



(12) **Øversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2147122 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 38/50 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Øversettelse publisert	2014.12.29
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.07.16
(86)	Europeisk søknadsnr	08754910.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.04.18
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.01.27
(30)	Prioritet	2007.04.20, US, 913039 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Sigma-Tau Pharma Limited, 21 Holborn Viaduct, London EC1A 2DY, GB-Storbritannia
(72)	Oppfinner	FILPULA, David R., 269 Carlton Club Drive, Piscataway, NJ 08854, US-USA SAPRA, Puja, 19 Monmouth Avenue, Edison, NJ 08820, US-USA
(74)	Fullmektig	Jesper Levin A/S, Enrum Slot, Vedbæk Strandvej 341, DK-2950 VEDBÆK, Danmark

(54) **Benevnelse** **Enzymatisk kreftbehandling**

(56) **Anførte publikasjoner**
WO-A1-03/045436
WO-A2-01/26625
WO-A2-02/077233
US-A1- 2002 088 017
US-A1- 2002 156 248

Beskrivelse

OPPFINNELSENS OMRÅDE

- 5 **[0001]** Oppfinnelsen angår adenosindeaminase til anvendelse i behandlingen av tumorer, især ondartede tumorer. Anvendelsen involverer nærmere bestemt reduksjon av vevsnivåer av adenosin og deoksyadenosin.

BAKGRUNNEN FOR OPPFINNELSEN

10

- [0002]** En tumor er en abnorm godartet eller ondartet vekst av celler eller vev som oppstår fra ukontrollert celleproliferasjon. En ondartet tumor er en som sprer seg fra sitt opprinnelsessted, og er innenfor teknikken også kjent som kreft. Tumorer og kreft er således en familie av sykdommer som deler den felles
- 15 egenskap av ukontrollert eller uhensiktsmessig cellevekst. Generelt er ondartede tumorer enten blodrelaterte tumorer, slik som leukemi, eller solide tumorer. Blodrelaterte ondartede tumorer sirkulerer generelt i blodet, mens solide ondartede tumorer sprer seg overalt i kroppen fra en primærtumor. De spredde tumorceller kan ha potensialet til å utvikle seg til flere sekundær-
- 20 tumorer i en metastaseprosess. For at en solid tumor skal gjennomgå en slik metastatisk spredning, må solid tumor-celler unnslippe fra primær- eller originaltumoren, komme inn i blodomløpet eller det lymfatiske system, og derfra invadere vevet i andre organer, hvor de mangfoldiggjør seg og danner nye tumorer. Metastase er en kompleks flertrinnsprosess som involverer endringer i
- 25 tumorcelleadhesjon og motilitet, sekresjon av proteolytiske enzymer, kjemoattraktanter og proteoglykaner, samt andre faktorer. I tillegg er angiogenese, eller dannelsen av nye blodkar, også et viktig trinn i metastaseprosessen (Folkman, 1995, Nature Medicine 1:27-31).

[0003] Det har også vist seg at immunsystemet inhiberer metastasen av slike ondartede tumorceller, og det har blitt rapportert at adenosin til gjengjeld kan inhibere slike immunbeskyttende reaksjoner. Eksempelvis i Loshkin et al.,
5 (2006, Cancer Res. 66: 7758-7765) rapporteres det at adenosin inhiberer aktivering og cytokinproduksjon i T-dreperceller. Adenosin har negativ innvirkning på annen immunfunksjon, herunder både celleelementer og inflammatoriske funksjoner (se f.eks. gjennomgangene til Spychala, 2000, Pharmacology & Therapeutics 87: 161-173 og av Sitkovesky et al., 2005 Nature
10 Reviews Immunology 5: 713-721). Sitkovesky et al., i WO 03/050241, utstedt 19. juni 2003, beskriver også fremgangsmåter for å øke en immunrespons til et antigen og for å behandle tumorer, ved å administrere en adenosinreseptor-antagonist, som kan innbefatte adenosindeaminase.

[0004] Det har også blitt vist at adenosin fremmer tumorcellemigrasjon og angiogenese (Barcz et al., 2000, Oncol. Rep. 7(6): 1285-91; Adair, 2005, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289: R283-R296) og at adenosin stimulerer proliferasjon av tykktarmskreftceller (Mujoomdar et al. 2003, Biochemical
15 Pharmacology 66 1737-1747). Det har også blitt rapportert av Asmar et al., 1966, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. (abstrakt nr. 73) at veksten av visse tumorceller ble inhibert ved injeksjon av ADA, med over 50% i en museascites-modell. Disse var lymfatiske leukemier L1210 og L4946, lymfosarkom 6C3HED, brystadenokarsinom TA3 og Ehrlich karsinom E2. I det samme abstrakt ble et
20 adenokarsinom 755 rapportert til å være dobbelt så motstandsdyktig mot, og et sarkom 180 var fullstendig motstandsdyktig mot, effekten. I WO03050241A2 beskrives effektene av en inhibitor av adenosinreseptorer på B16-melanom-celler. Selv om WO03050241A2 nevner ADA som en inhibitor av adenosin, er det ingen spesifikk beskrivelse om å anvende ADA på behandlingen av
25 spesifikke krefttyper, og især eggstokkreft og prostatakraft.

30

[0005] Det ser således ut til at for noen tumorer tilveiebringer nærværet av

adenosin et "klar"-signal for tumorproliferasjon og for tumorangiogenese, og et "stopp"-signal for T-drepercellene som normalt ville drepe disse tumorene.

5 **[0006]** I motsetning til de ovenfor drøftede funnene har Lind, et al. (US-patent nr. 6,579,857) rapportert at adenosin, i kombinasjon med en inhibitor av enzymadenosindeaminasen, og/eller i kombinasjon med et middel mot kreft, slik som coformycin, er nyttig i en fremgangsmåte for å potensere celledød i neoplastiske celler av epitelopprinnelse. Denne referansen antyder således at adenosins rolle i kreft er mer kompleks og uavklart.

10

[0007] Som bemerket ovenfor, er enzymet adenosindeaminase et middel for reduksjon av endogene adenosinnivåer. Adenosindeaminase ("ADA"), betegnet EC 3.5.4.4, er et viktig enzym i purin-salvage-pathway. ADA omdanner enten adenosin eller deoksyadenosin, i nærvær av vann, til inosin eller deoksyinosin og ammoniakk. Det er kjent at individer som har deletære mutasjoner i ADA-genet, kan utvikle ulike grader av en immunsviktsykdom, fra mild til alvorlig, dvs. alvorlig kombinert immunsvikt ("SCID"). Det har blitt fastslått at SCID er resultat av toksisk akkumulering av enzymsubstratene, adenosin og deoksyadenosin, i umodne lymfatiske celler. Lidelsens inntreden kan være fra tidlig barndom til voksenliv, avhengig av de nedarvede mutasjoner. Mangel på ADA er en av hovedårsakene til SCID hos barn, og er et av de viktigste utgangspunktene for genterapitilnærminger (R. Parkman et al., 2000, "Gene therapy for adenosine deaminase deficiency", Ann. Rev. Med., 51:33-47).

15

25 **[0008]** Tidligere har ADA blitt kommersielt isolert fra bovine kilder og benyttet i behandling av et antall lidelser, herunder SCID, i formen av en bovin ADA konjugert til en polyetylenglykolpolymer ("PEG"-polymer). PEGylert ADA for medisinsk bruk er kommersielt tilgjengelig fra Enzon Pharmaceuticals, Inc. som ADAGEN[®], PEGylert ADA. Konjugasjonen av en PEG-del til ADA tillater
30 enzymet å oppnå sin fulle terapeutiske effekt ved å øke sirkulasjonslevetiden og gjør ADA-en i det vesentlige ikke-antigen for å minimere potensialet for immunogene reaksjoner. Det er også mulig å produsere humane eller bovine

ADA-enzymet for anvendelse i en konjugert form som beskrevet i den sameide US-patentsøknad med serienr. 11/738,012 under tittelen "Stabilized Proteins", og sameid US-patent nr. 8,071,741 under tittelen "Stable Recombinant Adenosine Deaminase", inngitt på samme dato som denne og idet det kreves
5 fordel fra US-patentsøknad med serienr. 60/913,009.

[0009] Det er således et gammelt behov innenfor teknikken for hittil ukjente og forbedrede molekyler til anvendelse i behandlingen eller inhiberingen av vekst, spredning og utvikling av kreft.

10

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

[0010] Følgelig viser oppfinnelsen til ADA for anvendelse i behandlingen av en pasient med behov for dette. En effektiv mengde er det som enkelt kan
15 avgjøres av fagmannen for å redusere vevsnivåer av adenosin eller deoksyadenosin hos en pasient, og hvor vekst eller spredning av tumoren inhiberes ved hjelp av i det vesentlige reduserte vevsnivåer av adenosin hos pasienten. Administrasjonsveien er en vei slik som subkutan, intravenøs, intramuskulær, intratekal, intraperitoneal, inhalasjon og transuretral.

20

[0011] Tumoren kan være ondartet eller ikke-ondartet, og er fortrinnsvis en solid tumor, f.eks. en tumor slik som prostatatumor, en eggstokkreft og/eller en kolorektalkreft.

[0012] Adenosindeaminasen konjugeres fortrinnsvis til en i det vesentlige ikke-antigen polymer, slik som et polyalkylenoksid (PAO). PAO-en er fortrinnsvis i størrelsesområdet på fra cirka 4000 til cirka 45 000 Dalton. PAO-en er fortrinnsvis et polyetylen glykol ("PEG"). Molforholdet av ADA i forhold til polymer kan være 1:1, eller kan være to eller flere ADA-molekyler per polymer,

eller, mer foretrukket, tilveiebringer fra cirka 1 til cirka 20 polymermolekyler (dvs. 11-18 PEG-strenger) per ADA-molekyl.

5 **[0013]** Den polymerkonjugerte ADA-dose er i området fra cirka 10U til cirka 30U per kg eller mer, og i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å opprettholde inhibering av tumoren, f.eks. fra cirka 1 til cirka 20 dager, eller lenger.

10 **[0014]** Mengden av adenosindeaminase som administreres, er så effektiv at den i det vesentlige reduserer vevsnivåer av adenosin eller deoksyadenosin hos pasienten, og hvor vekst eller spredning av svulsten inhiberes av i det vesentlige reduserte vevsnivåer av adenosin hos pasienten. Det vil for eksempel si en dose adenosindeaminase som er i området på fra cirka 10U til cirka 30U per kg. Dosen repeteres i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å opprettholde inhibering av tumoren, f.eks. fra cirka 1 til cirka 20 dager, eller
15 lenger. Dosen administreres via en hvilken som helst passende vei, slik som subkutant, intravenøst, intramuskulært, intratekalt, intraperitonealt, inhalasjon og transuretralt.

20 **[0015]** Adenosindeaminasen renses eventuelt fra en bovin kilde, eller er en rekombinant adenosindeaminase. Den rekombinante adenosindeaminase er for eksempel rekombinant bovin adenosindeaminase (Ser74-rbADA) som omfatter SEQ ID NO: 1, rekombinant human adenosindeaminase (Ser74-rhADA) som omfatter SEQ ID NO: 3, og rekombinant bovin adenosindeaminase som omfatter SEQ ID NO: 5 og/eller variasjoner eller polymorfismer derav.
25 Rekombinant bovin adenosindeaminase, f.eks. SEQ ID NO: 5, er eventuelt capped ved Cys74 med henblikk på stabilitet i et vandig medium.

30 **[0016]** For den foreliggende oppfinnelses formål skal uttrykket "rest" forstås som å bety den del av en forbindelse som den viser til, f.eks. PEG, ADA, aminosyre osv., som blir igjen etter at den har gjennomgått en substitusjonsreaksjon med en annen forbindelse.

[0017] For den foreliggende oppfinnelses formål skal uttrykket "polymerrest", f.eks. "PEG-rest", hver forstås som å bety den delen av polymeren eller PEG-en som blir igjen etter at den har gjennomgått en reaksjon med andre forbindelser, deler osv.

[0018] For den foreliggende oppfinnelses formål skal uttrykket "alkyl" som anvendt heri, henviser til et mettet alifatisk hydrokarbon, herunder rettkjedede, forgrenede og sykliske alkylgrupper. Uttrykket "alkyl" innbefatter også alkyltioalkyl, alkoksyalkyl, sykloalkylalkyl, heterosykloalkyl og C₁₋₆-alkylkarbonylalkylgrupper. Det foretrekkes at alkylgruppen har 1 til 12 karboner. Mer foretrukket er den en lavere alkyl på fra 1 til 7 karboner, enda mer foretrukket cirka 1 til 4 karboner. Alkylgruppen kan være substituert eller usubstituert. Når substituert, innbefatter de(n) substituerte gruppe(r) fortrinnsvis halo, oksy, azido, nitro, cyano, alkyl, alkoksy, alkyltio, alkyltioalkyl, alkoksyalkyl, alkylamino, trihalometyl, hydroksyl, merkapt, hydroksy, cyano, alkylsilyl, sykloalkyl, sykloalkylalkyl, heterosykloalkyl, heteroaryl, alkenyl, alkynyl, C₁₋₆-hydrokarbonyl, aryl og aminogrunder.

[0019] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "substituert" som anvendt heri, til å legge til eller skifte ut ett eller flere atomer som inneholdes i en funksjonell gruppe eller forbindelse med én av delene fra gruppen av halo, oksy, azido, nitro, cyano, alkyl, alkoksy, alkyltio, alkyltioalkyl, alkoksyalkyl, alkylamino, trihalometyl, hydroksyl, merkapt, hydroksy, cyano, alkylsilyl, sykloalkyl, sykloalkylalkyl, heterosykloalkyl, heteroaryl, alkenyl, alkynyl, C₁₋₆-alkylkarbonylalkyl, aryl og aminogrunder.

[0020] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "alkenyl" til grupper som inneholder i det minste én karbon-karbon-dobbelbinding, herunder rettkjedede, forgrenede og sykliske grupper. Det foretrekkes at alkenylgruppen har cirka 2 til 12 karboner. Mer foretrukket er den en lavere alkenyl på fra 2 til 7 karboner, enda mer foretrukket cirka 2 til 4 karboner. Alkenylgruppen kan være

substituert eller usubstituert. Når substituert, innbefatter de(n) substituerte gruppe(r) fortrinnsvis halo, oksy, azido, nitro, cyano, alkyl, alkoksy, alkyltio, alkyltioalkyl, alkoksyalkyl, alkylamino, trihalometyl, hydroksyl, merkaptogruppe, hydroksy, cyano, alkylsilyl, sykloalkyl, sykloalkylalkyl, heterosykloalkyl, heteroaryl, alkenyl, alkynyl, C₁₋₆-hydrokarbonyl, aryl og aminogru-

[0021] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "alkynyl" til grupper som inneholder i det minste én karbon-karbon-trippelbinding, herunder rettkjedede, forgrenede og sykliske grupper. Det foretrekkes at alkynylgruppen har cirka 2 til 12 karboner. Mer foretrukket er den en lavere alkynyl på fra 2 til 7 karboner, enda mer foretrukket cirka 2 til 4 karboner. Alkynylgruppen kan være substituert eller usubstituert. Når substituert, innbefatter de(n) substituerte gruppe(r) fortrinnsvis halo, oksy, azido, nitro, cyano, alkyl, alkoksy, alkyltio, alkyltioalkyl, alkoksyalkyl, alkylamino, trihalometyl, hydroksyl, merkaptogruppe, hydroksy, cyano, alkylsilyl, sykloalkyl, sykloalkylalkyl, heterosykloalkyl, heteroaryl, alkenyl, alkynyl, C₁₋₆-hydrokarbonyl, aryl og aminogru-

Eksempler på "alkynyl" innbefatter propargyl, propyn og 3-heksyn.

[0022] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "aryl" til et aromatisk hydrokarbonringsystem som inneholder i det minste én aromatisk ring. Den aromatiske ringen kan eventuelt være smeltet eller på annen måte festet til andre aromatiske hydrokarbonringer eller ikke-aromatiske hydrokarbonringer. Eksempler på arylgrupper innbefatter for eksempel fenyl, naftyl, 1,2,3,4-tetrahydronaftalen og bifenyl. Foretrukne eksempler på arylgrupper innbefatter fenyl og naftyl.

[0023] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "sykloalkyl" til et C₃₋₈-syklisk hydrokarbon. Eksempler på sykloalkyl innbefatter syklopropyl, syklobutyl, syklopentyl, sykloheksyl, sykloheptyl og syklooktyl.

[0024] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "sykloalkenyl" til et C₃₋₈-syklisk hydrokarbon som inneholder i det minste én karbon-karbon-

dobbeltbinding. Eksempler på sykloalkenyl innbefatter syklopentenyl, syklopentadienyl, sykloheksenyl, 1,3-sykloheksadienyl, sykloheptenyl, sykloheptatrienyl og syklooktenyl.

5 **[0025]** For den foreliggende oppfinnelse formål viser uttrykket "sykloalkylalkyl" til en alkylgruppe som er substituert med en C₃₋₈-sykloalkylgruppe. Eksempler på sykloalkylalkylgrupper innbefatter syklopropylmetyl og syklopentyletyl.

10 **[0026]** For den foreliggende oppfinnelse formål viser uttrykket "alkoksy" til en alkylgruppe med angitt antall karbonatomer festet til en primærmolekyldel gjennom en oksygenbro. Eksempler på alkoksygrupper innbefatter for eksempel metoksy, etoksy, propoksy og isopropoksy.

15 **[0027]** For den foreliggende oppfinnelse formål viser en "alkylaryl"-gruppe til en arylgruppe som er substituert med en alkylgruppe.

[0028] For den foreliggende oppfinnelse formål viser en "aralkyl"-gruppe til en alkylgruppe som er substituert med en arylgruppe.

20 **[0029]** For den foreliggende oppfinnelse formål viser uttrykket "alkoksyalkyl"-gruppe til en alkylgruppe som er substituert med en alkoksygruppe.

25 **[0030]** For den foreliggende oppfinnelse formål viser uttrykket "alkyltioalkyl" til en alkyl-S-alkyltioeter, for eksempel metyltiumetyl eller metyltioetyl.

30 **[0031]** For den foreliggende oppfinnelse formål viser uttrykket "amino" til en nitrogenholdig gruppe som er kjent innenfor teknikken, avledet fra ammoniakk ved utskifting av én eller flere hydrogenradikaler med organiske radikaler. Eksempelvis viser uttrykkene "acylamino" og "alkylamino" til spesifikke N-substituerte organiske radikaler med henholdsvis acyl- og alkylsubstituentgrupper.

[0032] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "alkylkarbonyl" til en karbonylgruppe substituert med alkylgruppe.

5 **[0033]** For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykkene "halogen" eller "halo" til fluor, klor, brom og jod.

[0034] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "heterosykloalkyl" til et ikke-aromatisk ringsystem som inneholder i det minste
10 ett heteroatom valgt blant nitrogen, oksygen og svovel. Heterosykloalkylringen kan eventuelt være sammensmeltet med eller på annen måte festet til andre heterosykloalkylringer og/eller ikke-aromatiske hydrokarbonringer. Foretrukne heterosykloalkylgrupper har fra 3 til 7 elementer. Eksempler på heterosykloalkylgrupper innbefatter for eksempel piperazin, morfolin, piperidin,
15 tetrahydrofuran, pyrrolidin og pyrazol. Foretrukne heterosykloalkylgrupper innbefatter piperidinyl, piperazinyl, morfolinyl og pyrrolidinyl.

