



No. 12-020409- -00000-0000

Fecha: 2012-02-06 16:36:21
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 98



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: L-ASPARAGINASA TRATADA CON PEG.

SOLICITANTES: ALIZE PHARMA II.

DIRECCIÓN: 15 Chemin Du Saquin Espace Europeen, F-69130 Ecully,
Francia.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 06 de Febrero de 2012

P2012/000012

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & AS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-020409- -00000-0000

Fecha: 2012-02-06 16:36:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 98

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000012

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: ALIZE PHARMA II.

Dirección: 15 Chemin Du Saquin Espace
Europeen, F-69130 Ecully, Francia.

Nacionalidad o Domicilio: Francesa

Lugar de Constitución: Francesa

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: Thierry ABRIBAT.

Dirección: 124 Chemin de Montray, F-69110 Sainte Foy Les Lyon. Francia.

Nacionalidad o Domicilio: 1) Francesa.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/059599

Fecha Julio 06, 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/003886

Fecha Enero 13, 2011

6

Título (54) L-ASPARAGINASA TRATADA CON PEG.

/Clasificación Internacional (51) A61K 47/48; C12N 9/82; A61P 35/02.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

EP

(32) Fecha

Julio 06, 2009

Marzo 30, 2010

(31) Número de Solicitud

61/223.320

PCT/EP2010/054156

9

Comprobante de pago No. 12-

Fecha Febrero de 2012



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



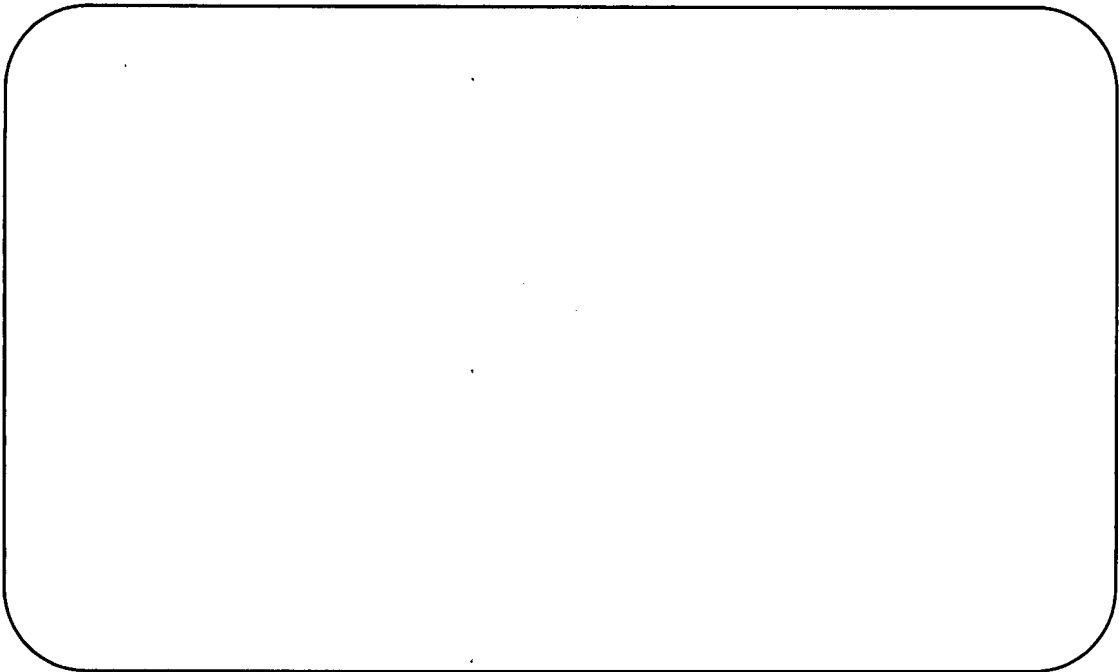
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

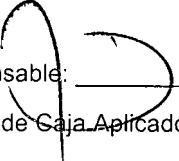
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 009881
		Bogotá D.C., Febrero 01 de 2012 - 11:04:46

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	408377384	31/01/2012	2.360.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			\$590.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-020409- -00000-0000
Fecha: 2012-02-06 16:36:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 98

3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 January 2011 (13.01.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/003886 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C12N 9/82 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/059599

(22) International Filing Date:
6 July 2010 (06.07.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/223,320 6 July 2009 (06.07.2009) US
PCT/EP2010/054156 30 March 2010 (30.03.2010) EP

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **ALIZE PHARMA II** [FR/FR]; 15 Chemin Du Saquin Espace Europeen, F-69130 Ecully (FR).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (*for US only*): **ABRIBAT, Thierry** [FR/FR]; 124 Chemin de Montray, F-69110 Sainte Foy Les Lyon (FR).

(74) Agent: **TETAZ, Franck**; Cabinet Regimbeau, 139 rue Vendome, F-69477 Lyon Cecex 06 (FR).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*
- *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

- *with international search report (Art. 21(3))*
- *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: PEGYLATED L-ASPARAGINASE

(57) Abstract: Disclosed is a conjugate of a protein having substantial L-asparagine aminohydrolase activity and polyethylene glycol. In particular, the polyethylene glycol has a molecular weight less than or equal to about 5000 Da and the protein is an L-asparaginase from *Erwinia*. The conjugate of the invention has shown superior properties such as maintenance of a high level of in vitro activity and an unexpected increase in half-life in vivo. Also disclosed are methods of producing the conjugate and use of the conjugate in therapy. In particular, a method is disclosed for use of the conjugate in the treatment of cancer, particularly Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). More specifically, a method is disclosed for use of the conjugate as a second line therapy for patients who have developed hypersensitivity or have had a disease relapse after treatment with other L-asparaginase preparations.

WO 2011/003886 A1

Q

PEGYLATED L-ASPARAGINASE

Background of the invention

Field of the Invention

[0001] The present invention concerns a conjugate of a protein having substantial L-asparagine
5 aminohydrolase activity and polyethylene glycol, particularly wherein the polyethylene glycol
has a molecular weight less than or equal to about 5000 Da, particularly a conjugate wherein the
protein is a L-asparaginase from *Erwinia*, and its use in therapy.

Background

[0002] Proteins with L-asparagine aminohydrolase activity, commonly known as L-
10 asparaginases, have successfully been used for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia
(ALL) in children for many years. ALL is the most common childhood malignancy (Avramis
and Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393).

[0003] L-asparaginase has also been used to treat Hodgkin's disease, acute myelocytic
15 leukemia, acute myelomonocytic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, lymphosarcoma,
reticulosarcoma, and melanosarcoma (Kotzia and Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669).
The anti-tumor activity of L-asparaginase is believed to be due to the inability or reduced ability
of certain malignant cells to synthesize L-asparagine (Kotzia and Labrou, *J. Biotechnol.* 127
(2007) 657-669). These malignant cells rely on an extracellular supply of L-asparagine.
20 However, the L-asparaginase enzyme catalyzes the hydrolysis of L-asparagine to aspartic acid
and ammonia, thereby depleting circulating pools of L-asparagine and killing tumor cells which
cannot perform protein synthesis without L-asparagine (Kotzia and Labrou, *J. Biotechnol.* 127
(2007) 657-669).

[0004] L-asparaginase from *E. coli* was the first enzyme drug used in ALL therapy and has been
25 marketed as Elspar® in the USA or as Kidrolase® and L-asparaginase Medac® in Europe. L-
asparaginases have also been isolated from other microorganisms, e.g., an L-asparaginase protein
from *Erwinia chrysanthemi*, named crisantaspase, that has been marketed as Erwinase®
(Wriston Jr., J.C. (1985) "L-asparaginase" *Meth. Enzymol.* 113, 608-618; Goward, C.R. et al.
(1992) "Rapid large scale preparation of recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase",
Bioseparation 2, 335-341). L-asparaginases from other species of *Erwinia* have also been
30 identified, including, for example, *Erwinia chrysanthemi* 3937 (Genbank Accession
#AAS67028), *Erwinia chrysanthemi* NCPB 1125 (Genbank Accession #CAA31239), *Erwinia*
carotovora (Genbank Accession #AAP92666), and *Erwinia carotovora* subsp. *Astroseptica*
(Genbank Accession #AAS67027). These *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginases have about
91-98% amino acid sequence identity with each other, while the *Erwinia carotovora* L-

asparaginases have approximately 75-77% amino acid sequence identity with the *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginases (Kotzia and Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669).

[0005] L-asparaginases of bacterial origin have a high immunogenic and antigenic potential and frequently provoke adverse reactions ranging from mild allergic reaction to anaphylactic shock in sensitized patients (Wang, B. et al. (2003) "Evaluation of immunologic cross reaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL and lymphoma patients), *Leukemia* 17, 1583-1588). *E. coli* L-asparaginase is particularly immunogenic, with reports of the presence of anti-asparaginase antibodies to *E. coli* L-asparaginase following i.v. or i.m. administration reaching as high as 78% in adults and 70% in children (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588).

[0006] L-asparaginases from *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* differ in their pharmacokinetic properties and have distinct immunogenic profiles, respectively (Klug Albertsen, B. et al. (2001) "Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system" *Brit. J. Haematol.* 115, 983-990). Furthermore, it has been shown that antibodies that developed after a treatment with L-asparaginase from *E. coli* do not cross react with L-Asparaginase from *Erwinia* (Wang, B. et al., *Leukemia* 17 (2003) 1583-1588). Thus, L-asparaginase from *Erwinia* (crisantaspase) has been used as a second line treatment of ALL in patients that react to *E. coli* L-asparaginase (Duval, M. et al. (2002) "Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Children's Leukemia Group phase 3 trial" *Blood* 15, 2734-2739; Avramis and Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393).

[0007] In another attempt to reduce immunogenicity associated with administration of microbial L-asparaginases, an *E. coli* L-asparaginase has been developed that is modified with methoxy-polyethyleneglycol (mPEG). This method is commonly known as "PEGylation" and has been shown to alter the immunological properties of proteins (Abuchowski, A. et al. (1977) "Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol," *J.Biol.Chem.* 252 (11), 3578-3581). This so-called mPEG-L-asparaginase, or pegaspargase, marketed as Oncaspar® (Enzon Inc., USA), was first approved in the U.S. for second line treatment of ALL in 1994, and has been approved for first-line therapy of ALL in children and adults since 2006. Oncaspar® has a prolonged *in vivo* half-life and a reduced immunogenicity/antigenicity.

[0008] Oncaspar® is *E. coli* L-asparaginase that has been modified at multiple lysine residues using 5 kDa mPEG-succinimidyl succinate (SS-PEG) (U.S. Patent No. 4,179,337). SS-PEG is a PEG reagent of the first generation that contains an instable ester linkage that is sensitive to

hydrolysis by enzymes or at slightly alkaline pH values (U.S. Patent No. 4,670,417; *Makromol. Chem.* 1986, 187, 1131-1144). These properties decrease both *in vitro* and *in vivo* stability and can impair drug safety.

[0009] Furthermore, it has been demonstrated that antibodies developed against L-asparaginase from *E. coli* will cross react with Oncaspar® (Wang; B. *et al.* (2003) "Evaluation of immunologic cross-reaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL and lymphoma patients)," *Leukemia* 17, 1583-1588). Even though these antibodies were not neutralizing, this finding clearly demonstrated the high potential for cross-hypersensitivity or cross-inactivation *in vivo*. Indeed, in one report 30-41% of children who received pegaspargase had an allergic reaction (Wang, B. *et al.* (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588).

[0010] In addition to outward allergic reactions, the problem of "silent hypersensitivity" was recently reported, whereby patients develop anti-asparaginase antibodies without showing any clinical evidence of a hypersensitivity reaction (Wang, B. *et al.* (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588). This reaction can result in the formation of neutralizing antibodies to *E. coli* L-asparaginase and pegaspargase; however, these patients are not switched to *Erwinia* L-asparaginase because there are not outward signs of hypersensitivity, and therefore they receive a shorter duration of effective treatment (Holcenberg, J., *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 26 (2004) 273-274).

[0011] *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase treatment is often used in the event of hypersensitivity to *E. coli*-derived L-asparaginases. However, it has been observed that as many as 30-50% of patients receiving *Erwinia* L-asparaginase are antibody-positive (Avramis and Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). Moreover, because *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase has a significantly shorter elimination half-life than the *E. coli* L-asparaginases, it must be administered more frequently (Avramis and Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). In a study by Avramis *et al.*, *Erwinia* asparaginase was associated with inferior pharmacokinetic profiles (Avramis *et al.*, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 29 (2007) 239-247). *E. coli* L-asparaginase and pegaspargase therefore have been the preferred first-line therapies for ALL over *Erwinia* L-asparaginase.

[0012] Numerous biopharmaceuticals have successfully been PEGylated and marketed for many years. In order to couple PEG to a protein, the PEG has to be activated at its OH terminus. The activation group is chosen based on the available reactive group on the protein that will be PEGylated. In the case of proteins, the most important amino acids are lysine, cysteine, glutamic acid, aspartic acid, C-terminal carboxylic acid and the N-terminal amino group. In view of the wide range of reactive groups in a protein nearly the entire peptide chemistry has been applied to activate the PEG moiety. Examples for this activated PEG-reagents are activated carbonates, *e.g.*, p-nitrophenyl carbonate, succinimidyl carbonate; active esters, *e.g.*, succinimidyl ester; and for site specific coupling aldehydes and maleimides have been developed (Harris, M., *Adv. Drug*

Del. Rev. 54 (2002), 459-476). The availability of various chemical methods for PEG modification shows that each new development of a PEGylated protein will be a case by case study. In addition to the chemistry the molecular weight of the PEG that is attached to the protein has a strong impact on the pharmaceutical properties of the PEGylated protein. In most cases it is expected that, the higher the molecular weight of the PEG, the better the improvement of the pharmaceutical properties (Sherman, M. R., *Adv. Drug Del. Rev.* 60 (2008), 59-68; Holtsberg, F.W., *Journal of Controlled Release* 80 (2002), 259-271). For example, Holtsberg *et al.* found that, when PEG was conjugated to arginine deaminase, another amino acid degrading enzyme isolated from a microbial source, pharmacokinetic and pharmacodynamic function of the enzyme increased as the size of the PEG attachment increased from a molecular weight of 5000 Da to 20,000 Da (Holtsberg, F.W., *Journal of Controlled Release* 80 (2002), 259-271).

[0013] However, in many cases, PEGylated biopharmaceuticals show significantly reduced activity compared to the unmodified biopharmaceutical (Fishburn, C.S. (2008) Review "The Pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics" *J. Pharm. Sci.*, 1-17). In the case of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, it has been observed that PEGylation reduced its *in vitro* activity to approximately 57% (Kuchumova, A.V. *et al.* (2007) "Modification of Recombinant asparaginase from *Erwinia carotovora* with Polyethylene Glycol 5000" *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 1, 230-232). The L-asparaginase from *Erwinia carotovora* has only about 75% homology to the *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase (crisantaspase). For Oncaspar® it is also known that its *in vitro* activity is approximately 50% compared to the unmodified *E. coli* L-asparaginase.

[0014] The currently available L-asparaginase preparations do not provide alternative or complementary therapies--particularly therapies to treat ALL--that are characterized by high catalytic activity and significantly improved pharmacological and pharmacokinetic properties, as well as reduced immunogenicity.

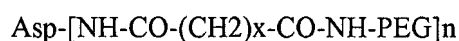
BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0015] The present invention is directed to a conjugate of a protein having substantial L-asparagine aminohydrolase activity and polyethylene glycol, wherein the polyethylene glycol has a molecular weight less than or equal to about 5000 Da, particularly a conjugate where the protein is a L-asparaginase from *Erwinia*. In one embodiment, the conjugate comprises an L-asparaginase from *Erwinia* having at least 80% identity to the amino acid of SEQ ID NO:1 and polyethylene glycol (PEG), wherein the PEG has a molecular weight less than or equal to about 5000 Da. In one embodiment, the L-asparaginase has at least about 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% identity to the amino acid of SEQ ID NO:1. In

some embodiments, the PEG has a molecular weight of about 5000 Da, 4000 Da, 3000 Da, 2500 Da, or 2000 Da. In one embodiment, the conjugate has an *in vitro* activity of at least 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% as compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG. In another embodiment, the conjugate has an L-asparagine depletion activity at least about 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100 times more potent than the L-asparaginase when not conjugated to PEG. In another embodiment, the conjugate depletes plasma L-asparagine levels to an undetectable level for at least about 12, 24, 48, 96, 108, or 120 hours.

[0016] In one embodiment, the conjugate has a longer *in vivo* circulating half life compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG. In a specific embodiment, the conjugate has a longer $t_{1/2}$ than pegaspargase (*i.e.*, PEG-conjugated L-asparaginase from *E. coli*) administered at an equivalent protein dose (*e.g.*, measured in $\mu\text{g/kg}$). In a more specific embodiment, the conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 58 to about 65 hours at a dose of about 50 $\mu\text{g/kg}$ on a protein content basis, and a $t_{1/2}$ of at least about 34 to about 40 hours at a dose of about 10 $\mu\text{g/kg}$ on a protein content basis, following iv administration in mice. In another specific embodiment, the conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 100 to about 200 hours at a dose ranging from about 10,000 to about 15,000 IU/ m^2 (about 20-30 mg protein/ m^2). In one embodiment, the conjugate has a greater area under the curve (AUC) compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG. In a specific embodiment, the conjugate has a mean AUC that is at least about 3 times greater than pegaspargase at an equivalent protein dose.

