



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

(21) PI 0810383-6 A2



(22) Data do Depósito: 18/04/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 30/10/2008

(54) Título: ADENOSINA DEAMINASE RECOMBINANTE ESTÁVEL

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

(30) Prioridade Unionista: 20/04/2007 US 60/913,009.

(71) Depositante(es): ENZON PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): DAVID R. FILPULA; STEPHEN K. YOUNGSTER.

(86) Pedido PCT: PCT US2008060805 de 18/04/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/131208 de 30/10/2008

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

(57) Resumo: ADENOSINA DEAMINASE RECOMBINANTE ESTÁVEL Uma adenosina deaminase recombinante mutante que possui qualquer resíduo de cisteína oxidável substituído por um resíduo de aminoácido não oxidável é descrita. Adenosinas deaminase recombinantes estabilizadas, conjugadas com polímeros e métodos de tratamento, usando as mesmas também são descritos.

ADENOSINA DEAMINASE RECOMBINANTE ESTÁVEL

REFERÊNCIA CRUZADA RELACIONADA COM O PEDIDO

Este pedido reivindica o benefício da prioridade do Pedido de Patente Provisional dos Estados Unidos No. 60/913,009 depositado em 20 de Abril de 2007, os conteúdos do qual sendo incorporados aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção fornece adenosina deaminase recombinante mutada com estabilidade intensificada.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A Adenosina deaminase (ADA) tem sido usada no tratamento de um distúrbio de deficiência enzimática chamado de distúrbio de imunodeficiência combinada severa (SCID) ou doença de "Bubble boy" (menino bolha) por algumas vezes. Por mais de 15 anos, os medicamentos de Enzon tem tornado a ADA terapêutica disponível para pacientes na forma de uma ADA PEGuilada preparada usando uma fonte bovina de enzima ADA.

Recentemente, tem havido esforços para substituir a enzima de origem bovina por uma enzima de origem recombinante (doravante "rADA"). Ambas a enzima humana recombinante ("rhADA") e a bovina recombinante ("rbADA") têm sido consideradas como substituintes para a ADA bovina natural purificada. As enzimas rbADA e rhADA são relativamente menos estáveis que a enzima bovina purificada nativa que é atualmente empregada. Ambas a rhADA e a rbADA são consideradas degradar de uma maneira consistente com a degradação de cisteína: adição de oxigênio, formação de ditióis; aumento da degradação na medida em que o pH aumenta; precipitação, especialmente quando o pH é aumentado e as amostras são concentradas. No estado reduzido, a cisteína contém um grupo SH reativo (sulfidril) que é a forma responsável pela degradação.

A evidência sugeriu que uma cisteína exposta, única pode ser responsável pela degradação que é vista por ambas a rbADA e a rhADA. A ADA Bovina (isto é, ADA bovina nativa purificada a partir de fonte bovina) possui uma estrutura muito similar a aquela da rhADA: tanto a ADA bovina quanto a rhADA possuem o mesmo número de cisteínas nas mesmas posições da sequência primária. A ADA bovina recombinante e a humana recombinante atualmente obtidas contém degradação/impurezas (ditióis) que são consistentes

com a reatividade de cisteína. A ADA bovina nativa difere estruturalmente da ADA bovina recombinante pelo fato de que a ADA bovina nativa possui um único mol de cisteína ligado a cada mol de ADA. A ADA bovina nativa também é estável em pH elevado, sugerindo que a cisteína ligada a ADA está funcionando como um grupo protetor.

Um método para estabilizar a ADA bovina recombinante e/ou humana recombinante é revestir o resíduo de Cys ativo (Cys 74 de rbADA madura e rhADA madura) com qualquer uma dentre glutatona oxidada, iodoacetamida, ácido iodoacético, cistina, outros ditióis e misturas dos mesmos. Este método é estabelecido pelo pedido de Patente U.S. de co-propriedade No. de série 11/738,012, intitulado, "Stabilized Proteínas", os conteúdos do qual sendo incorporados aqui por referência em sua totalidade.

Apesar do exposto acima, seria vantajoso evitar a necessidade de uma etapa de revestimento adicional pela modificação da estrutura da proteína para fornecer estabilidade inerente imediatamente na expressão. A Patente U.S. No. 5,346,823 descreve a estabilização de proteases procarióticas, tais como, subtilisina, e protease neural, pela substituição de resíduos de Cys desestabilizantes com Ser e outros resíduos de aminoácidos, por mutação. Entretanto, a análise mutacional de locais de atividade na ADA revelou que a substituição de um resíduo de Cys (Cys 262) resultou em uma enzima com atividade significativamente diminuída, Bhaumik *et al.* 1993, *The J. of Biol Chem*, 268. (8):5464-5470. Desse modo, antes da presente invenção, não era conhecido a estabilização de enzimas adenosina deaminase pela substituição de um resíduo de Cys exposto e ativo por outro resíduo de aminoácido enquanto mantendo a atividade enzimática útil ótima.

Desse modo, seria proveitoso fornecer a rbADA e a rhADA que é estável, isto é, sem degradação significativa durante armazenamento e processamento, em níveis de pH que são úteis para a PEGuilação ótima da enzima.

RESUMO DA INVENÇÃO

Consequentemente, a invenção fornece uma ADA recombinante que possui um resíduo de cisteína oxidável substituído por um resíduo de aminoácido não oxidável, relacionado com a forma tipo selvagem da enzima ADA. A ADA muteína inclui um resíduo de aminoácido não oxidável que é um dos aminoácidos-L de ocorrência natural, por exemplo, alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina,

triptofano, tirosina e/ou variações conhecidas na arte e derivados de aminoácidos-L de ocorrência natural, por exemplo, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiônico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocapróico, ácido 2-aminoheptanóico, ácido 2-aminoisobutírico, 5 ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4 diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiônico, n-etilglicina, n-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxirolina, 4-hidroxirolina, isodesmosina, alo-isoleucina, n-metilglicina, sarcosina, n-metilisoleucina, 6-n-metilisina, n-metilvalina, norvalina, norleucina e ornitina, e semelhante. Opcionalmente, metionina ou triptofano são 10 evitados na medida em que estes são potencialmente oxidados.

Mais preferencialmente, o resíduo de aminoácido não oxidável é um dentre, serina, alanina, asparagina, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, tirosina, e valina. Serina é a mais preferida. Em certas modalidades preferidas, a cisteína oxidável está localizada aproximadamente na posição 74 da proteína ADA madura. A ADA recombinante 15 é preferencialmente uma ADA bovina recombinante ou uma ADA humana recombinante que é, por exemplo, traduzida a partir de uma molécula de DNA de acordo com a SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4 e que preferencialmente compreende SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3. Quando a ADA recombinante é uma ADA recombinante bovina de acordo com a SEQ ID NO: 1, a ADA opcionalmente é expressa com um polimorfismo selecionado dentre um ou 20 mais de Gln no lugar de Lis₁₉₈; Ala no lugar de Tr₂₄₅; e Arg no lugar de Gli₃₅₁.

A invenção também fornece um conjugado de ADA-óxido de polialquileno, em que o óxido de polialquileno é preferencialmente polietileno glicol. Opcionalmente, o polietileno glicol é conjugado com a adenosina deaminase recombinante via um ligante químico selecionado a partir do grupo que consiste de carbonato de succinimidila, tiazolidina tiona, 25 uretano, succinato de succinimidila, e ligantes à base de amida. O carbonato de succinimidila é preferido. O polietileno glicol é preferencialmente preso de forma covalente a um grupo amino épsilon de um Lis da adenosina deaminase recombinante.

O conjugado de polietileno glicol-ADA compreende pelo menos 1 (isto é., um ou mais) filamento de polietileno glicol preso a grupos amino épsilon, preferencialmente pelo 30 menos 5 (isto é., cinco ou mais) filamentos de polietileno glicol presos a grupos amino épsilon, ou mais preferencialmente, de aproximadamente 11 a aproximadamente 18

filamentos de polietileno glicol presos ao grupo amino épsilon, de resíduo de Lis de ADA recombinante.

O polietileno glicol dos conjugados inventivos possuem um peso molecular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 100.000 kDa, ou mais preferencialmente de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 45.000 kDa.

A invenção fornece adicionalmente um processo para purificar a adenosina deaminase recombinante da invenção. Por exemplo, a adenosina deaminase recombinante é preferencialmente purificada por cromatografia de troca iônica (por exemplo, cromatografia com Capto Q, DEAE e SP), e a adenosina deaminase recombinante de SEQ ID NO: 1, é preferencialmente purificada por cromatografia de interação hidrofóbica.

A adenosina deaminase recombinante da presente invenção pode ser usada para a preparação de um medicamento para tratar uma condição mediada por adenosina deaminase.

A invenção fornece ainda um método para tratar uma condição mediada por ADA em mamíferos, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de ADA recombinante inventiva. A condição mediada por ADA inclui, por exemplo, SCID, câncer, e semelhante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Enzimas de adenosina deaminase estáveis são fornecidas aqui. As enzimas de adenosina deaminase inventivas são fornecidas pela substituição de um resíduo de cisteína que é submetido a processos de oxidação quando a enzima está em solução, com um resíduo de aminoácido alternativo aceitável que conserva a atividade, carga e estrutura terciária da enzima enquanto removendo uma fonte de instabilidade de colapso.

A. Definições

Para fornecer uma descrição clara da invenção, vários termos são definidos, como segue.

O termo, "recombinante" se refere a uma proteína produzida usando células que não têm, em seu estado natural, uma cópia endógena de DNA capaz expressar a proteína. As células produzem a proteína recombinante porque elas têm sido geneticamente alteradas pela introdução de sequência apropriada de ácido nucléico isolado. O termo também inclui referência a uma célula, ou ácido nucléico, ou vetor, que tenha sido modificado pela introdução de um ácido nucléico heterólogo (exógeno ou estrangeiro) ou a alteração de um ácido nucléico natural para uma forma não natural para aquela célula, ou que a célula e

derivada de uma célula então modificada. Desse modo, por exemplo, as células recombinantes expressam genes que não são encontrados dentro da forma natural (não-recombinante) da célula, expressam mutantes de genes que são encontrados dentro da forma natural, ou expressam genes naturais que são encontrados, de outro modo, expressos de forma anormal, subexpressos ou não expressos no todo.

Como usado aqui, "ácido nucléico" ou "sequência de ácido nucléico" inclui referência a um polímero de ribonucleotídeo ou deoxiribonucleotídeo ou na forma filamentada dupla ou única, e a menos que limitado de outro modo, abrange análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que se hibridizam a ácidos nucléicos de uma maneira similar aos nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que indicado de outro modo, uma sequência de ácido nucléico particular inclui a sequência complementar do mesmo.

O termo, "codificar" com respeito a um ácido nucléico especificado, inclui referência a ácidos nucléicos que compreendem a informação para tradução na proteína especificada. A informação é especificada pelo uso de códons.