[0035] For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "heteroaryl" til et aromatisk ringsystem som inneholder i det minste ett heteroatom valgt blant
20 nitrogen, oksygen og svovel. Heteroarylringen kan være sammensmeltet med eller på annen måte festet til én eller flere heteroarylringer, aromatiske eller ikke-aromatiske hydrokarbonringer eller heterosykloalkylringer. Eksempler på heteroarylgrupper innbefatter for eksempel pyridin, furan, tiofen, 5,6,7,8-tetrahydroisokinolin og pyrimidin. Foretrukne eksempler på heteroarylgrupper
25 innbefatter tienyl, benzotienyl, pyridyl, kinolyl, pyrazinyl, pyrimidyl, imidazolyl, benzimidazolyl, furanyl, benzofuranyl, tiazolyl, benzotiazolyl, isoksazolyl, oksadiazolyl, isotiazolyl, benzisothiazolyl, triazolyl, tetrazolyl, pyrrolyl, indolyl, pyrazolyl og benzopyrazolyl.

30 **[0036]** For den foreliggende oppfinnelses formål viser uttrykket "heteroatom" til nitrogen, oksygen og svovel.

[0037] I noen utførelsesformer innbefatter substituerte alkyler karboksyalkyler, aminoalkyler, dialkylaminoer, hydroksyalkyler og merkaptoalkyler; substituerte alkenyler innbefatter karboksyalkenyler, aminoalkenyler, dialkenylaminoer, hydroksyalkenyler og merkaptoalkenyler; substituerte alkynyler innbefatter karboksyalkynyler, aminoalkynyler, dialkynylaminoer, hydroksyalkynyler og merkaptoalkynyler; substituerte sykloalkyler innbefatter deler slik som 4-klorisykloheksyl; aryler innbefatter deler slik som naftyl; substituerte aryler innbefatter deler slik som 3-bromfenyl; aralkyler innbefatter deler slik som tolyl; heteroalkyler innbefatter deler slik som etyltiofen; substituerte heteroalkyler innbefatter deler slik som 3-metoksytiofen; alkoksy innbefatter deler slik som metoksy; og fenoksy innbefatter deler slik som 3-nitrofenoksy. Halo skal forstås som innbefattende fluor, klor, jod og brom.

[0038] For den foreliggende oppfinnelses formål skal "positivt heltall" forstås som å innbefatte et heltall likt med eller større enn 1, og det vil være klart for fagmannen som værende innenfor det som med rimelighet kan forventes av en fagmann innenfor teknikken.

[0039] For den foreliggende oppfinnelses formål skal uttrykket "bundet" forstås som innbefattende kovalent (fortrinnsvis) eller ikke-kovalent tilknytning av en gruppe til en annen, dvs. som et resultat av en kjemisk reaksjon.

[0040] For den foreliggende oppfinnelses formål skal uttrykkene "effektive mengder" og "tilstrekkelige mengder" bety en mengde som oppnår en ønsket effekt eller terapeutisk effekt som dette forstås av fagmannen.

[0041] For den foreliggende oppfinnelses formål skal uttrykket "adenosin" forstås som innbefattende nukleosidene adenosin og deoksyadenosin. Adenosin innbefatter også adenosin og deoksyadenosin som er til stede i form av AMP, ADP, ATP, dAMP, dADP eller dATP.

5 **[0042]** For den foreliggende oppfinnelse formål skal "adenosinmediert tumor" eller "adenosindeaminase-responsiv tumor" forstås som bredt innbefattende hvilke som helst tumortyper som drar nytte av administrasjonen av ADA eller aktiv fraksjon derav osv., uavhengig av administrasjonsveien.

10 **[0043]** For den foreliggende oppfinnelse formål skal "behandling av adenosinmediert tumor" eller "behandling av adenosindeaminaseresponsiv tumor" eller "inhibering av adenosinmediert tumorvekst" eller "inhibering av adenosindeaminaseresponsiv tumorvekst" forstås som å bety at symptomer eller tilstander minimeres eller dempes sammenlignet med det som observeres i fravær av ADA-behandling. De behandlede tilstander kan bekreftes ved for eksempel tumorvekstinhibering og/eller fall i adenosinnivåer i kreftceller eller vev.

15 **[0044]** Generelt skal det vurderes at vellykket behandling finner sted når den ønskede kliniske respons oppnås. Eksempelvis kan vellykket behandling defineres ved oppnåelse av tumorvekstinhibering på f.eks. 10% eller høyere (dvs. 20% 30%, 40%). Alternativt kan vellykket behandling defineres ved
20 oppnåelse av et fall på i det minste 20% eller fortrinnsvis 30%, mer foretrukket 40 % eller høyere (dvs. 50% eller 80%) i adenosinnivåer i kreftceller eller vev, herunder andre kliniske markører som fagmannen vurderer, sammenlignet med det som observeres i fravær av den heri beskrevne ADA-behandling.

25 **[0045]** Videre skal den anvendelse av uttrykk i entall som av praktiske årsaker finner sted i beskrivelsen, på ingen måte oppfattes som være således begrensende. Eksempelvis viser henvisningen til en sammensetning som omfatter et enzym, således til ett eller flere molekyler av dette enzym. Det er
30 også klart at denne oppfinnelse ikke skal være begrenset av de bestemte konfigurasjoner, prosesstrinn og materialer som beskrives heri, da slike konfigurasjoner, prosesstrinn og materialer kan variere noe.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

[0046] Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen hittil ukjente fremgangsmåter for behandling av tumorer, herunder krefttyper, ved å administrere ADA-enzym til en pasient som har behov for dette, i en mengde og i en varighet som er tilstrekkelig til å redusere mengden av adenosin som er til stede i pasientens vev og/eller kroppsvæsker. Det foretrekkes at ADA-enzymet er polymerkonjugert. For de tumorer som er avhengig av nærværet av adenosin for vekst, metastatisk spredning og/eller for beskyttelse fra pasientens immunsystem, vil en tilstrekkelig reduksjon i endogent adenosin begrense eller forebygge kreftspredning, metastatisk spredning og/eller tillate pasientens immunsystems normale antitumoraktivitetsfunksjon.

[0047] Det påtenkes også at ADA-behandlingen av tumorer ifølge oppfinnelsen eventuelt utføres i kombinasjon eller koordinasjon med én eller flere andre egnede fremgangsmåter og midler mot kreft som er kjente innenfor teknikken, hvilket vil bli beskrevet i ytterligere detalj nedenfor. Kombinasjonsbehandlingen ifølge den foreliggende oppfinnelse innbefatter å administrere en effektiv mengde av de heri beskrevne forbindelser alene eller i kombinasjon, simultant eller sekvensielt, med et andre kjemoterapeutisk middel.

[0048] Eksempler på kjente midler mot kreft som er kjente innenfor teknikken, innbefatter f.eks. Taxol™, bevacizumab (Avastin®), vinkristin, vinblastin, neomycin, combretastatin(er), podofyllotoksin(er), TNF-alfa, angiostatin, endostatin, vasculostatin, alfa- ν -beta₃-antagonister, kalsiumionoforer, kalsiumfluksinduserende midler, hvilket som helst derivat eller prodrug derav.

[0049] De ytterligere midler mot kreft innbefatter også kjemoterapeutiske midler, radioterapeutiske midler, cytokiner, anti-angiogene midler, apoptoseinduserende midler eller krefthemmende immunotoksiner eller koagulgander. Ett slikt immunotoksin er f.eks. Erbitux® (cetuximab). "Kjemoterapeutiske midler" som anvendt heri, viser til klassiske

kjemoterapeutiske midler eller legemidler som anvendes i behandlingen av maligniteter. Dette uttrykket anvendes for enkelthets skyld, til tross for at andre forbindelser rent teknisk kan beskrives som kjemoterapeutiske midler ved at de utøver en krefthemmende virkning. "Kjemoterapeutisk" har imidlertid fått en distinkt betydning innenfor teknikken, og anvendes i overensstemmelse med denne standardbetydningen.

[0050] Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan således anvendes i kombinasjon med ett eller flere kjemoterapeutiske midler som er kjente for å være virksomme i behandlingen av kreft, herunder, men ikke begrenset til, 5-azacytidin, 5-floururacil, valgfritt i kombinasjon med leucovorin, 5-fluordeoksyuridin, 6-merkaptopurin, 6-tioguanin, mitoksantron, aziridinylnbenzokinon (AZQ), Carmustine (BCNU eller BiCNU[®] fra Bristol-Myers Squibb), bleomycin, karboplatin (CBDCA), Lomustine (CCNU), metyl-CCNU eller MeCCNU, klorambucil, klordeoksyadenosin, cisplatin, syklofosfamid, cytarabin, daktinomycin, daunorubicin, deoksykoformycin, doxorubicin, doxycoformycin, DTIC (dacarbazin), epirubicin, etoposid (VP-16), fludarabin, heksametylmelamin, hydroksyurea, idarubicin, ifosfamid, ifosfamid og mesna, levamisol, N-acetylcystein ("NAC"), 1-phenylalanine mustard, 4'-(9-acridinylamino)metansulfon-m-anisidid ("mAMSA"), innenfor teknikken kjente inhibitorer av multiresistens (dvs. MDR-inhibitorer), melfalan, metotreksat, eventuelt i kombinasjon med leucovorin, mitramycin, mitomycin-c, inhibitorer av multiresistensproteiner ("MRP"-inhibitorer), paklitaxel, prokarbazin, streptozotocin, N,N,N'-trietylentiofosforamid ("tioTEPA"), inhibitorer av topoisomerase I og/eller topoisomerase II, taxol, vinblastin, vinkristein, vinkristin, vindesin, teniposid (VM-26[®]), og andre som er for mange å nevne.

[0051] Andre fremgangsmåter for behandling av kreft som vurderes benyttet i kombinasjon med fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen, innbefatter bestråling med røntgenstråler, gammastråler, være seg direkte eller med tomografisk targeting, behandling av kankrøst vev med implanterte radioaktive pellets eller

"frø," nøytronstrålebestråling av vev som er primet med borforbindelser, og/eller andre typer partikkelstrålebehandling som er kjent innenfor teknikken.

5 **[0052]** Ytterligere tumor- eller krefthemmende midler (antineoplastiske midler) som eventuelt administreres i kombinasjon eller koordinasjon med foreliggende fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen, innbefatter de som beskrives i "GOODMAN AND GILMAN'S, THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS", TENTH EDITION, Eds. Hardman and Limbird.

10 **[0053]** De følgende uttrykk defineres med henblikk på oppnåelse av en bedre forståelse av oppfinnelsen.

[0054] Henvisning til "adenosin" heri omfatter også deoksyadenosin og innenfor teknikken kjente variasjoner og derivater derav som er til stede *in vivo*, med mindre annet er anført.

15

[0055] Henvisning til adenosindeaminase eller ADA innbefatter en hvilken som helst innenfor teknikken kjent form av enzymet, herunder rensset naturlige enzym, f.eks. rensset naturlig ADA, rekombinant human eller bovin ADA og variasjoner, polymorfismer og derivater derav. ADA-enzym rensset fra bovine kilder har en sekvens ifølge SEQ ID NO: 5, med Cys 74-resten naturlig cappet eller beskyttet av et cystein, og de seks C-terminus-rester predikert fra genet som koder ADA-en i SEQ ID NO: 5, er ikke til stede. Det vurderes imidlertid heri at oppfinnelsen kan praktiseres med alternative variasjoner over naturlig bovin ADA, herunder alternative alleler og polymorfismer, både naturlig og rekombinant produsert, med og uten de predikerte seks C-terminus-rester. Bovine ADA-polymorfismer innbefatter f.eks. glutamin i posisjon 198 i stedet for lysin; alanin i posisjon 245 i stedet for treonin; arginin i posisjon 351 i stedet for glysin.

20

25

30 **[0056]** Foretrukne derivater av ADA-enzym innbefatter rekombinant produsert ADA-enzym som har blitt mutert med henblikk på økt stabilitet i forhold til ikke-

mutert rekombinant ADA-enzym. Disse innbefatter for eksempel rekombinante ADA-enzymmer som er modifisert fra SEQ ID NO: 5, og/eller SEQ ID NO: 5 med én eller flere av de ovenfor nevnte polymorfismer, for å erstatte en oksiderbar Cys-rest som er løsemiddeleksponert med en passende ikke-oksiderbar aminosyrerest. Slik ikke-oksiderbar rest innbefatter en hvilken som helst innenfor teknikken kjent naturlig aminosyrerest og/eller hvilke som helst innenfor teknikken kjente derivater derav. Eksempelvis har moden rekombinant ADA uttrykt fra et gen som først isoleres fra en bovin eller human kilde, en ustabil Cys₇₄-rest som fortrinnsvis skiftes ut med en ikke-oksiderbar aminosyrerest, f.eks. med en Ser₇₄. Slike rekombinante ADA-enzymmer illustreres ved hjelp av SEQ ID NO: 1 (bovin ADA-struktur) og SEQ ID NO: 3 (human ADA-struktur). SEQ ID NO: 2 og SEQ ID NO: 4 illustrerer nyttige DNA-molekyler for å uttrykke det samme, som har blitt kodonoptimalisert med henblikk på *E. coli*-ekspressjon. Ytterligere detaljer vedrørende slike rekombinante ADA-muteiner samt produksjon og rensing av disse proteinene, tilveiebringes i den sameide US-patentsøknad med serie nr. _____, som krever fordel fra US-patentsøknad nr. 60/913,009 med tittelen "Stable Recombinant Adenosine Deaminase", inngitt på samme dato med denne, og som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad. Spesifikke detaljer om vektorene og fremgangsmåtene for rensing finnes deri, nærmere bestemt i avsnittet med eksempler, og især i eksempel 1-4.

[0057] Alternativt kan ADA-enzymmer stabiliseres etter behov ved capping av en løsemiddeleksponert oksiderbar Cys-rest, ved å behandle ADA-enzymet med en tilstrekkelig mengde av et capping-middel under reaksjonsbetingelser som er tilstrekkelige til å cappe det reaktive cystein uten i det vesentlige å inaktivere ADA-proteinet. Denne prosessen benyttes fortrinnsvis med rekombinant produsert ADA, enten mutein- eller villtype-ADA-enzymmer.

30

[0058] Capping-midler innbefatter for eksempel, uten begrensning, oksidert glutation (foretrukket), jodacetamid, jodeddiksyre, cystin og andre ditioler som

er kjente for fagfolk, samt blandinger herav. Mengden og konsentrasjonen av capping-middelet som innbefattes under de heri beskrevne fremgangsmåters reaksjonsfase, vil avhenge noe av det bestemte capping-middel som anvendes, og fagmannens behov, men vil ikke være gjenstand for unødig

5 eksperimentering. Under anvendelse av oksidert glutation som en prototype, kan konsentrasjonen av anvendt når brakt til å reagere med det rekombinante protein slik som rhADA, være i området på fra cirka 25 μ M til cirka 100mM. Det foretrekkes at det oksiderte glutation bringes til å reagere med det rekombinante protein ved en konsentrasjon på fra cirka 5nM til cirka 25mM.

10

[0059] Reaksjonsbetingelsene som anvendes under bringingen av capping-middelet til å reagere med det rekombinante protein, innbefatter videre anvendelsen av en vandig løsning som har en pH på fra cirka 6,5 til cirka 8,4, fortrinnsvis fra cirka 7,2 til cirka 7,8. I tillegg innbefatter den vandige løsning med fordel en passende buffer, slik som natriumfosfat, kaliumfosfat, Tris og Hepes samt blandinger derav ved konsentrasjoner som er i området på fra 10 til 150mM (capping kan eventuelt finne sted utenfor dette bufferområdet, lavere enn 10 eller høyere enn 150mM). Reaksjonsbetingelsene innbefatter videre å tillate reaksjonen å fortsette ved temperaturer som ikke vil bidra til degradering av proteinet, dvs. fra cirka 4 -37°C. Capping kan eventuelt finne sted utenfor 20 dette temperaturområdet, f.eks. ved et temperaturområde lavere enn 0-4°C eller høyere enn 37°C. Reaksjonen utføres i en tid som er tilstrekkelig til å oppnå den ønskede stabilisering av det reaktive cystein. Kun som eksempel utføres reaksjonen i en tid som er i området fra cirka 5 sekunder til cirka 8 timer (f.eks. 25 over natten).

[0060] Ytterligere detaljer vedrørende cappet, stabilisert rekombinant ADA tilveiebringes av den sameide US-patentsøknad med serienr. 11/738,012 under tittelen "Stabilized Proteins", og især i avsnittet med eksempler, som det 30 hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad.

[0061] Videre skal den anvendelse av uttrykk i entall som av praktiske årsaker finner sted i beskrivelsen, på ingen måte oppfattes som være således begrensende. Eksempelvis viser henvisningen til en sammensetning som
 5 omfatter et enzym, således til ett eller flere molekyler av dette enzym. Det er også klart at denne oppfinnelse ikke skal være begrenset av de bestemte konfigurasjoner, prosesstrinn og materialer som beskrives heri, da slike konfigurasjoner, prosesstrinn og materialer kan variere noe.