[0017] In one embodiment, the PEG is covalently linked to one or more amino groups (wherein "amino groups" includes lysine residues and/or the N-terminus) of the L-asparaginase. In a more specific embodiment, the PEG is covalently linked to the one or more amino groups by an amide bond. In another specific embodiment, the PEG is covalently linked to at least from about 40% to about 100% of the accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus of the protein) or at least from about 40% to about 90% of total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus of the protein). In one embodiment, the conjugate has the formula:



wherein Asp is the L-asparaginase, NH is one or more of the NH groups of the lysine residues and/or the N-terminus of the Asp, PEG is a polyethylene glycol moiety, n is a number that represents at least about 40% to about 100% of the accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) in the Asp, and x is an integer ranging from about 1 to about 8, more specifically, from about 2 to about 5. In a specific embodiment, the PEG is monomethoxy-polyethylene glycol (mPEG).

[0018] In another aspect, the invention is directed to a method of making a conjugate comprising combining an amount of PEG with an amount of the L-asparaginase in a buffered solution for a time period sufficient to covalently link the PEG to the L-asparaginase.

[0019] In another aspect, the invention is directed to a pharmaceutical composition comprising the conjugate of the invention.

[0020] In another aspect, the invention is directed to a method of treating a disease treatable by L-asparagine depletion in a patient comprising administering an effective amount of the conjugate of the invention. In one embodiment, the disease is a cancer. In a specific embodiment, the cancer is ALL. In another specific embodiment, the conjugate is administered at an amount of about 5 U/kg body weight to about 50 U/kg body weight. In another specific embodiment, the conjugate is administered at a dose ranging from about 10,000 to about 15,000 IU/m² (about 20-30 mg protein/m²). In some embodiments, the administration may be intravenous or intramuscular and may be less than once per week (e.g., once per month or once every other week), once per week, twice per week, or three times per week. In other specific embodiments, the conjugate is administered as monotherapy and, more specifically, without an asparagine synthetase inhibitor. In other embodiments, the conjugate is administered as part of a combination therapy (but in some embodiments, the combination therapy does not comprise an asparagine synthetase inhibitor). In a specific embodiment, the patient receiving treatment has had a previous hypersensitivity to an *E. coli* asparaginase or PEGylated form thereof or to an *Erwinia* asparaginase. In another specific embodiment, the patient receiving treatment has had a disease relapse, in particular a relapse that occurs after treatment with an *E. coli* asparaginase or PEGylated form thereof.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS/FIGURES

[0021] Figure 1: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. Purified recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase (r-crisantaspase) was analyzed on SDS-PAGE. Protein bands were stained with silver nitrate. Lane 1: Molecular Weight Marker (116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, and 14.4kDa), lane 2: purified recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase (r-crisantaspase).

[0022] Figure 2: SDS-PAGE analysis of mPEG-r-crisantaspase conjugates.

[0023] Figure 3: Plasma L-asparagine levels following a single intravenous dose of Erwinase® (5U/kg, 25U/kg, 125U/kg and 250U/kg body weight).

[0024] Figure 4: Plasma L-asparagine levels following a single intravenous injection of mPEG-r-crisantaspase conjugates compared to Erwinase® in mice. The numbers "40%" and "100%"

7

indicate an approximate degree of PEGylation of, respectively, about 40-55% (partially PEGylated) and about 100% (maximally PEGylated) of the accessible amino groups.

[0025] Figure 5: Area under the curves (AUC) (residual enzymatic activity) calculated from L-asparaginase profiles following a single intravenous injection of mPEG-r-crisantaspase conjugates in mice.

[0026] Figure 6: Plasma L-asparagine levels following a single intravenous dose in mice of 2 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase (5U/kg, 25U/kg and 50U/kg body weight) (Figure 6A), 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase (5U/kg, 25U/kg and 50U/kg body weight) (Figure 6B), or 2 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase (5U/kg), 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase (5U/kg), and pegaspargase (Oncaspar®) (1 U/kg) (Figure 6C). Administration of an equivalent quantity of protein (10µg/kg) of either 2 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase (5 U/kg), 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase (5 U/kg), or pegaspargase (Oncaspar®, 1 U/kg), resulted in a similar L-asparagine depletion over 72 hours.

[0027] Figure 7: Dose-effect Relationship of 2 kDa-100% PEGylated r-crisantaspase compared to 5 kDa-100% PEGylated r-crisantaspase. Figure 7A shows the residual enzymatic activity in plasma following a single intravenous dose of 2 kDa-100% PEGylated r-crisantaspase at 5 U/kg (10µg/kg on a protein content basis), 25 U/kg, and 50 U/kg. Figure 7B shows the residual enzymatic activity in plasma following a single intravenous dose of 5 kDa-100% PEGylated r-crisantaspase at 5 U/kg (10µg/kg on a protein content basis), 25 U/kg, and 50 U/kg.

[0028] Figure 8: Dose-effect relationship of 2 kDa-100% PEGylated r-crisantaspase compared to 5 kDa-100% PEGylated r-crisantaspase. AUCs of the residual enzymatic activity measured in mice after a single intravenous dose of 2 kDa-100% or 5 kDa-100% mPEG-conjugates. Overall, when compared at the same dose level, AUCs measured for the 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase were higher than those observed for the 2-kDa-100% mPEG-r-crisantaspase. A difference of 31, 37, and 14% was observed at 5, 25, and 50 U/kg doses, respectively.

[0029] Figure 9: Pharmacokinetics of mPEG-r-crisantaspase conjugates vs. pegaspargase (Oncaspar®) in mice. Figure 9A represents the residual enzymatic activity measured in mice after a single intravenous dose of 2 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase, 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase, or pegaspargase (Oncaspar®). Figure 9B represents AUCs of the residual enzymatic activity measured in mice after a single intravenous dose of 2 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase, 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspase, or pegaspargase (Oncaspar®).

[0030] Figure 10: Serum levels of anti-crisantaspase specific antibodies after treatment with mPEG-r-crisantaspase conjugates or Erwinase®. Antibodies are directed toward crisantaspase. Data are expressed as means ± SD (N=8).

[0031] Figure 11: Serum levels of anti-conjugate specific antibodies after treatment with mPEG-r-crisantaspase maximally (100%) PEGylated conjugates. Figure 11A: results presented

as mean $\pm$ SD (n=8); Figure 11B: results presented as the percentage of animals with absorbance values > 0.5 in the anti-conjugate ELISA.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0032] In one aspect, the problem to be solved by the invention is to provide an L-asparaginase preparation with:

- High *in vitro* bioactivity;
- A stable PEG-protein linkage;
- Prolonged *in vivo* half-life;
- Significantly reduced immunogenicity, as evidenced, for example, by the reduction or elimination of an antibody response against the L-asparaginase preparation following repeated administrations; and
- Usefulness as a second-line therapy for patients who have developed sensitivity to first-line therapies using, e.g., *E. coli*-derived L-asparaginases.

[0033] This problem has not been solved by known L-asparaginase conjugates, which either have significant cross-reactivity with modified L-asparaginase preparations (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588, incorporated herein by reference in its entirety), or which have considerably reduced *in vitro* activity (Kuchumova, A.V. et al. (2007) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 1, 230-232, incorporated herein by reference in its entirety). This problem is solved according to the present invention by providing a conjugate of *Erwinia* L-asparaginase with a hydrophilic polymer, more specifically, a polyethylene glycol with a molecular weight of 5000 Da or less, a method for preparing such a conjugate and the use of the conjugate.

[0034] Described herein is a PEGylated L-asparaginase from *Erwinia* with improved pharmacological properties as compared with the unmodified L-asparaginase protein, as well as compared to the pegaspargase preparation from *E. coli*. The PEGylated L-asparaginase conjugate described herein, e.g., *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase PEGylated with 5000 Da molecular weight PEG, serves as a therapeutic agent particularly for use in patients who show hypersensitivity (e.g., an allergic reaction or silent hypersensitivity) to treatment with L-asparaginase or PEGylated L-asparaginase from *E. coli*. or unmodified L-asparaginase from *Erwinia*. The PEGylated L-asparaginase conjugate described herein is also useful as a therapeutic agent for use in patients who have had a disease relapse, e.g., a relapse of ALL, and

have been previously treated with another form of asparaginase, e.g., with L-asparaginase or PEGylated L-asparaginase from *E. coli*.

[0035] As described in detail herein, the conjugate of the invention shows unexpectedly superior properties compared to known L-asparaginase preparations such as pegaspargase. For example, unmodified L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspase) has a significantly lower half-life than unmodified L-asparaginase from *E. coli* (Avramis and Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393, incorporated herein by reference in its entirety). The PEGylated conjugate of the invention has a half life that is greater than PEGylated L-asparaginase from *E. coli* at an equivalent protein dose.

Definitions

[0036] Unless otherwise expressly defined, the terms used herein will be understood according to their ordinary meaning in the art.

[0037] As used herein, the term "including" means "including, without limitation," and terms used in the singular shall include the plural, and vice versa, unless the context dictates otherwise.

[0038] As used herein, the term "disease treatable by depletion of asparagine" refers to a condition or disorder wherein the cells involved in or responsible for the condition or disorder either lack or have a reduced ability to synthesize L-asparagine. Depletion or deprivation of L-asparagine can be partial or substantially complete (e.g., to levels that are undetectable using methods and apparatus that are known in the art).

[0039] As used herein, the term "therapeutically effective amount" refers to the amount of a protein (e.g., asparaginase or conjugate thereof), required to produce a desired therapeutic effect.

L-Asparaginase Protein

[0040] The protein according to the invention is an enzyme with L-asparagine aminohydrolase activity, namely an L-asparaginase.

[0041] Many L-asparaginase proteins have been identified in the art, isolated by known methods from microorganisms. (See, e.g., Savitri and Azmi, *Indian J. Biotechnol* 2 (2003) 184-194, incorporated herein by reference in its entirety). The most widely used and commercially available L-asparaginases are derived from *E. coli* or from *Erwinia chrysanthemi*, both of which share 50% or less structural homology. Within the *Erwinia* species, typically 75-77% sequence identity was reported between *Erwinia chrysanthemi* and *Erwinia carotovora*-derived enzymes, and approximately 90% sequence identity was found between different subspecies of *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia GA, Labrou E, *Journal of Biotechnology* (2007) 127:657-669, incorporated herein by reference in its entirety). Some representative *Erwinia* L-asparaginases include, for example, those provided in Table 1:

Table 1

SPECIES	GENBANK ACCESSION No.	% IDENTITY TO <i>ERWINIA CHRYSANTHEMI</i> NCPBP 1066
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	AAS67028	91%
<i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPBP 1125	CAA31239	98%
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Astroseptica</i>	AAS67027	75%
<i>Erwinia carotovora</i>	AAP92666	77%

[0042] The sequences of the *Erwinia* L-asparaginases and the GenBank entries of Table 1 are herein incorporated by reference. Preferred L-asparaginases used in therapy are L-asparaginase isolated from *E. coli* and from *Erwinia*, specifically, *Erwinia chrysanthemi*.

5 [0043] The L-asparaginases may be native enzymes isolated from the microorganisms. They can also be produced by recombinant enzyme technologies in producing microorganisms such as *E. coli*. As examples, the protein used in the conjugate of the invention can be a protein form *E. coli* produced in a recombinant *E. coli* producing strain, of a protein from an *Erwinia* species, particularly *Erwinia chrysanthemi*, produced in a recombinant *E. coli* producing strain.

10 [0044] Enzymes can be identified by their specific activities. This definition thus includes all polypeptides that have the defined specific activity also present in other organisms, more particularly in other microorganisms. Often enzymes with similar activities can be identified by their grouping to certain families defined as PFAM or COG. PFAM (protein family database of alignments and hidden Markov models; <http://pfam.sanger.ac.uk/>) represents a large collection of protein sequence alignments. Each PFAM makes it possible to visualize multiple alignments, see
15 protein domains, evaluate distribution among organisms, gain access to other databases, and visualize known protein structures. COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) are obtained by comparing protein sequences from 43 fully sequenced genomes representing 30 major phylogenetic lines. Each COG is defined from at least
20 three lines, which permits the identification of former conserved domains.

[0045] The means of identifying homologous sequences and their percentage homology and/or identity are well known to those skilled in the art, and include in particular the BLAST programs, which can be used from the website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> with the default parameters indicated on that website. The sequences obtained can then be exploited (e.g.,
25 aligned) using, for example, the programs CLUSTALW

g

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) or MULTALIN (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) with the default parameters indicated on those websites. Using the references given on GenBank for known genes, those skilled in the art are able to determine the equivalent genes in other organisms, bacterial strains, yeasts, fungi, mammals, plants, etc. This routine work is advantageously done using consensus sequences that can be determined by carrying out sequence alignments with genes derived from other microorganisms, and designing degenerate probes to clone the corresponding gene in another organism. These routine methods of molecular biology are well known to those skilled in the art, and are described, for example, in Sambrook *et al.* (1989 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York).

[0046] Indeed, a person skilled in the art will understand how to select and design homologous proteins retaining substantially their L-asparaginase activity. Typically, a Nessler assay is used for the determination of L-asparaginase activity according to a method described by Mashburn and Wriston (Mashburn, L., and Wriston, J. (1963) "Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase," *Biochem Biophys Res Commun* 12, 50, incorporated herein by reference in its entirety).

[0047] In a particular embodiment of the conjugate of the invention, the L-asparaginase protein has at least about 80% homology or identity with the protein comprising the sequence of SEQ ID NO:1, more specifically at least about 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% homology or identity with the protein comprising the sequence of SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:1 is as follows:

ADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGE
QFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTV
KSDKPVVFVAAMRPATAISADGPMNLLAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSA
RYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKV
DILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVVI
RSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY (SEQ
ID NO:1)

[0048] The term "comprising the sequence of SEQ ID NO:1" means that the amino-acid sequence of the protein may not be strictly limited to SEQ ID NO:1 but may contain additional amino-acids.

[0049] In a particular embodiment, the protein is the L-asparaginase of *Erwinia chrysanthemi* having the sequence of SEQ ID NO:1. In another embodiment, the L-asparaginase is from *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 (Genbank Accession No. CAA32884, incorporated herein by reference in its entirety), either with or without signal peptides and/or leader sequences.

[0050] Fragments of the protein of SEQ ID NO:1 are also comprised within the definition of the protein used in the conjugate of the invention. The term "a fragment of SEQ ID NO:1" means

that the sequence of the polypeptide may include less amino-acid than SEQ ID N01 but still enough amino-acids to confer L-aminohydrolase activity.

[0051] It is well known in the art that a polypeptide can be modified by substitution, insertion, deletion and/or addition of one or more amino-acids while retaining its enzymatic activity. For example, substitution of one amino-acid at a given position by a chemically equivalent amino-acid that does not affect the functional properties of a protein is common. Substitutions may be defined as exchanges within one of the following groups:

- Small aliphatic, non-polar or slightly polar residues : Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- Polar, negatively charged residues and their amides : Asp, Asn, Glu, Gln
- Polar, positively charged residues : His, Arg, Lys
- Large aliphatic, non-polar residues : Met, Leu, Ile, Val, Cys
- Large aromatic residues: Phe, Tyr, Trp.

[0052] Thus, changes that result in the substitution of one negatively charged residue for another (such as glutamic acid for aspartic acid) or one positively charged residue for another (such as lysine for arginine) can be expected to produce a functionally equivalent product.

[0053] The positions where the amino-acids are modified and the number of amino-acids subject to modification in the amino-acid sequence are not particularly limited. The skilled artisan is able to recognize the modifications that can be introduced without affecting the activity of the protein. For example, modifications in the N- or C-terminal portion of a protein may be expected not to alter the activity of a protein under certain circumstances. With respect to asparaginases, in particular, much characterization has been done, particularly with respect to the sequences, structures, and the residues forming the active catalytic site. This provides guidance with respect to residues that can be modified without affecting the activity of the enzyme. All known L-asparaginases from bacterial sources have common structural features. All are homotetramers with four active sites between the N- and C-terminal domains of two adjacent monomers (Aghaipoor *et al.*, *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664, incorporated herein by reference in its entirety). All have a high degree of similarity in their tertiary and quaternary structures (Papageorgiou *et al.*, *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316, incorporated herein by reference in its entirety). The sequences of the catalytic sites of L-asparaginases are highly conserved between *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora*, and *E. coli* L-asparaginase II (Papageorgiou *et al.*, *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). The active site flexible loop contains amino acid residues 14-33, and structural analysis show that Thr15, Thr95, Ser62, Glu63, Asp96, and Ala120 contact the ligand (Papageorgiou *et al.*, *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). Aghaipoor *et al.* have conducted a detailed analysis of the four active sites of *Erwinia chrysanthemi* L-

asparaginase by examining high resolution crystal structures of the enzyme complexed with its substrates (Aghaipour *et al.*, *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664). Kotzia *et al.* provide sequences for L-asparaginases from several species and subspecies of *Erwinia* and, even though the proteins have only about 75-77% identity between *Erwinia chrysanthemi* and *Erwinia carotovora*, they each still have L-asparaginase activity (Kotzia *et al.*, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669, incorporated herein by reference in its entirety). Moola *et al.* performed epitope mapping studies of *Erwinia chrysanthemi* 3937 L-asparaginase and were able to retain enzyme activity even after mutating various antigenic sequences in an attempt to reduce immunogenicity of the asparaginase (Moola *et al.*, *Biochem. J.* 302 (1994) 921-927, incorporated herein by reference in its entirety). Each of the above-cited articles is herein incorporated by reference in its entirety. In view of the extensive characterization that has been performed on L-asparaginases, one of skill in the art could determine how to make fragments and/or sequence substitutions while still retaining enzyme activity.