Uma "célula hospedeira" é uma célula que pode suportar a replicação ou expressão do vetor de expressão. Células hospedeiras podem ser células procarióticas, tais como, *E. coli*, ou células eucarióticas, tais como, levedura, inseto, anfíbio ou células de mamíferos.

Como usado aqui, "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados intercambiavelmente e incluem referência a um polímero de resíduos de aminoácidos.

O termo "resíduo" ou "resíduo de aminoácido" ou "aminoácido" inclui referência a um aminoácido que é incorporado em uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo ("peptídeo" de forma coletiva). O aminoácido pode ser um aminoácido de ocorrência natural e, a menos que limitado de outro modo, pode abranger análogos conhecidos de aminoácidos naturais que podem funcionar de uma maneira similar a dos aminoácidos de ocorrência natural.

A "Transfecção" se refere à absorção de um vetor de expressão por uma célula hospedeira, mesmo se ou não quaisquer das sequências de codificação sejam de fato expressas. Numerosos métodos de transfecção são conhecidos por um técnico com habilidade ordinária. Por exemplo, a transfecção é efetuada na presença de um vetor de expressão e concentrações elevadas de CaPO_4 , por eletroporação, pelo uso de um fago ou vetor de expressão viral para inserção em uma célula hospedeira, por inserção mecânica de ácido nucléico, e mesmo pelo cultivo de células hospedeiras na presença de fragmentos de ácidos

nucléicos desempacotados. A transfecção bem sucedida é geralmente reconhecida quando qualquer indicação de operação do vetor de interesse ocorre dentro da célula hospedeira.

A "Transformação" descreve a introdução de um ácido nucleico em um organismo de modo que o ácido nucléico seja replicável, ou como um elemento extracromossomal ou por integração no cromossomo hospedeiro. Dependendo da célula hospedeira usada, a transformação é efetuada usando métodos apropriados conhecidos na arte para células hospedeiras particulares. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio, como descrito por Cohen, S. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 69: 2110 (1972) and Mandel *et al.*, *J. Mol. Biol.* 53:154 (1970), é geralmente usado para células procaruóticas ou outras células que são encapsuladas dentro de paredes celulares (por exemplo., muitas bactérias e/ou células de plantas). Para células de mamíferos sem tais paredes celulares, o método de precipitação de fosfato de cálcio de Graham, F. e van der Eb, A., *Virology*, 52: 456-457 (1978) é preferido. Aspectos gerais de transformações de sistemas de célula hospedeira de mamíferos foram descritos na Patente U.S. No. 4,399,216 publicada em 16 de Agosto de 1983. As transformações em leveduras são tipicamente realizadas de acordo com o método de Van Solingen, P., *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) and Hsiao, C. L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 3829 (1979). Entretanto, quaisquer outros métodos conhecidos na arte para introduzir ácido nucléico, por exemplo, DNA, em células, tais como, por exemplo, pela injeção nuclear, lipofecção, ou por fusão protoplasta, também podem ser usados.

Como usado aqui, o termo "complementar" com respeito a um ácido nucléico se refere ao filamento oposto (usando emparelhamento de base de Watson-Crick) produzido quando uma primeira molécula de ácido nucléico é replicada usando aquela molécula como um molde, para formar um segundo filamento de ácido nucléico, novo. Em um aspecto da invenção, duas moléculas de ácido nucléico são consideradas como sendo complementares, uma da outra, quando elas hibridizam ou se ligam juntas sob condições rigorosas.

"Operavelmente ligado" se refere a uma justaposição de componentes, por exemplo, uma região reguladora e uma estrutura de leitura aberta, tal que a função normal dos componentes possa ser realizada. Desse modo, uma estrutura de leitura aberta que é "operavelmente ligada" para controlar frequências se refere a uma configuração em que a sequência de codificação pode ser expressa sob o controle destas sequências.

As "Sequências de Controle" se referem a sequências de ácidos nucleicos necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operavelmente em um organismo hospedeiro particular. As sequências de controle que são adequadas para procarióticos, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência de operador, um local de
5 ligação de ribossomo e, possivelmente, outras sequências ainda pobremente conhecidas. As células eucarióticas são conhecidas por utilizar, por exemplo, tais sequências de controle como promotores, sinais de poliadenilação, e intensificadores, para citar apenas alguns.

"Sistema de expressão" ou "vector de expressão" se refere a sequências de ácidos nucleicos que contém uma sequência de codificação desejada e sequências de controle na
10 ligação operável, de modo que hospedeiros transformados com estas sequências são capazes de produzir as proteínas codificadas. Para efetuar a transformação, o sistema de expressão pode ser incluído e um vetor, entretanto, a molécula de ácido nucleico relevante pode, então, também ser integrada dentro do cromossomo hospedeiro.

Como usado aqui, "célula," "linhagem celular," e "cultura celular" são usados
15 intercambiavelmente e todas as tais designações incluem progênie. Desse modo, "transformantes" ou "células transformadas" incluem células primárias de sujeito e culturas derivadas das mesmas sem considerar o número de transferências. Também é entendido que todas as progênies não podem ser precisamente idênticas no conteúdo genômico, devido as mutações inadvertidas ou deliberadas. A progênie de mutante que possui a mesma
20 funcionalidade tal como selecionada para a célula transformada originalmente é incluída. Onde designações distintas são pretendidas, as mesmas serão claras a partir do contexto.

Para propósitos da presente invenção, o termo "resíduo" deve ser entendido para
25 significar aquela parte de um composto, a qual a mesma se refere, por exemplo, PEG, ADA, aminoácido, etc., que permanece 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.

30 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- C_{1-6} . 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- C_{1-6} , arila e amino.

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 em um composto com um dos grupamentos a partir do grupo que consiste de halo, oxi, azido, nitro, ciano, alquila, alcóxila, alquil-tio, alquil-tio-alquila, alcóxialquila, alquilamino, trihalometila, hidroxila, mercapto, hidróxi, ciano, alquilsilila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, heteroarila, alquenila, alquinila, alquilcarbonilalquila- C_{1-6} , arila, e grupos amino.

Para propósitos da presente invenção, o termo “alquenila” como usado aqui 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, alcóxila, alquil-tio, alquil-tio-alquila, alcóxialquila, alquilamino, trihalometila, hidroxila, mercapto, hidróxi, ciano, alquilsilila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, heteroarila, alquenila, alquinila, hidrocarbonila- C_{1-6} , arila, e grupos amino.

O termo “alquinila” como usado aqui 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, alcóxialquila, 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. 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-C₁₋₈. Exemplos de cicloalquila incluem ciclopropila, 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, ciclohexenial, 1,3-ciclohexadienila, cicloheptenila, cicloheptatrienila, e ciclooctenila.

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 presos ao grupamento molecular original através de uma ponte de oxigênio. Exemplos de grupos alcóxi incluem, por 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 grupo alquila substituído com um grupo arila.

Para propósitos da presente invenção, o termo "alcóxialquila" 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, metiltiometil ou metiltioetil.

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.

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 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 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 aromático ou não aromático ou anéis de heterocicloalquila. Exemplos de grupos heteroarila incluem, por exemplo, piridino, furano, tiofeno, 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, 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, aminoalquilas, dialquilaminos, hidroxialquilas e mercaptoalquilas; alquenilas substituídas incluem carboxialquenilas, aminoalquenilas, dialquenilaminos, hidroxialquenilas e mercaptoalquenilas; alquinilas substituídas incluem carboxialquinilas, aminoalquinilas, dialquinilaminos, hidroxialquinilas e mercaptoalquinilas; 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; 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 versados na técnica, para estar dentro do domínio de razoabilidade pelo técnico com habilidade ordinária.

Para propósitos da presente invenção o termo "ligado" deve ser entendido incluir fixação covalente (preferencialmente) ou não covalente de um grupo com o outro, isto é, como resultado de uma reação química.

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 com habilidade ordinária na arte.

Para propósitos da presente invenção, o termo "adenosina" deve ser 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, "condição mediada por adenosina" ou "condição responsiva a adenosina deaminase" deve ser entendido como incluindo amplamente quaisquer doenças, condições ou distúrbios 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 uma condição mediada por adenosina" ou "tratamento de uma condição responsiva a adenosina deaminase", tal como, SCID deve ser entendido significar que sintomas ou condições são evitados, minimizados ou

atenuados quando comparados a aqueles observados na ausência de tratamento com ADA. As condições tratadas podem ser confirmadas, por exemplo, pela diminuição de adenosina.

Amplamente dizendo, um tratamento bem sucedido da condição mediada por adenosina ocorrerá quando a resposta clínica desejada for obtida. Alternativamente, um
5 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, incluindo outros marcadores clínicos contemplados pelos técnicos da área, quando comparados a aqueles observados na ausência de tratamento com ADA descrito aqui.

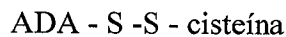
10 Além disso, o uso de termos singulares para conveniência da descrição não é de modo algum para serem limitantes. Desse modo, por exemplo, referência a uma composição compreendendo uma enzima se refere a uma ou mais moléculas daquela enzima. Também deve ser entendido que esta invenção não está limitada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

Também deve ser entendido que a terminologia empregada aqui é usada 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 apenas e equivalentes das mesmas.

20 **B. Enzimas ADA Produzidas de Forma recombinante**

Esforços iniciais para obter a enzima ADA recombinante, incluem enzimas expressas a partir de genes derivados de humano ou bovino, não cobriram uma instabilidade de armazenamento não vista previamente com ADA natural derivada de intestino bovino. Estudos de produtos de colapso de rhADA e rbADA foram conduzidos, e confirmaram que as
25 enzimas ADA degradam de uma maneira consistente com a degradação de cisteína. Por exemplo, a adição de oxigênio para rhADA resulta na formação de compostos mais hidrofílicos que rhADA que tem massas de 16 e 32 Da maior que a de rhADA. Além disso, isto resulta na formação de ditióis (como indicado pela inversão de uma subpopulação de degradantes pela adição de ditioneitol ("DTT")); aumentando a degradação com o aumento do
30 pH; precipitação, especialmente quando o pH é aumentado e as amostras são concentradas, sugerindo formação de ligação de dissulfeto intermolecular produzindo agregados insolúveis.