10 **A. Polymer-ADA-konjugater**

[0062] En foretrukket form av ADA er i form av et polymerkonjugert enzym. ADA-polymer-konjugatene ifølge den foreliggende oppfinnelse svarer generelt til formelen (I):

15



hvor

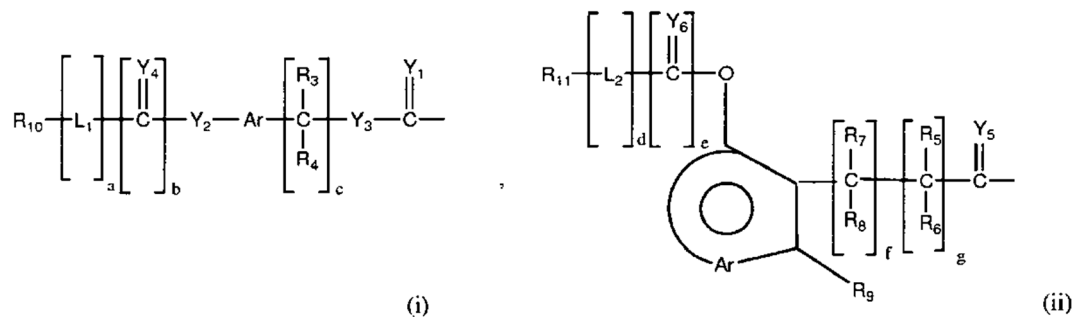
(ADA) representerer adenosindeaminaseenzymet eller eventuelt et
 20 derivat eller fragment derav;

NH- er en aminogruppe av en aminosyre funnet på ADA-en, derivat eller fragment derav med henblikk på tilknytning til polymeren;

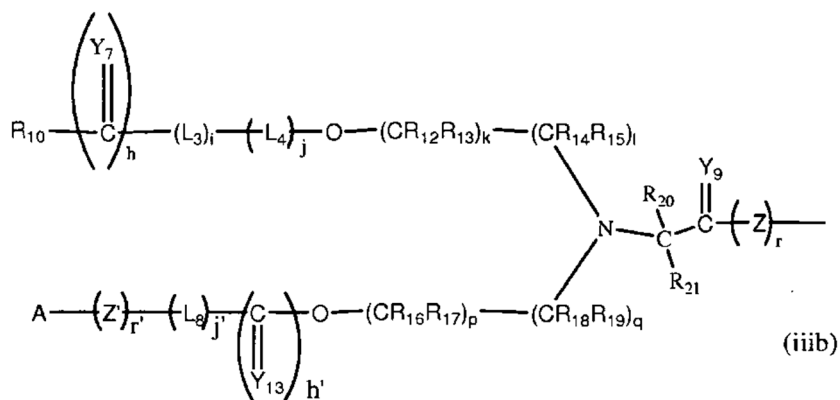
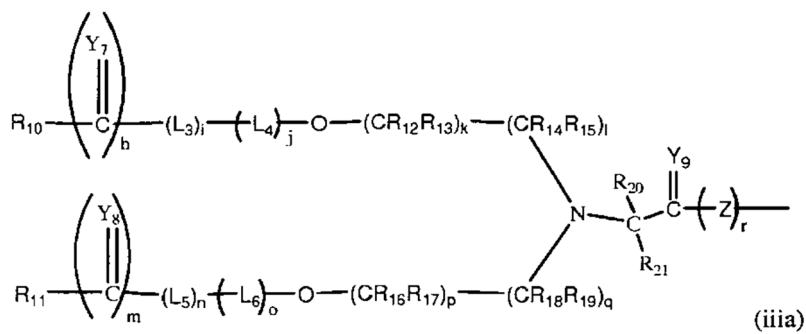
(z) er et positivt heltall, fortrinnsvis fra cirka 1 til cirka 80, mer foretrukket fra cirka 5 til cirka 80, enda mer foretrukket fra cirka 11 til cirka 18; og

25 R er en i det vesentlige ikke-antigen polymerrest som er tilknyttet til ADA-en i en frigjørbar eller ikke-frigjørbar form.

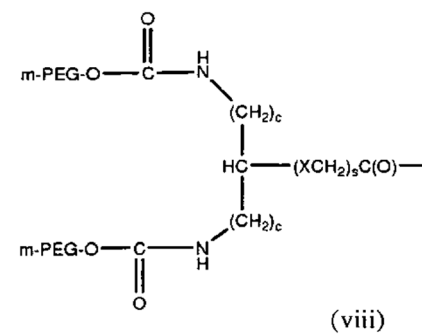
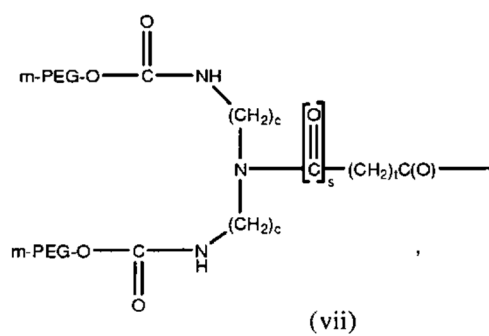
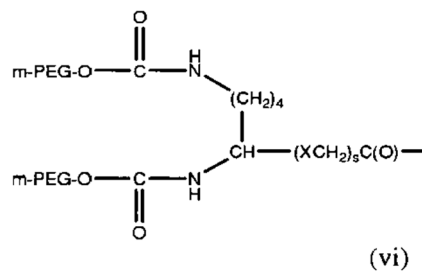
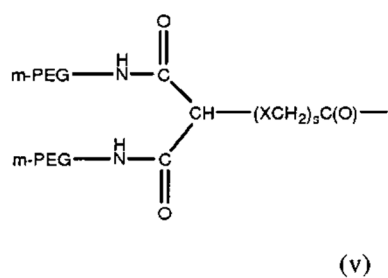
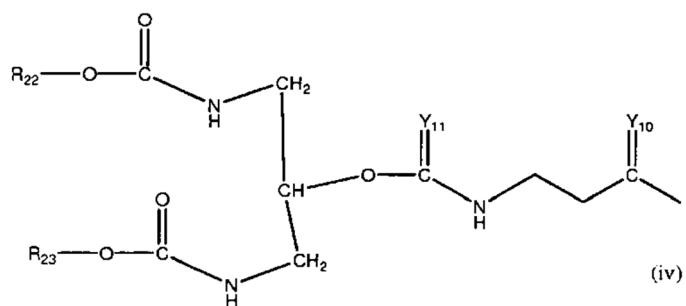
[0063] Den ikke-antigene restdel av konjugatet (R) kan velges fra en ikke-begrensede liste over polymerbaserte systemer, slik som:



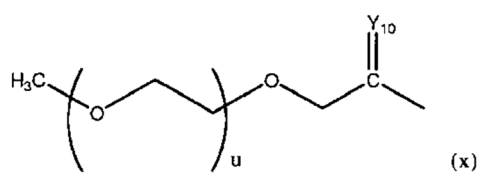
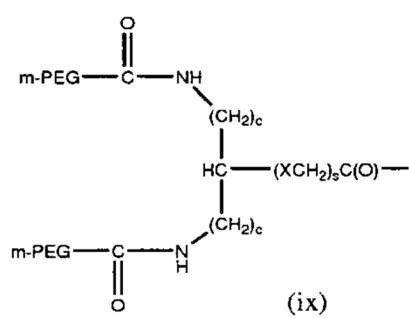
5



10

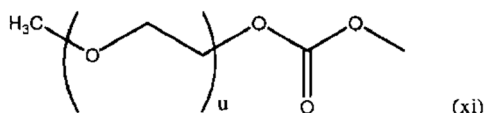


5



10

og



hvor:

5 R_{10-11} og R_{22-23} kan være de samme eller forskjellige, og er uavhengig valgte ikke-antigene polymerrester;

10 R_{3-9} , R_{12-21} og R_{24} (se nedenfor) er de samme eller forskjellige, og velges hver uavhengig blant C_{1-6} -alkyler, C_{3-12} -forgrenede alkyler, C_{3-8} -sykloalkyler, C_{1-6} -substituerte alkyler, C_{3-8} -substituerte sykloalkyler, aryler, substituerte aryler, aralkyler, C_{1-6} -heteroalkyler, substituerte C_{1-6} -heteroalkyler, C_{1-6} -alkoksy, fenoksy og C_{1-6} -heteroalkoksyer;

Ar er en del som danner et multisubstituert aromatisk hydrokarbon eller en multisubstituert heterosyklisk gruppe;

Y_{1-11} og Y_{13} kan være de samme eller forskjellige, og velges uavhengig blant O, S og NR_{24} ;

15 A velges blant alkylgrupper, targeting-deler, diagnostiske midler og biologisk aktive deler;

X er O, NQ, S, SO eller SO_2 ; hvor Q er H, C_{1-8} -alkyl, C_{1-8} -forgrenet alkyl, C_{1-8} -substituert alkyl, aryl eller aralkyl;

20 Z og Z' velges uavhengig blant deler som aktivt transporteres inn i en target-celle, hydrofobiske deler, bifunksjonelle forbindende deler og kombinasjoner derav.

L_{1-6} og L_8 kan være de samme eller forskjellige, og er uavhengig valgte bifunksjonelle linkergrupper;

25 (a), (c), (d), (f), (g), (i), (j), (j'), (k), (l), (n), (o), (p), (q) og (t) kan være de samme eller forskjellige, og er uavhengig 0 eller et positivt heltall,

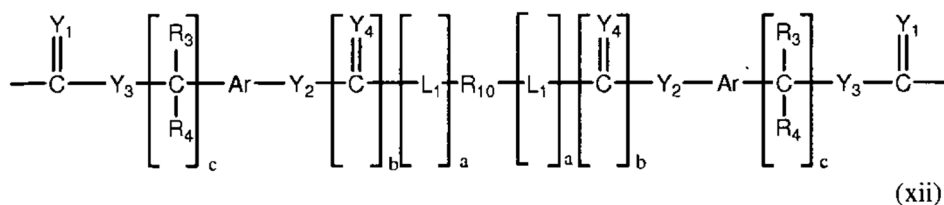
fortrinnsvis, i det fleste aspekter; (b), (e), (r), (r'), (s), (h), (h') og (m) kan være de samme eller forskjellige og er uavhengig 0 eller 1;

mPEG er metoksy PEG, og

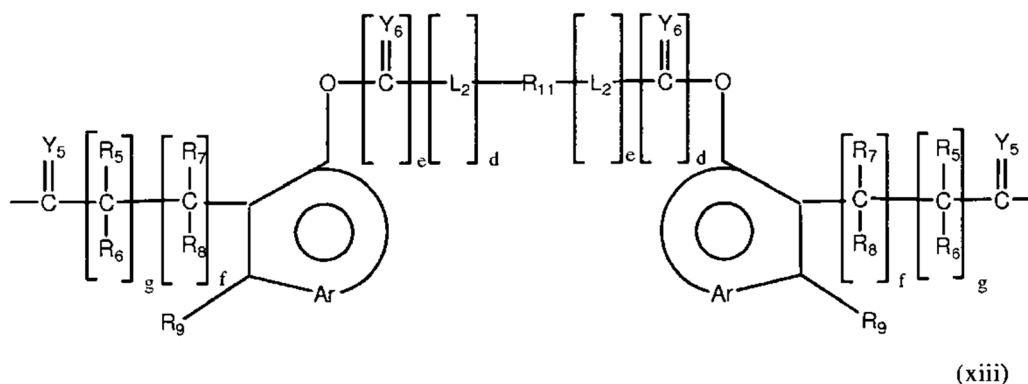
5 (u) er et positivt heltall for å tilveiebringe polymerer som har en total molekylvekt på fra cirka 2000 til cirka 100 000 Da, fortrinnsvis fra cirka 4000 til cirka 45 000 Da/

10 **[0064]** I det ovenstående foretrekkes det at Y_{1-11} og Y_{13} er O; R_{3-8} , R_{12-21} og R_{24} er hver enten hydrogen eller C_{1-6} -alkyler, idet metyl og etyl er de mest foretrukne alkyler, og R_{7-9} er fortrinnsvis CH_3 .

15 **[0065]** I et ytterligere aspekt av oppfinnelsen kan konjugatets polymerdel være én som byr på flerfoldige tilknytningspunkter for ADA-en. En ikke-begrensede liste over slike systemer innbefatter:



og

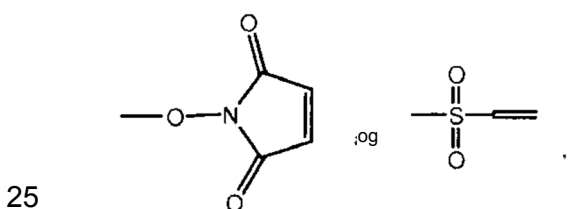
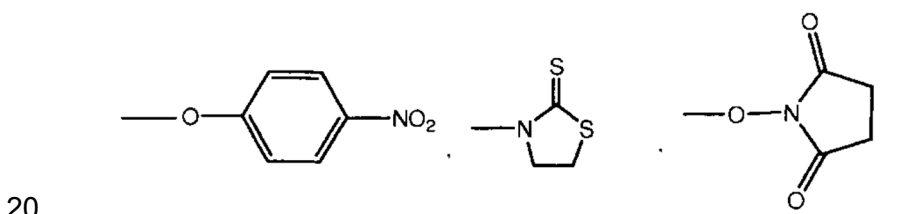


20 hvor alle variabler er de samme som presentert ovenfor.

[0066] Alternativt og/eller fortrinnsvis er flerfoldige PEG-strenger tilknyttet til ADA-en. I disse aspekter kan ADA-polymerkonjugatene innbefatte i det minste 5 polyetylenglykolstrenger, opptil 80 strenger tilknyttet til epsilon-aminogru-
 5 av Lys på enzymet, men kan fortrinnsvis innbefatte cirka 11-18 PEG-strenger tilknyttet til epsilon-aminogru-
 per av Lys på enzymet.

[0067] Mens ADA-en konjugeres til fra cirka 11 til cirka 18 PEG-molekyler per enzyimmolekyl via lysinbindinger, kan forholdet av PEG i forhold til ADA varieres
 10 for å modifisere det kombinerte konjugats fysiske og kinetiske egenskaper til å passe til en hvilken som helst bestemt klinisk situasjon.

[0068] De aktiverte polymerer som kan benyttes til å lage ADA-konjugatene, vil naturligvis svare direkte til de ovenfor beskrevne polymerdelene. Den viktigste forskjellen er nærværet av en fraspaltelig eller aktiverende gruppe, noen ganger betegnet heri som B₁, som legger til rette for polymersystemets tilknytning til en amingruppe (f.eks. epsilon-amingruppe av lysin) funnet på ADA-en. Forbindelser (i) - (xiii) innbefatter således en fraspaltelig eller aktiverende gruppe, slik som:



eller andre egnede fraspaltelige eller aktiverende grupper, slik som N-hydroksybenzotriazolyl, halogen, N-hydroksyftalimidyl, imidazolyl, O-acylureaer, pentafluorfenol eller 2,4,6-triklorfenol eller andre passende forlatende grupper

som vil være opplagte for fagmannen, funnet på det sted hvor ADA tilknytter seg etter konjugasjonsreaksjonen.

[0069] Noen foretrukne aktiverte PEG-er innbefatter de som beskrives i felles tildelte US-patenter nr. 5,122,614, 5,324,844, 5,612,460 og 5,808,096 (succinimidyl-karbonataktivert polyetylenglykol (SC-PEG) og relaterte aktiverte PEG-er), og US-patent nr. 5,349,001 (syklisk imiditionaktiverte PEG-er), som det hermed henvises til, og som i deres helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad. Som vil være klart for fagmannen, utføres slike konjugasjonsreaksjoner typisk på en passende buffer under anvendelse av et mangefoldig molart overskudd av aktivert PEG. Noen foretrukne konjugater utført med lineære PEG-er, slik som den ovennevnte SC-PEG, kan gjennomsnittlig inneholde fra cirka 1 til cirka 80 PEG-strenger per enzym. Følgelig kan det for disse benyttes molare overskudd på flere hundre ganger, f.eks. 200-1000x. Det molare overskudd som anvendes til forgrenede polymerer og polymerer som er tilknyttet enzymet, vil være lavere og kan bestemmes under anvendelse av de teknikker som beskrives i de patenter og patentsøknader som beskriver det samme som det som nevnes heri nedenfor.

[0070] For den foreliggende oppfinnelses formål skal aktiverte grupper forstås som de grupper som er i stand til å reagere med en amingruppe (nukleofil) funnet på en ADA, f.eks. på en Lys.

[0071] For den foreliggende oppfinnelses formål vises det også til de foregående som aktiverte polymerlinkere. Det foretrekkes at polymerrestene er polyalkylenoksidbaserte, og mer foretrukket polyetylenglykol (PEG)-baserte, hvor PEG-en er rett, forgrenet eller flerarmet.

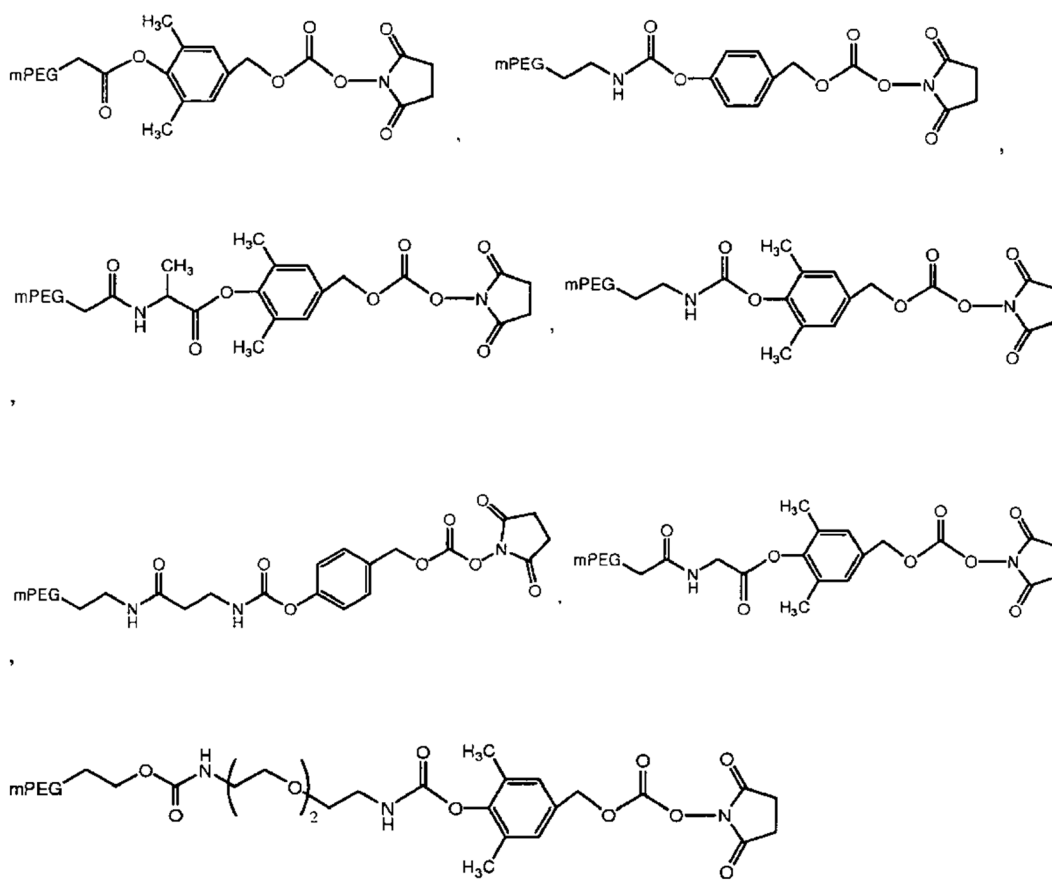
[0072] Idet det nå henvises til de ovenfor beskrevne polymerer, kan det sees at Ar er en del som danner et multisubstituert aromatisk hydrokarbon eller en multisubstituert heterosyklisk gruppe. Et nøkkeltrekk er at Ar-delen er aromatisk av natur. Generelt, for å være aromatisk må pi-elektronene være delt med en

"sky" både over og under et syklisk molekyls plan. Videre må antallet av pi-elektroner tilfredsstillende Huckle-regelen ($4n+2$). Fagmannen vil innse at en myriade av deler vil tilfredsstillende det aromatiske krav til delen, og således vil være egnet for anvendelse heri.