Polymers for use in the Conjugate

[0054] Polymers are selected from the group of non-toxic water soluble polymers such as polysaccharides, e.g. hydroxyethyl starch, poly amino acids, e.g. poly lysine, polyester, e.g., polylactic acid, and poly alkylene oxides, e.g., polyethylene glycol (PEG).

[0055] Polyethylene glycol (PEG) or mono-methoxy-polyethyleneglycol (mPEG) is well known in the art and comprises linear and branched polymers. Examples of some polymers, particularly PEG, are provided in the following, each of which is herein incorporated by reference in its entirety: US Pat. No. 5,672,662; US Pat. No. 4,179,337; US Pat. No. 5,252,714; US Pat. Appl. Publ. No. 2003/0114647; US Pat. No. 6,113,906; US Pat. No. 7,419,600; and PCT Publ. No. WO2004/083258.

[0056] The quality of such polymers is characterized by the polydispersity index (PDI). The PDI reflects the distribution of molecular weights in a given polymer sample and is calculated from the weight average molecular weight divided by the number average molecular weight. It indicates the distribution of individual molecular weights in a batch of polymers. The PDI has a value always greater than 1, but as the polymer chains approach the ideal Gauss distribution (= monodispersity), the PDI approaches 1.

[0057] The polyethylene glycol has advantageously a molecular weight comprised within the range of about 500 Da to about 9,000 Da. More specifically, the polyethylene glycol (e.g. mPEG) has a molecular weight selected from the group consisting of polyethylene glycols of 2000 Da, 2500 Da, 3000 Da, 3500 Da, 4000 Da, 4500 Da, and 5000 Da. In a particular embodiment, the polyethylene glycol (e.g., mPEG) has a molecular weight of 5000 Da.

Method for Preparing the Conjugate

[0058] For subsequent coupling of the polymer to proteins with L-asparagine aminohydrolase activity, the polymer moiety contains an activated functionality that preferably reacts with amino groups in the protein. In one aspect, the invention is directed to a method of making a conjugate, the method comprising combining an amount of polyethylene glycol (PEG) with an amount of L-asparaginase in a buffered solution for a time period sufficient to covalently link the PEG to the L-asparaginase. In a particular embodiment, the L-asparaginase is from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In one embodiment, the PEG is monomethoxy-polyethylene glycol (mPEG).

[0059] In one embodiment, the reaction between the polyethylene glycol and L-asparaginase is performed in a buffered solution. In some particular embodiments, the pH value of the buffer solution ranges between about 7.0 and about 9.0. The most preferred pH value ranges between about 7.5 and about 8.5, e.g., a pH value of about 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, or 8.5. In a particular embodiment, the L-asparaginase is from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1.

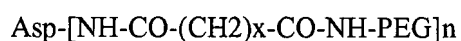
[0060] Furthermore, PEGylation of L-asparaginase is performed at protein concentrations between about 0.5 and about 25 mg/mL, more specifically between about 2 and about 20 mg/mL and most specifically between about 3 and about 15 mg/mL. For example, the protein concentration is about 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 mg/mL. In a particular embodiment, the PEGylation of L-asparaginase at these protein concentrations is of *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1.

[0061] At elevated protein concentration of more than 2 mg/mL the PEGylation reaction proceeds rapidly, within less than 2 hours. Furthermore, a molar excess of polymer over amino groups in L-asparaginase of less than about 20:1 is applied. For example, the molar excess is less than about 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7.5:1, 7:1, 6.5:1, 6:1, 5.5:1, 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1, or 1:1. In a specific embodiment the molar excess is less than about 10:1 and in a more specific embodiment, the molar excess is less than about 8:1. In a particular embodiment, the L-asparaginase is from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1.

[0062] The number of PEG moieties which can be coupled to the protein will be subject to the number of free amino groups and, even more so, to which amino groups are accessible for a PEGylation reaction. In a particular embodiment, the degree of PEGylation (*i.e.*, the number of

PEG moieties coupled to amino groups on the L-asparaginase) is within a range from about 10% to about 100% of free and/or accessible amino groups (e.g., about 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100%). 100% PEGylation of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus of the protein) is also referred to herein as "maximally PEGylated." One method to determine the modified amino groups in mPEG-r-crisantaspase conjugates (degree of PEGylation) is a method described by Habeeb (A.F.S.A. Habeeb, "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzensulfonic acid", *Anal. Biochem.* 14 (1966), p. 328, incorporated herein by reference in its entirety). In one embodiment, the PEG moieties are coupled to one or more amino groups (wherein amino groups include lysine residues and/or the N-terminus) of the L-asparaginase. In a particular embodiment, the degree of PEGylation is within a range of from about 10% to about 100% of total or accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus), e.g., about 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 100%. In a specific embodiment, about 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% of the total amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are coupled to a PEG moiety. In another specific embodiment, about 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% of the accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are coupled to a PEG moiety. In a specific embodiment, 40-55% or 100% of the accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are coupled to a PEG moiety. In some embodiments, the PEG moieties are coupled to the L-asparaginase by a covalent linkage. In a particular embodiment, the L-asparaginase is from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1.

[0063] In one embodiment, the conjugate of the invention can be represented by the formula



wherein Asp is a L-asparaginase protein, NH is the NH group of a lysine residue and/or the N-terminus of the protein chain, PEG is a polyethylene glycol moiety and n is a number of at least 40% to about 100% of the accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) in the protein, all being defined above and below in the examples, x is an integer ranging from 1 to 8 (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), preferably 2 to 5 (e.g., 2, 3, 4, 5). In a particular embodiment, the L-asparaginase is from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1.

[0064] Other methods of PEGylation that can be used to form the conjugates of the invention are provided, for example, in U.S. Pat. No. 4,179,337, U.S. Pat. No. 5,766,897, U.S. Pat. Appl. Publ. No. US 2002/0065397A1, and U.S. Pat. Appl. Publ. No. US 2009/0054590A1, each of which is herein incorporated by reference in its entirety.

5 [0065] Specific embodiments include proteins having substantial L-Asparagine aminohydrolase activity and polyethylene glycol, selected from the group of conjugates wherein:

(A)

– the protein has at least 90% homology of structure with the L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* as disclosed in SEQ ID NO:1

10

– the polyethylene glycol has a molecular weight of about 5000 Da,

– the protein and polyethylene glycol moieties are covalently linked to the protein by amide bonds, and

15

– about 100% of the accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) or about 80-90%, in particular, about 84%, of total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) are linked to a polyethylene glycol moiety.

(B)

– the protein has at least 90% homology with the L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* as disclosed in SEQ ID NO:1

– the polyethylene glycol has a molecular weight of about 5000 Da,

20

– the protein and polyethylene glycol moieties are covalently linked to the protein by amide bonds, and

– about 40% to about 45 %, and in particular about 43% of the accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus), or about 36% of the total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) are linked to a polyethylene glycol moiety.

25

(C)

– the protein has at least 90% homology with the L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* as disclosed in SEQ ID NO:1

– the polyethylene glycol has a molecular weight of about 2000 Da,

- the protein and polyethylene glycol moieties are covalently linked to the protein by amide bonds, and
- about 100% of the accessible amino groups (*e.g.*, one or more lysine residues and/or the N-terminus) or about 80-90%, in particular, about 84% of total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) are linked to a polyethylene glycol moiety.

(D)

- the protein has at least 90% homology with the L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* as disclosed in SEQ ID NO:1
- the polyethylene glycol has a molecular weight of about 2000 Da,
- the protein and polyethylene glycol moieties are covalently linked to the protein by amide bonds, and
- about 50% to about 60%, and in particular about 55% of the accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) or about 47% of the total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) are linked to a polyethylene glycol moiety.

L-Asparaginase-PEG Conjugates

[0066] Conjugates of the invention have certain advantageous and unexpected properties compared to unmodified L-asparaginases, particularly compared to unmodified *Erwinia* L-asparaginases, more particularly compared to unmodified L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi*, and more particularly compared to unmodified L-asparaginase having the sequence of SEQ ID NO:1.

[0067] In some embodiments, the conjugate of the invention reduces plasma L-asparagine levels for a time period of at least about 12, 24, 48, 72, 96, or 120 hours when administered at a dose of 5 U/kg body weight (bw) or 10 µg/kg (protein content basis). In other embodiments, the conjugate of the invention reduces plasma L-asparagine levels to undetectable levels for a time period of at least about 12, 24, 48, 72, 96, 120, or 144 hours when administered at a dose of 25 U/kg bw or 50 µg/kg (protein content basis). In other embodiments, the conjugate of the invention reduces plasma L-asparagine levels for a time period of at least about 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, or 240 hours when administered at a dose of 50 U/kg bw or 100 µg/kg (protein content basis). In another embodiment, the conjugate of the invention reduces plasma L-asparagine levels to undetectable levels for a time period of at least about 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, or 240 hours when administered at a dose ranging from about 10,000 to about 15,000 IU/m² (about 20-30 mg protein/m²). In a particular embodiment, the

conjugate comprises L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a particular embodiment, the conjugate comprises PEG (e.g., mPEG) having a molecular weight of less than or equal to about 5000 Da. In a more particular embodiment, at least about 40% to about 100% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are PEGylated.

[0068] In one embodiment, the conjugate comprises a ratio of mol PEG/mol monomer of about 4.5 to about 8.5, particularly about 6.5; a specific activity of about 450 to about 550 U/mg, particularly about 501 U/mg; and a relative activity of about 75% to about 85%, particularly about 81% compared to the corresponding unmodified L-asparaginase. In a specific embodiment, the conjugate with these properties comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1, with PEGylation of approximately 40-55% accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) with 5000 Da mPEG.

[0069] In one embodiment, the conjugate comprises a ratio of mol PEG/mol monomer of about 12.0 to about 18.0, particularly about 15.1; a specific activity of about 450 to about 550 U/mg, particularly about 483 U/mg; and a relative activity of about 75 to about 85%, particularly about 78% compared to the corresponding unmodified L-asparaginase. In a specific embodiment, the conjugate with these properties comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1, with PEGylation of approximately 100% accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) with 5000 Da mPEG.

[0070] In one embodiment, the conjugate comprises a ratio of mol PEG/mol monomer of about 5.0 to about 9.0, particularly about 7.0; a specific activity of about 450 to about 550 U/mg, particularly about 501 U/mg; and a relative activity of about 80 to about 90%, particularly about 87% compared to the corresponding unmodified L-asparaginase. In a specific embodiment, the conjugate with these properties comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1, with PEGylation of approximately 40-55% accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) with 10,000 Da mPEG.

[0071] In one embodiment, the conjugate comprises a ratio of mol PEG/mol monomer of about 11.0 to about 17.0, particularly about 14.1; a specific activity of about 450 to about 550 U/mg, particularly about 541 U/mg; and a relative activity of about 80 to about 90%, particularly about 87% compared to the corresponding unmodified L-asparaginase. In a specific embodiment, the conjugate with these properties comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the

sequence of SEQ ID NO:1, with PEGylation of approximately 100% accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) with 10,000 Da mPEG.

[0072] In one embodiment, the conjugate comprises a ratio of mol PEG/mol monomer of about 6.5 to about 10.5, particularly about 8.5; a specific activity of about 450 to about 550 U/mg, particularly about 524 U/mg; and a relative activity of about 80 to about 90%, particularly about 84% compared to the corresponding unmodified L-asparaginase. In a specific embodiment, the conjugate with these properties comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1, with PEGylation of approximately 40-55% accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) with 2,000 Da mPEG.

[0073] In one embodiment, the conjugate comprises a ratio of mol PEG/mol monomer of about 12.5 to about 18.5, particularly about 15.5; a specific activity of about 450 to about 550 U/mg, particularly about 515 U/mg; and a relative activity of about 80 to about 90%, particularly about 83% compared to the corresponding unmodified L-asparaginase. In a specific embodiment, the conjugate with these properties comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1, with PEGylation of approximately 100% accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) with 2,000 Da mPEG.

[0074] In other embodiments, the conjugate of the invention has an increased potency of at least about 10 times, 20 times, 30 times, 40 times, 50 times, 60 times, 70 times, 80 times, 90 times, or 100 times after a single injection compared to the corresponding unmodified L-asparaginase. In a specific embodiment, the conjugate with these properties comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a particular embodiment, the conjugate comprises PEG (e.g., mPEG) having a molecular weight of less than or equal to about 5000 Da. In a more particular embodiment, at least about 40% to about 100% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are PEGylated.

[0075] In one aspect the conjugate of the invention has a pharmacokinetic profile according to the following parameters:

Parameter	Definition
A _{max}	Maximal residual enzyme activity
t _{Amax}	Time to A _{max} after test item exposure
d _{Amax}	Maximal duration of A _{max} or A above zero

The half-life time of the residual enzyme activity in plasma is derived from the following formula:

Mean:

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

where $t_{1/2}$ is the half-life, t is the time point, c_t is the residual plasma activity at the time point and c_0 the residual plasma activity at the beginning. Area under the curve (AUC) is calculated using a pharmacokinetics software program, e.g., SigmaPlot Version 11.

[0076] In one embodiment, the conjugate of the invention has a single-dose pharmacokinetic profile according to the following, specifically wherein the conjugate comprises mPEG at molecular weight of less than or equal to 2000 Da and an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1:

A_{max} : about 150 U/L to about 250 U/L;

T_{Amax} : about 4h to about 8h, specifically about 6h;

d_{Amax} : about 220 h to about 250 h, specifically, about 238.5 h (above zero, from about 90 min to about 240 h);

AUC: about 12000 to about 30000; and

$t_{1/2}$: about 50h to about 90h.

[0077] In one embodiment, the conjugate of the invention has a single-dose pharmacokinetic profile according to the following, specifically where the conjugate comprises mPEG at molecular weight of less than or equal to 5000 Da and an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1:

A_{max} : about 18 U/L to about 250 U/L;

T_{Amax} : about 1h to about 50h;

d_{Amax} : about 90 h to about 250 h, specifically, about 238.5 h (above zero, from about 90 min to about 240 h);

AUC: about 500 to about 35000; and

$t_{1/2}$: about 30h to about 120 h.

[0078] In one embodiment, the conjugate of the invention results in a similar level of L-asparagine depletion over a period of time (e.g., 24, 48, or 72 hours) after a single dose compared to an equivalent quantity of protein of pegaspargase. In a specific embodiment, the conjugate comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a particular embodiment, the conjugate comprises PEG (e.g., mPEG) having a molecular weight of less than or equal to about 5000 Da. In a more particular embodiment, at least about 40% to about 100% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are PEGylated, more particularly about 40-55% or 100%.

[0079] In one embodiment, the conjugate of the invention has a longer $t_{1/2}$ than pegaspargase administered at an equivalent protein dose. In a specific embodiment, the conjugate has a $t_{1/2}$

of at least about 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, or 65 hours at a dose of about 50 µg/kg (protein content basis). In another specific embodiment, the conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39, or 40 hours at a dose of about 10 µg/kg (protein content basis). In another specific embodiment, the conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 100 to about 200 hours at a dose ranging from about 10,000 to about 15,000 IU/m² (about 20-30 mg protein/m²).

[0080] In one embodiment, the conjugate of the invention has a mean AUC that is at least about 2, 3, 4 or 5 times greater than pegaspargase at an equivalent protein dose.

[0081] In one embodiment, the conjugate of the invention does not raise any significant antibody response for a particular period of time after administration of a single dose, e.g., greater than about 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4, weeks, 5 weeks, 6 weeks, 7 weeks, 8 weeks, 9 weeks, 10 weeks, 11 weeks, 12 weeks, etc. In a particular embodiment the conjugate of the invention does not raise any significant antibody response for at least 8 weeks. In one example, "does not raise any significant antibody response" means that the subject receiving the conjugate is identified within art-recognized parameters as "antibody-negative." Antibody levels can be determined by methods known in the art, for example ELISA or surface plasmon resonance (SPR-Biacore) assays (Zalewska-Szewczyk *et al.*, *Clin. Exp. Med.* (2009) 9:113-116; Avramis *et al.*, *Anticancer Research* 29 (2009) 299-302, each of which is incorporated herein by reference in its entirety). Conjugates of the invention may have any combination of these properties.

Methods of Treatment and Use of the Conjugate

[0082] The conjugates of the invention can be used in the treatment of a disease treatable by depletion of asparagine. For example, the conjugate is useful in the treatment or the manufacture of a medicament for use in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in both adults and children, as well as other conditions where asparagine depletion is expected to have a useful effect. Such conditions include, but are not limited to the following: malignancies, or cancers, including but not limited to hematologic malignancies, non-Hodgkin's lymphoma, NK lymphoma, pancreatic cancer, Hodgkin's disease, acute myelocytic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, lymphosarcoma, reticulosarcoma, and melanosarcoma. Representative non-malignant hematologic diseases which respond to asparagine depletion include immune system-mediated blood diseases, e.g., infectious diseases such as those caused by HIV infection (i.e., AIDS). Non-hematologic diseases associated with asparagine dependence include autoimmune diseases, for example rheumatoid arthritis, SLE, autoimmune, collagen vascular diseases, AIDS, etc. Other autoimmune diseases include osteoarthritis, Issac's syndrome, psoriasis, insulin dependent diabetes mellitus, multiple sclerosis, sclerosing panencephalitis, systemic lupus erythematosus, rheumatic fever, inflammatory bowel disease (e.g., ulcerative colitis and Crohn's disease), primary billiary cirrhosis, chronic active

hepatitis, glomerulonephritis, myasthenia gravis, pemphigus vulgaris, and Graves' disease. Cells suspected of causing disease can be tested for asparagine dependence in any suitable *in vitro* or *in vivo* assay, e.g., an *in vitro* assay wherein the growth medium lacks asparagine. Thus, in one aspect, the invention is directed to a method of treating a disease treatable in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of a conjugate of the invention. In a specific embodiment, the disease is ALL. In a particular embodiment, the conjugate used in the treatment of a disease treatable by asparagine depletion comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a particular embodiment, the conjugate comprises PEG (e.g., mPEG) having a molecular weight of less than or equal to about 5000 Da. In a more particular embodiment, at least about 40% to about 100% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are PEGylated, more particularly about 40-55% or 100%.

