina desaminase purificada a partir de uma fonte bovina ou é uma adenosina desaminase recombinante.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a adenosina desaminase recombinante é selecionada do grupo consistindo de

adenosina desaminase bovina recombinante consistindo da SEQ ID NO: 1, adenosina desaminase humana recombinante consistindo da SEQ ID NO: 3 e adenosina desaminase bovina recombinante consistindo da SEQ ID NO: 5.

11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 10, caracterizado pelo fato de que a adenosina desaminase recombinante é adenosina desaminase bovina recombinante consistindo da SEQ ID NO: 1.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 10, caracterizado pelo fato de que a adenosina desaminase recombinante é adenosina desaminase bovina recombinante consistindo da SEQ ID NO: 5.

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 10 a 12, caracterizado pelo fato de que a adenosina-desaminase bovina recombinante consistindo da SEQ ID NO: 5 consistindo em uma Cys74 que é protegida para evitar a oxidação em um meio aquoso.

14. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 10 a 12, caracterizado pelo fato de que a adenosina desaminase recombinante está de acordo com a SEQ ID NO: 1 ou com a SEQ ID NO: 5, com uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em Gln no lugar de Lys₁₉₈; Ala no lugar de Thr₂₄₅; Arg no lugar de Gly₃₅₁ e suas combinações.