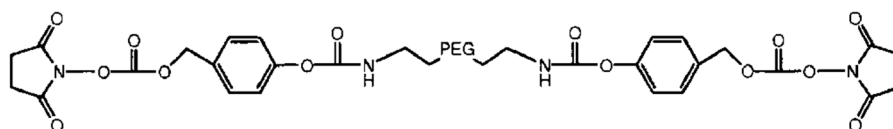
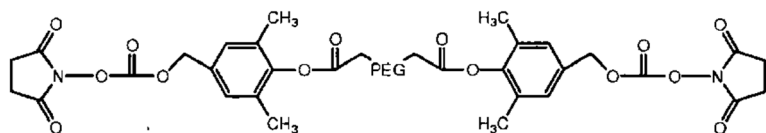
5

[0073] I noen foretrukne aspekter av oppfinnelsen fremstilles de aktiverte polymerlinkere av polymersystemene som er basert på benzyleliminering eller trimetyl-"lock"-laktonisering, i overensstemmelse med de felles tildelte US-patent nr. 6,180,095, 6,720,306, 5,965,119, 6,624,142 og 6,303,569, som det hermed henvises til, og som i deres helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad. Innenfor denne kontekst foretrekkes de følgende aktiverte polymerlinkere:

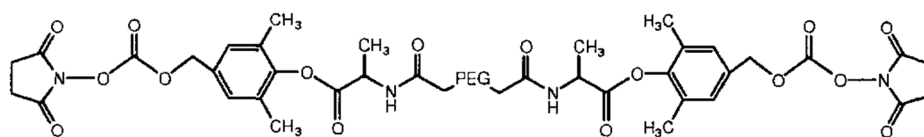
15



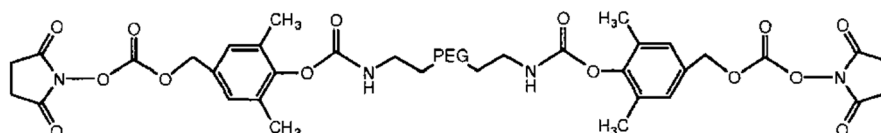
20



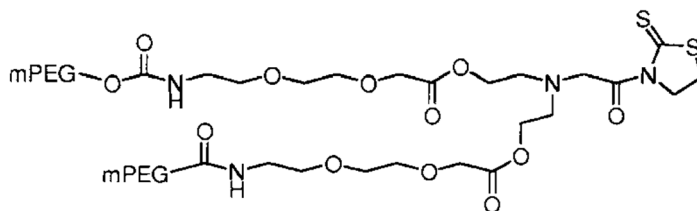
5



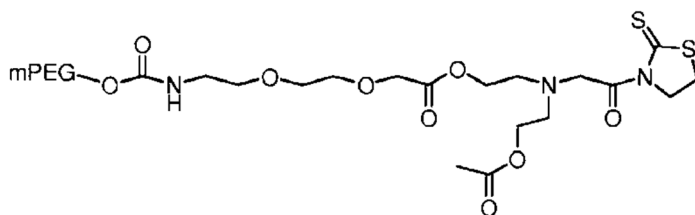
og



- 10 **[0074]** I ett alternativt aspekt av oppfinnelsen lages ADA-polymerkonjugatene under anvendelse av visse bicinpolymerrester, slik som de som beskrives i felles tildelte US-patent nr. 7,122,189 og 7,087,229 og US-patentsøknad nr. 10/557,522, 11/502,108 og 11/011,818. Det henvises hermed til beskrivelsen av hver av disse patentsøknader, og de skal betraktes som værende en del av den
- 15 foreliggende søknad. Noen få av de foretrukne aktiverte polymerer innbefatter:

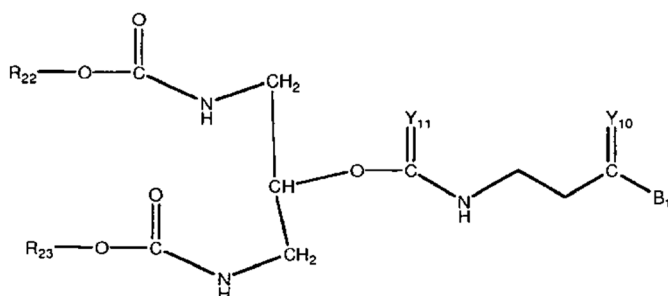


og



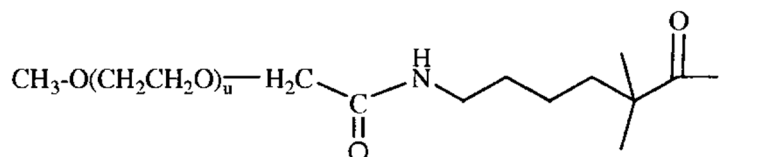
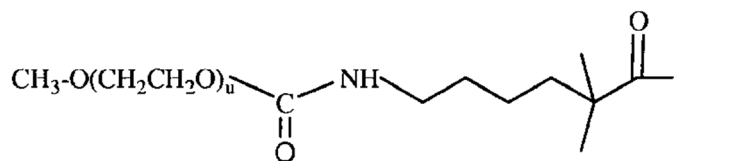
Det er også klart at den fraspaltelige eller aktiverende gruppe som vises ovenfor, kun er én av de passende grupper, og at andre som nevnes heri, også kan anvendes uten unødig eksperimentering.

[0075] I alternative aspekter fremstilles de aktiverte polymerlinkere under anvendelse av forgrenede polymerrester, slik som de som beskrives i felles tildelte US-patent nr. 5,681,567, 5,756,593, 5,643,575; 5,919,455, 6,113,906, 6,153,655, 6,395,266 og 6,638,499, 6,251,382 og 6,824,766, som det hermed henvises til, og som i deres helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad. Slike aktiverte polymerer svarer til polymersystemer (iv) - (ix) idet det følgende er representativt:

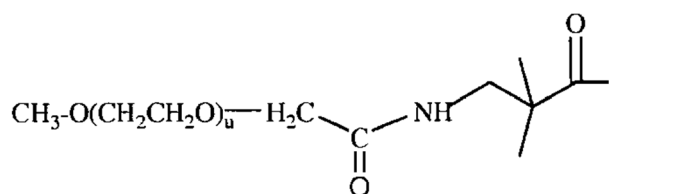
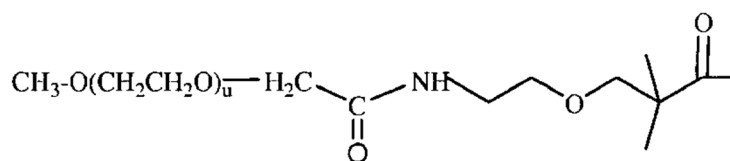


15 hvor B_1 er en aktiverende gruppe, og alle variabler er som tidligere definert.

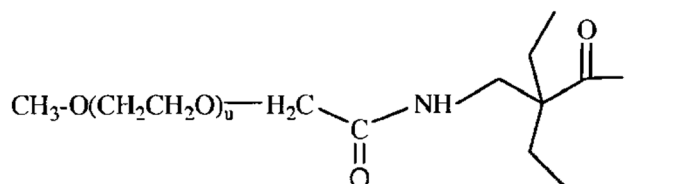
[0076] I atter alternative aspekter kan de aktiverte polymerer benytte en hindret esterbasert linker. Se PCT/US07/78593 med tittelen "Polyalkylene Oxides Having Hindered Ester-Based Biodegradable Linkers", som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad. En ikke-begrensende liste over slike forbindelser innbefatter for eksempel:



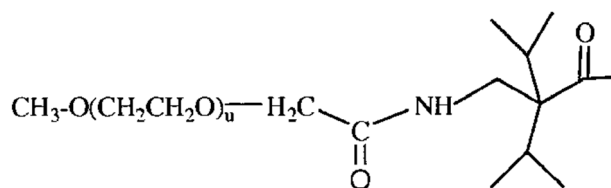
5



10 og



15



hvor (u) er et heltall i området fra cirka 10 til cirka 2300, for fortrinnsvis å tilveiebringe polymerer som har en samlet molekylvekt på fra cirka 4000 til cirka 45 000.

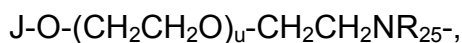
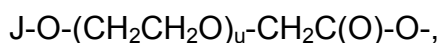
[0077] I én foretrukket utførelsesform er den aktiverte polyetylenglykol én som tilveiebringer en uretanbinding eller amidbinding med proteinet.

[0078] Fremgangsmåter for fremstilling av polymerer som har terminale karboksylsyrer i høy renhet, er beskrevet i US-patentsøknad nr. 11/328,662, som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad. Fremgangsmåtene innbefatter å først fremstille en tertiær alkylester av en polyalkylenoksid etterfulgt av omdanning til karboksylsyrederivatet derav. Det første trinn i fremstillingen av PAO-karboksylsyrene ifølge prosessen innbefatter å danne et mellomprodukt, slik som *t*-butylester av polyalkylenoksidkarboksylsyre. Dette mellomproduktet dannes ved å bringe en PAO til å reagere med et *t*-butylhaloacetat i nærvær av en base, slik som kalium-*t*-butoksid. Når *t*-butylestermellomproduktet har blitt dannet, kan karboksylsyrederivatet av polyalkylenoksidet enkelt tilveiebringes med renheter som overstiger 92%, idet de fortrinnsvis overstiger 97%, idet de mer fortrinnsvis overstiger 99% og idet de mest foretrukket overstiger 99,5% renhet.

[0079] I atter alternative aspekter kan polymerer som har terminale amingrupper, benyttes til å lage ADA-konjugatene. Fremgangsmåtene for fremstilling av polymerer som inneholder terminale aminer med høy renhet, beskrives i US-patentsøknad nr. 11/508,507 og 11/537,172, som det hermed henvises til, og som hver og en skal betraktes for værende en del av den foreliggende søknad. Eksempelvis reagerer polymerer som har azider, med fosfinbasert reduksjonsmiddel slik som trifenyfosfin eller et alkalimetallborhydrid-reduksjonsmiddel, slik som NaBH_4 . Alternativt bringes polymerer som innbefatter fraspaltelige grupper, til å reagere med beskyttedeaminsalter, slik som kaliumsalt av metyltertbutylimidodikarbonat (KNMeBoc) eller kaliumsaltet av ditertbutylimidodikarbonat (KNBoc_2) etterfulgt av avbeskyttelse av den beskyttede amingruppe. Renheten til polymerene som inneholder de terminale aminer tildannet ved disse prosessene, er større enn cirka 95% og fortrinnsvis større enn 99%.

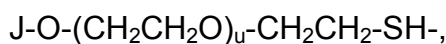
1. I det vesentlige ikke-antigene polymerer

[0080] Som anført ovenfor foretrekkes det at hver R_{10-11} og R_{22-23} er vannløselige polymerrester som er fortrinnsvis i det vesentlige ikke-antigene, slik som polyalkylenoksider (PAO-er) og mer foretrukket polyetylenglykoler, slik som mPEG. For den foreliggende oppfinnelses formål og uten å være begrensende, kan polyetylenglykol (PEG)-restdelen av R_{10-11} og R_{22-23} velges ut blant:



15

og



20 hvor:

(u) er graden av polymerisering, dvs. fra cirka 10 til cirka 2300;

R_{25} velges ut blant hydrogen, C_{1-6} -alkyler, C_{2-6} -alkenyler, C_{2-6} -alkynyler, C_{3-12} -forgrenede alkyler, C_{3-8} -sykloalkyler, C_{1-6} -substituerte alkyler, C_{2-6} -substituerte alkenyler, C_{2-6} -substituerte alkynyler, C_{3-8} -substituerte sykloalkyler, aryler, substituerte aryler, aralkyler, C_{1-6} -heteroalkyler, substituerte C_{1-6} -heteroalkyler, C_{1-6} -alkoksy, fenoksy og C_{1-6} -heteroalkoksy, og

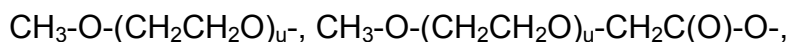
25

J er en capping-gruppe, dvs. en gruppe som finnes på polymerens terminal, og kan, i noen aspekter, velges ut blant hvilke som helst av NH_2 (eller $CH_2CH_2NH_2$), H, SH (eller CH_2CH_2SH), CO_2H (eller CH_2CO_2H), C_1-

30

ω -alkyler, fortrinnsvis metyl, eller andre PEG-terminal-aktiverende grupper, slik som slike grupper forstås av fagmannen.

5 **[0081]** I en særlig foretrukket utførelsesform velges R_{10-11} og R_{22-23} blant,



10

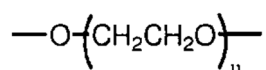
hvor (u) er et positivt heltall, fortrinnsvis valgt slik at polymerdelens midlere totale molekylvekt er i området fra cirka 2000 til cirka 100 000 Da. Mer foretrukket har R_{10-11} og R_{22-23} uavhengig av midlere total molekylvekt på fra cirka 4000 Da til cirka 4.5000 Da, idet en vektmidlere molekylvekt på fra cirka 5000 Da er mest foretrukket. Andre molekylvekter betraktes også, for på den

15

måte å ta høyde for fagarbeiderens behov.

[0082] PEG representeres generelt ved strukturen:

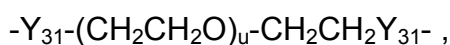
20



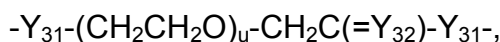
og R_{10-11} og R_{22-23} omfatter fortrinnsvis rester ifølge denne formelen. Graden av polymerisasjon for polymeren representerer antallet av repeterende enheter i polymerkjeden, og er avhengig av polymerens molekylvekt.

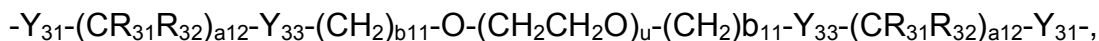
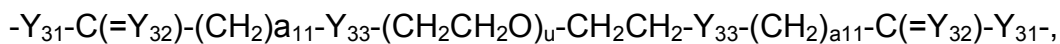
25

[0083] Alternativt kan polyetylenglykol (PEG)-restdelen ifølge oppfinnelsen representeres ved strukturen:

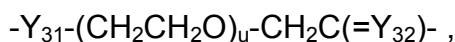
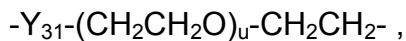


30

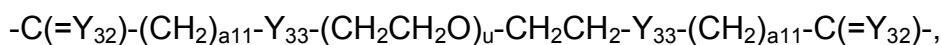




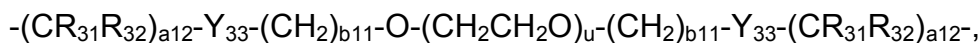
5



10



og



15

hvor:

Y_{31} og Y_{33} er uavhengig O, S, SO, SO₂, NR₃₃ eller en binding;

Y_{32} er O, S eller NR₃₄;

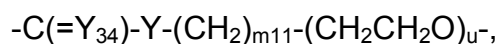
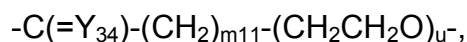
R_{31-34} velges uavhengig blant hydrogen, C₁₋₆-alkyl, C₂₋₆-alkenyl, C₂₋₆-alkynyl, C₃₋₁₉-forgrenet alkyl, C₃₋₈-sykloalkyl, C₁₋₆-substituert alkyl, C₂₋₆-substituert alkenyl, C₂₋₆-substituert alkynyl, C₃₋₈-substituert sykloalkyl, aryl, substituert aryl, heteroaryl, substituert heteroaryl, C₁₋₆-heteroalkyl, substituert C₁₋₆-heteroalkyl, C₁₋₆-alkoksy, aryloksy, C₁₋₆-heteroalkoksy, heteroaryloksy, C₂₋₆-alkanoyl, arylkarbonyl, C₂₋₆-alkoksykarbonyl, aryloksykarbonyl, C₂₋₆-alkanoyloksy, arylkarbonyloksy, C₂₋₆-substituert alkanoyl, substituert arylkarbonyl, C₂₋₆-substituert alkanoyloksy, substituert aryloksykarbonyl, C₂₋₆-substituert alkanoyloksy og substituert arylkarbonyloksy;

(a11), (a12) og (b11) er uavhengig null eller et positivt heltall, fortrinnsvis 0-6, og mer foretrukket 0, 1 eller 2; og

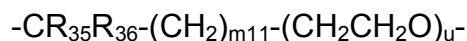
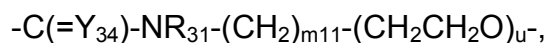
30

(u) er et heltall fra cirka 10 til cirka 2300.

[0084] Som et eksempel kan PEG-en funksjonaliseres på den følgende ikke-
5 begrensende måte:



10



15 hvor

R_{31} , R_{35} og R_{36} velges uavhengig blant H, C_{1-6} -alkyler, aryler, substituerte aryler, aralkyler, heteroalkyler, substituerte heteroalkyler og substituerte C_{1-6} -alkyler;

(m11) er null eller et positivt heltall, og fortrinnsvis 1 eller 2;

20 Y_{34} er O eller S; og

(u) representerer graden av polymerisasjon.

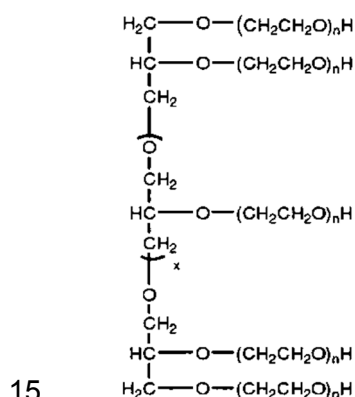
[0085] I disse aspekter festes en capping-gruppe (J) slik som metyl til PEG-ens
25 terminal.

[0086] Eksempelvis kan konjugatene ifølge den foreliggende oppfinnelse lages ved hjelp av fremgangsmåter som innbefatter å omdanne flerarms-PEG-OH-

eller "stjerne-PEG"-produkter, slik som de som beskrives i NOF Corp. Drug Delivery System catalog, Ver. 8, april 2006, som det hermed henvises til, og som skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad, til en passende aktivert polymer under anvendelse av aktiveringsteknikkene som

5 beskrives i tidligere nevnte US-patent nr. 5,122,614 eller 5,808,096. Se også Shearwater Corporations 2001-katalog "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Application", som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad.

10 **[0087]** Flerarmpolymerer inneholder fire eller flere polymerarmer, og fortrinnsvis fire eller åtte polymerarmer. Av illustrasjonsmessige formål og uten å være begrensende, kan den flerarmede polyetylenglykol (PEG)-rest være på formelen:



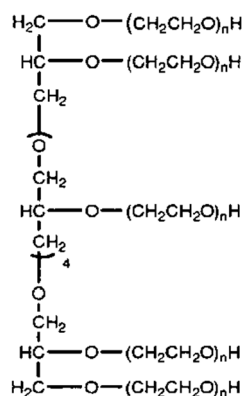
hvor:

(x) er 0 og et positivt heltall, dvs. fra cirka 0 til cirka 28; og

(n) er graden av polymerisasjon.

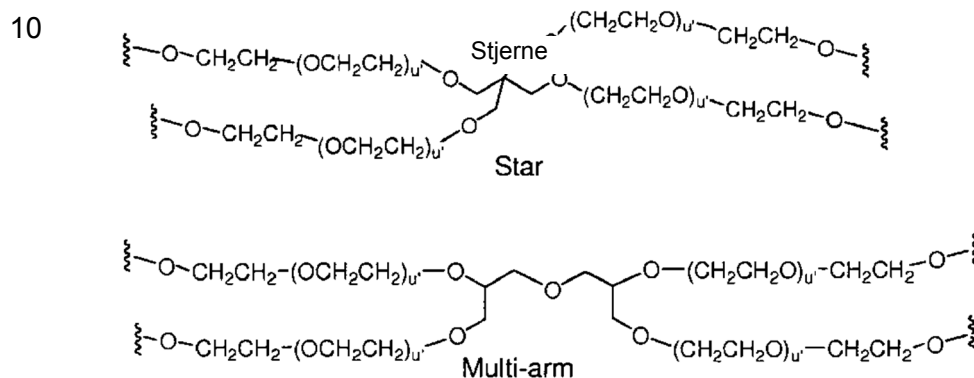
20

[0088] I én bestemt utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse har flerarms-PEG-en strukturen:



5 hvor (n) er et positivt heltall. I én foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen har polymerene en total molekylvekt på fra cirka 2000 Da til cirka 100 000 Da, og fortrinnsvis på fra 4000 Da til 45 000 Da.