Nós determinamos que uma cisteína exposta, única é responsável pela degradação que e vista para rhADA. A ADA Bovina (não degradada) possui uma estrutura muito similar a aquela da rhADA: tanto ADA bovina quanto a rhADA possuem o mesmo número de cisteínas na mesma posição da sequência primária. A rbADA também contém degradantes/impurezas (ditióis) que são consistentes com restividade de cisteína. A ADA bovina natural se difere estruturalmente da rbADA pelo fato de que a mesma possui um mol único cisteína ligado a cada mol de ADA, e ADA bovina natural é estável em elevado pH, sugerindo que a cisteína ligada a ADA está funcionando como um grupo protetor. A cisteína ligada a ADA bovina natural pode ser removida pelo tratamento com um agente redutor, tal como, mercaptoetanol ou DTT. Embora não desejando ser limitado por qualquer teoria ou hipótese, isto sugere que o grupo cisteína está conjugado a ADA via uma ligação de dissulfeto como segue:



onde uma cisteína na sequência primária de ADA está ligada a uma molécula de cisteína. As cisteínas engatadas em tais ligações de dissulfeto são estáveis com respeito aos percursos de degradação oxidativa mencionados no primeiro parágrafo. Os resíduos de cisteína ocorrem nas posições 74, 152, 153, 168, e 261 da ADA madura bovina e humana. A inspeção de estrutura 3-dimensional de ADA bovina obtida por cristalografia de raios-X (Kinoshita *et al.*, 2005, *Biochemistry*, 44:10562-10569) indica que a cisteína nas posições 74, 152, 153, 168, e 261 não têm oportunidade para se engatar nas ligações intramoleculares de dissulfeto. Os confinamentos geométricos estruturais são conhecidos por geralmente impedir resíduos de cisteína vicinal, tais como aqueles que ocorrem nas posições 152 e 153 de ADA, a partir do engate na ligação de dissulfeto. Desse modo, todos os resíduos estão potencialmente no estado reduzido e, conseqüentemente, são locais candidatos potenciais para reações de degradação oxidativa. Entretanto, a inspeção visual da estrutura 3-dimensional de ADA bovina *supracitada*, indica que a cisteína 74 está claramente exposta ao solvente em um grau maior que as outras quatro cisteínas e, além disso, que as outras quatro cisteínas aparentam estar encobertas dentro da estrutura da enzima a um grau que provavelmente impediria a interação sigificante com reagentes solvatados. (contanto que a proteína não esteja desnaturada). A existência de um resíduo de cisteína reativo único explicaria a monoderivatização de adenosina deaminase bovina natural que presumidamente resulta de modificação pós-translacional.

Os fatos acima indicam que a cisteína reativa na posição 74 pode ser responsável para a degradação vista na rhADA e rbADA e que revestir o grupo -S-H reativo de cisteína protegerá a rhADA ou a rbADA dos percursos de degradação oxidativa aparentes vistos para aquelas enzimas recombinantes. Os experimentos seguintes foram realizados para determinar se este era o caso. A hADA recombinante, em uma concentração de aproximadamente 0,6 mg/mL, foi reagida com iodoacetamida (IAA) 125 mM em tampão de fosfato de sódio em pH 7,4 por 16 horas a 37°C. Dentro de alguns minutos do início da reação, as análises da amostra por RP-HPLC com detecção espectrométrica de massa e UV mostrou que aproximadamente 70,9% de rhADA foi monoderivatizada com IAA e 17,2% foram derivatizados em dois locais. Após 2 e 16 horas de incubação, o perfil cromatográfico não foi mudado significativamente, indicando que o derivativo era estável com respeito ao percurso de degradação oxidativa típico de rhADA. Uma amostra similar de rhADA foi preparada sem IAA e foi analisada similarmente. Após 16 horas de incubação a 37°C em pH 7,4, a proteína rhADA se degradou em uma extensão de 30% (além da degradação que a amostra teve inicialmente). Os resultados são consistentes com uma cisteína exposta predominante, única que pode ser protegida pelo revestimento de com iodoacetamida. Estes experimentos são descritos em maior detalhe pelo Pedido de Patente U.S. de co-propriedade de No. de série 11/738,012, intitulado, "Stabilized Proteínas," incorporado aqui por referência, como *supra* citado.

Embora o revestimento seja eficaz na eliminação de degradação oxidativa de cisteína reativa na ADA, o emprego de tal enzima revestida requer que uma etapa de fabricação seja adicionada. Desse modo, a eliminação direta de resíduo de Cys instável do gene de codificação pela substituição com um aminoácido diferente, foi investigada. Um aminoácido de substituição adequado é um que não é submetido ao mesmo tipo de oxidação, não romperá a estrutura terciária da proteína ADA duplicada, e na modalidade típica da invenção é selecionada de modo a não passar por conjugação aleatória ao óxido de polialquilenos ativado durante a formação de conjugado. Quaisquer dos aminoácidos de ocorrência natural e/ou aminoácidos que não ocorrem naturalmente e/ou derivados dos mesmos conhecidos na arte que encontrem este critério são contemplados como sendo adequados para substituir uma cisteína oxidável de acordo com a invenção. Uma lista exemplar de tais aminoácidos inclui aminoácidos-L de ocorrência natural, tais como, alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina,

glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano e tirosina. Triptofano e metionina podem oxidar relativamente facilmente e em certas modalidades opcionais, são menos preferidos.

Métodos para produção de proteínas recombinantes com incorporação em local específico de aminoácidos não naturais em células hospedeiras foram descritos na literatura, por exemplo, Liu *et al.*, 2007, *Nat. Methods* **4**(3):239-44, Xie *et al.*, 2006 *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**(10):775-82, Riu *et al.*, 2006, *Nat. Methods* **3**(4):263-65, Deiters *et al.*, 2004, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**(23):5743-5, Bogosian *et al.*, 1989, *J. Biol. Chem.* **264**(1):531-9, Tang *et al.*, 2002, *Biochemistry* **41**(34):10635-45, Budisa *et al.*, 1995, *Eur. J. Biochem.* **230**(2): 788-96, and Randhawa *et al.*, 1994, *Biochemistry*, **33**(14):4352-62. Desse modo, o aminoácido substituído também inclui um aminoácido modificado ou menos típico, tal como: ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiônico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanóico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4 diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiônico, n-etilglicina, n-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, n-metilglicina, sarcosina, n-metilisoleucina, 6-n-metilisina, n-metilvalina, norvalina, norleucina e ornitina.

Os aminoácidos de ocorrência natural preferidos opcionalmente substituídos por cisteína na ADA recombinante incluem, por exemplo, alanina, serina, asparagina, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, tirosina, e valina. A Serina é mais preferida, e é exemplificada a seguir.

Consequentemente, as moléculas de DNA que expressam a adenosina deaminase bovina e humana tipo selvagem foram obtidas e submetidas a otimização por códon para expressão em *E. coli*, e também mutadas para expressar rbADA muteína e rhADA muteína cada uma compreendendo um resíduo de Ser na posição 74 das respectivas proteínas maduras (posição 75 da proteína traduzida) no lugar do resíduo de Cys de ocorrência natural. Estes são Ser₇₄-rbADA (SEQ ID NO: 1) e Ser₇₄-rhADA (SEQ ID NO: 3), respectivamente. Além disso, deve ser observado que a ADA bovina natural quando isolada do intestino bovino também possui 6 resíduos removidos de forma pós-traduzida a partir da extremidade C-terminal. É uma característica opcional da presente invenção que a Ser₇₄-rbADA de acordo com a

presente invenção também seja expressa sem os 6 resíduos C-terminais (como uma muteína) ou seja modificada de forma pós traduzida para remover os mesmos resíduos C-terminais sem a ADA bovina natural purificada.

Deve ser adicionalmente observado que a ADA bovina natural quando isolada do intestino bovino possui polimorfismo: com referência a SEQ ID NO: 5, o polimorfismo de ADA bovina, por exemplo, glutamina na posição 198 no lugar de lisina, alanina na posição 245 no lugar de treonina; arginina na posição 351 em vez de glicina. É, portanto, contemplado que a posição 74 de ADA bovina muteínas de acordo com a invenção, também pode ter substituições adicionais em uma ou mais das posições observadas ou análogas a aquelas posições: Gln no lugar de Lis₁₉₈; Ala no lugar de Tr₂₄₅; Arg no lugar de Gli₃₅₁.

Em um aspecto adicional da invenção, a presente invenção fornece DNAs isolados que codificam a ADA muteína que tem a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3 descrita aqui. Outros DNAs que codificam a ADA muteína com uma ou mais substituições: Gln no lugar de Lis₁₉₈; Ala no lugar de Tr₂₄₅; Arg no lugar de Gli₃₅₁ são também contemplados como escopo da invenção.

Um vetor de expressão adequado pode ser preparado a partir de genômica ou cDNA que codifica rhADA ou rbADA, respectivamente, que está sob o controle de um promotor induzível conectado operavelmente adequado. O DNA é preferencialmente códon otimizado para a célula hospedeira apropriada e mutada por qualquer método conveniente conhecido na arte, por exemplo, pela mutagênese direcionada a oligonucleotídeo de alta eficiência (Olsen DB e Eckstein F, *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1451-5; 1990), síntese total de gene com sobreposição de oligonucleotídeos longos (Vasanta N and Filpula D, *Gene* 76: 53-60; 1989), síntese de gene mediada por PCR (Jayaraman K *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4084-88; 1991), ou PCR de extensão de sobreposição (Pogulis RJ *et al.*, *Methods Mol Biol* 57: 167-76; 1996).

Em geral, os procarióticos são preferidos para a clonagem inicial de sequências de DNA e construção de vetores úteis na invenção. Por exemplo, cepa de *E. coli* K12 MM 294 (ATCC No. 31,446) é particularmente útil. Outras cepas microbianas, simplesmente a modo de exemplo, que podem ser usadas incluem cepas de *E. coli*, tais como, *E. coli* B e *E. coli* X1776 (ATCC No. 31,537). As cepas mencionadas anteriormente, bem como, por exemplo, cepas de *E. coli* W3110 (F-, lambda-, prototrófica, ATCC No. 27,325), K5772 (ATCC No.

53,635), e SR101, bacilos, tais como, *Bacillus subtilis*, e outras enterobacteriaceae, tais como, *Salmonella tifimurium* ou *Serratia marcesans*, e várias espécies de pseudomonas, podem ser usadas.

5 Geralmente, vetores de plasmídeo que contém sequências de controle e de replicon que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira são usadas em conexão com estas hospedeiras.

10 Vetores de plasmídeos conventionais são moléculas de DNA circulares com filamento duplo preferencialmente construído com locais de reconhecimento enzimático adequados para inserção de sequências de DNA exógeno, um gene selecionável de antibiótico, uma origem de replicação para propagação autônoma na célula hospedeira, e um gene para discriminação ou seleção de clones que contém DNA de inserção recombinante. Vetores de plasmídeo disponível para uso em *E. coli* incluem, por exemplo, pET3, pET9, pET11 e as séries extendidas de pET (catalogadas por Novagen Corporation), pBAD, trc, foA, trp, e plasmídeos O_{L/R}/P_{L/R}.

15 Simplesmente a modo de exemplo, *E. coli* é tipicamente transformada usando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli* (vide, por exemplo, Bolivar *et al.*, 1977, *Gene*, 2: 95). O pBR322 contém genes para resistência a ampicilina e tetraciclina e, desse modo, fornece meios fáceis para identificar células transformadas. Similarmente, o plasmídeo pUC fornece vetores de clonagem práticos com moléculas de DNA para seleção e replicação
20 (Yanisch-Perron, *et al.*, 1985, *Gene* 33:103-119, a descrição do qual sendo incorporada aqui em sua totalidade). O plasmídeo pBR322, ou outro plasmídeo microbiano ou fago, também precisa conter, ou ser modificado para conter, promotores que podem ser usados pelo organismo microbiano para expressão de suas próprias proteínas codificadas.