[0083] In one embodiment, treatment with a conjugate of the invention will be administered as a first line therapy. In another embodiment, treatment with a conjugate of the invention will be administered as a second line therapy in patients, particularly patients with ALL, where objective signs of allergy or hypersensitivity, including "silent hypersensitivity," have developed to other asparaginase preparations, in particular, the native *Escherichia coli*-derived L-asparaginase or its PEGylated variant (pegaspargase). Non-limiting examples of objective signs of allergy or hypersensitivity include testing "antibody positive" for an asparaginase enzyme. In a specific embodiment, the conjugate of the invention is used in second line therapy after treatment with pegaspargase. In a more specific embodiment, the conjugate used in second line therapy comprises an L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a more specific embodiment, the conjugate further comprises PEG (e.g., mPEG) having a molecular weight of less than or equal to about 5000 Da, more specifically about 5000 Da. In an even more specific embodiment, at least about 40% to about 100% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are PEGylated, more particularly about 40-55% or 100%.

[0084] In another aspect, the invention is directed to a method for treating acute lymphoblastic leukemia comprising administering to a patient in need of the treatment a therapeutically effective amount of a conjugate of the invention. In a specific embodiment, treatment will be administered at a dose ranging from about 1500 IU/m² to about 15,000 IU/m², typically about 10,000 to about 15,000 IU/m² (about 20-30 mg protein/m²), at a schedule ranging from about twice a week to about once a month, typically once per week or once every other week, as a single agent (e.g., monotherapy) or as part of a combination of chemotherapy drugs, including, but not limited to glucocorticoids, corticosteroids, anticancer compounds or other agents,

8

including, but not limited to methotrexate, dexamethasone, prednisone, prednisolone, vincristine, cyclophosphamide, and anthracycline. As an example, patients with ALL will be administered the conjugate of the invention as a component of multi-agent chemotherapy during 3 chemotherapy phases including induction, consolidation or intensification, and maintenance. In a specific example, the conjugate is not administered with an asparagine synthetase inhibitor (e.g., such as set forth in PCT Pub. No. WO 2007/103290, which is herein incorporated by reference in its entirety). In another specific example, the conjugate is not administered with an asparagine synthetase inhibitor, but is administered with other chemotherapy drugs. The conjugate can be administered before, after, or simultaneously with other compounds as part of a multi-agent chemotherapy regimen. In a particular embodiment, the conjugate comprises L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a particular embodiment, the conjugate comprises PEG (e.g., mPEG) having a molecular weight of less than or equal to about 5000 Da. In a more particular embodiment, at least about 40% to about 100% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are PEGylated, more particularly about 40-55% or 100%.

[0085] In a specific embodiment, the method comprises administering a conjugate of the invention at an amount of about 1U/kg to about 25 U/kg (e.g., about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 U/kg) or an equivalent amount thereof (e.g., on a protein content basis). In a more specific embodiment, the conjugate is administered at an amount selected from the group consisting of about 5, about 10, and about 25 U/kg. In another specific embodiment, the conjugate is administered at a dose ranging from about 1,000 IU/m² to about 20,000 IU/m² (e.g., 1,000 IU/m², 2,000 IU/m², 3,000 IU/m², 4,000 IU/m², 5,000 IU/m², 6,000 IU/m², 7,000 IU/m², 8,000 IU/m², 9,000 IU/m², 10,000 IU/m², 11,000 IU/m², 12,000 IU/m², 13,000 IU/m², 14,000 IU/m², 15,000 IU/m², 16,000 IU/m², 17,000 IU/m², 18,000 IU/m², 19,000 IU/m², or 20,000 IU/m²). In another specific embodiment, the conjugate is administered at a dose that depletes L-asparagine to undetectable levels using methods and apparatus known in the art for a period of about 3 days to about 10 days (e.g., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 days) for a single dose. In another embodiment, the method comprises administering a conjugate of the invention that elicits a lower immunogenic response in a patient compared to an unconjugated L-asparaginase. In another embodiment, the method comprises administering a conjugate of the invention that has a longer *in vivo* circulating half-life after a single dose compared to the unconjugated L-asparaginase. In one embodiment, the method comprises administering a conjugate that has a longer $t_{1/2}$ than pegaspargase administered at an equivalent protein dose. In an a specific embodiment, the method comprises administering a conjugate that has a $t_{1/2}$ of at least about 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, or 65 hours at a dose of about

50 µg/kg (protein content basis). In another specific embodiment, the method comprises administering a conjugate that has a $t_{1/2}$ of at least about 30, 32, 34, 36, 37, 37, 39, or 40 hours at a dose of about 10 µg/kg (protein content basis). In another specific embodiment, the method comprises administering a conjugate that has a $t_{1/2}$ of at least about 100 to about 200 hours at a dose ranging from about 10,000 to about 15,000 IU/m² (about 20-30 mg protein/m²). In one embodiment, the method comprises administering a conjugate that has a mean AUC that is at least about 2, 3, 4 or 5 times greater than pegaspargase at an equivalent protein dose. In another embodiment, the method comprises administering a conjugate of the invention that has a greater AUC value after a single dose compared to the unconjugated L-asparaginase. In a particular embodiment, the conjugate comprises L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a particular embodiment, the conjugate comprises PEG (e.g., mPEG) having a molecular weight of less than or equal to about 5000 Da. In a more particular embodiment, at least about 40% to about 100% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are PEGylated, more particularly about 40-55% or 100%.

[0086] The incidence of relapse in ALL patients following treatment with L-asparaginase remains high, with approximately 10-25% of pediatric ALL patients having early relapse (e.g., some during maintenance phase at 30-36 months post-induction) (Avramis and Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). If a patient treated with *E. coli*-derived L-asparaginase has a relapse, subsequent treatment with *E. coli* preparations could lead to a "vaccination" effect, whereby the *E. coli* preparation has increased immunogenicity during the subsequent administrations. In one embodiment, the conjugate of the invention may be used in a method of treating patients with relapsed ALL who were previously treated with other asparaginase preparations, in particular those who were previously treated with *E. coli*-derived asparaginases.

[0087] In some embodiments, the uses and methods of treatment of the invention comprise administering an L-asparaginase conjugate having properties or combinations of properties described herein above (e.g., in the section entitled "L-asparaginase PEG conjugates") or herein below.

Compositions, Formulations, and Routes of Administration

[0088] The invention also includes a pharmaceutical composition comprising a conjugate of the invention. In a specific embodiment the pharmaceutical composition is contained in a vial as a lyophilized powder to be reconstituted with a solvent, such as currently available native L-asparaginases, whatever the bacterial source used for its production (Kidrolase®, Elspar®, Erwinase®...). In another embodiment, the pharmaceutical composition is a "ready to use" solution, such as pegaspargase (Oncaspar®) enabling, further to an appropriate handling, an

administration through, *e.g.*, intramuscular, intravenous (infusion and/or bolus), intra-cerebro-ventricular (icv), sub-cutaneous routes.

[0089] Conjugates of the invention, including compositions comprising conjugates of the invention (*e.g.*, a pharmaceutical composition) can be administered to a patient using standard techniques. Techniques and formulations generally may be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990 (herein incorporated by reference).

[0090] Suitable dosage forms, in part, depend upon the use or the route of entry, for example, oral, transdermal, transmucosal, or by injection (parenteral). Such dosage forms should allow the therapeutic agent to reach a target cell or otherwise have the desired therapeutic effect. For example, pharmaceutical compositions injected into the blood stream preferably are soluble.

[0091] Conjugates and/or pharmaceutical compositions according to the invention can be formulated as pharmaceutically acceptable salts and complexes thereof. Pharmaceutically acceptable salts are non-toxic salts present in the amounts and concentrations at which they are administered. The preparation of such salts can facilitate pharmaceutical use by altering the physical characteristics of the compound without preventing it from exerting its physiological effect. Useful alterations in physical properties include lowering the melting point to facilitate transmucosal administration and increasing solubility to facilitate administering higher concentrations of the drug. The pharmaceutically acceptable salt of an asparaginase may be present as a complex, as those in the art will appreciate.

[0092] Pharmaceutically acceptable salts include acid addition salts such as those containing sulfate, hydrochloride, fumarate, maleate, phosphate, sulfamate, acetate, citrate, lactate, tartrate, methanesulfonate, ethanesulfonate, benzenesulfonate, p-toluenesulfonate, cyclohexylsulfamate, and quinate. Pharmaceutically acceptable salts can be obtained from acids, including hydrochloric acid, maleic acid, sulfuric acid, phosphoric acid, sulfamic acid, acetic acid, citric acid, lactic acid, tartaric acid, malonic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, cyclohexylsulfamic acid, fumaric acid, and quinic acid.

[0093] Pharmaceutically acceptable salts also include basic addition salts such as those containing benzathine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, meglumine, procaine, aluminum, calcium, lithium, magnesium, potassium, sodium, ammonium, alkylamine, and zinc, when acidic functional groups, such as carboxylic acid or phenol are present. For example, see Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*. Such salts can be prepared using the appropriate corresponding bases.

[0094] Pharmaceutically acceptable carriers and/or excipients can also be incorporated into a pharmaceutical composition according to the invention to facilitate administration of the particular asparaginase. Examples of carriers suitable for use in the practice of the invention

include calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars such as lactose, glucose, or sucrose, or types of starch, cellulose derivatives, gelatin, vegetable oils, polyethylene glycols, and physiologically compatible solvents. Examples of physiologically compatible solvents include sterile solutions of water for injection (WFI), saline solution and dextrose.

5 [0095] Pharmaceutical compositions according to the invention can be administered by different routes, including intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, oral, topical (transdermal), or transmucosal administration. For systemic administration, oral administration is preferred. For oral administration, for example, the compounds can be formulated into conventional oral dosage forms such as capsules, tablets, and liquid preparations such as syrups, elixirs, and concentrated drops.

10 [0096] Alternatively, injection (parenteral administration) may be used, e.g., intramuscular, intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous injection. For injection, pharmaceutical compositions are formulated in liquid solutions, preferably in physiologically compatible buffers or solutions, such as saline solution, Hank's solution, or Ringer's solution. In addition, the compounds may be formulated in solid form and redissolved or suspended immediately prior to use. For example, lyophilized forms of the conjugate can be produced. In a specific embodiment, the conjugate is administered intramuscularly. In another specific embodiment, the conjugate is administered intravenously.

15 [0097] Systemic administration can also be accomplished by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are well known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, bile salts, and fusidic acid derivatives. In addition, detergents may be used to facilitate permeation. Transmucosal administration, for example, may be through nasal sprays, inhalers (for pulmonary delivery), rectal suppositories, or vaginal suppositories. For topical administration, compounds can be formulated into ointments, salves, gels, or creams, as is well known in the art.

20 [0098] The amounts of the conjugate to be delivered will depend on many factors, for example, the IC_{50} , EC_{50} , the biological half-life of the compound, the age, size, weight, and physical condition of the patient, and the disease or disorder to be treated. The importance of these and other factors to be considered are well known to those of ordinary skill in the art. Generally, the amount of the conjugate to be administered will range from about 10 International Units per square meter of the surface area of the patient's body (IU/m^2) to 50,000 IU/m^2 , with a dosage range of about 1,000 IU/m^2 to about 15,000 IU/m^2 being preferred, and a range of about 6,000 IU/m^2 to about 15,000 IU/m^2 being more preferred, and a range of about 10,000 to about 15,000 IU/m^2 (about 20-30 mg protein/ m^2) being particularly preferred to treat a malignant hematologic disease, e.g., leukemia. Typically, these dosages are administered via intramuscular or

25
30
35

17

intravenous injection at an interval of about 3 times weekly to about once per month, typically once per week or once every other week during the course of therapy. Of course, other dosages and/or treatment regimens may be employed, as determined by the attending physician.

[0099] In particular embodiments, the conjugate and/or pharmaceutical composition or formulation to be administered as described herein comprises L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a particular embodiment, the conjugate comprises L-asparaginase from *Erwinia* species, more specifically *Erwinia chrysanthemi*, and more specifically, the L-asparaginase comprising the sequence of SEQ ID NO:1. In a particular embodiment, the conjugate comprises PEG (e.g., mPEG) having a molecular weight of less than or equal to about 5000 Da. In a more particular embodiment, at least about 40% to about 100% of amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) are PEGylated.

Examples

Example 1: Preparation of Recombinant Crisantaspase

[0100] The recombinant bacterial strain used to manufacture the naked recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase protein (also referred to herein as "r-crisantaspase") was an *E. coli* BL21 strain with a deleted *ansB* gene (the gene encoding the endogenous *E. coli* type II L-asparaginase) to avoid potential contamination of the recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase with this enzyme. The deletion of the *ansB* gene relies on homologous recombination methods and phage transduction performed according to the three following steps: 1) a bacterial strain (NM1100) expressing a defective lambda phage which supplies functions that protect and recombine electroporated linear DNA substrate in the bacterial cell was transformed with a linear plasmid (kanamycin cassette) containing the kanamycin gene flanked by an FLP recognition target sequence (FRT). Recombination occurs to replace the *ansB* gene by the *kanamycin* cassette in the bacterial genome, resulting in a $\Delta ansB$ strain; 2) phage transduction was used to integrate the integrated kanamycin cassette region from the $\Delta ansB$ NM1100 strain to the *ansB* locus in BL21 strain. This results in an *E. coli* BL21 strain with a deleted *ansB* gene and resistant to kanamycin; 3) this strain was transformed with a FLP-helper plasmid to remove the kanamycin gene by homologous recombination at the FRT sequence. The genome of the final strain (BL21 $\Delta ansB$ strain) was sequenced, confirming full deletion of the endogenous *ansB* gene.

[0101] The *E. coli*-optimized DNA sequence encoding for the mature *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase fused with the ENX signal peptide from *Bacillus subtilis* was inserted into an expression vector. This vector allows expression of recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-

asparaginase under the control of hybrid T5/lac promoter induced by the addition of Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and confers resistance to kanamycin.

[0102] BL21 *ΔansB* strain was transformed with this expression vector. The transformed cells were used for production of the r-crisantaspase by feed batch glucose fermentation in Reisenberg medium. The induction of the cell was done 16h at 23°C with IPTG as inducer. After cell harvest and lysis by homogenization in 10mM sodium phosphate buffer pH6 5mM EDTA (Buffer A), the protein solution was clarified by centrifugation twice at 15000g, followed by 0.45 μ m and 0.22 μ m filtration steps. The recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase was next purified using a sequence of chromatography and concentration steps. Briefly, the theoretical isoelectric point of the *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase (7.23) permits the recombinant enzyme to adsorb to cation exchange resins at pH6. Thus, the recombinant enzyme was captured on a Capto S column (cation exchange chromatography) and eluted with salt gradient in Buffer A. Fractions containing the recombinant enzyme were pooled. The pooled solution was next purified on Capto MMC column (cation exchange chromatography) in Buffer A with salt gradient. The eluted fractions containing *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase were pooled and concentrated before protein separation on Superdex 200pg size exclusion chromatography as polishing step. Fractions containing recombinant enzymes were pooled, concentrated, and diafiltered against 100mM sodium phosphate buffer pH8. The purity of the final *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase preparation was evaluated by SDS-PAGE (Figure 1) and RP-HPLC and was at least 90%. The integrity of the recombinant enzyme was verified by N-terminal sequencing and LC-MS. Enzyme activity was measured at 37°C using Nessler's reagent. The specific activity of the purified recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase was around 600 U/mg. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that liberates 1 μ mol of ammonia from L-asparagine per minute at 37°C.

Example 2: Preparation of 10 kDa mPEG-L-Asparaginase Conjugates

[0103] A solution of L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* was stirred in a 100 mM sodium phosphate buffer at pH 8.0, at a protein concentration between 2.5 and 4 mg/mL, in the presence of 150 mg/mL or 36 mg/mL 10 kDa mPEG-NHS, for 2 hours at 22°C. The resulting crude 10 kDa mPEG-L-asparaginase was purified by size exclusion chromatography using a Superdex 200 pg column on an Äkta purifier UPC 100 system. Protein-containing fractions were pooled and concentrated to result in a protein concentration between 2 and 8 mg/mL. Two 10 kDa mPEG-L-asparaginase conjugates were prepared in this way, differing in their degree of PEGylation as determined by TNBS assay with unmodified L-asparaginase as a reference, one corresponding to full PEGylation (100% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or

the N-terminus) residues being conjugated corresponding to PEGylation of 78% of total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus)); the second one corresponding to partial PEGylation (39% of total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) or about 50% of accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus)) . SDS-PAGE analysis of the conjugates is shown in Figure 2. The resulting conjugates appeared as an essentially homogeneous band and contained no detectable unmodified r-crisantaspase.