[0089] Nærmere bestemt kan PEG-en ha formelen:



15

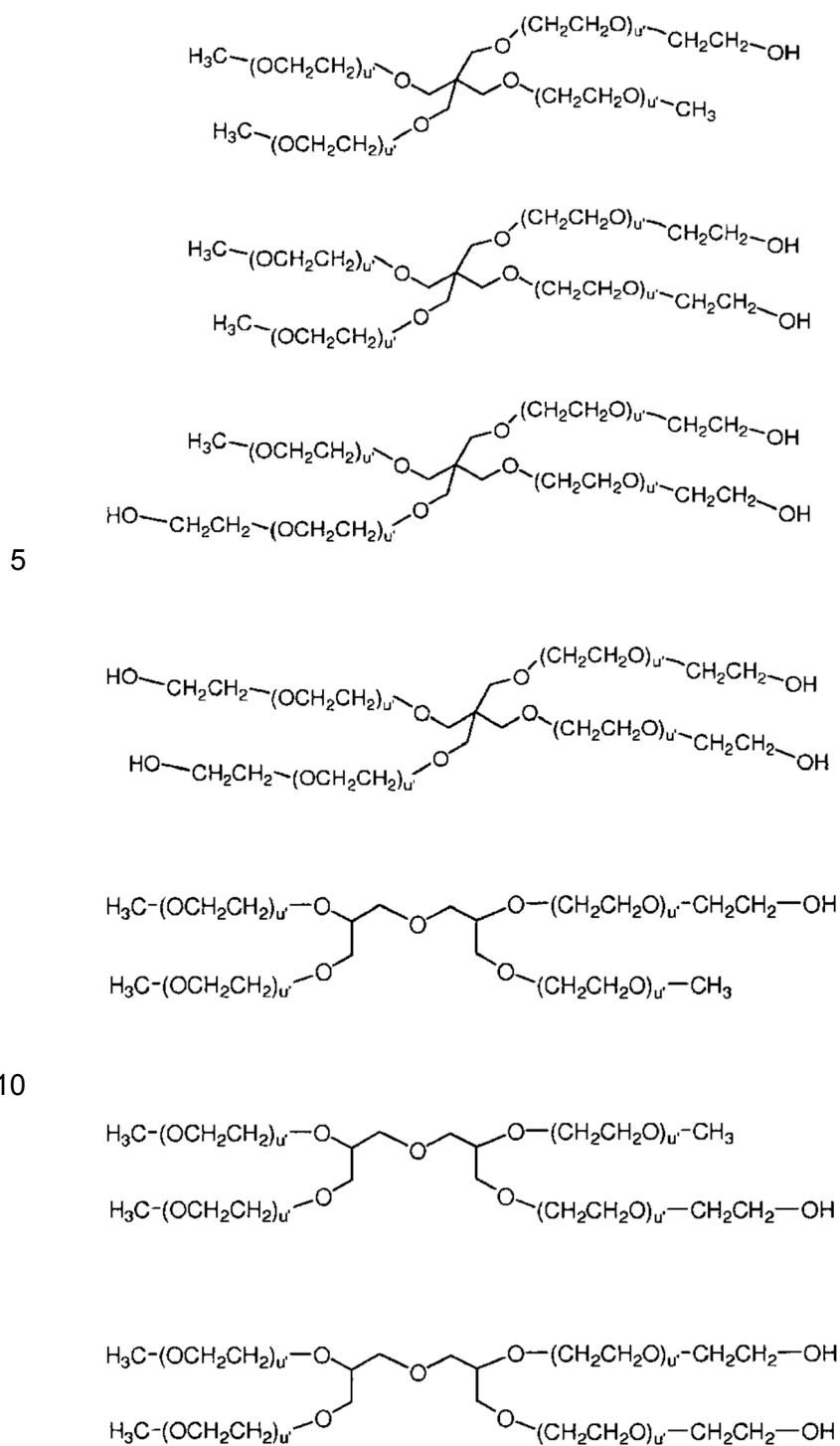
hvor:

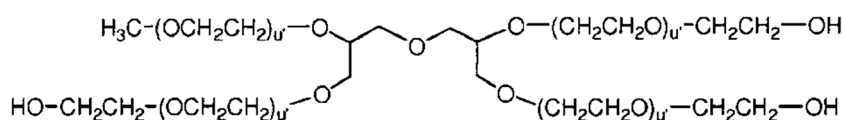
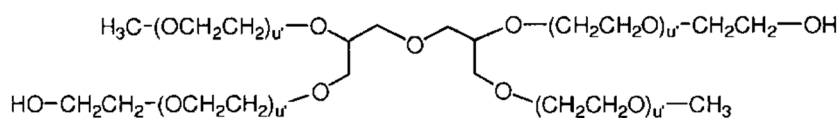
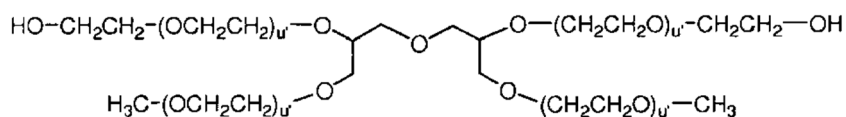
(u') er et heltall fra cirka 10 til cirka 570, for fortrinnsvis å tilveiebringe polymerer som har en total molekylvekt på fra cirka 4000 til cirka 45 000; og opptil 3 terminale deler av resten cappes med et metyl eller et annet lavere alkyl.

20

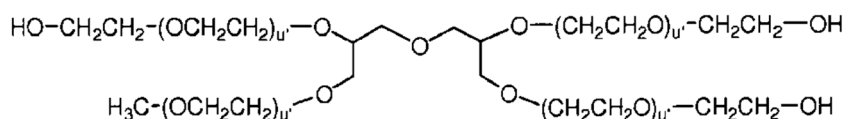
[0090] I noen foretrukne utførelsesformer omdannes alle 4 av PEG-armene til

passende funksjonelle grupper, dvs. SC osv., med henblikk på å legge til rette for tilknytning til det rekombinante protein. Slike forbindelser innbefatter forut for omdanning:

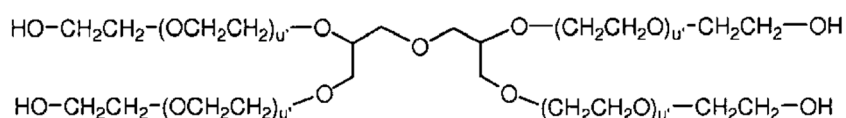




5



og



10

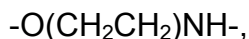
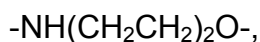
[0091] De polymere stoffer som innbefattes heri, er fortrinnsvis vannløselige ved romtemperatur. En ikke-begrensede liste over slike polymerer innbefatter polyalkylenoksidhomopolymerer, slik som polyetylenglykol (PEG) eller polypropylenglykoler, polyoksyetylenerte polyoler, kopolymerer derav og blokk-kopolymerer derav, forutsatt at blokk-kopolymerens vannløselighet bibeholdes.

[0092] I en ytterligere utførelsesform, og som et alternativt til PAO-baserte polymerer, er hver R₁₀₋₁₁ og R₂₂₋₂₃ eventuelt valgt blant én eller flere effektivt ikke-antigene materialer, slik som dekstran, polyvinylalkoholer, karbohydratbaserte polymerer, hydroksypropylmethakrylamid (HPMA),

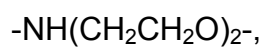
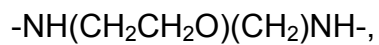
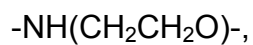
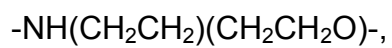
polyalkylenoksider, og/eller kopolymerer derav. Se også felles tildelte US-patent nr. 6,153,655, som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad. Det vil stå klart for fagfolk at den samme type aktivering benyttes som beskrevet heri, som for PAO-er, slik som PEG. Fagfolk innenfor teknikken vil videre innse at den foregående liste kun er illustrerende, og at alle polymermaterialer som innehar de heri beskrevne kvaliteter, er under overveielse, og at andre polyalkylenoksidderivater slik som polypropylenglykolene osv., også er under overveielse.

10 2. Bifunksjonelle linkergrupper

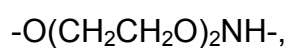
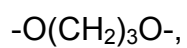
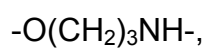
[0093] I mange aspekter av oppfinnelsen er L_{1-6} og L_8 bindingsgrupper som letter tilknytning av polymerstrengene, f.eks. R_{10-11} og/eller R_{22-23} . Den tilveiebrakte binding kan være enten direkte eller gjennom ytterligere koblingsgrupper som er kjente for fagmannen. I dette aspekt av oppfinnelsen kan L_{1-6} og L_8 være de samme eller forskjellige, og kan velges fra en lang rekke grupper som er velkjente for fagmannen, slik som bifunksjonelle og heterobifunksjonelle alifatiske og aromatisk-alifatiske grupper, aminosyrer osv. L_{1-6} og L_8 kan således være de samme eller forskjellige, og innbefatte grupper slik som:



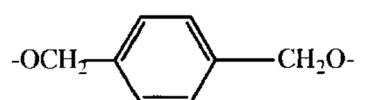
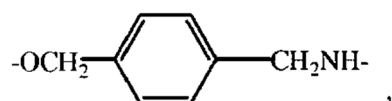
5



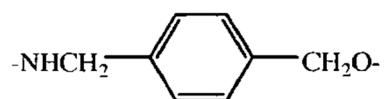
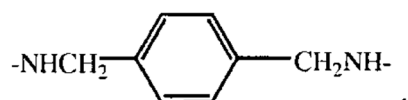
10



15

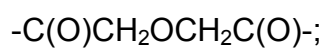


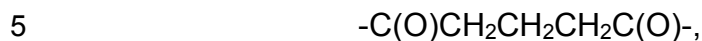
20



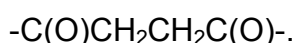
25

[0094] Det foretrekkes at L₁₋₆ og L₈ velges fra:





og



10

[0095] Alternativt kan passende aminosyrerester velges ut fra hvilke som helst av de kjente naturlig forekommende L-aminosyrer, f.eks. alanin, valin, leucin, osv. og/eller en kombinasjon derav, for bare å nevne noen få. L₁₋₆ og L₈ kan
15 også innbefatte et peptid som har en størrelse i området fra for eksempel cirka 2 til cirka 10 aminosyrerester.

[0096] Derivater og analoger av de naturlig forekommende aminosyrer så vel som ulike innenfor teknikken kjente ikke-naturlig forekommende aminosyrer (D eller L), hydrofobe eller ikke-hydrofobe, vurderes også som værende innenfor
20 oppfinnelsens omfang.

3. Z-deler og deres funksjon

[0097] I ett aspekt av forbindelsen er Z og Z' L₇-C(=Y₁₂), hvor L₇ er en
25 bifunksjonell linker valgt ut fra gruppen som definerer L₁₋₆, og Y₁₂ velges ut fra de samme grupper som den som definerer Y₁. I dette aspekt av oppfinnelsen tjener Z-gruppen som bindingen mellom ADA-en og det gjenværende av polymerleveringssystemet. I andre aspekter av oppfinnelsen er Z en del som
30 aktivt transporteres inn i en målcelle, en hydrofob del og kombinasjoner derav.

Z'-en, når den er til stede, kan tjene som en bifunksjonell linker, en del som aktivt transporteres inn i en målcelle, en hydrofob del, og kombinasjoner derav.

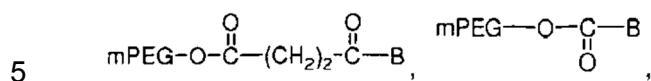
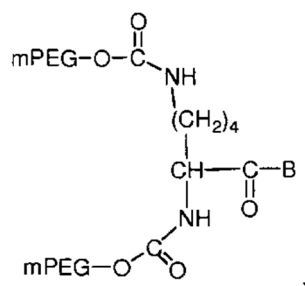
[0098] I dette aspekt av oppfinnelsen fremstilles de frigjørbare

- 5 polymersystemer slik at *in vivo*-hydrolyse spalter polymeren fra ADA-en, og frigjør enzymet i vevsvæsken, idet den fremdeles er bundet til Z-delen. Eksempelvis er noen potensielle Z-B-kombinasjoner leucin-ADA og Gly-Phe-Leu-Gly-ADA.

10 **B. Fremstilling av ADA-konjugater**

- [0099]** For den foreliggende oppfinnelses formål innbefatter passende konjugasjonsreaksjoner å bringe ADA til å reagere med et passende heri beskrevet aktivert polymersystem. Reaksjonen utføres fortrinnsvis under
15 anvendelse av betingelser som er velkjente for fagmannen med henblikk på proteinmodifikasjon, herunder anvendelsen av et PBS-bufret system osv., hvor pH-en er i området på cirka 6,5-8,5. Det vurderes at i de fleste tilfeller vil et overskudd av den aktiverte polymer bli brakt til å reagere med ADA-en.

- 20 **[0100]** Reaksjoner av denne typen vil ofte føre til dannelsen av konjugater som inneholder én eller flere polymerer festet til ADA-en. Som vil være klart, vil det ofte være ønskelig å isolere de ulike fraksjoner og tilveiebringe et mer homogent produkt. I de fleste aspekter av oppfinnelsen blir reaksjonsblandingen samlet inn, lastet over i en passende søyle-harpiks, og de ønskede fraksjoner
25 utvaskes sekvensielt med økende nivåer av buffer. Fraksjoner analyseres ved hjelp av passende analytiske redskaper for å bestemme det konjugerte proteins renhet før videre behandling. Uavhengig av synteseruten og utvalgt aktivert polymer, vil konjugatene være i overensstemmelse med formel (I) som definert heri. Noen av de foretrukne konjugater som resulterer fra de heri beskrevne
30 syntetiske teknikker, innbefatter:



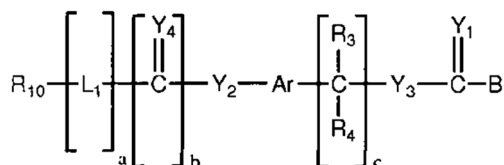
5

hvor B er ADA.

10

[0101] Atter ytterligere konjugater fremstilt i overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelse, innbefatter:

15

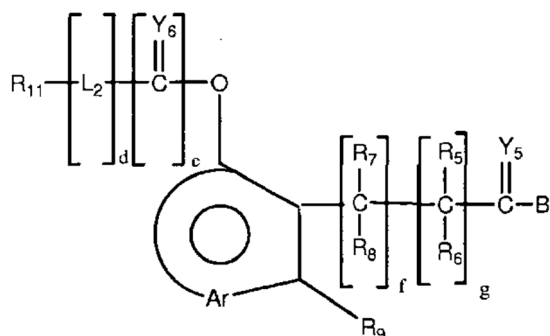


20

ADA.

hvor alle variabler er de samme som anført ovenfor, og B er

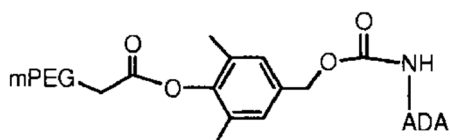
[0102] Ytterligere konjugater innbefatter:



hvor B er ADA.

5

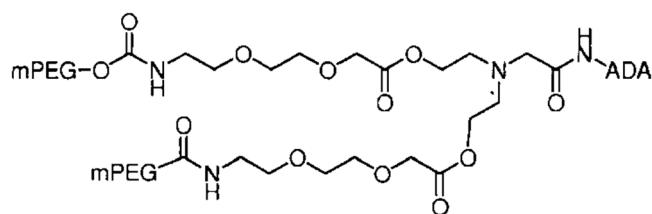
[0103] Et særlig foretrukket konjugat er:



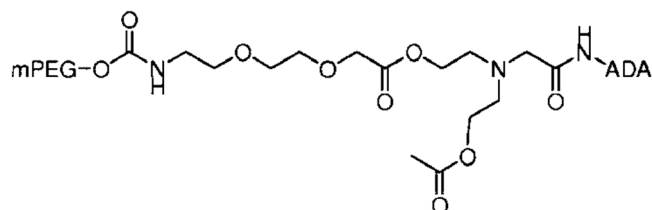
10 hvor mPEG-ens molekylvekt er fra cirka 4000 til cirka 45 000.

[0104] Når bicinbaserte polymersystemer anvendes, er to foretrukne konjugater:

15

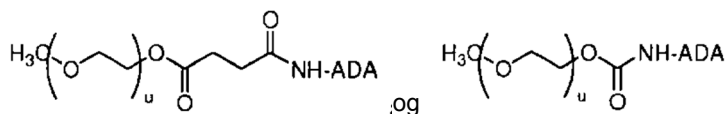


og



hvor mPEG-enes molekylvekter er de samme som ovenfor.

[0105] Mer foretrukne konjugater innbefatter



5

[0106] Det bemerkes at PEGylering av ADA vil bli empirisk optimalisert for totale PEG-tilknytninger per protein, PEG-polymerstørrelse og PEG-linkerdesign. Nøkkeltarakteristika for det PEGylerte ADA med henblikk på evaluering av PEGyleringsoptimalisering, innbefatter både in vitro-assayer (f.eks. enzymaktivitet og stabilitet) og in vivo-assayer (f.eks. farmakokinetikk og farmakodynamikk).

10

C. Tumorer som skal behandles

15

[0107] Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen er anvendelige til behandling av alle tumortyper, herunder kreftsvulster som er mottakelige for en reduksjon i adenosin- eller deoksyadenosinnivåer i blodet og/eller vev av et menneske eller et dyr som skal behandles. Disse innbefatter i store trekk tumorer i blodet så vel som solide tumorer. Blant solide tumorer innbefattes de som hemmes når reduserte adenosinnivåer tillater pasientens immunsystem å hemme tumoren og/eller tumorene som hemmes når reduserte nivåer av adenosin inhiberer blodtilførselen, f.eks. i allerede hypoksiske tumorer.

20

[0108] Mer foretrukket er tumorer som er mottakelige for behandling ved hjelp av fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen, solide tumorer som drar nytte av den ekstra effekt av en reduksjon i angiogenisk stimulering, som ledsager en reduksjon i vevsnivåer av adenosin.

25

[0109] Tumorer som skal behandles, innbefatter, kun som eksempel, de som

30

har deres opprinnelse i immunsystemet, skjelettet, muskler og hjerte, bryst, mage-tarm-kanalen, sentrale og perifere nervesystem, nyresystem, forplantningssystem, åndedrettssystem, hud, bindevevssystemer, herunder ledd, fettvev, kretsløpssystemet, herunder blodkarvegger, og lignende.