25 Aqueles promotores mais comumente usados na construção de DNA recombinante inclui a beta-lactamase (penicillinase) e sistemas promotores de lactose (Chang *et al.*, 1978 *Nature*, 375: 615; Itakura *et al.*, 1977, *Science*, 198: 1056; Goeddel *et al.*, 1979, *Nature*, 281: 544) e um sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel *et al.*, 1980, *Nucleic Ácidos Res.*, 8: 4057; EPO Appl. Publ. No. 0036,776). Embora estes sejam os mais comumente usados, outros promotores microbianos foram verificados e utilizados, e detalhes com respeito a suas
30 sequência de nucleotídeos foram publicados, possibilitando um trabalhador habilitado

correlacioná-los funcionalmente com vetores conhecidos na arte, por exemplo, vetores de plasmídeos

5 Simplesmente a modo de exemplo, a regulação transcricional na *E. coli* pode ser alcançada com qualquer dos promotores indizíveis seguintes: lac, trp, foA, araBAD, T7, trc, e derivados de promotores lambda P_L e P_R bem como outros bem conhecidos na arte (por exemplo, Makrides, 1996, Microbiol. Rev. 60:512-538, a descrição do qual sendo incorporada aqui por referência em sua totalidade).

10 As condições indutoras adequadas opcionalmente compatíveis com o vetor incluem, por exemplo, arabinose, lactose, ou indução por calor, limitação de fosfato, limitação de triptofano, para citar apenas alguns. Preferencialmente, o elemento indutor é um operon Lac, que é induzível por isopropil tiogalactosida ("IPTG").

Uma sequência de sinalização adequada (peptídeo de sinalização) pode ser derivada a partir de pelB, fd pIII, ou ompA.

15 Marcadores de seleção de antibiótico adequados são bem conhecidos na arte e incluem, por exemplo, aqueles que conferem resistência a ampicilina, canamicina, cloranfenicol, rifampicina, ou tetraciclina, entre outros.

Sequências de replicação de origem adequadas incluem aquelas encontradas nos seguintes plasmídeos: *pUC19*, *pACYC177*, *pUB110*, *pE194*, *pAMB1*, *pIJ702*, *pBR322*, *pBR327*, e *pSC101*.

20 Sequências de terminação adequadas incluem, por exemplo, terminado principal fago fd, T Φ , e *rrnB*.

Além dos procarióticos, micróbios eucarióticos, tais como, culturas de leveduras, podem também ser usadas. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de baker comum, é a mais comumente usada dentre os microorganismos eucarióticos, entretanto várias outras cepas 25 estão comumente disponíveis. Para expressão em *Saccharomyces*, o plasmídeo YRp7, por exemplo (Stinchcomb *et al.*, 1979, Nature, 282: 39; Kingsman *et al.*, 1979, Gene, 7: 141; Tschemper *et al.*, 1980, Gene, 10: 157), é comumente usado. Este plasmídeo já contém o gene trp1 que fornece um marcador de seleção para uma cepa mutante de levedura que não tem a habilidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC No. 44,076 ou PEP4-1 (Jones, 30 1977, Genetics, 85: 12). A presença de lesão de trp1 como uma característica de genoma de

célula hospedeira de levedura, então, fornece um ambiente eficaz para detectar a transformação pelo crescimento na ausência de triptofano.

O sistema de expressão *Pichia pastoris* mostrou alcançar produção de níveis elevados de várias proteínas (Cregg, J.M. *et al.*, 1993, Bio/Technology 11: 905-910, a descrição do qual sendo incorporada aqui por referência em sua totalidade) e pode ser empregada para expressar ADA como uma proteína solúvel no citoplasma de *Pichia pastoris*.

Sequências de promoção adequadas em vetores de leveduras incluem os promotores para 3-fosfoglicerato quinase (Hitzeman *et al.*, J. 1980, Biol. Chem., 255: 2073) ou outras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, 1968, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 ; Holland *et al.*, 1978, Biochemistri, 17: 4900), tais como, enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvate decarboxilase, fosfofructoquinase, glucose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase, triosefosfato isomerase, fosfoglucoose isomerase, e glucoquinase. Na construção de plasmídeos de expressão adequados, as sequências de terminação associadas com estes genes estão também ligadas ao vektor de expressão 3' da sequência desejada a ser espessa para fornecer poliadenilação de mRNA e terminação de transcrição. Outros promotores, que possuem a vantagem adicional de transcrição controlada pelas condições de crescimento, são as regiões de promotor para álcool desidrogenase 2, isocitocrome C, ácido fosfatase, enzimas degradativas associadas com metabolismo de nitrogênio, e a gliceraldeído-3-fosfate desidrogenase mencionada anteriormente, e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Qualquer vetor de plasmídeo contendo o promotor compatível com levedura, de origem de replicação e sequências de terminação, é adequado.

Uma origem de replicação pode ser também fornecida pela construção do vetor para incluir uma origem exógena, que pode ser derivada de SV40 ou outra fonte viral (por exemplo., Polioma, Adeno, VSV, BPV), ou pode ser fornecida pelo mecanismo de replicação cromossomal de célula hospedeira. Se o vetor for integrado dentro do cromossoma de célula hospedeira, o último é frequentemente suficiente. Outros elementos de plasmídeos úteis podem incluir genes expressos que codificam proteínas chaperona, proteínas prolina isomerase, ou proteínas com rearranjo de pontes de dissulfeto.

C. Conjugados de Polímeros

Em outro aspecto da invenção, a ADA muteínas, tal como, proteína Ser₇₄-rbADA (SEQ ID NO: 1) e Ser₇₄-rhADA (SEQ ID NO: 3) é conjugada a um polímero adequado para preparar conjugados de polímeros.

Em um aspecto preferido, o polipeptídeo ADA muteína é conjugado a um polímero substancialmente não antigênico, preferencialmente um óxido de polialquileno ("PAO").

Os conjugados de ADA-polímero geralmente correspondem à fórmula (I):



em que

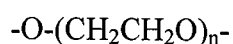
(ADA) representa a adenosina deaminase muteína recombinante ou fragmento ativo da mesma;

NH- é um grupo amino de um aminoácido encontrado na ADA muteína para fixação 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

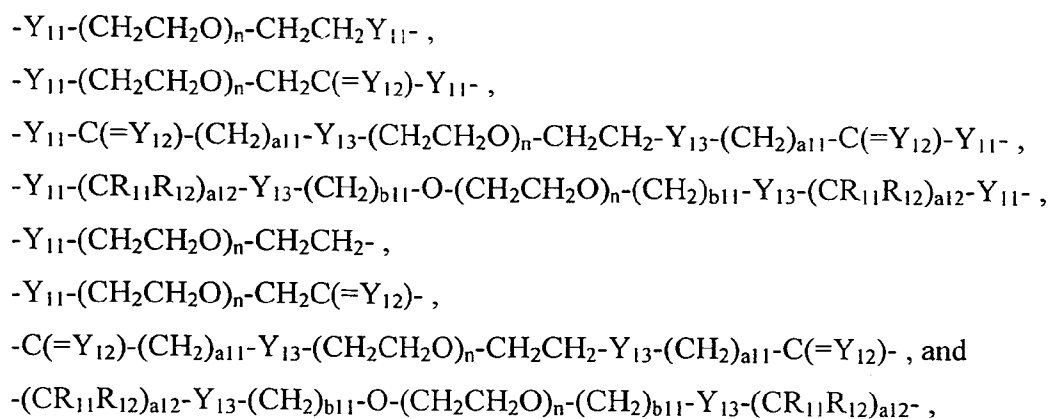
R inclui um resíduo de polímero substancialmente não antigênico que é preso à ADA de forma liberável ou não liberável.

Em um aspecto preferido, os polímeros incluem polietileno glicol (PEG) em que o PEG pode ser linear, ramificado ou PEG de multi-braços. Geralmente, o polietileno glicol possui a fórmula:



em que (n) é um inteiro positivo, preferencialmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 2.300, mais preferencialmente de aproximadamente 40 a aproximadamente 2.300. O peso molecular médio dos polímeros varia de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 100.000 Da. Mais preferencialmente, o polímero possui um peso molecular médio de aproximadamente 4.000 Da a aproximadamente 45.000 Da, ainda mais preferencialmente, 4.000 Da a aproximadamente 20.000 Da. Mais preferencialmente, o PEG tem aproximadamente 5.000 Daltons. Outros pesos moleculares também são contemplados de modo a acomodar as necessidades do técnico.

Alternativamente, a porção de resíduo de polietileno glicol (PEG) da invenção pode ser representada pelas estruturas:



em que:

10 Y_{11} e Y_{13} são independentemente O, S, SO, SO₂, NR₁₃ ou um ligante;

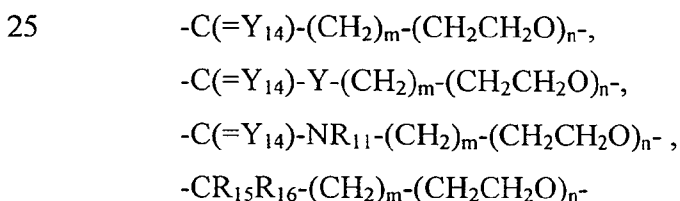
Y_{12} é O, S, ou NR₁₄;

R_{11-14} 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 substituída, arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroalquila C₁₋₆, heteroalquila C₁₋₆ substituída, alcóxi C₁₋₆, arilóxi, heteroalcóxi C₁₋₆, heteroarilóxi, alcanoila C₂₋₆, arilcarbonila, alcóxicarbonila C₂₋₆, arilóxicarbonila, alcanoilóxi C₂₋₆, arilcarbonilóxi, alcanoil C₂₋₆ substituída, arilcarbonila substituída, alcanoilóxi C₂₋₆ substituído, arilóxicarbonila substituída, alcanoilóxi C₂₋₆ substituído e arilcarbonilóxi substituído;

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

(n) é um inteiro de aproximadamente 10 a aproximadamente 2300.

Como um exemplo, o PEG pode ser funcionalizado das seguintes maneiras não limitantes:



em que

R_{11} , R_{15} e R_{16} são independentemente selecionados dentre H, alquilas C_{1-6} , arilas, arilas substituídas, aralquilas, heteroalquilas, heteroalquilas substituídas e alquilas C_{1-6} substituídas;

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

5 Y_{14} é O ou S; e

(n) representa o grau de polimerização.