Example 3: Preparation of 5 kDa mPEG-L-Asparaginase Conjugates

[0104] A solution of L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* was stirred in a 100 mM sodium phosphate buffer at pH 8.0, at a protein concentration of 4 mg/mL, in the presence of 150 mg/mL or 22.5 mg/mL 5 kDa mPEG-NHS, for 2 hours at 22°C. The resulting crude 5 kDa mPEG-L-asparaginase was purified by size exclusion chromatography using a Superdex 200 pg column on an Äkta purifier UPC 100 system. Protein-containing fractions were pooled and concentrated to result in a protein concentration between 2 and 8 mg/mL. Two 5 kDa mPEG-L-asparaginase conjugates were prepared in this way, differing in their degree of PEGylation as determined by TNBS assay with unmodified L-asparaginase as a reference, one corresponding to full PEGylation (100% of accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) being conjugated corresponding to PEGylation of 84% of total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus)); the second one corresponding to partial PEGylation (36% of total amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) or about 43% of accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus)). SDS-PAGE analysis of the conjugates is shown in Figure 2. The resulting conjugates appeared as an essentially homogeneous band and contained no detectable unmodified r-crisantaspase.

Example 4: Preparation of 2 kDa mPEG-L-Asparaginase Conjugates

[0105] A solution of L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* was stirred in a 100 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 at a protein concentration of 4 mg/mL in the presence of 150 mg/mL or 22.5 mg/mL 2 kDa mPEG-NHS for 2 hours at 22°C. The resulting crude 2 kDa mPEG-L-asparaginase was purified by size exclusion chromatography using a Superdex 200 pg column on an Äkta purifier UPC 100 system. Protein containing fractions were pooled and concentrated to result in a protein concentration between 2 and 8 mg/mL. Two 2 kDa mPEG-L-asparaginase conjugates were prepared in this way, differing in their degree of PEGylation as determined by TNBS assay with unmodified L-asparaginase as reference, one corresponding to maximum PEGylation (100% of accessible amino groups (*e.g.*, lysine residues and/or the N-terminus) being conjugated corresponding to PEGylation of 86% of total amino groups (*e.g.*,

lysine residues and/or the N-terminus)); the second one corresponding to partial PEGylation (47% of total amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) or about 55% of accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus)). SDS-PAGE analysis of the conjugates is shown in Figure 2. The resulting conjugates appeared as an essentially homogeneous band and contained no detectable unmodified r-crisantaspase.

Example 5: Activity of mPEG-r-Crisantaspase Conjugates

[0106] L-asparaginase aminohydrolase activity of each conjugate described in the proceeding examples was determined by Nesslerization of ammonia that is liberated from L-asparagine by enzymatic activity. Briefly, 50µL of enzyme solution were mixed with 20mM of L-asparagine in a 50 mM Sodium borate buffer pH 8.6 and incubated for 10 min at 37°C. The reaction was stopped by addition of 200µL of Nessler reagent. Absorbance of this solution was measured at 450 nm. The activity was calculated from a calibration curve that was obtained from Ammonia sulfate as reference. The results are summarized in Table 2, below:

Table 2: Activity of mPEG-r-crisantaspase conjugates

Sample *	mol PEG/ mol monomer**	Specific activity [U/mg]	Rel. activity %
10 kDa mPEG-r-crisantaspase 40%	7.0	543	87
10 kDa mPEG-r-crisantaspase 100%	14.1	541	87
5 kDa mPEG-r-crisantaspase 40%	6.5	501	81
5 kDa mPEG-r-crisantaspase 100%	15.1	483	78
2 kDa mPEG-r-crisantaspase 40%	8.5	524	84
2 kDa mPEG-r-crisantaspase 100%	15.5	515	83
r-crisantaspase	-	622	100

* the numbers "40%" and "100%" indicate an approximate degree of PEGylation of respectively 40-55% and 100% of accessible amino groups (see Examples 2-4, *supra*).

** the ratio mol PEG / mol monomer was extrapolated from data using TNBS assay, that makes the assumption that all amino groups from the protein (e.g., lysine residues and the N-terminus) are accessible.

[0107] Residual activity of mPEG-r-crisantaspase conjugates ranged between 483 and 543 Units/mg. This corresponds to 78-87% of L-asparagine aminohydrolase activity of the unmodified enzyme.

19

Example 6: L-Asparagine-Depleting Effect of Unmodified Crisantaspase

[0108] The pharmacodynamic profile of Erwinase® was determined in B6D2F1-Hybrids (immune competent, females), Charles River Germany. Erwinase® is a commercially available crisantaspase (L-asparaginase derived from *Erwinia chrysanthemi*). Briefly, 2 animals per group received a single i.v. injection of 5, 25, 125, or 250 Units/kg bw Erwinase® At -1 h pre-dose and at 6 h, 12h, 24 h, and 48 h post-dose, plasma samples were collected from orbital sinus and analyzed for plasma levels of L-asparagine.

[0109] Plasma amino acid levels were determined with a PICO-TAG Amino Acid Analysis Kit (Waters). Briefly, plasma samples were deproteinised by methanol precipitation. Free amino acids in the supernatant were derivatised with phenylisothiocyanate and quantified by RP-HPLC.

[0110] As shown in Figure 3, the 5 and 25 U/kg doses were not efficient in depleting L-asparagine levels in mice following iv administration. Only the 250 U/kg dose induced a complete depletion over 48 hrs.

[0111] This result illustrates the clinical limitations of Erwinase®, an unmodified crisantaspase, which needs to be administered up to 3 times a weeks as painful injections in patients suffering from ALL, and at high doses resulting in frequent allergic reactions and immunogenicity.

Example 7: L-Asparagine-Depleting Effect and Plasma L-Asparaginase Activity Following Single Administration of Six mPEG-r-Crisantaspase Conjugates

[0112] The pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles of 6 different mPEG-r-crisantaspase conjugates was determined in B6D2F1-Hybrids (immune competent, females), Charles River Germany. The six conjugates tested differed in the molecular size of the PEG (2, 5 or 10 kDa) and in the degree of PEGylation (maximal vs. partial PEGylation). Unmodified crisantaspase (Erwinase®) was used as a reference. Briefly, 4 animals per group received a single i.v. injection of 5 Units/kg bw conjugate vs. 250 Units/kg bw Erwinase®. At -1 h pre-dose and at 6 h, 24 h, 48 h, 96 h and 192 h after injection, plasma samples were collected from the orbital sinus of each animal and analyzed for plasma levels of L-asparagine and residual enzyme activity, respectively.

[0113] Plasma amino acid levels were determined with a PICO-TAG Amino Acid Analysis Kit (Waters). Briefly, plasma samples were deproteinised by methanol precipitation. Free amino acids in the supernatant were derivatised with phenylisothiocyanate and quantified by RP-HPLC.

[0114] Enzyme activity in plasma was determined by a chromogenic assay. L-aspartic β -hydroxamate (AHA) was used as substrate. The enzymes hydrolyzed AHA to L-Asp and hydroxylamine, which was determined at 710 nm after condensation with 8-hydroxyquinoline

and oxidation to indooxine. (Analytical Biochemistry 309 (2002): 117-126, incorporated herein by reference in its entirety).

[0115] As shown in Figure 4, the, conjugates administered at 5U/kg showed an L-asparagine depleting potency at least as good as that of Erwinase® 250 U/kg, suggesting that PEGylation increased potency of the protein by at least 50 times. All conjugates exhibited similar potency, depleting plasma levels in L-asparagine for 2 days, except for the 5 kDa-100% conjugate which showed longer duration of action (96h = 4 days as compared to 48h = 2 days for other conjugates).

[0116] Thus, increasing the size of the PEG conjugated to the r-crisantaspase from 2 kDa to 5 kDa resulted in an improved potency and duration of action. However, surprisingly, increasing the size of the PEG to 10 kDa did not further improve the potency and duration of action of the conjugate, it even resulted in a decrease when compared to the 5 kDa maximally PEGylated conjugate.

[0117] Enzymatic activity was consistent with L-asparagine depletion. As shown in Figure 5, the 5 kDa-100% conjugate exhibited the largest AUC, reflecting a longer half-life. Lower AUCs were observed with PEG-40% (partially PEGylated) vs. PEG-100% (maximally PEGylated) conjugates for the 2 kDa and 5 kDa candidates and no difference was observed for the 10 kDa candidates.

[0118] Consistent with the L-asparagine depletion data, increasing the molecular size of the PEG conjugated to the r-crisantaspase from 2 kDa to 5 kDa resulted in a longer circulating L-asparaginase activity. However, surprisingly, increasing the size of the PEG to 10 kDa did not further improve the *in vivo* enzymatic activity of the conjugate, it even resulted in a decrease when compared to the 5 kDa maximally PEGylated conjugate. Also, notably, when r-crisantaspase was N-terminally monoPEGylated with high molecular weight (i.e., 40 kDa) mPEG, there was no significant impact on the *in vitro* stability of the enzyme toward proteolysis (data not shown).

Example 8: Dose-Ranging Effects of Two mPEG-r-Crisantaspase Conjugates on Plasma L-Asparagine

[0119] The pharmacodynamic profile of 2 mPEG-r-crisantaspase conjugates compared to pegaspargase (Oncaspar®) was determined in B6D2F1-Hybrids (immune competent, females), Charles River Germany. The conjugates tested were the 2 kDa maximally (100%) PEGylated r-crisantaspase and the 5 kDa maximally (100%) PEGylated r-crisantaspase at 3 doses. Briefly, 8 animals per group received a single i.v. injection of 5, 25 or 50 Units/kg bw of the r-crisantaspase conjugates, corresponding to 10, 50 or 100 µg protein/kg. As a comparative arm, Oncaspar® was tested at 1 Unit/kg, corresponding to 10 µg protein/kg. At -1 h pre-dose and at

2

90 min, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 192 h and 240 h post-dose plasma samples were collected from orbital sinus and analyzed for plasma levels of L-asparagine.

[0120] Plasma amino acid levels were determined with a PICO-TAG Amino Acid Analysis Kit (Waters). Briefly, plasma samples were deproteinised by methanol precipitation. Free amino acids in the supernatant were derivatised with phenylisothiocyanate and quantified by RP-HPLC.

[0121] The dose-related effects of the conjugates on plasma L-asparagine levels are shown in Figure 6. As shown in Figures 6A and 6B, both conjugates were highly efficient in depleting circulating L-asparagine. For the 2 kDa 100% conjugate, total depletion was observed over 3, 6 and at least 10 days at the 5U, 25U and 50U/kg doses, respectively. For the 5 kDa 100% conjugate, total depletion was observed over 3, 10 and 10 days at the 5U, 25U and 50U/kg doses, respectively. For both conjugates tested, the 5, 25 and 50 U/kg doses tested corresponded to 10, 50 and 100 µg/kg on a protein content basis, which is a very low amount of protein when compared to other available L-asparaginase preparations. Indeed, 250 U/kg Erwinase® corresponds to approximately 520 µg/kg, and 1 U/kg Oncaspar® corresponds approximately to 10 µg/kg (protein content basis). Figure 6C shows that the administration of an equivalent quantity of protein (10 µg/kg) of either the 2 kDa-100% conjugate, the 5 kDa-100% conjugate or Oncaspar® resulted in a similar L-asparagine depletion over 72 hrs.

Example 9: Pharmacokinetic Profiles of Two mPEG-r-Crisantaspase Conjugates

[0122] The pharmacokinetic profile of mPEG-r-crisantaspase conjugates was determined in B6D2F1-Hybrids (immune competent, females), Charles River Germany. The conjugates tested were the 2 kDa maximally (100%) PEGylated r-crisantaspase and the 5 kDa maximally (100%) fully PEGylated r-crisantaspase at 3 doses. Unmodified crisantaspase (Erwinase®) at 250 U/kg and Oncaspar® at 1 U/kg were also tested as controls. Briefly, 8 animals per group received a single i.v. injection of 5, 25 or 50 Units/kg bw of each mPEG-r-crisantaspase conjugate compared to Erwinase® and Oncaspar®. At -1 h pre-dose and at 90 min, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 192 h and 240 h post-dose plasma samples were collected from orbital sinus and analyzed for plasma levels of residual enzyme activity.

[0123] Enzyme activity in plasma was determined by a chromogenic assay. L-aspartic β-hydroxamate (AHA) was used as substrate. The enzymes hydrolyzed AHA to L-Asp and hydroxylamine, which was determined at 710 nm after condensation with 8-hydroxyquinoline and oxidation to indooxine. (*Analytical Biochemistry* 309 (2002): 117-126).

[0124] For the calculation of the half-life time, exponential best-fit lines of the respective residual plasma activities were derived using the MS-excel function tool. Negative activity values were excluded from the calculation.

Parameter	Definition
A _{max}	Maximal residual enzyme activity
t _{Amax}	Time to A _{max} after test item exposure
d _{Amax}	Maximal duration of A _{max} or A above zero

[0125] The half-life time of the residual enzyme activity in plasma were derived from the following formula using the MS-excel function tool and the respective formula of the exponential best-fit lines:

Mean:

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

where t_{1/2} is the half-life, t is the time point, c_t is the residual plasma activity at the time point and c₀ the residual plasma activity at the beginning.

[0126] The areas under the curve (AUC) were calculated using SigmaPlot Version11. Pharmacokinetic data are summarized in Tables 3 and 4, below, and Figures 7-9.

Table 3: Primary pharmacokinetics of a single treatment with 250 U/kg bw of Erwinase®, 1 U/kg bw Pegaspargase (Oncaspar®), or 2 kDa mPEG-r-crisantaspase 100% conjugates (residual plasma enzyme activity)

Parameter	Erwinase®	Pegaspargase 1 U/kg bw	2kDa / 100% 5U/kg bw	2kDa / 100% 25U/kg bw	2kDa / 100% 50U/kg bw
A _{max}	83.9 U/L	6 U/L	14 U/L	153 U/L	208 U/L
t _{Amax}	6 h	90 min	90 min	6 h	6 h
d _{Amax} above zero	18 h from 6 h – 24 h	46.5 h 90 min – 48 h	70.5 h 90 min – 72 h	238.5 h 90 min – 240 h	238.5 h 90 min – 240 h
AUC (mean)	1205	222	627	12446	28349
t _{1/2}	6 h	28 h	31 h	55 h	85 h

Table 4: Primary pharmacokinetics of a single treatment with 250 U/kg bw of Erwinase®, 1 U/kg bw Pegaspargase (Oncaspar®), or 5 kDa mPEG-r-crisantaspase 100% conjugates (residual plasma enzyme activity)

Parameter	Erwinase®	Pegaspargase 1 U/kg bw	5 kDa / 100% 5 U/kg bw	5 kDa / 100% 25 U/kg bw	5 kDa / 100% 50 U/kg bw
A _{max}	83.9 U/L	6 U/L	18 U/L	188 U/L	226 U/L

21

t _{Amax}	6 h	90 min	90 min	6 h	48 h
d _{Amax} above zero	18 h from 6 h – 24 h	46.5 h 90 min – 48 h	94.5 h 90 min – 96 h	238.5 h 90 min – 240 h	238.5 h 90 min – 240 h
AUC (mean)	1205	222	798	19748	33151
t _{1/2}	6 h	28 h	38 h	63 h	104 h

[0127] The data show that PEGylation of r-crisantaspase significantly prolongs half-life when compared to unmodified crisantaspase, and in a dose-dependent manner (Tables 3 and 4, Figures 7-9). Additionally, when compared at the same dose level, AUCs measured for the 5 kDa-100% were higher than those observed for the 2-kDa-100% conjugates. A difference of 21%, 37% and 14% were consistently found in favor of the 5 kDa-100% conjugate, at the 5, 25 and 50 U/kg doses, respectively (Figure 8). The 5 kDa-100% conjugate also appeared to have a longer half-life than Oncaspar® itself when tested at the same dose on a protein content basis, as shown in Figure 9 and in the derived pharmacokinetic parameters shown in Table 4. The superior pharmacokinetic profiles for the *Erwinia* conjugates are surprising, since *E. coli*-derived L-asparaginase is known to have a longer half-life in human and in animals than *Erwinia chrysanthemi*-derived L-asparaginase (crisantaspase). Hence, a longer half-life would have logically been predicted for PEGylated *E. coli* L-asparaginase (pegaspargase) compared to PEGylated r-crisantaspase. However, unexpectedly and advantageously, the PEGylated r-crisantaspase has a longer half-life than pegaspargase.

[0128] Table 5, below, summarizes pharmacokinetic and pharmacodynamic data gathered from several experiments, including those described in Examples 7-9 herein, showing that: 1) both the 2 kDa-100% and the 5 kDa-100% conjugates were highly potent in increasing potency and duration of action of crisantaspase, as shown by the marked differences observed compared to Erwinase®; 2) the 5 kDa-100% conjugate was longer-acting than both the 2 kDa-100% conjugate and Oncaspar®, as shown by a longer half-life observed at all doses tested. In view of the surprisingly inferior results obtained with the 10 kDa-100% conjugate, these data suggest that the benefit of PEGylation increases with the size of the PEG moiety anchored to the crisantaspase up to 5 kDa. The higher molecular weight PEG did not add further benefit, and, at least in the case of 10 kDa, might be even be detrimental. This is unexpected and contrary to results that were seen *e.g.*, when Holtsberg *et al.* conjugated varying molecular weights of PEG to arginine deaminase, another amino acid degrading enzyme isolated from a microbial source. In those studies pharmacokinetic and pharmacodynamic function of the arginine deaminase enzyme increased as the size of the PEG attachment increased from a molecular weight of 5000 Da to 20,000 Da (Holtsberg, F.W., *Journal of Controlled Release* 80 (2002), 259-271), , incorporated herein by reference in its entirety).