5

[0110] Tumorer i skjelettet innbefatter f.eks. både sarkomer og blastomer, slik som osteosarkom, kondrosarkom, kondroblastom osv. Muskel- og hjertetumorer innbefatter tumorer i både skjelettet og glatte muskler, f.eks. leiomyomer (godartede tumorer i glatt muskel), leiomyosarkomer, rabdomyomer (godartede tumorer i skjelettmuskel), rabdomyosarkomer, hjertesarkom osv. Tumorer i mage-tarm-kanalen innbefatter f.eks. tumorer i munnen, spiserøret, magen, tynntarmen, tykktarms- og kolorektaltumorer, så vel som tumorer i gastrointestinale sekretoriske organer, slik som spyttkjertel, lever, bukspyttkjertel, galleveiene og lignende.

15

[0111] Tumorer i sentralnervesystemet innbefatter tumorer i hjernen, retina og ryggmargen, og kan også oppstå i assosiert bindevev, bein, blodkar eller nervevev. Tumorer i det perifere nervesystem vurderes også for behandling. I tillegg innbefatter tumorer i det perifere nervesystem ondartede perifere nerveskjedetumorer.

20

[0112] Tumorer i nyresystemet innbefatter de i nyrene, f.eks. renalt cellekarsinom så vel som tumorer i urinledere og blære. Tumorer i forplantningssystemet innbefatter tumorer i livmorhalsen, livmoren, eggstokker, prostata, testikler og relaterte sekretoriske kjertler. Tumorer i immunsystemet innbefatter både blodbaserte tumorer og solide tumorer, herunder lymfomer, f.eks. både hodgkins og ikke-hodgkins.

25

[0113] Tumorer i åndedrettssystemet innbefatter tumorer i nesepassasjene, bronkiene og lungene. Tumorer i brystet innbefatter f.eks. både lobulære og duktalt karsinom.

30

[0114] Særlig alminnelige typer av ondartede tumorer som skal behandles, innbefatter, kun som eksempel, prostatakreft, lungekreft, brystkreft, kolorektalkreft, blærekreft, bukspyttkjertelkreft, endometriekreft, eggstokkreft, 5 kutant melanom, lymfomer, ikke-hodgkins lymfom, bukspyttkjertelkreft, nevroblastom, Wilms' tumor, rabdomyosarom (oppstående fra muskel), retinoblastom, osteosarkom og Ewings sarkom, for bare å nevne noen få.

D. Dosevalg

10

[0115] Fagmannen vil innse at i en klinisk sammenheng individualiseres doseringen av Adagen[®] avhengig av tumorens kliniske respons og den individuelle pasients bivirkningsprofil, være seg dyr eller menneske. I den heri nedenfor tilveiebrakte eksempelstudien er den høyeste dose den maksimalt 15 gjennommulige dose som tolereres. Adagen[®] leveres kommersielt i 250U/mL. Dette omdannes til 2000U/kg for en mus på ca. 25 g som injiseres med 0,2 ml Adagen[®]. Den laveste benyttede dose som anvendes i de nedenfor tilveiebrakte eksempelstudier, nærmer seg den kliniske dose for mennesker. Den anbefalte doseringsplan ved behandling av humane SCID-pasienter er 10 U/kg for den 20 første dosen, 15 U/kg for den andre dosen, og 20 U/kg for den tredje dosen. Ytterligere økninger på 5 U/kg/uke tillates, opp til en maksimal enkeltdose på 30 U/kg. Dosen i den nedenfor eksemplifiserte protokoll (100 U/kg) er dosen for mus som er ekvivalent med en dose på cirka 12 U/kg klinisk barnedose.

25

[0116] Dosen basert på mengden av enzym vil være i området på fra for eksempel cirka 0,10 U/kg til cirka 30 U/kg, eller høyere, fortrinnsvis fra cirka 0,5 U/kg til cirka 20 U/kg, og mer foretrukket fra cirka 0,5 U/kg til cirka 12U/kg (dvs. per kg av pasientens kroppsvekt), slik som fra cirka 0,5 U/kg til cirka 5 U/kg. En total ukentlig dose kan være på opptil 40U/kg eller mer, alt etter hva som 30 tolereres av mottakeren. Ytterligere økninger på 5 U/kg/uke er tillatt, opptil en

maksimal enkeltdose på 30 U/kg, eller mer, alt etter hva som tolereres av mottakeren. Generelt, påfølgende ukentlige injeksjoner av ADAGEN[®] ved 15U/kg, er det gjennomsnittlige bunnivå av ADA-aktivitet i plasma mellom 20 og 25 $\mu\text{mol/h/mL}$.

5

[0117] Fagmannen vil naturligvis innse at dosen av polymerkonjugert ADA også kan justeres etter den bestemte polymerstørrelse, linkerkjemi og valens. Eksempelvis vil doseringsregimet for et polymerkonjugat som omfatter to eller fire ADA-enzymmer per polymer, justeres i overensstemmelse med enhetene av ADA per ml løsning av et hvilket som helst bestemt polymerkonjugat av ADA.

10

[0118] Ved å tilveiebringe ADA-en eller ADA-PEG-konjugatet ved injeksjon, kan det optimale doseområdet justeres ved å overvåke adenosinnivåer i plasma. Det er generelt ønskelig å tilveiebringe mottakeren med en dosering som vil opprettholde plasma-ADA-aktivitet (bunnivåer) i området på fra cirka 10 til 100 $\mu\text{mol/h/mL}$, fortrinnsvis fra cirka 15 til cirka 35 $\mu\text{mol/h/mL}$ (undersøkt ved 37°C); og påvise et fall i erytrocyttadenosin, dvs. dATP til \leq cirka 0,001- 0,057 $\mu\text{mol/mL}$, fortrinnsvis cirka 0,005 - cirka 0,015 $\mu\text{mol/mL}$ i pakkede erytrocytter, eller \leq cirka 1% av det samlede erytrocyttadenosin (dvs. ATP + dATP-innhold) med et normalt adenosinnivå, som målt i en prøve tatt før injeksjon. dATP's normalverdi er under cirka 0,001 $\mu\text{mol/mL}$.

15

20

[0119] Detaljer for ADA-doseringsinformasjon er beskrevet i pakningsvedlegget for ADAGEN[®] (Enzon, Inc.).

25

EKSEMPLER

[0120] De følgende eksempler tjener til å tilveiebringe ytterligere forståelse av oppfinnelsen.

30

EKSEMPEL 1**ANTITUMOR-EFFEKTIVITET AV ADAGEN® HOS DU145 HUMAN
PROSTATATUMOR XENOGRAFTMODELL**

5

A) TESTSYSTEM**[0121]**

<u>Art:</u>	Mus, Mus musculus
<u>Sort:</u>	Atymisk naken
<u>Leverandør:</u>	Harlan-Sprague Dawley
<u>Kjønn:</u>	Hunnkjønn
<u>Midlere initialvekt:</u>	27,2 g
<u>Antall i studie:</u>	40
<u>Akklimatiseringsperiode:</u>	7 dager etter ankomst
<u>Identifisering:</u>	Burnummer og øremerke

10

B) METODER**Eksperimentell design:**

15 **[0122]** DU 145 humane prostatakreftceller ble oppnådd fra American Type Culture Collection (ATTC), Manassas, VA. Tumor er etablert hos nakne mus

ved hjelp av subkutan injeksjon av $2,0 \times 10^6$ DU 145 celler/mus i den høyre aksillære flanke. Tumorvekst ble overvåket to ganger ukentlig og målt når palpabel. Når tumorer nådde et gjennomsnittsvolum på 78 mm^3 , ble musene delt opp i forsøksgrupper (8/gruppe). Mus ble behandlet med Adagen[®] ved enten 2000, 500 eller 100 IU/kg to ganger ukentlig i 5 uker. Som en positiv kontroll fikk mus Avastin[®] (Bevacizumab, et anti-VEGF monoklonalt antistoff) ved en dose på 5 mg/kg ved den samme hyppighet som Adagen[®].

Forsøksgruppene ble satt opp som vist i tabell 1 nedenfor. Den første doseringsdag ble betegnet dag 1. Tumorummet for hver mus ble bestemt ved å måle to dimensjoner med krumpassere og beregnet under anvendelse av formelen $= (\text{lengde} \times \text{bredde}^2)/2$. Musevekt og tumorstørrelse ble målt ved begynnelsen av studien og to ganger ukentlig gjennom 8-ukersperioden.

TABELL 1

Gruppe #	Gruppe	# dyr (n)	Dose (IU/kg)	Injeksjons-vei	Doseringsplan
1	Kontroll	8	Saltløsning	i.p.	To ganger ukentlig x 5
2	Adagen [®]	8	2000	i.p.	To ganger ukentlig x 5
3	Adagen [®]	8	500	i.p.	To ganger ukentlig x 5
4	Adagen [®]	8	100	i.p.	To ganger ukentlig x 5
5	Avastin [®]	8	5 mg/kg	i.p.	To ganger ukentlig x 5

15

Dosevalg:

[0123] Adagen[®] eller Avastin[®] ble administrert via den intraperitoneale ("i.p.") vei to ganger ukentlig i fem uker (totalt: 10 doser).

20 Adagen[®]: Lottnummer: NV0604, konsentrasjon: 229 IU/ml

Avastin[®]: Lottnummer: M66781, konsentrasjon: 25 mg/ml

[0124] Doseberegninger var basert på kroppsvekt tatt på dag 1.

Kliniske undersøkelser:

5

[0125] Musene ble undersøkt visuelt ved ankomst. Deretter ble mus individuelt undersøkt to ganger ukentlig påfølgende innledende tumor palpasjon for kliniske tegn, generelle atferdsendringer, og undersøkt for kroppsvekt.

10 Eventuelle dødsfall og klinisk tegn ble registrert. Mat- og vannforbruk ble ikke overvåket. Mus med tumorer som viste åpne nekrotiske skader, ble avlivet. Mus som mistet mer enn 20% av kroppsvekten, ble også skånsomt avlivet.

Statistisk analyse:

15 [0126] Forskjeller i %-endring i tumorvolum mellom ulike behandlinger ble sammenlignet under anvendelse av enveis variansanalyse. Alle parvise flerfoldige sammenligninger ble utført under anvendelse av Holm-Sidak-metoden.

20 **C) RESULTATER**

Definisjoner av anvendte uttrykk:

25 [0127]

1. (a) % av initialt tumorvolum: $(\text{Tumorvolum på en gitt dag} / \text{Tumorvolum på dag 1}) \times 100$
2. (b) %-endring i tumorvolum: $[(\text{Tumorvolum på en gitt dag} - \text{Tumorvolum på dag 1}) / \text{Tumorvolum på dag 1}] \times 100$
- 5 3. (c) % Tumorveksthemming (TGI): $[(\text{Midlere tumorvolum for kontrollgruppe} - \text{Midlere tumorvolum for behandlingsgruppe}) / \text{Midlere tumorvolum for kontrollgruppe}] \times 100$
4. (d) Tumorregresjon er definert som negativt tumorvolum sammenlignet med dag 1.
- 10 5. (e) Helbredelse defineres som fullstendig fravær av tumor som observert med det blotte menneskeøye.

15 **[0128]** Gjennomsnittlig tumorstørrelse ved begynnelsen av studien var 78 mm^3 . Gjennomsnittlig kroppsvekt ved begynnelsen av studien var $27,20 \text{ g}$. Mus i alle grupper la på seg, og ved enden av studiene hadde vekten til mus i de ulike gruppene økt med 20 til 25% av deres vekt før behandling. Studien ble avsluttet på dag 57, når et flertall av dyrene enten hadde ulcererte tumorer eller hadde et tumorvolum på over 1500 mm^3 .

20

[0129] Tabell 2 og 3 nedenfor oppsummerer de siste resultatene sett på dag 49 av studien (siste dag med 100% overlevelse blant kontrolldyrene), og tilveiebringer en gruppeoverlevelsessammenligning mellom de Adagen[®]-behandlede dyr og de Avastin[®]-behandlede dyr. Tumorer i kontrollgruppen vokste stabilt gjennom studien. På dag 49 var den midlere tumorvolumstørrelse $783,1 (\pm 556,2) \text{ mm}^3$. Prosentendringen i tumorvekst var $833,3 \% (\pm 622,7)$. Behandling med Adagen[®] på alle tre dosenivåer var effektivt i å hemme tumorvekst. Det skal bemerkes at for alle behandlingsgrupper vokste tumorene ved en langsom hastighet helt til den siste doseringsdag (dag 33), hvoretter

25

30 tumorene hadde en høyere veksthastighet (data ikke vist). Konsistent med denne observasjonen er det faktum at %-endringen i tumorvolum ved alle tre

dosenivåer av Adagen[®] var signifikant forskjellig fra den i kontrollgruppen til dag 36 ($P < 0,05$) (data ikke vist).

5 [0130] Dette antyder at Adagen[®] har en cytostatisk effekt på tumorvekst. Selv om %-endringen i tumorvolum ikke var statistisk forskjellig fra den hos kontroller etter dag 36 til enden av studien, resulterte behandling med Adagen[®] i påviselig hemning av tumorvekst. Nærmere bestemt hadde tumorer behandlet med 2000IU/kg Adagen[®] gjennomsnittlig tumorvolum på 343,0 ($\pm 249,8$) mm³ på dag 49. Gjennomsnittlig endring i tumorvolum var 424,2 % ($\pm 360,6$). Adagen[®] ved 10 2000IU/kg viste 56% tumorveksthemming.

[0131] Tumorene som ble behandlet med 500IU/kg Adagen[®], hadde et midlere tumorvolum på 696,3 ($\pm 290,4$) mm³ på dag 49. Den gjennomsnittlige endring i tumorvolum var 797,6% ($\pm 492,7$), og endringen fra inititaltumoren var 897,6% ($\pm 492,7$). Tumorveksthemming var 11,1%. Tumorer i denne gruppen hadde 15 lignende tumorveksthastigheter som de andre Adagen[®]-behandlede grupper helt til dag 40, hvorefter de vokste ved en mye høyere hastighet. Årsaken til denne diskrepansen er ikke kjent.

20 [0132] Tumorene som ble behandlet med 100IU/kg Adagen[®], hadde et midlere tumorvolum på 414,8 ($\pm 219,0$) mm³ på dag 49. Den gjennomsnittlige endring i tumorvolum var 489,9% ($\pm 307,0$), og den gjennomsnittlige prosentendring fra inititaltumoren var 589,9% ($\pm 307,0$). Tumorveksthemming, eller TGI, var 47,0%.

25 [0133] Den terapeutiske effekt av Adagen[®] nådde en maksimal effekt ved den laveste dose på 100IU/kg. Det skal bemerkes at dose på 100 IU/kg nærmer seg den kliniske humane dose av Adagen[®] (dose som anvendes til å behandle barn med SCID). Avastin[®] viste den mest effektive forminskning i tumorstørrelse med en tumorveksthemming, eller TGI, på 92,5%.

30

[0134] Som konklusjon var behandling med Adagen[®] ved alle de tre dosenivåer effektiv til å inhibere vekst av DU 145-tumorer *in vivo*.

TABELL 2: Endelig oppsummering (dag 49)

Gruppe nr.	Forbindelse	Endelig tumorvolum – middelverdier	Endelig tumorvolum – medianverdier	%-endring i tumorvolum	% Initialt tumorvolum	% Initialt tumorvolum	# av regresjoner	# Helbredet	% overlevelse
1	Saltløsning	783,1 (556,2)	680,0	833,3 (622,7)	933,3 (622,7)	-	0	0	62,5
2	Adagen (2000 IU/kg)	343,0 (249,8)	283,8	424,2 (360,6)	524,2 (360,6)	56,2	0	0	75,0
3	Adagen (500 IU/kg)	696,3 (290,4)	766,2	797,6 (492,7)	897,6 (492,7)	11,1	0	0	75,0
4	Adagen (100 IU/kg)	414,8 (219,0)	349,8	489,9 (307,0)	589,9 (307,0)	47,0	0	0	75,0
5	Avastin (5 mg/kg)	58,5 (36,1)	49,3	-15,7 (59,6)	84,3 (59,6)	92,5	7/8	0	87,5

regresjon, # helbredet og % overlevelsesdata er fra dag 56.
Middelverdier, medianverdier, %-endring i tumorvolum, % innledende tumorvolum og % tumorveksthemmeringsdata er fra dag 49.

TABELL 3: Sammenligning av gruppeoverlevelse (# dyr i live)

Gruppe	1	5	8	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	49	51	55	57
1: saltløsning	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	5 ^á	5	5	5
2:Adagen (2000U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 ^é	7	6 ^ñ	6	6	6
3:Adagen (500U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 ^é	7	6 ^ñ	6	5 _i	5
4:Adagen (100U/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6 ^ú	6	6	6	5 _i	5
5:Avastin (5mp/kg)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7 ^ñ	7	7	7
^á To dyr ble avlivet på grunn av tumorstørrelser på over 1500 mm ³ . Ett dyr ble avlivet på grunn av en ulcerert tumor.																	
^é Dyr avlivet på grunn av en ulcerert tumor på dag 40.																	
^ñ Dyr avlivet på grunn av en ulcerert tumor på dag 49.																	
ⁱ Dyr avlivet på grunn av en ulcerert tumor på dag 55.																	
^ú To dyr ble avlivet på grunn av en ulcerert tumor på dag 49.																	

5

EKSEMPEL 2**ANTITUMOR-EFFEKTIVITET AV ADAGEN® HOS SK-OV-3 HUMAN
OVARIALTUMOR XENOGRAFTMODELL**

5

A) TESTSYSTEM**[0135]**

<u>Art:</u>	Mus, Mus musculus
<u>Sort:</u>	Atymisk naken
<u>Leverandør:</u>	Harlan-Sprague Dawley
<u>Kjønn:</u>	Hunnkjønn
<u>Midlere initialvekt:</u>	22,18 g
<u>Antall i studie:</u>	54
<u>Akklimatiseringsperiode:</u>	7 dager etter ankomst

10

B) METODER**Eksperimentell design:**

15

[0136] SK-OV-3 humane ovariale adenokarsinomtumor ble etablert hos nakne mus ved subkutan injeksjon av 3×10^6 celler/mus inn i den høyre aksillære flanke. Tumorvekst ble overvåket to ganger ukentlig og målt når palpabel. Tumorummet for hver mus ble bestemt ved å måle to dimensjoner med krumpassere og beregnet under anvendelse av formelen = (lengde x bredde²)/2). Når tumorer nådde et gjennomsnittsvolum på 90 mm^3 , ble musene

delt opp i forsøksgrupper (9/gruppe). Forsøksgruppene ble satt opp som vist i tabellen nedenfor. Den første doseringsdag ble betegnet dag 1. Musevekt og tumorstørrelse ble målt ved begynnelsen av studien og to ganger ukentlig helt til studiens avslutning. Studien ble avsluttet etter cirka 7 uker (52 dager), når flertallet av dyrene hadde store eller ulcererte tumormasser.

5

TABELL 4

Gruppe #	Gruppe	# mus (n)	Dose (U/kg)	Injeksjons-vei	Doseringsplan
1	Kontroll	9	saltløsning	i.p	To ganger ukentlig x 5
2	Adagen [®]	9	2000	i.p	To ganger ukentlig x 5
3	Adagen [®]	9	500	i.p	To ganger ukentlig x 5
4	Adagen [®]	9	100	i.p	To ganger ukentlig x 5
5	Avastin [®]	9	100 ug/mus	i.p	To ganger ukentlig x 5
6	Nativ ADA	<u>9</u>	2000	i.p.	To ganger ukentlig x 5

10

Doseringsregime:

[0137] Adagen[®], Avastin[®] eller nativt ADA ble administrert to ganger ukentlig i fem uker (totalt: 10 doser).