Nestes aspectos, o polímero (grupo R) inclui um grupo de revestimento, isto é, um grupo que é encontrado no terminal do polímero. O grupo de revestimento pode ser selecionado a partir de qualquer um dentre NH_2 , OH, SH, CO_2H , alquilas C_{1-6} ,
10 preferencialmente metila, como tais grupos são entendidos por aqueles com habilidade ordinária.

Em um aspecto adicional, a porção de polímero do conjugado pode ser um que forneça múltiplos pontos de fixação para a ADA. Alternativamente, múltiplos PEGs podem ser presas a ADA.

15 A farmacocinética e outras propriedades de ADA PEGuilada podem ser ajustadas conforme necessário para uma aplicação clínica desejada pela manipulação do peso molecular de PEG, ligante químico e razão de cadeias de PEG para enzima.

Nestes aspectos, a ADA pode ser presa ao polímero não antigênico de uma forma liberável ou não liberável por meio de vários ligantes conhecidos na arte.

20 Os sistemas de liberação em polímeros podem ser à base de eliminação de benzila ou lactonização com agente travante de trimetila. Os ligantes de polímeros ativados dos sistemas de liberação em polímeros podem ser preparados de acordo com as Patentes U.S. Nos. 6,180,095, 6,720,306, 5,965,119, 6,624,142 e 6,303,569 comumente cedidas. Os ligantes de polímeros ativados dos sistemas de liberação em polímeros podem ser preparados de acordo
25 com a Patente comumente cedida, os conteúdos da qual sendo incorporados aqui por referência. Alternativamente, os conjugados de polímero de ADA são feitos usando certos resíduos de polímero de bicina tais como aqueles descritos nas Patentes U.S. comumente cedidas Nos. 7,122,189 e 7,087,229 e Pedidos de Patente U.S. Nos. 10/557,522, 11/502,108, e 11/011,818, incorporados aqui por referência. Outros sistemas de liberação em polímero
30 contemplados também são descritos no PCT/US07/78600, os conteúdos do qual sendo incorporados aqui por referência.

Exemplos ilustrativos de conjugados de polímeros de ADA não liberáveis contemplados aqui são descritos no Pedido de Patente U.S. No. 60/913,039, os conteúdos do qual sendo incorporados aqui por referência.

5 A conjugação de polímero é preferencialmente uma reação de PEGuilação conforme as reações mostradas por aqueles com habilidade ordinária. Como determinado resumidamente, a rbADA muteína ou rhADA, é reagida com um polímero ativado para formar conjugados de ADA-polímero. Com este respeito, uma ampla variedade de polietileno glicóis ativados ou funcionalizados pode ser usada, incluindo aqueles descritos nas Patentes US Nos. 5,122,614, 5,324,844, 5,612,460 e 5,808,096 (Polietileno glicol ativado por
10 carbonato de succinimidila (SC-PEG) e PEGs ativadas relacionadas), Patente U.S. No. 5,349,001 (PEGs ativadas de tiona imida cíclica), Patente U.S. No. 5,650,234, e outras conhecidas por aqueles com habilidade ordinária. A descrição de cada uma das Patentes anteriores é incorporada aqui por referência. Vide também polímeros ativados disponibilizados por Nektar / Shearwater Polymers. Aqueles com habilidade ordinária podem
15 usar várias formas ativadas de polímeros para fixação sem experimentação indevida.

Como sera apreciado por aqueles de habilidade ordinária tais reações de conjugação tipicamente são realizadas em um tampão adequado usando um excesso molar de várias vezes de PEG ativada. Alguns conjugados preferidos preparados com PEGs lineares como o SC-PEG mencionado acima podem conter, em média, de aproximadamente 10 a
20 aproximadamente 80 filamentos de PEG por enzima ADA. Consequentemente, para estes, excessos molares de várias centenas de vezes, por exemplo, 200-1000 x pode ser empregado. O excesso molar usado para PEG ramificado e PEG preso a enzima será inferior e pode ser determinado usando técnicas descritas nas Patentes e Pedidos de Patentes que descrevem os mesmos e que são mencionados aqui.

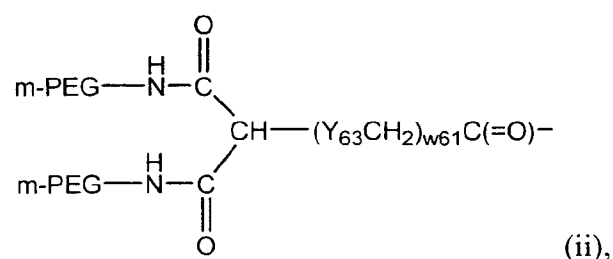
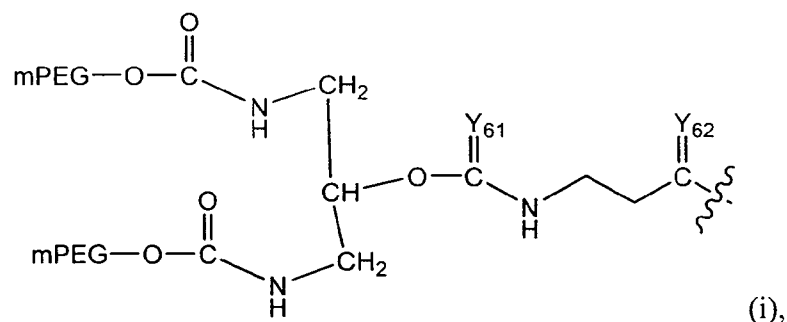
25 Nestes aspectos, o óxido de polialquilenos é conjugado a proteína por meio de ligante químico incluindo, por exemplo, carbonato de succinimidila, tiazolidina tiona, uretano, e ligantes à base de amida. O óxido de polialquilenos é preferencialmente preso de forma covalente a um grupo amino épsilon de um Lis na ADA, entretanto outros locais para fixação covalente são bem conhecidos na arte. Os conjugados de polímero ADA podem incluir pelo
30 menos 5 filamentos de polietileno glicol presos aos grupos amino épsilon de Lis na enzima,

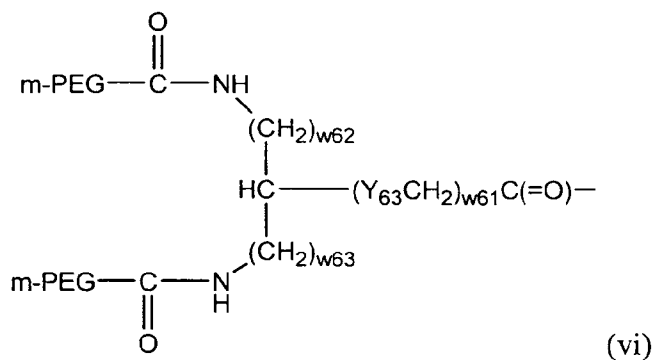
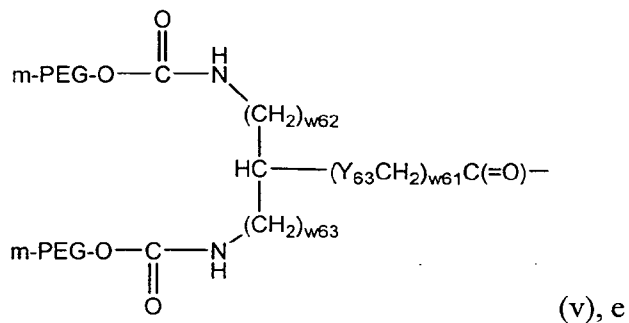
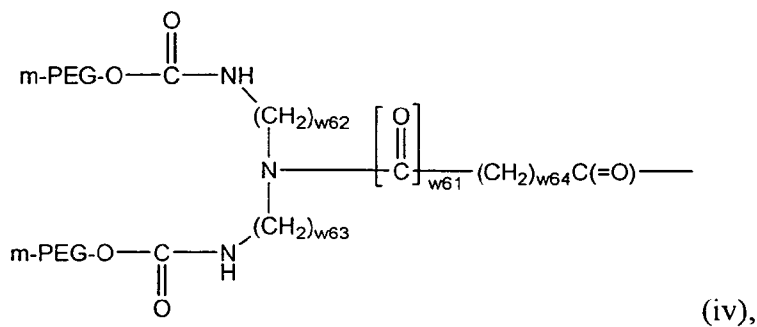
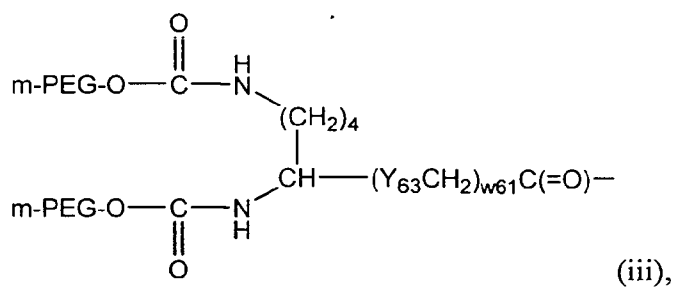
mas alternativamente, pode incluir 11-18 filamentos PEG presos aos grupos amino épsilon de Lis na enzima.

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

Será evidente a partir do mencionado anteriormente que aspectos adicionais da invenção incluem o uso de qualquer PEG ativado noticiado ou disponível comercialmente ou polímero similar para conjugar a enzima ADA ou fragmentos do mesmo para fornecer conjugados úteis para os métodos de tratamento descritos aqui. *Vide*, por exemplo., o catálogo de 2004 de Nektar Advanced Pegilation (Nektar, San Carlos, California), incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Os PEGs ativados podem incluir os lineares, ramificados ou derivados de U-PEG tais como aqueles descritos nas Patentes U.S. Nos. 5,681,567, 5,756,593, 5,643,575, 5,919,455, 6,113,906, 6,566,506, 6,153,655, 6,395,266 e 6,638,499, 6,251,382 e 6,824,766 (também incorporadas aqui por referência). Uma lista não limitante de tais polímeros corresponde aos sistemas de polímeros (i) - (vii) com as seguintes estruturas:





5 em que:

Y_{61-62} são independentemente O, S ou NR_{61} ;

Y_{63} é O, NR_{62} , S, SO ou SO_2

(w62), (w63) e (w64) são independentemente 0 ou um inteiro positivo, preferencialmente de aproximadamente 0 a aproximadamente 10, mais preferencialmente de 10 aproximadamente 1 a aproximadamente 6;

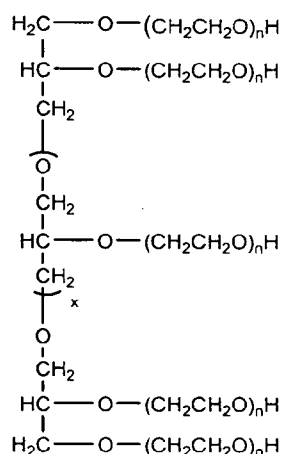
(w61) é 0 ou 1;

mPEG é metóxi PEG

em que o PEG é previamente definido e um peso molecular total da porção do polímero é de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 100,000 Daltons; e

R₆₁ e R₆₂ são independentemente os mesmos grupamentos que podem ser usados para R₁₁.