Table 5

	Erwinase®	2 kDA-100% mPEG-r- crisantaspase		5 kDA-100% mPEG-r- crisantaspase		Oncaspar®	
Dose (µg/kg)	520	10	50	10	50	10	50
Dose (U/kg)	250	5	25	5	25	1	5
T _{1/2} (h)	6	31	55	38	63	28	51
Duration of L-asparagine depletion (days)	2	2-3	6	3-4	10+	3	8+

[0129] In addition, as seen in more detail below, the immunogenicity data showed that the 10 kDa-100% exhibited an unacceptable immunogenicity profile, a major drawback when considering administering the compound to patients who are allergic to *E. coli* L-asparaginase or have developed anti-L-asparaginase antibodies. In this respect, the 10 kDa-100% conjugate is really not suitable. The 2 kDa-100% and the 5 kDa-100% are preferable, and the 5 kDa-100% conjugate is particularly preferable.

Example 10: Immunogenicity

[0130] Immunogenicity of mPEG-r-crisantaspase conjugates was determined in B6D2F1-Hybrids (immune competent, females), Charles River Germany. Animals were treated twice a week in weeks 1, 2, 3, 4, and 8 by i.v. injection of 250 U/kg bw for Erwinase® and 5 U/kg bw for all r-crisantaspase conjugates. Serum samples were collected at -1h pre-dose and after 1w, 2w, 4w, 6w and 8w from the orbital sinus. Anti-crisantaspase or anti-mPEG-r-crisantaspase antibody levels in serum were determined by ELISA. The results are summarized in Figures 10 and 11.

[0131] High titers of anti-crisantaspase antibodies were observed for Erwinase® starting at week 2 and were maintained for the whole study period. In contrast, no significant antibody levels were observed for r-crisantaspase conjugates (Figure 10).

[0132] As shown in Figure 11, the production of anti-conjugate antibodies remained of low intensity and frequency for the 2 kDa and 5 kDa mPEG-r-crisantaspase conjugates, and increased with higher values and frequency for the 10 kDa mPEG-r-crisantaspase conjugates. No clear difference was noted between the fully and partially PEGylated conjugates (not shown).

[0133] Thus, these data demonstrated that the PEGylation strategy that was selected reduced the immunogenicity of the conjugates compared to the unmodified L-asparaginase, markedly decreasing the anti-crisantaspase antibody response. However, anti-conjugate antibodies were detected, especially with the 10 kDa conjugates, and with a lower intensity with the 2 kDa and 5 kDa conjugates.

[0134] In conclusion, it appears that, up to 5 kDa, PEGylation succeeded in improving pharmacokinetic profile, potency and duration of action of r-crisantaspase, while reducing immunogenicity when compared to the unmodified protein, with a potency and duration of action increasing with the size of the polymer used, the 5 kDa mPEG-r-crisantaspase conjugate being slightly more potent than the 2 kDa mPEG-r-crisantaspase conjugate. However, further increasing the size of the PEG to 10 kDa failed to further improve potency and duration of action, as the 10 kDa mPEG-r-crisantaspase conjugate was less potent *in vivo* than the 5 kDa mPEG-r-crisantaspase conjugate, despite similar *in vitro* potencies. In addition, the 10 kDa mPEG-r-crisantaspase conjugates exhibited an unacceptable immunogenicity profile, an unexpected result in view of published results with other proteins.

* * *

[0135] While embodiments and applications of the present invention have been described in some detail by way of illustration and example, it would be apparent to those of skill in the art that many additional modifications would be possible without departing from the inventive concepts contained herein. All references cited herein are hereby incorporated in their entirety.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A conjugate comprising an L-asparaginase from *Erwinia* having at least 80% identity to the amino acid of SEQ ID NO:1 and polyethylene glycol (PEG), wherein the PEG has a molecular weight less than or equal to about 5000 Da.
- 5 2. The conjugate of claim 1, wherein said L-asparaginase has at least 90% identity to the amino acid of SEQ ID NO:1.
3. The conjugate of claim 1, wherein said L-asparaginase has at least 99% identity to the amino acid of SEQ ID NO:1.
- 10 4. The conjugate of claim 1, wherein said L-asparaginase is identical to the amino acid of SEQ ID NO:1.
5. The conjugate of any of claims 1-4, wherein said PEG has a molecular weight of about 5000 Da.
6. The conjugate of any of claims 1-4, wherein said PEG has a molecular weight of less than about 5000 Da.
- 15 7. The conjugate of any of claims 1-4, wherein said PEG has a molecular weight of less than about 4000 Da.
8. The conjugate of any of claims 1-4, wherein said PEG has a molecular weight of less than about 3000 Da.
9. The conjugate of any of claims 1-4, wherein said PEG has a molecular weight of less than about 2500 Da.
- 20 10. The conjugate of any one of claims 1-9, wherein said conjugate has an *in vitro* activity of at least 60% as compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG.
11. The conjugate of claim 10, wherein said conjugate has an *in vitro* activity of at least 70% as compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG.
- 25 12. The conjugate of claim 11, wherein said conjugate has an *in vitro* activity of at least 78% as compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG.
13. The conjugate of claim 10, wherein said conjugate has an *in vitro* activity of at least 80% as compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG.

14. The conjugate of claim 10, wherein said conjugate has an *in vitro* activity of at least 87% as compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG.
15. The conjugate of claim 10, wherein said conjugate has an *in vitro* activity of at least 90% as compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG.
- 5 16. The conjugate of any one of claims 1-15, wherein said conjugate has an L-asparagine depletion activity at least about 50 times more potent than the L-asparaginase when not conjugated to PEG.
17. The conjugate of any one of claims 1-16, wherein said conjugate depletes plasma L-asparagine levels to an undetectable level for at least 48 hours.
18. The conjugate of any one of claims 1-16, wherein said conjugate depletes plasma L-asparagine
10 levels to an undetectable level for at least 96 hours.
19. The conjugate of any one of claims 1-18, wherein said conjugate has a longer *in vivo* circulating half life compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG.
20. The conjugate of any one of claims 1-19, wherein said conjugate has a longer $t_{1/2}$ than pegaspargase at an equivalent protein dose.
- 15 21. The conjugate of claim 20, wherein said conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 58 hours at a dose of about 50 μg protein/kg.
22. The conjugate of claim 20, wherein said conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 60 hours at a dose of about 50 μg protein/kg.
23. The conjugate of claim 20, wherein said conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 63 hours at a dose of
20 about 50 μg protein/kg.
24. The conjugate of claim 20, wherein said conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 65 hours at a dose of about 50 μg protein/kg.
25. The conjugate of claim 20, wherein said conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 34 hours at a dose of about 10 μg protein/kg.
- 25 26. The conjugate of claim 20, wherein said conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 36 hours at a dose of about 10 μg protein/kg.
27. The conjugate of claim 20, wherein said conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 38 hours at a dose of about 10 μg protein/kg.

28. The conjugate of claim 20, wherein said conjugate has a $t_{1/2}$ of at least about 40 hours at a dose of about 10 μg protein/kg.
29. The conjugate of any one of claims 1-28, wherein said conjugate has a greater AUC compared to the L-asparaginase when not conjugated to PEG.
- 5 30. The conjugate of claim 29, wherein said conjugate has a mean AUC that is at least about 3 times greater than pegaspargase at an equivalent protein dose.
31. The conjugate of any one of claims 1-30 wherein the PEG is covalently linked to one or more amino of said L-asparaginase.
- 10 32. The conjugate of claim 31, wherein the PEG is covalently linked to said one or more amino groups by an amide bond.
33. The conjugate of claim 31 or 32, wherein the PEG is covalently linked to at least from about 40% to about 100% of the accessible amino groups.
34. The conjugate of claim 31, wherein the PEG is covalently linked to at least from about 40% to about 90% of total amino groups.
- 15 35. The conjugate of one of claims 1 to 34 having the formula:
- $\text{Asp}-[\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-\text{NH}-\text{PEG}]_n$
- wherein Asp is the L-asparaginase, NH is one or more of the NH groups of the lysine residues and/or the N-terminus in the Asp, PEG is a polyethylene glycol moiety, n is a number that represents at least 40% to about 100% of the accessible amino groups (e.g., lysine residues and/or the N-terminus) in the Asp, and x is an integer ranging from 1 to 8.
- 20 36. The conjugate of claim 35, wherein x is an integer ranging from 2 to 5.
37. The conjugate of claim 35, wherein n is a number that represents at least about 40% of the accessible amino groups in the Asp.
- 25 38. The conjugate of claim 37, wherein n is a number that represents about 100% of the accessible amino groups in the Asp.
39. The conjugate of any one of claims 1-38, wherein said PEG is monomethoxy-polyethylene glycol.

40. A method of making the conjugate of any one of claims 1-39, said method comprising combining an amount of said PEG with an amount of said L-asparaginase in a buffered solution for a time period sufficient to covalently link said PEG to said L-asparaginase.
- 5 41. The method of claim 40, wherein said buffered solution has a pH value of between about 7.0 and about 9.0.
42. The method of claim 41, wherein said buffered solution has a pH value of between about 7.5 and about 8.5.
43. The method of claim 40, wherein the amount of said L-asparaginase is a protein concentration of between about 0.5 mg/mL and about 25 mg/mL.
- 10 44. The method of claim 43, wherein the amount of said L-asparaginase is a protein concentration of between about 2 mg/mL and about 20 mg/mL.
45. The method of claim 43, wherein the amount of said L-asparaginase is a protein concentration of between about 3 mg/mL and about 15 mg/mL.
- 15 46. The method of claim 40, wherein the amount of said PEG is a molar excess of polymer over amino groups in said L-asparaginase of less than about 20:1.
47. The method of claim 46, wherein the amount of said PEG is a molar excess of polymer over amino groups in said L-asparaginase of less than about 10:1.
48. The method of claim 46, wherein the amount of said PEG is a molar excess of polymer over amino groups in said L-asparaginase of less than about 8:1.
- 20 49. The method of any of claims 40-48, wherein said PEG is monomethoxy-polyethylene glycol.
50. A method of treating a disease treatable by L-asparagine depletion in a patient, said method comprising administering to said patient an effective amount of the conjugate of any one of claims 1-39.
51. The method of claim 50, wherein said disease treatable by L-asparagine depletion is a cancer.
- 25 52. The method of claim 51, wherein said cancer is selected from the group consisting of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), non-Hodgkin's lymphoma, NK lymphoma, and pancreatic cancer.
53. The method of claim 52, wherein said cancer is ALL.

54. The method of claim 53, wherein said conjugate is administered at an amount of about 5 U/kg to about 25 U/kg.
55. The method of claim 54, wherein said conjugate is administered at an amount of about 25U/kg.
56. The method of any one of claims 53-55, wherein said conjugate is administered in a dose that depletes L-asparagine to undetectable levels for a period of about 3 days to about 10 days.
57. The method of any one of claims 53-56, wherein said conjugate elicits a lower immunogenic response in said patient compared to the unconjugated L-asparaginase.
58. The method of any one of claims 53-57, wherein said conjugate has a longer *in vivo* circulating half-life after a single dose compared to the unconjugated L-asparaginase.
59. The method of any one of claims 53-58, wherein said conjugate has a greater AUC value after a single dose compared to the unconjugated L-asparaginase.
60. The method of any one of claims 50-59, wherein said conjugate is administered intravenously.
61. The method of any one of claims 50-59, wherein said conjugate is administered intramuscularly.
62. The method of any one of claims 50-61, wherein said conjugate is administered once per week.
63. The method of any one of claims 50-61, wherein said conjugate is administered twice per week.
64. The method of any one of claims 50-61, wherein said conjugate is administered less than once per week.
65. The method of any one of claims 50-64, wherein said conjugate is administered as monotherapy.
66. The method of claim 65, wherein said conjugate is not administered with an asparagine synthetase inhibitor.
67. The method of any one of claims 50 to 66, wherein said patient has had a previous hypersensitivity to an *E. coli* L-asparaginase or PEGylated form thereof.
68. The method of any one of claims 50 to 66, wherein said patient has had a previous hypersensitivity to an *Erwinia* L-asparaginase.
69. The method of claim 67 or 68, wherein said hypersensitivity is selected from the group consisting of allergic reaction, anaphylactic shock, and silent hypersensitivity.

25

70. The method of any one of claims 50 to 69, wherein said patient has had a disease relapse.
71. The method of claim 70, wherein said disease relapse occurs after treatment with an *E. coli* L-asparaginase or PEGylated form thereof.
72. A pharmaceutical composition comprising the conjugate of any one of claims 1-39.
- 5 73. The conjugate of any of claims 1-39 for use in therapy.
74. The conjugate of claim 73 for its use in treating a disease treatable by L-asparagine depletion.
75. The conjugate of claim 74, wherein said disease is cancer.
76. The conjugate of claim 75, wherein said cancer is ALL.
- 10 77. The conjugate of claim 76, wherein said conjugate elicits a lower immunogenic response in a patient compared to the unconjugated L-asparaginase.
78. The conjugate of any one of claims 73-77, wherein said medicament is for treatment of disease in a patient who has had a previous hypersensitivity to an *E. coli* L-asparaginase or PEGylated form thereof.
- 15 79. The conjugate of any one of claims 73-77, wherein said medicament is for treatment of disease in a patient who has had a previous hypersensitivity to an *Erwinia* L-asparaginase.
80. The conjugate of claim 78 or 79, wherein said hypersensitivity is selected from the group consisting of allergic reaction, anaphylactic shock, and silent hypersensitivity.
81. The conjugate of any one of claims 73 to 80, wherein said medicament is for treatment of disease in a patient who has had a disease relapse.
- 20 82. The conjugate of claim 81, wherein said disease relapse occurs after treatment with an *E. coli* L-asparaginase or PEGylated form thereof.
- 25 83. A method of treating a disease treatable by L-asparagine depletion in a patient, said method comprising selecting a patient in need of a treatment, wherein said patient has had a previous hypersensitivity to an *E. coli* L-asparaginase or PEGylated form thereof, and/or wherein said patient has had a previous hypersensitivity to an *Erwinia* L-asparaginase, and/or said patient has had a disease relapse, and administering to said patient an effective amount of the conjugate of any one of claims 1-39.

84. The method of claim 83, wherein said hypersensitivity is selected from the group consisting of allergic reaction, anaphylactic shock, and silent hypersensitivity.
85. The method of claim 83, wherein said disease relapse occurs after treatment with an *E. coli* L-asparaginase or PEGylated form thereof.
- 5 86. The method of one of claims 83 to 85, wherein said disease treatable by L-asparagine depletion is a cancer, particularly selected from the group consisting of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), non-Hodgkin's lymphoma, NK lymphoma, and pancreatic cancer.
87. The method of one of claims 83 to 86, wherein said conjugate is administered at an amount of about 5 U/kg to about 25 U/kg, preferably at an amount of about 25U/kg.
- 10 88. The method of any one of claims 83 to 87, wherein said conjugate is administered in a dose that depletes L-asparagine to undetectable levels for a period of about 3 days to about 10 days.
89. The method of any one of claims 83 to 88, wherein said conjugate is administered intravenously or intramuscularly.
- 15 90. The method of any one of claims 83 to 89, wherein said conjugate is administered once per week.
91. The method of any one of claims 83 to 89, wherein said conjugate is administered twice per week.
92. The method of any one of claims 83 to 89, wherein said conjugate is administered less than once per week.
- 20 93. The method of any one of claims 83 to 92, wherein said conjugate is administered as monotherapy.
94. The method of claim 93, wherein said conjugate is not administered with an asparagine synthetase inhibitor.