15

Testgjensstander:**[0138]**

Adagen[®]: Lottnummer: NV0604, konsentrasjon: 229 IU/ml

5 Avastin[®]: Lottnummer: M66781, konsentrasjon: 25 mg/ml

Nativt ADA: Lottnummer: 06-0315-111

Doseberegninger:

10

[0139] Basert på kroppsvekt tatt på dag 1.

Kliniske undersøkelser:

15 **[0140]** Musene ble undersøkt visuelt ved ankomst. Deretter ble mus individuelt undersøkt to ganger ukentlig påfølgende innledende tumor palpasjon for kliniske tegn, generelle atferdsendringer, og undersøkt for kroppsvekt. Eventuelle dødsfall og klinisk tegn ble registrert. Mat- og vannforbruk ble ikke overvåket. Mus med tumorer som viste åpne nekrotiske skader, ble avlivet. Mus
20 som mistet mer enn 20% av kroppsvekten, ble også skånsomt avlivet.

Statistisk analyse:

[0141] Forskjeller i %-endring i tumorvolum mellom ulike behandlinger ble sammenlignet under anvendelse av enveis variansanalyse. Alle parvise
5 flerfoldige sammenligninger ble utført under anvendelse av Tukey-Kramer-metoden.

C) RESULTATER**10 Definisjoner av anvendte uttrykk:****[0142]**

1. (a) % av initialt tumorvolum: $(\text{Tumorvolum på en gitt dag} / \text{Tumorvolum på dag 1}) \times 100$
- 15 2. (b) %-endring i tumorvolum: $[(\text{Tumorvolum på en gitt dag} - \text{Tumorvolum på dag 1}) / \text{Tumorvolum på dag 1}] \times 100$
3. (c) % Tumorveksthemming (TGI): $[(\text{Midlere tumorvolum for kontrollgruppe} - \text{Midlere tumorvolum for behandlingsgruppe}) / \text{Midlere tumorvolum for kontrollgruppe}] \times 100$
- 20 4. (d) Tumorregresjon er definert som negativt tumorvolum sammenlignet med dag 1.
5. (e) Helbredelse defineres som fullstendig fravær av tumor som observert med det blotte menneskeøye

25

[0143] Gjennomsnittlig tumorstørrelse ved begynnelsen av studien var 90 mm³. Gjennomsnittlig kroppsvekt ved begynnelsen av studien var 22,2g. Den midlere

kroppsvekt i alle grupper endret seg ikke signifikant i løpet av studien. Studien ble avsluttet på dag 52. Fire av musene ble avlivet på grunn av tumorer som vokste over 1500 mm³.

- 5 **[0144]** I tabell 5 finnes den endelige oppsummering av resultater som på dag 32 (siste dag med 66% overlevelse av kontrolldyr). Tumorer i kontrollgruppen vokste stabilt gjennom studien. På dag 32 var den midlere tumorvolumstørrelse 754,9 (\pm 700,7) mm³. Prosentendringen i tumorvekst var 693,2 % (\pm 673,6) mm³.

10

TABELL 5: Endelig oppsummering (dag 32)

Gruppe nr.	Forbindelse	Endelig tumorvolum – middelverdier	Endelig tumorvolum – medianverdier	%-endring i tumorvolum	% Initialt tumorvolum	% Initialt tumorvolum	# av regresjoner	# Helbredet	% overlevelse
1	Saltløsning	754,9 (700,7)	485,5	693,2 (673,6)	793,2 (673,6)	-	0	0	66
2	Adagen [®] (2000 IU/kg)	437,7 (122,2)	446,4	402,1 (177,7)	502,1 (177,7)	42,0	0	0	100
3	Adagen [®] (500 IU/kg)	471,1 (60,0)	465,8	421,3 (102,2)	521,3 (102,2)	37,6	0	0	89
4	Adagen [®] (100 IU/kg)	497,7 (152,6)	478,9	450,7 (172,7)	550,7 (172,7)	34,1	0	0	100
5	Avastin [®] (5 mg/kg)	210,2 (65,9)	198,6	161,6 (88,3)	261,6 (88,3)	72,2	0	0	100
6	Nativt ADA (2000 IU/kg)	356,6 (213,0)	329,7	340,1 (239,1)	440,1 (239,1)	52,8	0	0	77

- 5 **[0145]** Tumorer behandlet med 2000IU/kg Adagen[®] hadde gjennomsnittlig tumorvolum på 437,7 ($\pm 122,2$) mm³ på dag 32. Gjennomsnittlig endring i tumorvolum var 402,1 % ($\pm 177,7$). Adagen[®] ved 2000IU/kg viste 42% tumorveksthemming.
- 10 **[0146]** Tumorene som ble behandlet med 500IU/kg Adagen[®], hadde et midlere tumorvolum på 471,1 ($\pm 60,0$) mm³ på dag 32. Den gjennomsnittlige endring i tumorvolum var 421,3% ($\pm 102,2$), og endringen fra initialtumoren var 521,3% ($\pm 102,2$). Tumorveksthemming var 37,6%.
- 15 **[0147]** Tumorene som ble behandlet med 100IU/kg Adagen[®], hadde et midlere tumorvolum på 497,7 ($\pm 152,6$) mm³ på dag 32. Den gjennomsnittlige endring i tumorvolum var 450,7% ($\pm 172,7$), og den gjennomsnittlige prosentendring fra initialtumoren var 550,7% ($\pm 172,7$). Tumorveksthemming var 34,1%.
- 20 **[0148]** Tumorene som ble behandlet med 2000IU/kg nativt ADA, hadde et

midlere tumorvolum på 356,6 (213,0) mm³ på studiedag 32. Den gjennomsnittlige endring i tumorvolum var 340,1% ($\pm 210,0$), og den gjennomsnittlige prosentendring fra inititaltumoren var 440,1% (239,1). Tumorveksthemming var 52,8%.

5

[0149] Behandling med Adagen ved hvilke som helst dosenivå var i samsvar med resultatene fra kontroller. Adagen ved hvert dosenivå produserte imidlertid TGI, som bemerket ovenfor.

10

[0150] Den terapeutiske effekt av Adagen[®] nådde en maksimal effekt ved den laveste dose på 100IU/kg. Det skal bemerkes at dose på 100 IU/kg nærmer seg den kliniske humane dose av Adagen[®] (dose som anvendes til å behandle barn med SCID). Avastin[®], som tjener som en positiv kontroll i denne studien, viste den mest effektiv forminskning i tumorstørrelse, med en TGI på 72%.

15

[0151] Til slutt, behandling med [®] ved 100, 500 eller 2000 IU/kg resulterte i tumorveksthemming i området fra 34-42%.

20

[0152] Alternative rekombinante ADA-enzymmer for fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen, beskrives som følger.

EKSEMPEL 3

KONSTRUKSJON AV E. COLI-EKSPRESJONSSTAMME SOM UTTRYKKER REKOMBINANT HUMAN ADA MED EN CYS TIL SER ENDRING VED DET MODNE PROTEINS POSISJON 74

25

[0153] Den rapporterte 363 aminosyresekvens av human adenosindeaminase (GenBank NP_000013, som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad) ble analysert for nærværet av cysteinkodoner. Fem posisjoner i det modne (N-terminal Met

30

spaltes) polypeptid koder cystein (C74, C152, C153, C168, C261). I den designede og modifiserte genuttrykkende human ADA, ble kun én av disse fem cysteinkodoner (Cysteine 74, TGC) endret til et serinkodon (TCC) (dette er posisjon 75 i det translaterede protein). Den definerte polypeptidsekvens (se SEQ ID NO: 3) ble tilveiebrakt til Blue Heron Corporation (Bothell, Washington, U.S.A.) med henblikk på hel gensyntese av et nytt gen som har kodoner som er optimert for uttrykk i *E. coli*, under anvendelse av standard kjemisk syntese av overlappende oligonukleotidsegmenter. Kort fortalt ble sekvensen optimert med henblikk på bakterieekspressjon ved å følge den standard bakteriekodonbruken for *Escherichia coli* K12, under anvendelse av kodondataene som beskrives av Grantham R. et al.; 1981; "Codon catalogue usage in genome strategy modulated for gene expressivity," *Nucleic Acid Res.* 9:r43-r47, og Lathe, R. 1985; "Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data, Theoretical and practical considerations." *J. Mol Biol*; 183:1-12.

15

[0154] Den tilsvarende RNA-sekvens ble deretter analysert for dannelsen av hårnålstrukturer eller sløfyedannelse, og ble underkastet minimum fri energiberegninger. De flankerende restriksjonssteder *NdeI* og *BamHI* ble inkludert ved genets termini. Påfølgende fordøyelse av det syntetiske DNA med restriksjonsenzymene *NdeI* og *BamHI*, ble 1.1 kilobase-genet ligert via T4 DNA-ligase til plasmidvektoren pET-28a (Novagen Corporation), som også hadde blitt fordøyd med disse to enzymer. Det rekombinante plasmid ble introdusert i *E. coli*-stamme BLR (DE3) eller HMS174 (DE3) ved elektroporese under anvendelse av en BTX Electro Cell Manipulator 600 i overensstemmelse med produsentens instruksjer. Transformasjonsblandingen ble lagt på LB agarplater inneholdende kanamycin (15 µg/ml) for å muliggjøre seleksjon av kolonier inneholdende plasmidet pET-28a/ADAcysSer (betegnet ADAc75s/pET28a: BLR(DE3) eller ADAc75s/pET28a:HMS174(DE3)). ADA-variantens gennukleotidsekvens ble bekreftet ved hjelp av DNA-sekvensanalyse med en ABI Prism 310 Genetic Analyzer under anvendelse av Big Dye Terminators. DNA-sekvensen som koder for Ser₇₄-rhADA-åpenleserammen, er i overensstemmelse med SEQ ID NO: 4.

30

5 [0155] Isolerte kolonier ble rensert ved spredning på plater og analysert for IPTG-induserbar genekspressjon i LB-medium ved hjelp av standard metoder slik som de som beskrives i Novagen pET System Manual Ninth Edition, som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad.

10 [0156] Atskillige induksjonsparametere ble undersøkt, herunder tid, temperatur og induserkonsentrasjon. En foretrukket betingelse var induksjon med 50 μ M IPTG i 12 h ved 25 °C, noe som tillot høynivåproduksjon av ADA i vertsbakteriens cytoplasma på cirka 20% av totalt celleprotein. Det uttrykte ADA-protein ble bekreftet på SDS PAGE-analyse som utvisende den korrekte molekylvekt på cirka 40 kDa (data ikke vist).

15 **EKSEMPEL 4**

KONSTRUKSJON AV E. COLI-EKSPRESJONSSTAMME SOM UTTRYKKER REKOMBINANT BOVIN ADA MED EN CYS TIL SER ENDRING VED DET MODNE PROTEINS POSISJON 74

20 [0157] Det rensede modne ADA-protein avledet fra bovine intestinale tillaginger er et 356 aminosyreprotein som mangler N-terminal-metioninet og som også mangler de siste seks C-terminal-rester predikert fra the cDNA-sekvensen (GenBank NP_776312, som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad). Bovin
25 ADA-aminosyresekvensen ble analysert for nærværet av cysteinkodoner. Fem posisjoner i det modne polypeptid koder cystein (C74, C152, C153, C168, C261). I det designede og modifiserte bovin ADA-syntetiske gen, var kun én av disse fem cysteinposisjoner (cystein 74) endret til en serinrest. Dette ble utført ved å sette inn et serinkodon (TCC) i stedet for det normale cysteinkodonet på

posisjon 74 i det modne polypeptid (eller translasjonsproduktets posisjon 75). Genet ble også kodonoptimalisert for ekspresjon i *E. coli*.

[0158] Kort fortalt ble den definerte polypeptidsekvens (se SEQ ID NO: 1) tilveiebrakt til BioCatalytics Inc. med henblikk på hel gensyntese av et nytt gen som har kodoner som er optimert for uttrykk i *E. coli*, under anvendelse av deres metoder, som innbefatter kjemisk syntese av overlappende oligonukleotidsegmenter. BioCatalytics-metodene er beskrevet mer detaljert i US-patent nr. 6,366,860, som det hermed henvises til, og som i sin helhet skal betraktes som værende en del av den foreliggende søknad.

[0159] Bovin ADA-ekspresjon ble undersøkt i flere ekspresjonssystemer. Eksempelvis ble de flankerende restriksjonssteder *NdeI* og *BamHI* inkludert ved genets terminaler. Påfølgende fordøyelse av det syntetiske DNA med restriksjonsenzymene *NdeI* og *BamHI*, ble 1.1 kilobase-genet ligert via T4 DNA-ligase til plasmidvektoren pET-9d (Novagen Corporation), som også hadde blitt fordøyd med disse to enzymer. Det rekombinante plasmid ble introdusert i *E. coli*-stamme BLR (DE3) eller HMS174 (DE3) ved elektroporese under anvendelse av en BTX Electro Cell Manipulator 600 i overensstemmelse med produsentens instruksjer. Transformasjonsblandingen ble lagt på LB agarplater inneholdende kanamycin (15 µg/ml) for å muliggjøre seleksjon av kolonier inneholdende plasmidet pET-9d/bADA (betegnet bADA/pET9d: BLR(DE3) eller bADA/pET9d:HMS174(DE3)). ADA-variantens gennukleotidsekvens ble bekreftet ved hjelp av DNA-sekvensanalyse med en ABI Prism 310 Genetic Analyzer under anvendelse av Big Dye Terminators. DNA-ets åpne leseramme er vist ved SEQ ID NO: 2.

[0160] Isolerte kolonier ble rensset ved spredning på plater og analysert for IPTG-induserbar genekspresjon i LB-medium ved hjelp av standard metoder slik som de som beskrives i Novagen pET System Manual Ninth Edition. Atskillige induksjonsparametere ble undersøkt, herunder tid, temperatur og induserkonsentrasjon. En foretrukket betingelse var induksjon med 0,3%

laktose i 12 h ved 37°C, noe som tillot høynivåproduksjon av ADA i vertsbakteriens cytoplasma på cirka 20% av totalt celleprotein. ADA-produktet ble bekreftet på SDS PAGE-analyse som utvisende den korrekte molekylvekt på cirka 40 kDa.

5

EKSEMPEL 5

RENSING AV REKOMBINANT HUMAN MUTEIN ADA-PROTEIN

[0161] Rensingen av rhADA ble utført i en 3-kromatografisk protokoll utviklet av Enzon. Bakteriell fermentering ble gjennomført for *E. coli* uttrykkende rhADA-proteinet fra et syntetisk gen på plasmid pET28a (Novagen) i vertscelle HMS174(DE3). Rifampicin (200 µg/ml) og kanamycin (30 µg/ml) ble inkludert i et minimalt glyserolmedium supplert med gjærekstrakt (30 g/l), og cellene ble dyrket ved 28°C til en OD₆₀₀ på 11 når inducer-IPTG-en ble tilsatt til 5mM sluttkonsentrasjon. Etter 40 timer (OD₆₀₀ ~ 110) ble cellene høstet ved sentrifugering og frosset ved -20 °C. Kort fortalt ble tint cellepasta (50 g) resuspendert i 1800 ml buffer av 10mM Tris, 1mM DTT, pH 8,0, og homogenisert ved 1200 RPM i 10 sekunder med Tempest Virtis (Sentry™, Microprocessor, Boston, MA). Denne suspensjon ble sendt gjennom en sil av rustfritt stål (Opening micrometer 250µ, nr.60, W.S Tyler) for å fjerne store partikler. Den homogene cellesuspensjon ble mikrofluidisert i 3 sykluser ved 15 000 psi (enheten ble isbadet) (Micro Fluidizer, Microfluidics Corp., Model# 110Y, Boston, MA). Ved enden av mikrofluidiseringen ble 200 ml av den samme buffer som ovenfor, anvendt til å rense enheten, og denne løsning ble kombinert med den ovennevnte suspensjon. Det løselige protein fra cellelysater ble ekstrahert ved sentrifugering ved 16 000 rpm i 40 minutter ved 4°C (Sorvall RC 5C plus, rotor SLA-1000). Supernatanten ble forsiktig samlet opp for å unngå uønsket blanding. pH-en ble justert til 8,0, og 1mM MgCl₂ og 20 mg/mL DNase ble tilsatt og inkubert ved romtemperatur i 2 timer. pH-en ble deretter justert til 6,5 med 1N HCl. En andre sentrifugering ble utført som ovenfor,

supernatanten samlet opp og justert til 2mM EDTA, etterfulgt av filtrering på Nalgene (90 mm filterenhet). Mengden av den filtrerte supernatant var 500 ml, total proteinkonsentrasjon ved BCA-metoden var 8,5 mg/ml.

- 5 **[0162]** Celleekstrakt (100 ml) ble justert til pH 7,2, 4,5 mS/cm og lastet på HiTrap DEAE ff ved 20mM Bis-Tris, 20mM NaCl, pH 6,5 og vasket ut med 20mM Bis-Tris, 500mM NaCl, pH 6,5. Toppfraksjonene ble identifisert ved enzymassay og SDS-PAGE, og justert til 1,5M ammoniumsulfat i 20mM NaHPO₄, pH 6,5, og lastet på en HiTrap Phenyl ff-søyle. Proteinet ble vasket ut
10 med en gradient av lastebuffer og 20mM NaHPO₄, pH 6,5. Toppfraksjonen (55 ml; 0,4 mg/ml) ble diafiltrert mot 20mM NaHPO₄, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH 6,5 og lastet på HiTrap SP-Sepharose ff og vasket ut med 20mM NaHPO₄, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH 6,5. Den oppsamlede fraksjon inneholdt rensset ADA-protein (77 ml; 0,1 mg/ml).

15

EKSEMPEL 6

RENSING AV REKOMBINANT BOVIN ADA-PROTEIN

- [0163]** Rensingen av rbADA uttrykt ved hjelp av klonen i eksempel 4, ble utført
20 i en 3-kromatografisk protokoll utviklet av Enzon. Kort fortalt ble tint cellepasta (oppnådd fra henholdsvis Blue Hereon eller Biocatalytics) av 200 g som var lagret ved -80°C, resuspendert i 1800 ml buffer av 20mM Bis-Tris, 1mM EDTA, pH 7,4, og homogenisert ved 1200 RPM i 5 min med Tempest Virtis (Sentry™, Microprocessor, Boston, MA). Denne suspensjon ble sendt gjennom en sil av
25 rustfritt stål (Opening micrometer 250µ, nr.60, W.S Tyler) for å fjerne store partikler. Den homogene cellesuspensjon ble mikrofluidisert i 3 sykluser ved 15 000 psi (enheten ble isbadet) (Micro Fluidizer, Microfluidics Corp., Model# 110Y, Boston, MA). Ved enden av mikrofluidiseringen ble 200 ml av den samme buffer som ovenfor, anvendt til å rense enheten, og denne løsning ble
30 kombinert med den ovennevnte suspensjon. Det løselige protein fra cellelysater

ble ekstrahert ved sentrifugering ved 7100 rpm (12000 x g) i 60 minutter ved 4°C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor# JLA8.1000). Supernatanten ble forsiktig samlet opp for å unngå uønsket blanding.