Dever ser adicionalmente entendido que além dos polímeros à base de PEG, vários outros óxidos de polialquileno podem também ser usados. Por exemplo, os conjugados da presente invenção podem ser preparados por métodos que incluem a conversão de produtos de PEG-OH-multi-braços e "PEG-estrela" tais como aqueles descritos no catálogo de 2001 de Shearwater Corporation "Polietileno Glicol and Derivatives for Biomedical Application" Vide também o catálogo de sistema de liberação da NOF Corp., Ver. 8, April 2006. A descrição de cada um dos quais sendo incorporada aqui por referência. Os polímeros de multi-braços contêm quatro ou mais braços de polímeros e preferencialmente quatro ou oito braços de polímero. Para propósitos de ilustração e não de limitação, o resíduo de polietileno glicol (PEG) de multi-braços pode ser de fórmula:

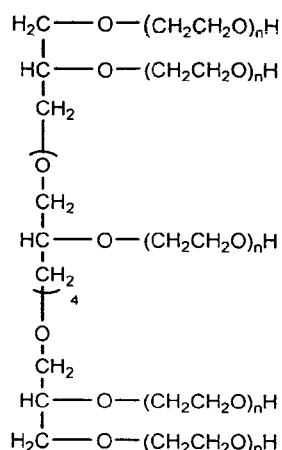


em que:

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

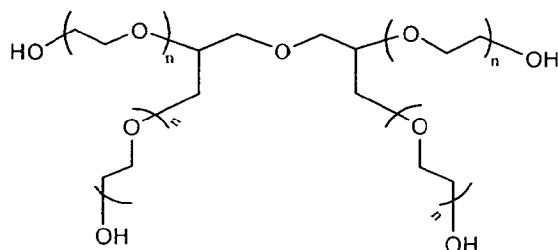
(n) é o grau de polimerização.

Em uma modalidade particular da presente invenção, o PEG de multi-braços possui a estrutura:

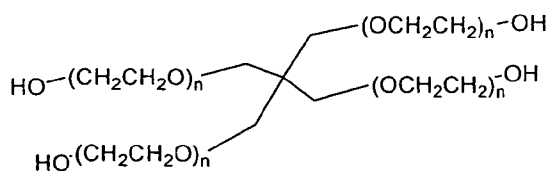


Em que (n) é um inteiro positivo. Em uma modalidade preferida da invenção, os polímeros possuem um peso molecular total de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 100.000 Da, e preferencialmente de 4.000 Da a 45.000 Da.

5 Em uma outra modalidade particular, o PEG de multi-braços possui a estrutura:



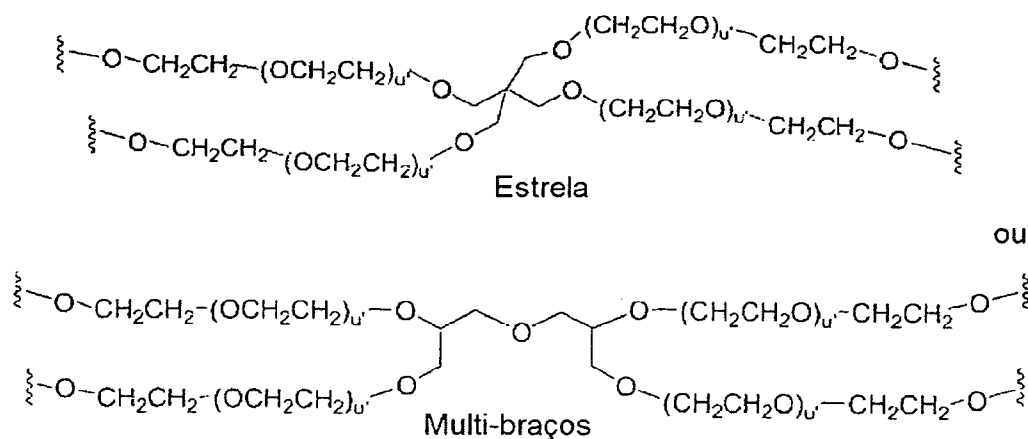
ou



em que n é um inteiro positivo. Em uma modalidade preferida da invenção, os polímeros possuem um peso molecular total de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 100.000

10 Da, e preferencialmente de 4.000 Da a 45.000 Da.

Os polímeros podem ser convertidos em um polímero ativado adequado, usando técnicas de ativação descritas nas Patentes U.S. Nos. 5,122,614 ou 5,808,096. Especificamente, tais PEGs podem ser de fórmula:

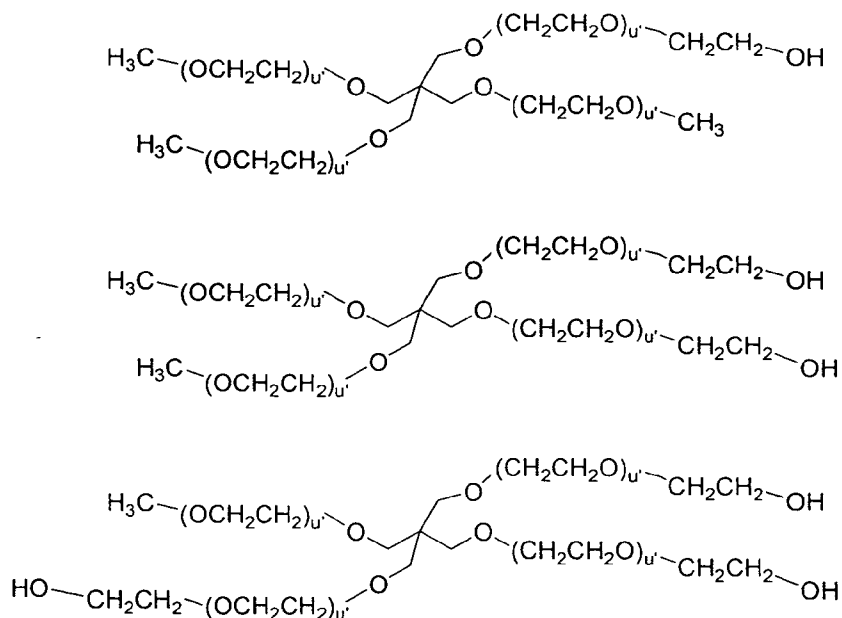


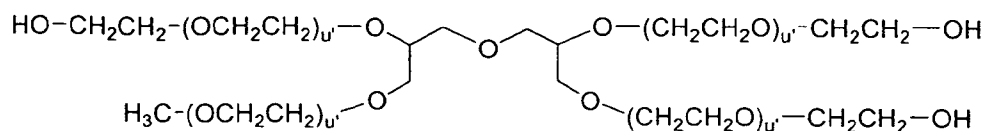
em que:

(u') é um inteiro de aproximadamente 10 a aproximadamente 570, para preferencialmente proporcionar polímeros tendo um peso molecular total de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 100.000 Da, e preferencialmente, de aproximadamente 4.000 Da a aproximadamente 45.000 Da; é até 3 porções terminais do resíduo é/são revestida(s) com uma metila ou outra alquila inferior.

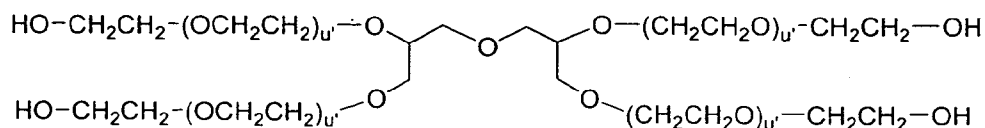
Em algumas modalidades preferidas, todos os 4 braços de PEG são convertidos a grupos funcionais adequados, isto é SC, etc., para facilitar a fixação à proteína recombinante.

10 Tais compostos antes da conversão incluem:



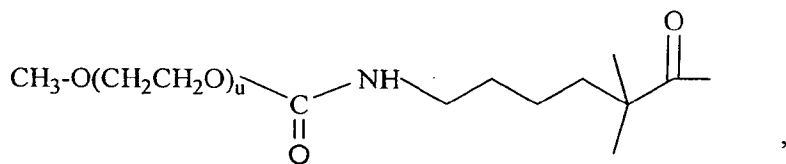


e

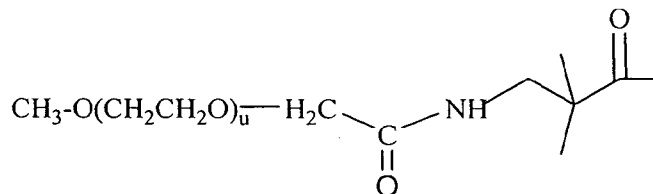
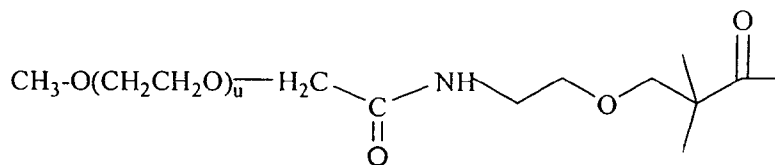
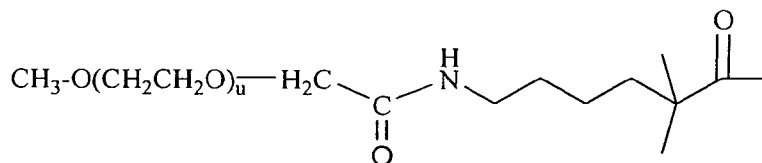


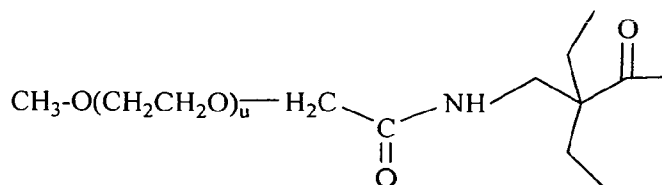
Na maioria dos aspectos preferidos da invenção, o polietileno glicol ativado é um que
5 fornece uma ligação de uretano ou ligação-amida com a proteína.

Ainda em aspectos alternativos, os polímeros ativados podem empregar um ligante à base de éster impedido. 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:

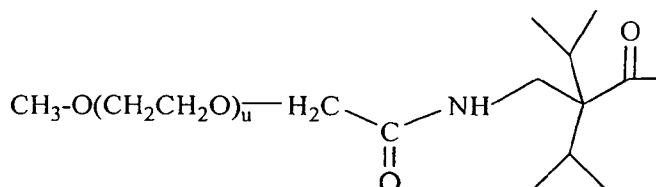


10



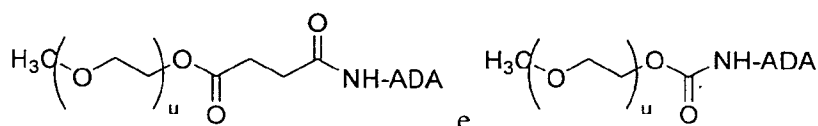


e



em que (u) é um inteiro para preferencialmente fornecer polímeros que tem um peso molecular total de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 100.000 Da.