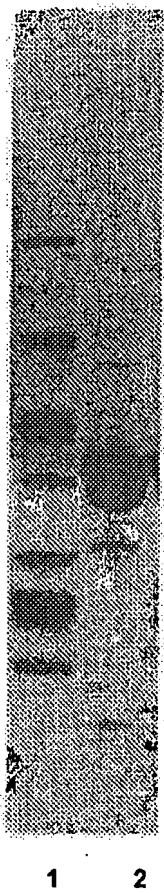
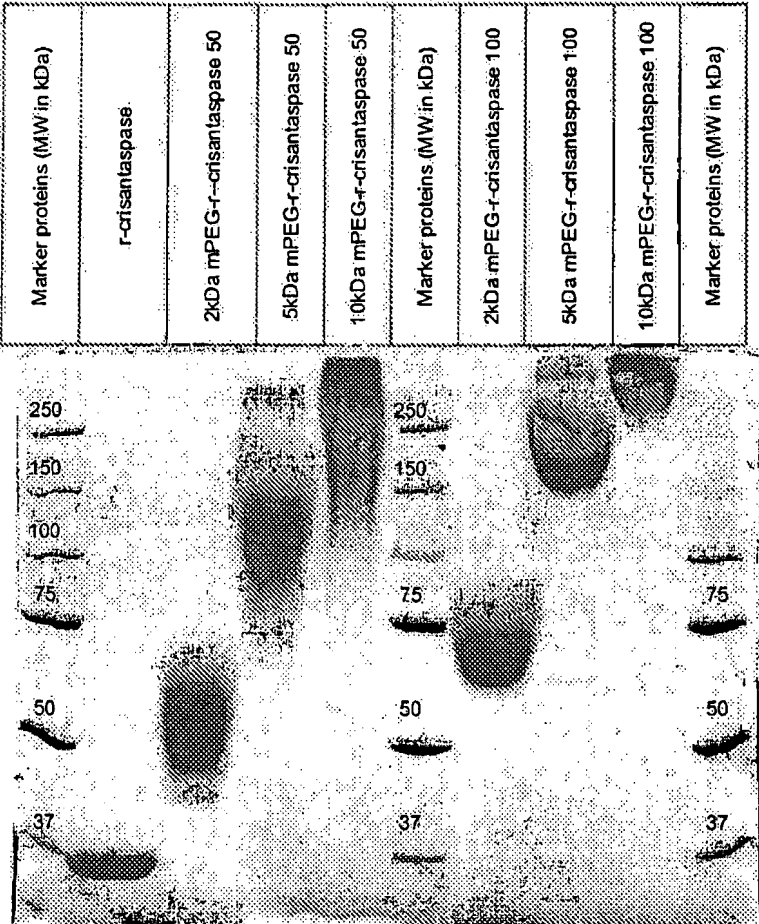


Figure 1

Figure 2



27

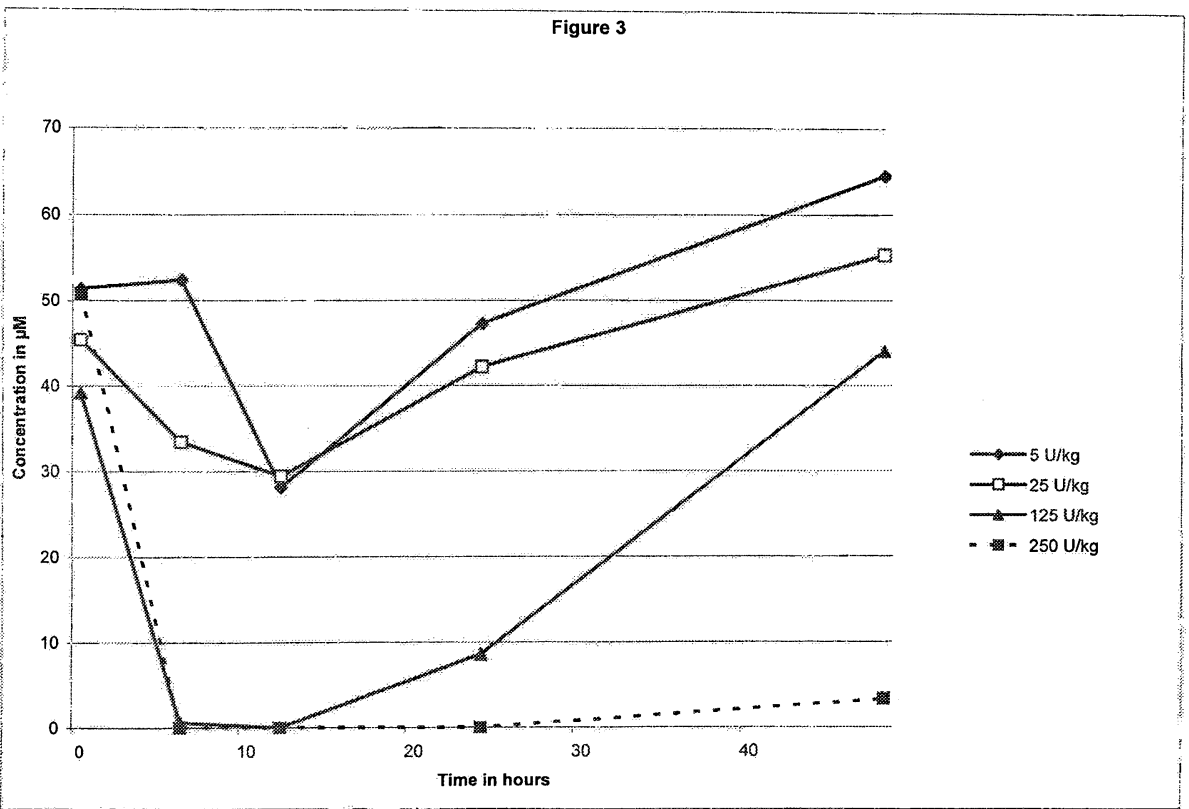
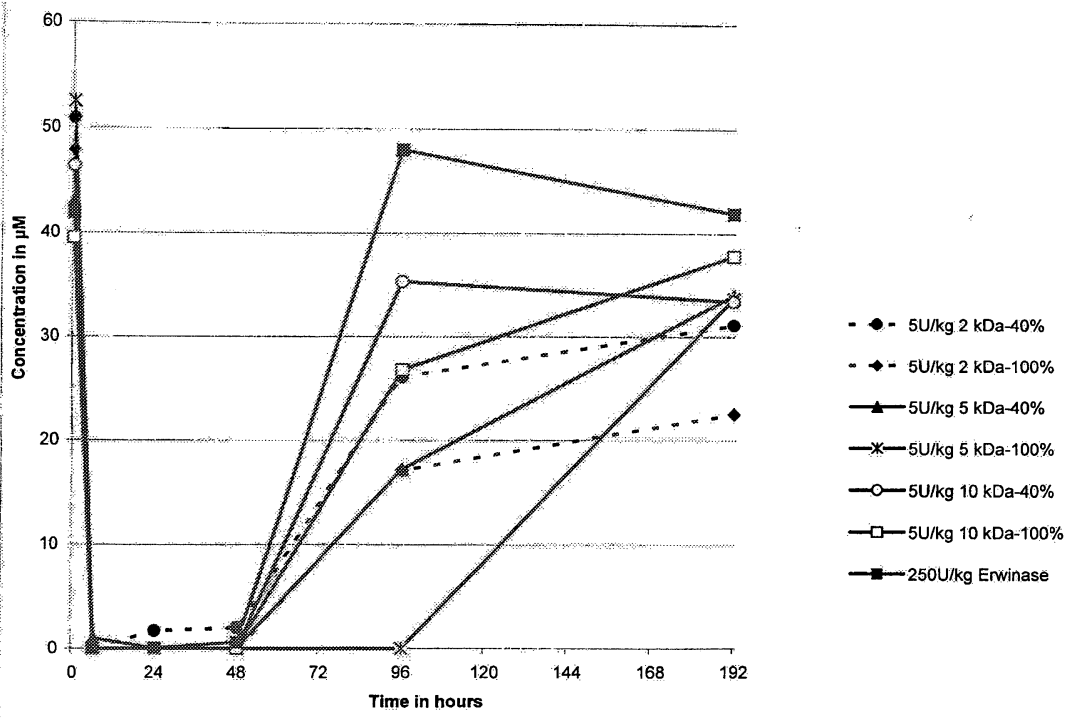


Figure 4



28

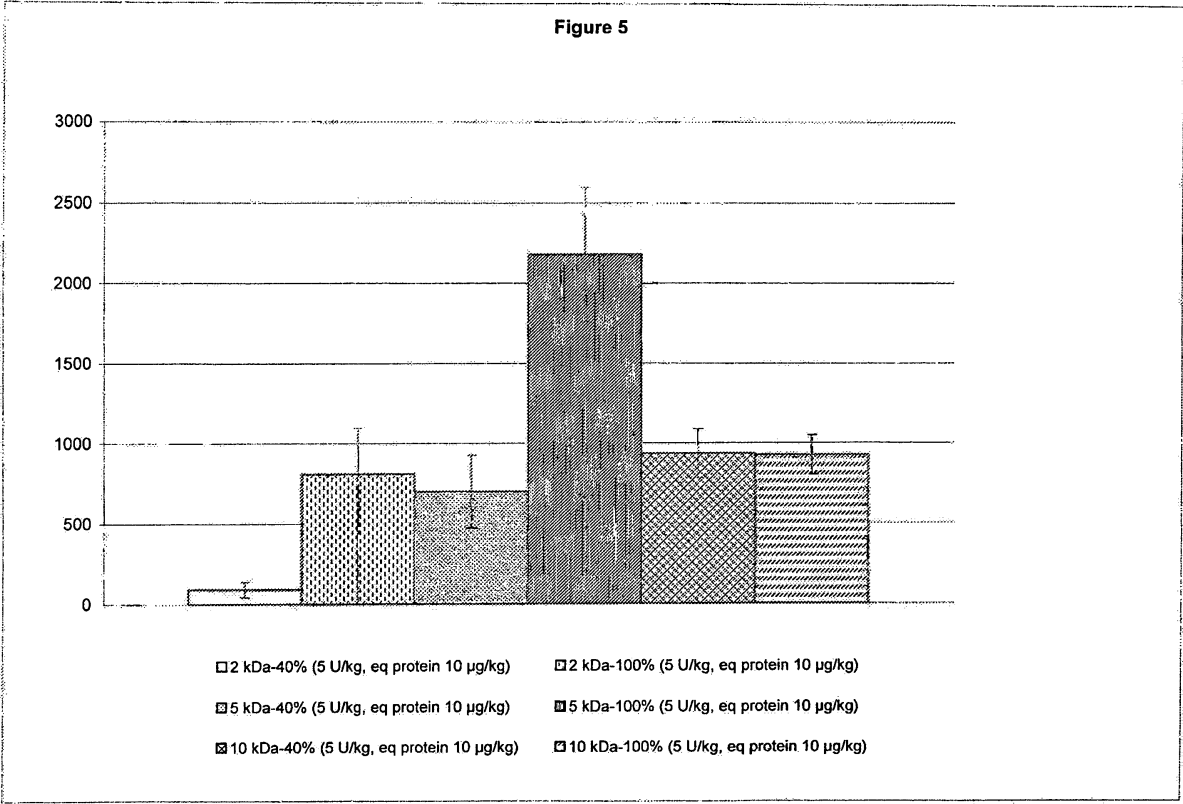
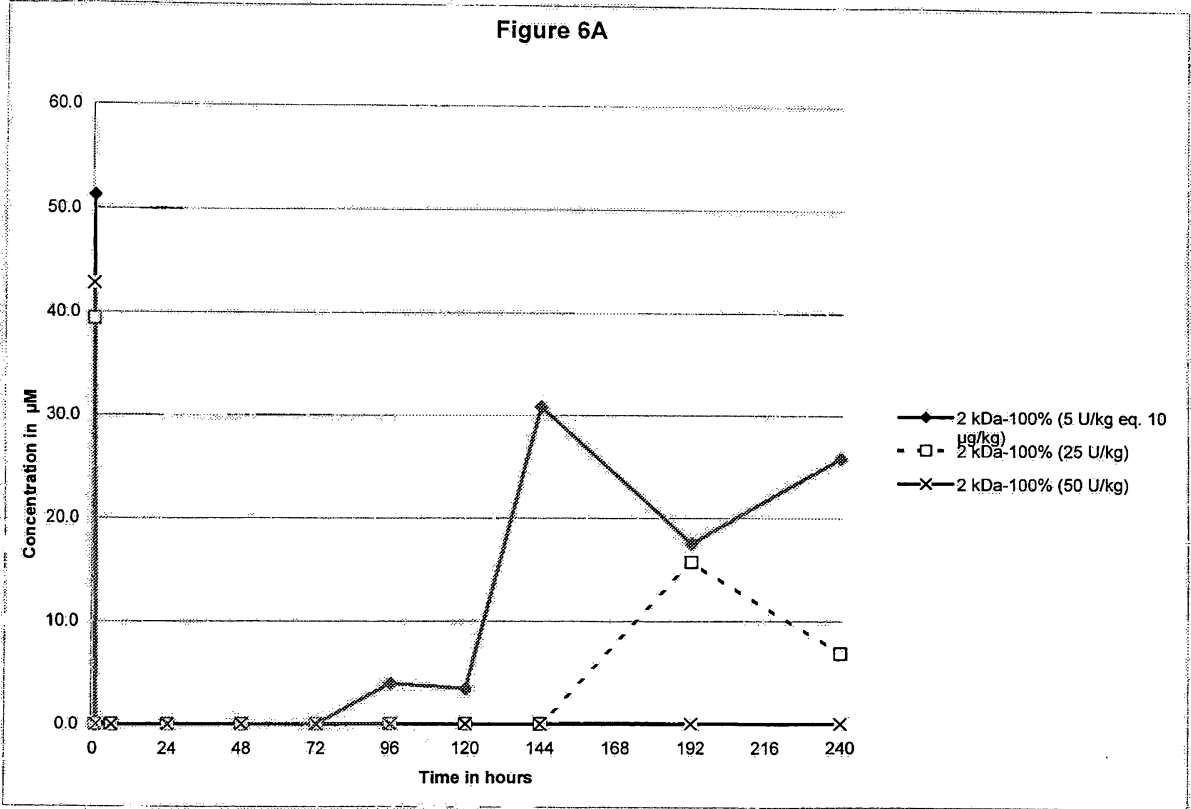


Figure 6A



29

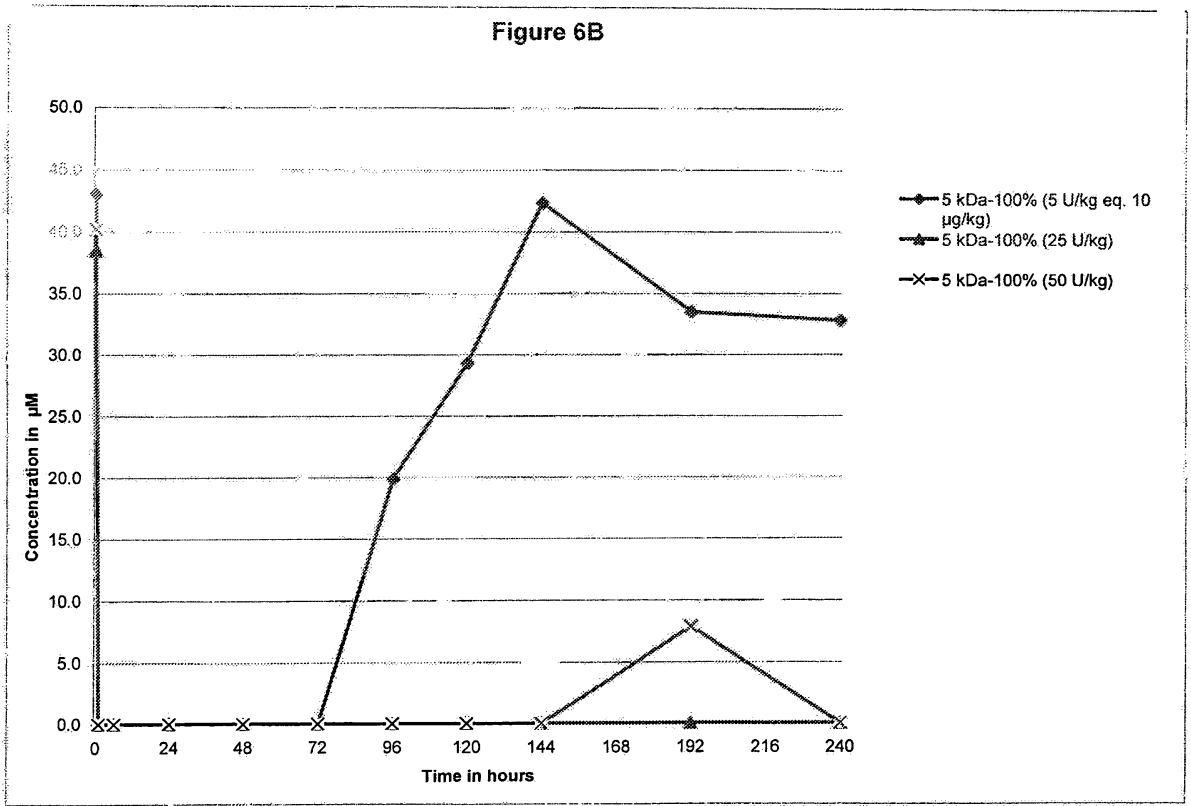
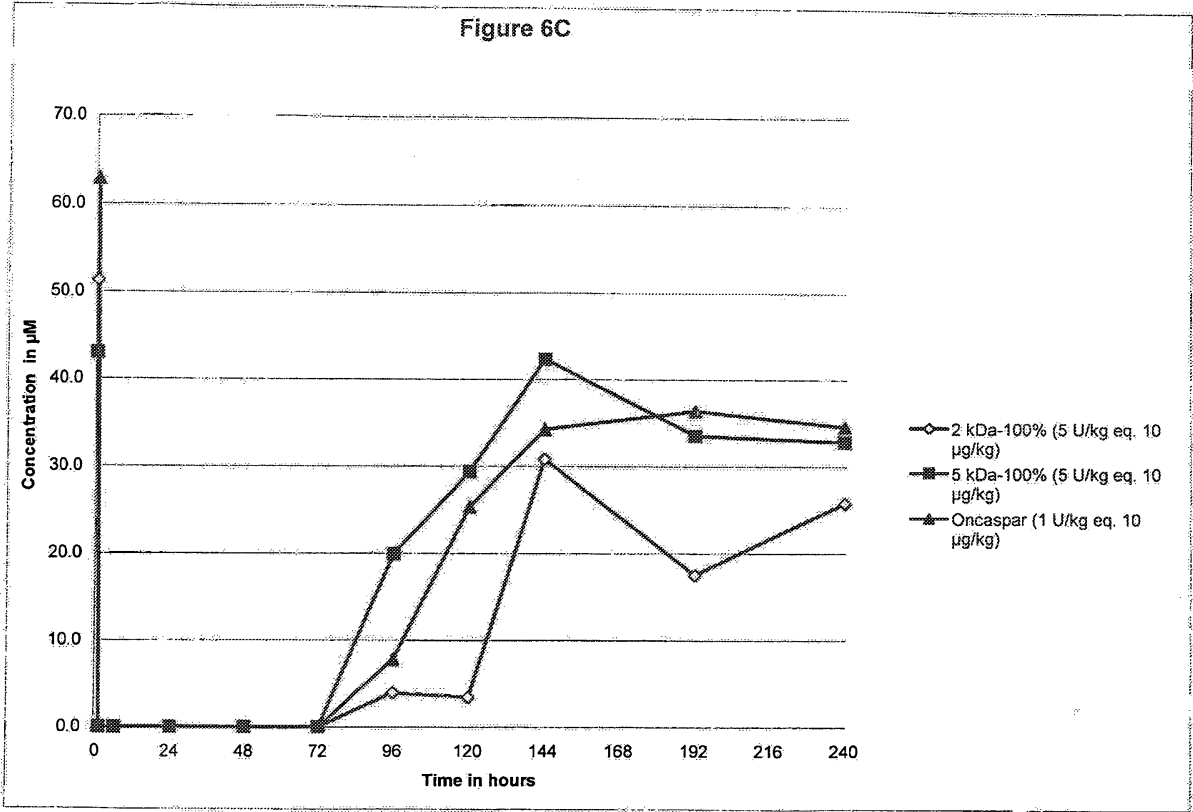