5 **[0164]** For å fjerne nukleotider i dette celleekstrakt, ble polyetylenimin (PEI) tilsatt til den ovennevnte supernatant (final 0,15%, wt/v) og grundig blandet under omrøring i 10 min. Deretter ble dette celleekstrakt latt stå ved 4°C over natten. Fellingsmiddelet fra denne prøve over natten, ble fjernet ved en sentrifugering ved 7100 rpm (12000 x g) i 60 minutter ved 4°C (Avanti J-201,
10 Beckman Coulter; Rotor# JLA8.1000). Likeledes ble supernatanten samlet opp forsiktig for å unngå eventuell uønsket blanding. For å hjelpe ADA binde seg til den første søylen, ble 10% PEG4600 langsomt tilsatt til dette celleekstraktet, og dette celleekstraktets pH ble langsomt justert til 6,5 med 1N NaOH og 1N HCl. Denne supernatanten ble sentrifugert igjen ved 7100 rpm (12000 x g) i 60
15 minutter ved 4° C (Avanti J-201, Beckman Coulter; Rotor# JLA8.1000) før den ble lastet over i den neste søylen.

[0165] Celleekstraktet ble lastet på en forhåndsekvilibrert Capto Q-søyle (Cat# 17-5316-01, GE Healthcare, Piscataway, NJ. Sengvolum 350 ml forpakket i en
20 XK-50-søyle) med en buffer på 20mM Bis-Tris, 1mM EDTA, pH 6,5. Før ADA ble vasket ut fra søylen ved 80mM NaCl i ekvibreringsbufferen, ble det først utført elusjoner ved 60mM og 70mM NaCl før å fjerne urenheter. Elusjonsprofilen ble analysert ved ADA-aktivitet, SDS-PAGE-analyse, Western Blot og RP-HPLC.

25 **[0166]** Etter Capto Q-søyle ble 2 hydrofobe interaksjonskromatografiske rensinger anvendt en etter en for ytterligere å polere proteinets renhet. Den første HIC var Octyl Sepharose 4FF (Cat# 17-0946-02, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Poolen av ADA-fraksjoner fra Capto Q-søyle ble justert til
30 1,5M (NH₄)₂SO₄ med ammoniumsulfatpulver direkte, og pH-en ble justert til 6,5. Den filtrerte prøve (Nalgene Nunc, CAT #540887, MEMB 0.2 PES, Rochester, NY) ble lastet på 1st HIC-søylen, som var forhåndsekvilibrert med 1,5M

(NH₄)₂SO₄, 20mM kaliumfosfat, 1mM EDTA, pH 6,5 (sengvolum 150 ml, i XK-50, GE Healthcare, Piscataway, NJ). ADA-proteinet ble vasket ut med en ammoniumsulfatgradient, og denne elusjonens renhetsprofil ble bestemt ved hjelp av SDS-PAGE og RP-HPLC. ADA-proteinet i fraksjonene i første HIC-søyle ble polet og justert til 1M (NH₄)₂SO₄ og lastet direkte på den andre HIC-søyle (sengevolum 150 ml, XK-50, HIC Phenyl HP, Cat# 17-1082-01, Piscataway, NJ), som var forhåndsekvilibrert med 1M (NH₄)₂SO₄, 20mM KH₂PO₄-K₂HPO₄, 1mM EDTA, pH 6,5. ADA ble vasket ut med en ammoniumsulfatgradient fra 1M til 300mM i den 20mMKH₂PO₄-K₂HPO₄, 1mM EDTA, pH 6,5. Disse fraksjonenes ADA-renhet ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE og RP-HPLC. Det rensede rbADA eller rhADA ble ytterligere avsaltet og konsentrert i et LabScale™ TFF-systemer (Membrane BioMax 5, Bedford, MA) mot lagringsbufferen (for eksempel 100mM natriumfosfat, 1mM EDTA, pH 6,5).

15 **EKSEMPEL 7**

FREMSTILLING AV PEGYLERT SER₇₄-rbADA VIA URETANBINDING

[0167] SC-PEG (N-hydroksysuccinimidylkarbonat-aktivert polyetylen glykol, 0,084 mmol) tilsettes til en løsning av Ser₇₄-rbADA (0,00027 mmol) i 3 mL natriumfosfatbuffer (0,1M, pH 7,8) med forsiktig omrøring. Løsningen omrøres ved 30°C i 30 minutter. En GPC-søyle (Zorbax GF-450) anvendes til å overvåke PEG-konjugasjonen. Ved enden av reaksjonen (som vist ved fraværet av det native enzym) fortynnes blandingen med 12 mL formuleringsbuffer (0,05M natriumfosfat, 0,85% natriumklorid, pH 7,3) og diafiltreres med en Centriprep konsentrator (Amicon) for å fjerne den ureagerede PEG. Diafiltrering fortsettes etter behov ved 4°C helt til intet mer fritt PEG detekteres, ved å blande en lik del filtret og 0,1% PMA (polymetakrylsyre i 0,1M HCl).

EKSEMPEL 8**FREMSTILLING AV PEGYLERT SER₇₄-rhADA VIA URETANBINDING**

5 [0168] SC-PEG (0,084 mmol) bringes til å reagere med Ser₇₄-rhADA (0,00027 mmol) under anvendelse av de samme betingelser som er beskrevet i eksempel 7.

EKSEMPEL 9**FREMSTILLING AV PEGYLERT SER₇₄-rbADA VIA AMIDBINDING**

10

[0169] SS-PEG (N-hydroksysuccinimidylsuccinat-aktivert polyetylenglykol, 0,084 mmol) tilsettes til en løsning av Ser₇₄-rbADA (0,00027 mmol) i 3 mL natriumfosfatbuffer (0,1M, pH 7,8) med forsiktig omrøring. Løsningen omrøres ved 30°C i 30 minutter. En GPC-søyle (Zorbax GF-450) anvendes til å overvåke PEG-konjugasjonen. Ved enden av reaksjonen (som vist ved fraværet av det native enzym) fortynnes blandingen med 12 mL formuleringsbuffer (0,05M natriumfosfat, 0,85% natriumklorid, pH 7,3) og diafiltreres med en Centriprep konsentrator (Amicon) for å fjerne den ureagerte PEG. Diafiltrering fortsettes etter behov ved 4°C helt til intet mer fritt PEG detekteres, ved å blande en lik del 15
20 filtret og 0,1% PMA (polymetakrylsyre i 0,1M HCl).

EKSEMPEL 10**FREMSTILLING AV PEGYLERT MUTEIN rhADA VIA AMIDBINDING**

25 [0170] SS-PEG (0,084 mmol) bringes til å reagere med mutein rhADA

(0,00027 mmol) under anvendelse av de samme betingelser som er beskrevet i eksempel 9.

SEKVENSLISTE

5

[0171]

<110> ENZON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> ENZYMATIC ANTICANCER THERAPY

<130> 27.L8308.12.EP.2W

10

<140> Not yet assigned

<141> On even date herewith

<150> PCT/US08/60733

<151> 2008-04-18

<150> US 60/913,039

15

<151> 2007-04-20

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 356

20

<212> PRT

<213> Bovine

<220>

<221> misc_feature

<222> (74)..(74)

<223> Cys to Ser mutein

<400> 1

Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asn Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val His
 1 5 10 15
 Leu Asp Gly Ala Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Lys
 20 25 30
 Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Pro Glu Glu Leu Gln Asn Ile
 35 40 45
 Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Ser Leu Pro Glu Phe Leu Ala Lys Phe
 50 55 60
 Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Ser Arg Glu Ala Val Lys Arg
 65 70 75 80
 Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Asp Gly Val Val Tyr
 85 90 95
 Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val Glu
 100 105 110
 Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu Val
 115 120 125
 Val Ser Leu Val Asn Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe Gly
 130 135 140

Val Lys Val Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Ser Trp
 145 150 155 160
 Ser Ser Glu Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Glu Gln Thr Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Glu Gly Ser Ser Leu
 180 185 190
 Phe Pro Gly His Val Lys Ala Tyr Ala Glu Ala Val Lys Ser Gly Val
 195 200 205
 His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Asn Val Val Lys
 210 215 220
 Glu Ala Val Asp Thr Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr His
 225 230 235 240
 Thr Leu Glu Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn Met
 245 250 255
 His Phe Glu Val Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp Lys
 260 265 270
 Pro Asp Thr Glu His Pro Val Val Arg Phe Lys Asn Asp Gln Val Asn
 275 280 285
 Tyr Ser Leu Asn Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu Asp
 290 295 300
 Thr Asp Tyr Gln Met Thr Lys Asn Glu Met Gly Phe Thr Glu Glu Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Arg Leu Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro Glu
 325 330 335
 Asp Glu Lys Lys Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly Met
 340 345 350
 Pro Ser Pro Ala
 355

<210> 2

<211> 1074

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 2

```

atggctcaga ccccggttt caacaaaccg aaggtagaac tgcacgtaca cctggatggt      60
gctatcaaac cggagactat cctgtactat ggtcgtaagc gtggcatcgc tctgccggct      120
gacactccgg aagaactgca gaacatcatc ggcatggaca aaccgctgtc tctgccggaa      180

ttcctggcta aattcgacta ctacatgccg gctatcgctg gttctcgtga agcagtcaaa      240
cgtatcgctt acgaattcgt agaaatgaaa gctaaagatg gtgtagtata cgttgaagtt      300
cgttactctc cgcacctgct ggcaaaactct aaagttgaac cgatcccgtg gaaccaggca      360
gaaggcgatc tgactccgga tgaagtagtt tctctgggta accagggctt gcaggagggt      420
gaacgcgatt tcggcgtaaa agttcgttct atcctgtgct gcatgcgcca ccagccgtct      480
tggtcttctg aagttgttga actgtgcaag aaataccgtg agcagaccgt agttgctatc      540
gatctggcag gtgatgaaac catcgaaggt tcttctctgt ttccgggtca cgtaaaggct      600
tatgctgaag ctgttaaate tggcgtacac cgtactgtac acgcaggtga agttggttct      660
gctaacgttg ttaaagaagc tgttgacacc ctgaaaactg aacgcctggg tcacggctac      720
cacaccctgg aagacaccac cctgtacaac cgtctgcgtc aggaaaacat gcacttcgaa      780
gtttgtccgt ggtcctctta cctgactggt gcttggaaac cggacaccga acaccgggtt      840
gttcgtttca aaaacgacca ggtaaaactac tctctgaaca ctgacgatcc gctgatcttc      900
aaatctaccc tggacaccga ctaccagatg accaaaaacg aaatgggttt cactgaagaa      960
gaattcaaac gtctgaacat caacgctgct aagtcctctt ttctgccgga agatgagaaa     1020
aaagaactgc tggacctgct gtacaaggca tacgggatgc cgtctccggc ttaa          1074

```

5

<210> 3

<211> 362

<212> PRT

<213> Human

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (74)..(74)

<223> Cys to Ser mutein

<400> 3

Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asp Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val His
 1 5 10 15
 Leu Asp Gly Ser Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Arg
 20 25 30
 Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asn Thr Ala Glu Gly Leu Leu Asn Val
 35 40 45
 Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Thr Leu Pro Asp Phe Leu Ala Lys Phe
 50 55 60
 Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Ser Arg Glu Ala Ile Lys Arg
 65 70 75 80
 Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Glu Gly Val Val Tyr
 85 90 95

Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val Glu
 100 105 110
 Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu Val
 115 120 125
 Val Ala Leu Val Gly Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe Gly
 130 135 140
 Val Lys Ala Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Asn Trp
 145 150 155 160
 Ser Pro Lys Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Gln Gln Gln Thr Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Pro Gly Ser Ser Leu
 180 185 190
 Leu Pro Gly His Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Val Lys Ser Gly Ile
 195 200 205
 His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Glu Val Val Lys
 210 215 220
 Glu Ala Val Asp Ile Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr His
 225 230 235 240
 Thr Leu Glu Asp Gln Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn Met
 245 250 255
 His Phe Glu Ile Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp Lys
 260 265 270
 Pro Asp Thr Glu His Ala Val Ile Arg Leu Lys Asn Asp Gln Ala Asn
 275 280 285
 Tyr Ser Leu Asn Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu Asp
 290 295 300
 Thr Asp Tyr Gln Met Thr Lys Arg Asp Met Gly Phe Thr Glu Glu Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Arg Leu Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro Glu
 325 330 335
 Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly Met
 340 345 350
 Pro Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Asn Leu
 355 360

<210> 4

<211> 1089

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

```

atggctcaga caccgcatt tgataaacg aaagtggaac tgcattgcca cctggatggt      60
agcatcaaac cggaactat cttatattac ggtcggcgtc gtggtattgc gttgccggca     120
aacacggctg aaggtttgct gaacgtgatc ggcattggaca aaccgctgac cttgccggat     180
tttttgccga aatttgatta ttatatgccg gcgattgctg gttcccgcga ggcaatcaaa     240
cgcatcgcgt atgagtttgt tgaatgaaa gcgaaagaag gcgttggtgta tgttgaggtc     300
cgttacagtc cgcatctgct ggctaacagc aaggtagaac ctatcccctg gaaccaagct     360
gaaggcagtc tgacgccgga tgaagtgggt gctctgggtg gtcagggttt acaggagggg     420
gagcgcgatt ttggcgtaa agctcgtctt attttatggt gcatgcgcca tcagcccaat     480
tggtccccga aagtggttga actttgtaa aagtaccaac aacagaccgt tgtcgcgatt     540
gatttgccag gcatgaaac aattccaggc agctccctgt tgccagggca cgtgcaagcg     600
taccaagaag cagtgaaaag cggcatccac cggactgtcc acgccggcga ggtcggtagc     660
gccgaggttg tgaagaagc cgtggacatc ctgaaaaccg agcggctggg ccatgggtac     720
cacacactgg aggatcaggc attatataac cgcttacgcc aggaaaatat gcatttcgaa     780
atgtgtccgt ggagtagtta cttactggc gcgtggaaac cggataccga acatgcggtt     840
atccgcttaa agaattgatc agcaaattac agtctgaata cagatgatcc cctgattttc     900
aagtctaccc tggacacaga ttatcagatg acgaagcggg atatgggatt tacggaagaa     960
gaatttaagc gtctcaatat caatcggcgc aaatcttcat ttctgccgga agatgagaaa    1020
cgtgagttgc tggatcttct gtacaaggcc tacggtatgc cgccgagcgc atcgccggg    1080
cagaacctg                                     1089

```

5

<210> 5

<211> 356

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 5

```

Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asn Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val His
 1          5          10          15
Leu Asp Gly Ala Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Lys
          20          25          30
Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Pro Glu Glu Leu Gln Asn Ile
          35          40          45
Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Ser Leu Pro Glu Phe Leu Ala Lys Phe
 50          55          60

```

10

Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Cys Arg Glu Ala Val Lys Arg
 65 70 75 80
 Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Asp Gly Val Val Tyr
 85 90 95
 Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val Glu
 100 105 110
 Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu Val
 115 120 125
 Val Ser Leu Val Asn Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe Gly
 130 135 140
 Val Lys Val Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Ser Trp
 145 150 155 160
 Ser Ser Glu Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Glu Gln Thr Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Glu Gly Ser Ser Leu
 180 185 190
 Phe Pro Gly His Val Lys Ala Tyr Ala Glu Ala Val Lys Ser Gly Val
 195 200 205
 His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Asn Val Val Lys
 210 215 220
 Glu Ala Val Asp Thr Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr His
 225 230 235 240
 Thr Leu Glu Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn Met
 245 250 255
 His Phe Glu Val Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp Lys
 260 265 270
 Pro Asp Thr Glu His Pro Val Val Arg Phe Lys Asn Asp Gln Val Asn
 275 280 285
 Tyr Ser Leu Asn Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu Asp
 290 295 300
 Thr Asp Tyr Gln Met Thr Lys Asn Glu Met Gly Phe Thr Glu Glu Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Arg Leu Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro Glu
 325 330 335
 Asp Glu Lys Lys Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly Met
 340 345 350
 Pro Ser Pro Ala
 355

Patentkrav

- 5 **1.** Adenosindeaminase konjugert til en i det vesentlige ikke-antigen polymer til anvendelse i behandlingen av en tumor.
- 10 **2.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, til anvendelse for i det vesentlige å redusere vevsnivåer av adenosin eller deoksyadenosin, og hvor vekst eller spredning av tumoren inhiberes ved reduserte vevsnivåer av adenosin.
- 15 **3.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, hvor tumoren er en solid tumor.
- 4.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, hvor tumoren velges fra gruppen bestående av prostatatumor, eggstokkreft og kolorektalkreft.
- 20 **5.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 4, hvor tumoren velges fra gruppen bestående av prostatatumor og eggstokkreft.
- 6.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, hvor den i det vesentlige ikke-antigene polymer er et polyalkylenoksid.
- 25 **7.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 6, hvor polyalkylenoksidet er polyetylenglykol.
- 8.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 6, hvor den i det vesentlige ikke-antigene polymer er i størrelsesområdet på fra cirka 4000 til cirka 45 000 Dalton.
- 30

- 9.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, hvor dosen av konjugert adenosindeaminase er i området på fra cirka 10U til cirka 30U per kg.
- 10.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, hvor anvendelsen av adenosindeaminase finner sted i en tidsperiode som er i området fra 1 til cirka 20 dager.
- 11.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, hvor konjugatet omfatter to eller flere molekyler av adenosindeaminase for hver i det vesentlige ikke-antigen polymer.
- 12.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, hvor adenosindeaminasen omfatter fra cirka 11 til cirka 18 polyetylenglykolstrenger forbundet med epsilon-aminogrupeer av én eller flere Lys-rester av adenosindeaminasen.
- 13.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 6 eller 12, hvor adenosindeaminasen konjugeres til polyetylenglykolen via en uretanbinding.
- 14.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1, hvor adenosindeaminasen er adenosindeaminase rensset fra en bovin kilde eller er en rekombinant adenosindeaminase.
- 15.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 14, hvor den rekombinante adenosindeaminase velges fra gruppen bestående av rekombinant bovin adenosindeaminase som omfatter SEQ ID NO: 1, rekombinant human adenosindeaminase som omfatter SEQ ID NO: 3, og rekombinant bovin adenosindeaminase som omfatter SEQ ID NO: 5.
- 16.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1 eller 15, hvor den rekombinante adenosindeaminase er rekombinant bovin adenosindeaminase som omfatter SEQ ID NO: 1.

- 17.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge krav 1 eller 15, hvor den rekombinante adenosindeaminase er rekombinant bovin adenosindeaminase som omfatter SEQ ID NO: 5.
- 5 **18.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17, hvor den rekombinante bovine adenosindeaminase som omfatter SEQ ID NO: 5, omfatter en Cys74 som er capped for å forebygge oksidasjon i et vandig medium.
- 10 **19.** Adenosindeaminase til anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17, hvor den rekombinante adenosindeaminase er ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 5, med en aminosyresubstitusjon valgt fra gruppen bestående av Gln i stedet for Lys₁₉₈; Ala i stedet for Thr₂₄₅; Arg i stedet for Gly₃₅₁, og kombinasjoner derav.

15