Em uma modalidade preferida, o conjugado de PEG inclui



em que (u) é um inteiro para fornecer uma porção de polímero que tem um peso molecular de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 100.000 Da, e preferencialmente de aproximadamente 4.000 Da a aproximadamente 45.000 Da, ainda mais preferencialmente aproximadamente 5.000 Da.

Polímeros adequados irão variar substancialmente em peso. Polímeros que tem peso molecular médio numérico de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 100.000 são geralmente selecionados para propósitos da presente invenção. Pesos moleculares de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 45.000 são preferidos e 5.000 a aproximadamente 12.000 são particularmente preferidos. As substâncias poliméricas incluídas também são preferencialmente solúveis em água a temperatura ambiente. Uma lista não limitante de tais polímeros inclui homopolímeros de óxido de polialquilenos tais como polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenados, copolímeros dos mesmos e copolímeros de bloqueio dos mesmos, contanto que a solubilidade em água de tais polímeros seja mantida. Além do mPEG, os polímeros terminados em alquila C₁₋₄ também são úteis.

Métodos para preparar polímeros que tem ácidos carboxílicos terminais com alta pureza são descritos no Pedido de Patente US No. 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 polialquilenos seguida pela conversão ao ácido carboxílico derivado do mesmo. A primeira etapa de preparação de ácidos carboxílicos PAO do processo inclui a formação de um intermediário tal como t-butila de ácido carboxílico de óxido de polialquilenos. Este intermediário é formado pela reação de um PAO com um haloacetato de t-butila na presença de uma base tal como t-butoxido de potássio. Um vez que o intermediário de éster de t-butila tenha sido formado, o derivado de ácido carboxílico de óxido de polialquilenos pode ser prontamente fornecido com purezas excedendo 92%, preferencialmente excedendo 97%, mais preferencialmente excedendo 99% e mais preferencialmente excedendo 99.5% de pureza.

Ainda em aspectos alternativos, polímeros que tem grupos amina terminais podem ser empregados para preparar os conjugados de ADA. Os métodos de preparação de polímeros que contém aminas terminais em alta pureza são descritos nos Pedidos de Patente US Nos. 11/508,507 e 11/537,172, os conteúdos dos quais sendo incorporados aqui por referência. Por exemplo, os polímeros que tem azidas reagem com agentes redutores à base de fosfina, tais como, trifenilfosfina ou um agente redutor de borohidreto de metal alcali tal como NaBH_4 . Alternativamente, os polímeros que incluem grupos de saída reagem com sais de amina protegida, tais como, sal de potássio de metil-terc-butil imidodicarbonato (KNMeBoc) ou o sal de potássio de di-terc-butil imidodicarbonato (KNBoc_2) seguido pela desproteção do grupo amino protegido. A pureza dos polímeros que contém aminas terminais formados por esses processos é maior que aproximadamente 95% e, preferencialmente, maior que 99%.

A ramificação produzida pelos polímeros da patente 6.153.655, citada acima, permite ramificação secundária ou terciária como uma forma de aumentar o carregamento do polímero em uma molécula biologicamente ativa de um ponto único de fixação. Será entendido que o polímero solúvel em água pode ser funcionalizado para fixação aos grupos de ligação bifuncionais se necessário sem experimentação indevida.

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 polialquilenos, tais como, polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis

polioxi-etilenados, copolímeros dos mesmos e copolímeros de bloqueio dos mesmos, contanto que a solubilidade em água dos copolímeros de bloqueio seja mantida.

Como uma alternativa para polímeros à base de PAO, materiais eficazmente não antigênicos, tais como, dextrana, polivinil pirrolidonas, poliacrilamidas, tais como, HPMAs (hidroxipropilmetacrilamidas), alcoóis polivinílicos, polímeros à base de carboidratos, copolímeros dos antecedentes, e semelhantes podem ser usados. Aqueles de habilidade ordinária na técnica compreenderão que a lista antecedente é meramente ilustrativa e que todos os materiais poliméricos que têm as qualidades descritas aqui são contemplados. Para propósitos da presente invenção, “substancialmente ou eficazmente não-antigênico” quer dizer todos os materiais entendidos na técnica como sendo não tóxicos e que não induzem uma resposta imunogênica apreciável em mamíferos.

D. Utilidade

O técnico no assunto apreciará que a ADA muteína inventiva é facilmente empregada em um ambiente clínico para tratar qualquer doença ou distúrbio responsivo à enzima ADA. Tal doença ou distúrbio é tal que responde a níveis de sangue ou tecido reduzido de adenosina ou deoxiadenosina. Tal doença ou distúrbio pode incluir, por exemplo, SCID, doenças pulmonares, por exemplo, asma, e cânceres que respondem a níveis de deoxiadenosina ou adenosina sistêmica ou local diminuídos. Mais detalhes para o uso de ADA no tratamento de tumores ou cânceres é fornecido pelo pedido de co-propriedade U.S. No. de Série _____ depositado na mesma data aqui (que reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente U.S. Provisional No. de série 60/913,039), intitulado: “Enzymatic Anticancer Therapy, e aqui incorporado integralmente por referência. O agente de tratamento pode ser, por exemplo, a enzima rhADA muteína ou rbADA muteína. Preferencialmente, a rADA muteína de tratamento é conjugada a polímero, como descrito *supra*, por exemplo., PEGilated. A dosagem de ADA ou ADA conjugada a polímero é individualizada dependendo da resposta clínica do tumor e do perfil de efeito colateral de um paciente individual, seja animal ou humano. Nos exemplos do estudo fornecidos aqui abaixo, a dose mais elevada é a dose máxima possível que é tolerada.

Por exemplo, Adagen[®] é fornecido comercialmente como 250U de ADA bovina /mL. Isto significa em outras palavras 2000U/kg para aproximadamente um comundongo de 25g injetado com 0,2 ml de Adagen[®]. Certamente, o técnico no assunto apreciará que a dose de

ADA conjugada a polímero pode também 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 duas ou mais enzimas de ADA por polímero será ajustado de acordo com as unidades de ADA por mL de solução de qualquer conjugado de polímero particular de ADA.

Para fornecer a ADA ou o conjugado ADA PEG pela injeção, a faixa ótima de dose é preferencialmente determinada por monitoramento de plasma. É geralmente desejável fornecer ao receptor uma dosagem que manterá a atividade de ADA do plasma (níveis baixos) na faixa de aproximadamente 10 a 100 $\mu\text{mol/hr/mL}$, preferencialmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 $\mu\text{mol/hr/mL}$ (ensaiada a 37°C); e demonstram um declínio de eritrócito em adenosina, i.e., dATP to $\leq$ a aproximadamente 0,001 - 0,057 $\mu\text{mol/mL}$, preferencialmente aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,015 $\mu\text{mol/mL}$ em eritrócitos empacotados, ou $\leq$ a aproximadamente 1% do total de adenosina no eritrócito (i.e., conteúdo de ATP + dATP), com um nível normal de adenosina, como medido em uma amostra de pré-injeção. O valor normal de dATP está abaixo de aproximadamente 0,001 $\mu\text{mol/mL}$.

A dose com base na quantidade de enzima irá variar de, por exemplo, aproximadamente 0,10U/kg até aproximadamente 30 U/kg, ou maior, preferencialmente de aproximadamente 0,5 U/kg até aproximadamente 20 U/kg, e mais preferencialmente de aproximadamente 0,5 U/kg até aproximadamente 12U/kg (i.e. por kg do peso do corpo do paciente) Tal como de aproximadamente 0,5U/kg até aproximadamente 5U/kg. Uma dose semanal total pode ser de até 40U/kg, ou mais, conforme tolerado pelo receptor. Aumentos adicionais de 5 U/kg/semana são permitido, até uma dose única máxima de 30 U/kg, ou mais, conforme tolerado pelo receptor. Em geral, injeções semanalmente seguidas de ADAGEN® a 15U/kg, o nível médio mínimo de atividade de ADA no plasma está entre 20 e 25 $\mu\text{mol/hr/mL}$.

Deve ser observado que a dose de 100 U/kg é a dose equivalente de camundongo de aproximadamente 12 U/kg de dose clínica infantil.

Deve ser entendido que a adenosina deaminase aqui revelada pode ser usada para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma condição mediada por adenosina deaminase.

Detalhes de informações de dosagem de ADA são conhecidos na técnica conforme descritos na prescrição inserida para ADAGEN® (Enzon, Inc.), os conteúdos da qual sendo incorporados aqui.

5

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.

EXEMPLO 1

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**

10

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 fornecida 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 bactérias 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, e Lathe, R. 1985; "Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data, Theoretical and practical considerations." *J. Mol Biol*; 183:1-12,

15

20

25

30

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 de flaqueamento, NdeI e BamHI foram incluídos no término 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 de isopropil β-D-L-tiogalactopiranosídeo ("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).

EXEMPLO 2

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 aminoácidos 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 modificada e modelada, apenas uma destas cinco posições de cisteína (cisteína 74) foi mudada para um resíduo de serina. Isto

foi realizado 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*.

Em resumo, a sequência de polipeptídeo definida (vide SEQ ID NO: 1) foi fornecida por 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 de BioCatalytics são descritos em maiores detalhes na Patente U.S. 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 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 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 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 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 de bactérias hospedeiras 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 3

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA rhADA MUTEÍNA

A purificação de rhADA foi realizada em um protocolo cromatográfico 3 desenvolvido por Enzon. A fermentação bacteriana foi conduzida por *E. coli* expressando a
5 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 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
10 centrifugação e congelamento a -20 °C. Rapidamente, a pasta de células descongeladas (50 g) foi ressuspensa 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
15 grandes. A suspensão de células 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 por centrifugação a 16.000 RPM por 40 minutos a 4°C (Sorvall
20 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 com EDTA 2 mM, seguido por filtração em Nalgene (unidade de filtro de
25 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-
30 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).

5

EXEMPLO 4

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.

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 e foi removido por uma centrifugação a 7100 RPM (12000 x g), por 60 minutos a 4°C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor# JLA8,1000) antes de ser carregado na segunda coluna.

O extrato celular foi carregado em uma coluna pré-equilibrada Capto Q (Cat# 17-5316-01, GE Healthcare, Piscataway, NJ. O volume de leito de 350 mL foi 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 com NaCl 60

mM e 70 mM foram realizadas primeiramente para remover impurezas. O perfil de eluição foi analisado por atividade de ADA, análise de SDS-PAGE, Western Blots, e RP-HPLC.

Após a coluna Capto Q, 2 purificações cromatográficas de interação hidrofóbica (“HIC”) 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 foi ajustado para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M 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 rbADA ou rhADA foi adicionalmente dessalgada e concentrada em um LabScale™ TFF systems (Membrana BioMax 5, Bedford, MA) contra o tampão de armazenamento (por exemplo, fosfato de sódio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5).

EXEMPLO 5

ESTUDOS DE ESTABILIDADE NA rbADA E Ser74-rbADA

Os estudos seguintes foram feitos para demonstrar que a estabilidade de rbADA com respeito a degradação oxidativa foi realmente melhorada pela mutação de cys74 para ser. Amostras de ADA bovina recombinante (rbADA) e ADA bovina mutada de cys74 para ser74 (Ser74-rbADA) em concentrações de aproximadamente 0,5 mg/mL em tampão de fosfato de sódio (pH 7,8) foram usadas para o estudo de estabilidade. A estabilidade foi monitorada por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) usando a detecção UV a 220 nm e adetecção por espectrometria de massa (espectrômetro de massa Micromass Q-TOF electrospray). As condições de HPLC foram como seguem:

Coluna: Zorbax 300 SB-C8 (Agilent, 250 x 4.6 mm, poro de tamanho de 300 angstrom, tamanho de partículas de 5 microns).

Fase Móvel A: ácido trifluoroacético a 0,1% em água.

Fase Móvel B: ácido trifluoroacético a 0,1% em acetonitrila/água (80/20; v/v).

Gradiente:	<u>Tempo</u>	<u>% Fase Móvel B</u>
	0	20
	5	20
	45	80

46 20
60 20

Temperatura da Coluna: 40°C.
Taxa de fluxo: 1,0 mL/min.
Volume de Injeção: 50 µL.

A pureza dos compostos foi determinada pela análise de RP-HPLC no tempo inicial que o estudo de estabilidade foi iniciado e em vários intervalos de tempo, incluindo 4, 8, e 17 dias, após a iniciação do estudo. Deve ser observado que as amostras de rbADA (não-mutefina) tinham aproximadamente dois meses de idade no início deste estudo e já haviam, sofrido alguma degradação. A amostra de Ser₇₄-rbADA foi rapidamente preparada e estava relativamente pura. No entanto, para o propósito do presente estudo, a diferença de pureza entre o intervalo de tempo inicial e após 17 dias de incubação a 25°C é o parâmetro relevante a examinar.

Como mostrado na Tabela 1, a pureza de rbADA foi 83.7% no intervalo de tempo inicial e diminuiu para 66,1% após 17 dias, indicando que 17,6% de rbADA foi degradada durante este período de tempo. A análise de espectrometria de massa dos picos separados cromatograficamente indicou que a eluição do principal degradante a 31,851 min, calculada para 30,5% da área do cromatograma, teve uma massa de 32 Da maior que aquela de rbADA. Esta mudança de massa é consistente com adição de 2 oxigênios à rbADA para formar o ácido sulfínico degradante da cisteína livre na posição 74 da rbADA. O menor pico degradante, de eluição a 32,538 min, teve uma massa consistente com adição de 1 oxigênio a rbADA para formar o ácido sulfênico degradante com cisteína livre na posição 74 da rbADA. Ser₇₄-rbADA, que tem um resíduo de serina substituindo o resíduo de cisteína₇₄, mostra pequena degradação durante o curso de 17 dias, virtualmente com as mesmas purezas do intervalo de tempo inicial (97,2%) e 17 dias depois (97,9%). Isto prova que a cisteína₇₄ é retalmente a fonte de degradação oxidativa que ocorre na rbADA e mutações de seus resíduos de serina, que não é suscetível de oxidação, elimina a degradação.

Tabela 1. Estabilidade de rbADA, e Ser₇₄-rbADA
Em tampão de fosfato de sódio (pH 7,8) a 25°C

Intervalo de tempo	% de Pureza conforme Determinada por RP-HPLC	
	rbADA	Mut-rbADA

Inicial	83,7	97,2
4 Dias	83,6	96,7
8 Dias	76,3	97,7
17 Dias	66,1	97,9

EXEMPLO 6

USO DE PROTEÍNAS DE ADA MUTEÍNA NA TERAPIA DE PACIENTES COM SCID DEFICIENTES DE ADA

5 As enzimas de ADA mutada são utilizadas em ambientes terapêuticos que agora empregam ADAGEN. A Ser₇₄-rb ou rhADA pode ser modificada pela conjugação de polietileno glicol (PEG) com, por exemplo, 11-17 polímeros de PEG de 5 kDa por proteína ADA. As preparações PEGuiladas de ADA muteína são formuladas em solução salina estéril em pH 7,2 – 7,4 e em uma concentração de aproximadamente 250 unidades por milímetro. A

10 ADA muteína PEGuilada é administrada a pacientes pela via parenteral, tal como pela via intramuscular. Pacientes que se beneficiam de tal terapia incluem aqueles com distúrbio da imunodeficiência combinada severa causado pela atividade de ADA insuficiente. A administração de PEG-ADA muteínas é feita tipicamente a cada sete dias com um esquema de dosagem de 10 U/kg para a primeira dose e 20 U/kg por semana para doses de

15 manutenção. A Ser₇₄-rb ou rh PEG-ADA é armazenada a 2-8 °C em solução aquosa com uma dose por frasco de 1,5 mililitros. O esquema de dosagem é designado para manter os níveis de atividade de ADA no plasma a 15-35 µmol/hr/mL (ensaiado at 37 °C) e reduz eritrócito na dATP para ≤0,005-0,015 µmol/mL eritrócitos empacotados.

EXEMPLO 7

PREPARAÇÃO DE SER74-rbADA PEGUILADA VIA LIGAÇÃO URETANO

20 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. No

25 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 seja detectado PEG livre

pela mistura de quantidades iguais de filtrado e PMA 0,1% (ácido polimetacrílico em HCl 0,1 M).

EXEMPLO 8

PREPARAÇÃO DE SER74-rhADA PEGUILADA VIA LIGAÇÃO URETANO

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

EXEMPLO 9

PREPARAÇÃO DE SER74-rbADA PEGUILADA VIA LIGAÇÃO DE AMIDA

10 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. 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
15 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 10

PREPARAÇÃO DE MUTEINA rhADA VIA LIGAÇÃO DE AMIDA

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

REIVINDICAÇÕES

1. Adenosina deaminase recombinante, **caracterizada** pelo fato de que um resíduo de aminoácido oxidável expresso no tipo selvagem de adenosina deaminase é substituído por um resíduo de aminoácido não oxidável.
- 5 2. Adenosina deaminase recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o resíduo de aminoácido oxidável é cisteína, metionina ou triptofano, e o resíduo de aminoácido não oxidável é selecionado a partir do grupo que consiste de alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, tirosina, ácido 2-
10 aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiônico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocapróico, ácido 2-aminoheptanóico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiônico, n-etilglicina, n-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-
15 hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, n-metilglicina, sarcosina, n-metilisoleucina, 6-n-metillisina, n-metilvalina, norvalina, norleucina e ornitina.
3. Adenosina deaminase recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o resíduo de aminoácido não oxidável é selecionado a partir do grupo que consiste de serina, alanina, asparagina, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, tirosina e valina.
20
4. Adenosina deaminase recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o resíduo de aminoácido não oxidável é serina.
5. Adenosina deaminase recombinante, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que a cisteína oxidável está localizada aproximadamente na posição 74 da
25 proteína madura.
6. Adenosina deaminase recombinante, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que é uma adenosina deaminase humana recombinante ou uma adenosina deaminase bovina recombinante.
7. Adenosina deaminase recombinante, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que é traduzida a partir de uma molécula de DNA de acordo com a SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4. .
30
8. Adenosina deaminase recombinante, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que compreende SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3.

9. Adenosina deaminase recombinante, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que compreende SEQ ID NO: 1 com uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste de Gln no lugar de Lys₁₉₈; Ala no lugar de Thr₂₄₅; Arg no lugar de Gly₃₅₁; e combinações das mesmas.
- 5 10. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, **caracterizado** pelo fato de que a adenosina deaminase é a adenosina deaminase recombinante da reivindicação 1.
11. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, de acordo com reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o óxido de polialquilenos é polietileno glicol.
- 10 12. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o polietileno glicol é conjugado com a adenosina deaminase recombinante por meio de um ligante selecionado a partir do grupo que consiste de carbonato de succinimidil, tiazolidina tiona, uretano e ligantes com base em amidas.
- 15 13. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o polietileno glicol é preso de forma covalente a um grupo epsilon amino de uma Lys da adenosina deaminase recombinante.
14. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a adenosina deaminase recombinante
- 20 compreende um ou mais filamentos presos aos grupos epsilon amino de um ou mais resíduos de Lys da adenosina deaminase recombinante.
15. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a adenosina deaminase recombinante compreende de aproximadamente 11 a aproximadamente 18 filamentos de polietileno glicol
- 25 presos aos grupos epsilon amino de um ou mais resíduos de Lys da adenosina deaminase recombinante.
16. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o polietileno glicol é conjugado com a adenosina deaminase por meio de um ligante de carbonato de succinimidil.
- 30 17. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o polietileno glicol possui um peso molecular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 100.000.
18. Conjugado de adenosina deaminase - óxido de polialquilenos, de acordo com a

reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o polietileno glicol possui um peso molecular de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 45.000.

19. Método para tratar uma condição mediada por adenosina deaminase em mamíferos, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz da adenosina deaminase racombinante da reivindicação 1.

20. Método, de acordo com reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de que a condição mediada por adenosina deaminase é distúrbio imune combinado severo.

21. Uso de adenosina deaminase recombinante conforme a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratar uma condição mediada por adenosina deaminase.

22. Uso de adenosina deaminase, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que a condição mediada por adenosina deaminase é distúrbio imune combinado severo.

23. Processo para purificar a adenosina deaminase recombinante da reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende purificar a proteína por cromatografia de troca iônica.

24. Processo para purificar a adenosina deaminase recombinante da reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende SEQ ID NO: 1, compreendendo purificar a proteína por cromatografia de interação hidrofóbica.

25. Adenosina deaminase recombinante, **caracterizada** pelo fato de que é produzida pelo processo da reivindicação 21.

26. Adenosina deaminase recombinante, **caracterizada** pelo fato de que é produzida pelo processo da reivindicação 22.

27. DNA isolado, **caracterizado** pelo fato de que codifica uma adenosina deaminase recombinante tendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3.

28. DNA isolado, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a adenosina deaminase recombinante possui uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste de Gln no lugar de Lys₁₉₈; Ala no lugar de Thr₂₄₅; Arg no lugar de Gly₃₅₁; e combinações das mesmas.

RESUMO

ADENOSINA DEAMINASE RECOMBINANTE ESTÁVEL

Uma adenosina deaminase recombinante mutante que possui qualquer resíduo de cisteína oxidável substituído por um resíduo de aminoácido não oxidável é descrita. Adenosinas deaminase recombinantes estabilizadas, conjugadas com polímeros e métodos de tratamento, usando as mesmas também são descritos.