Figure 6C



42

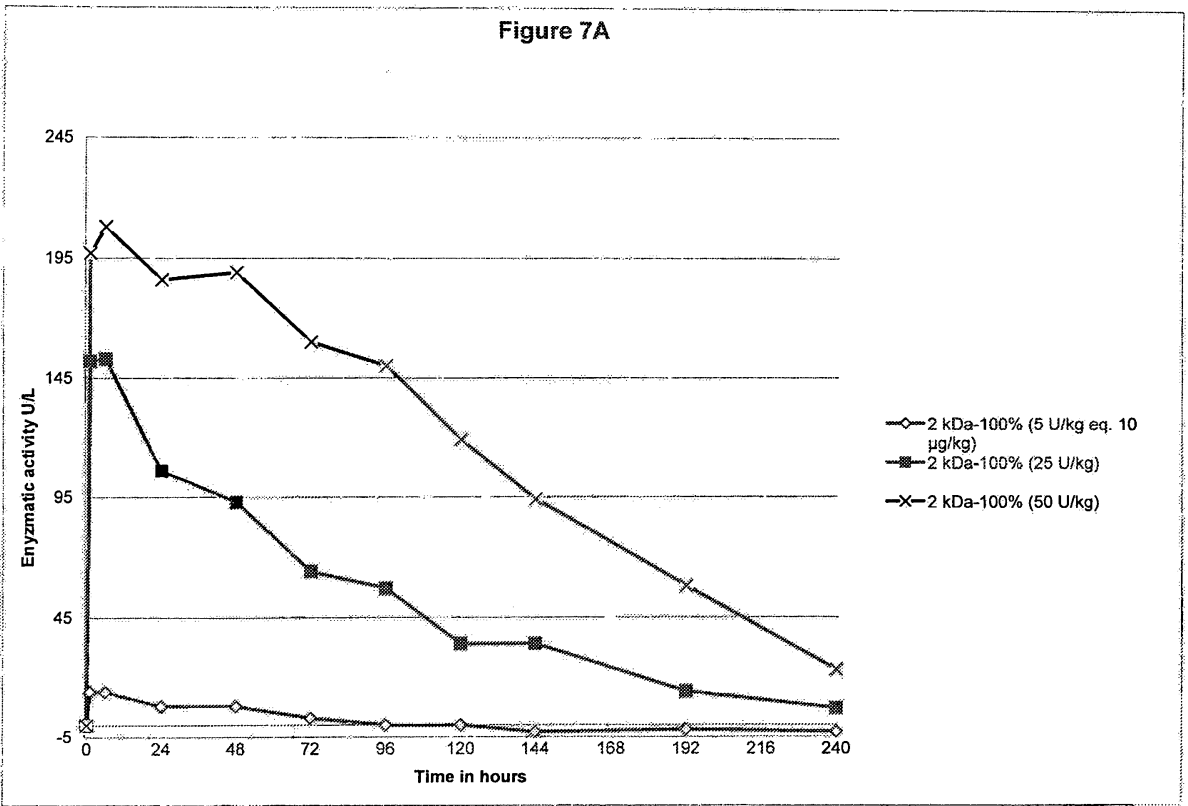
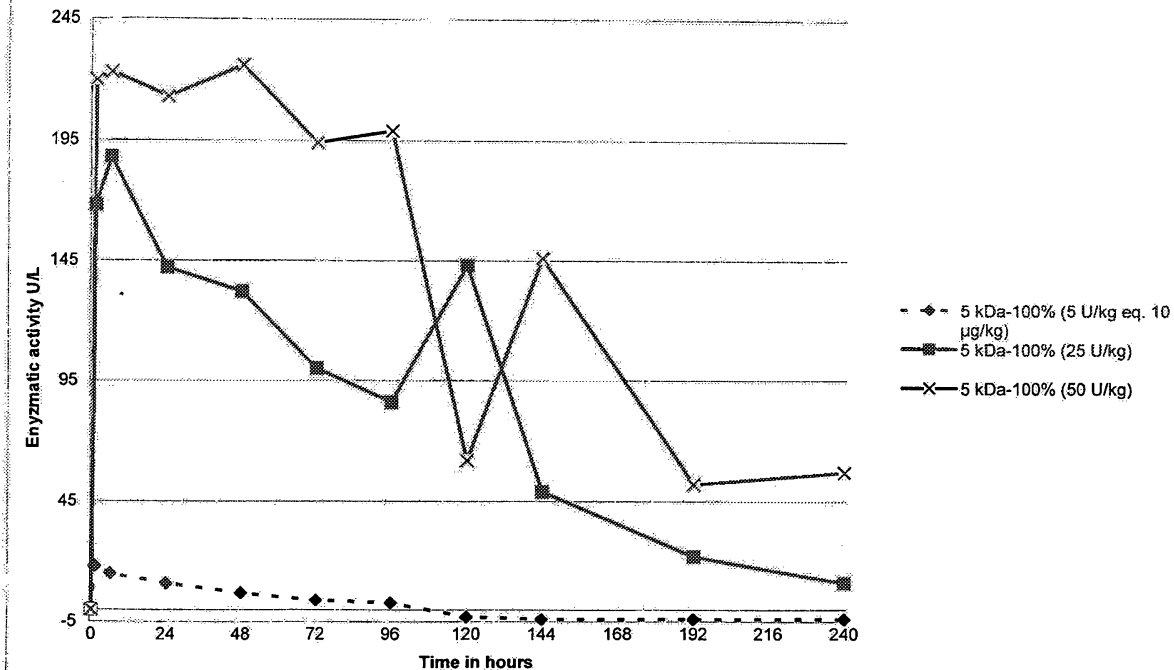


Figure 7B



67

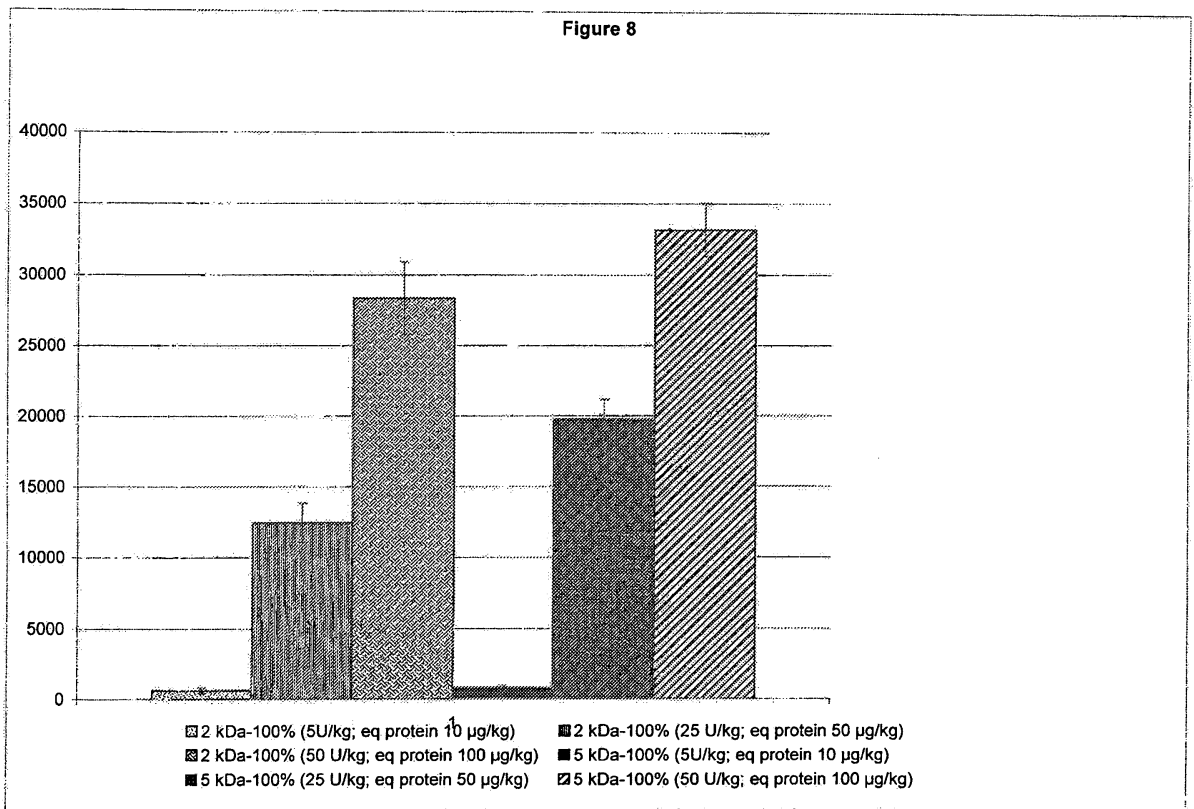
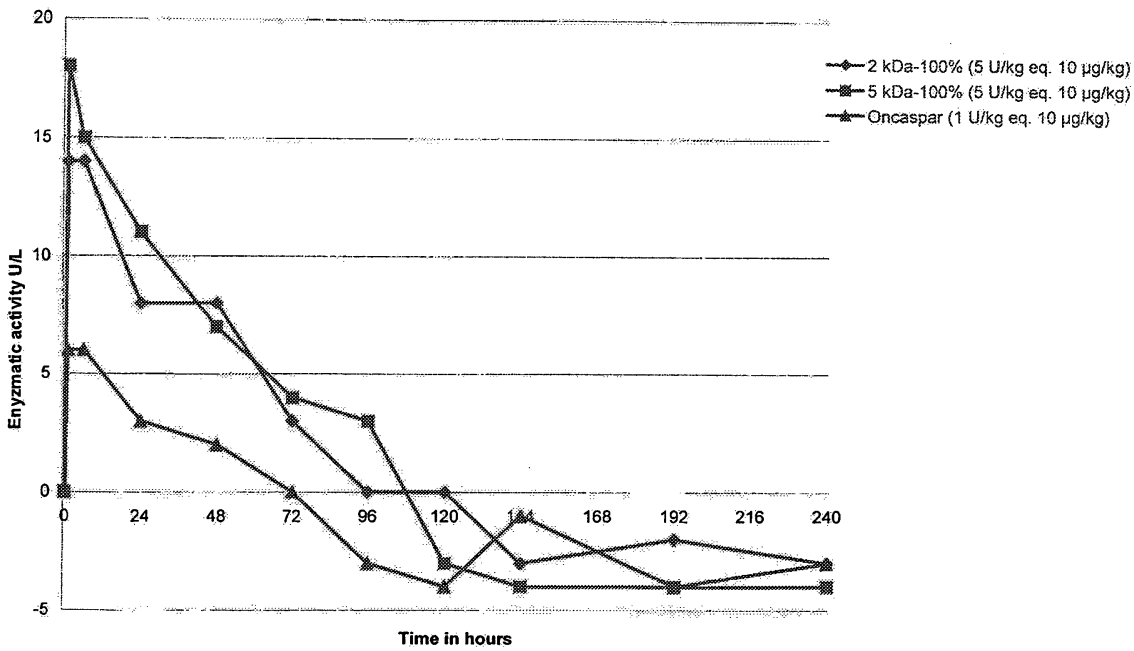
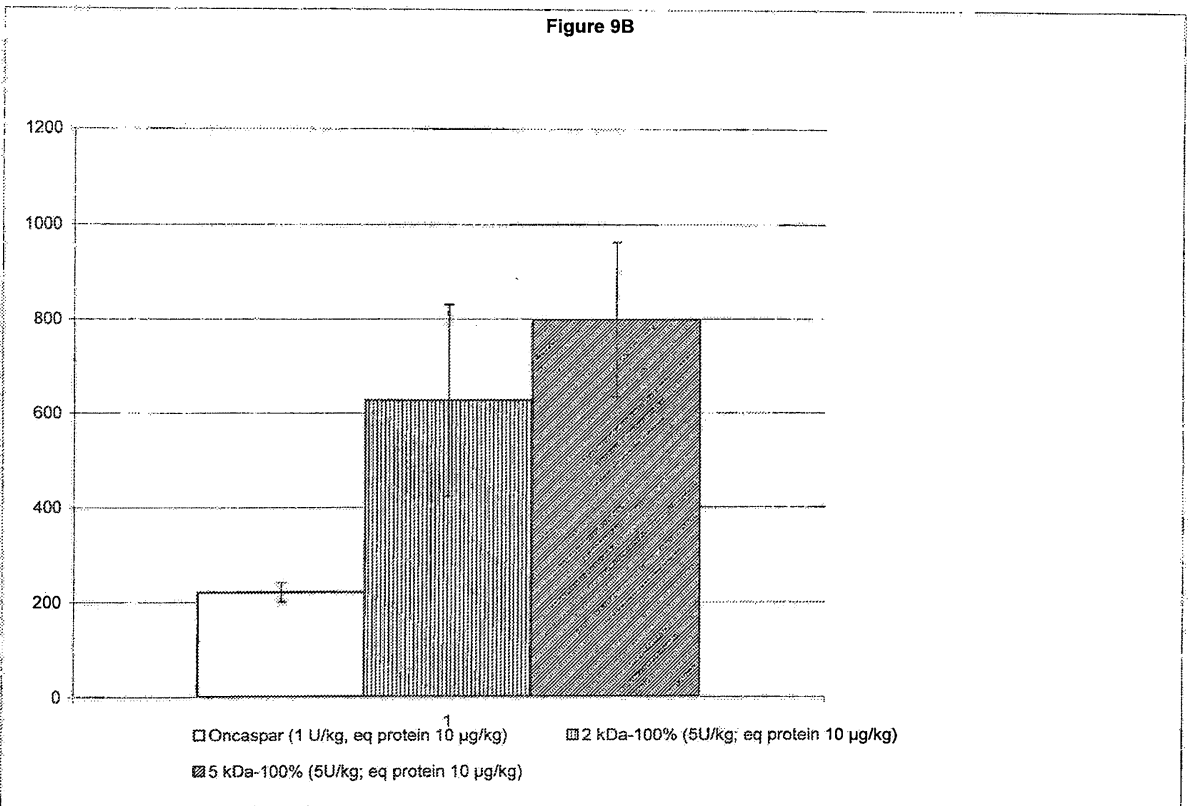


Figure 9A



47



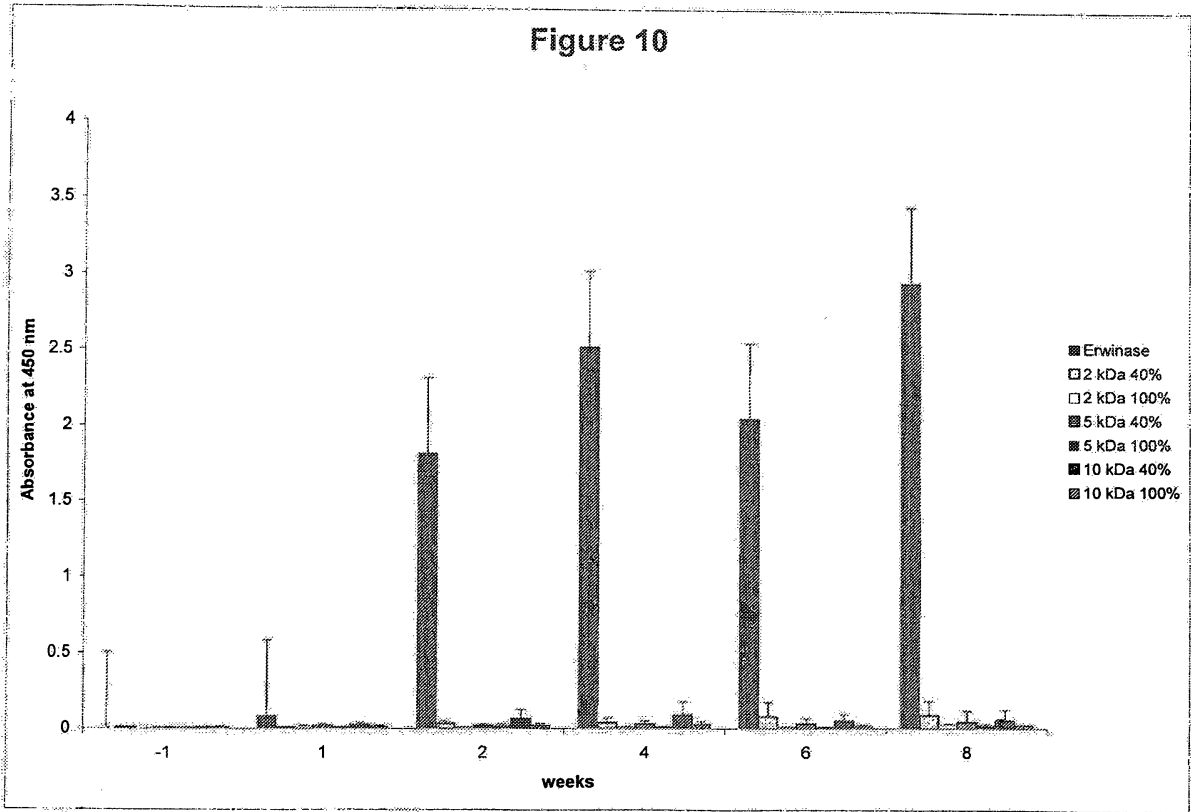
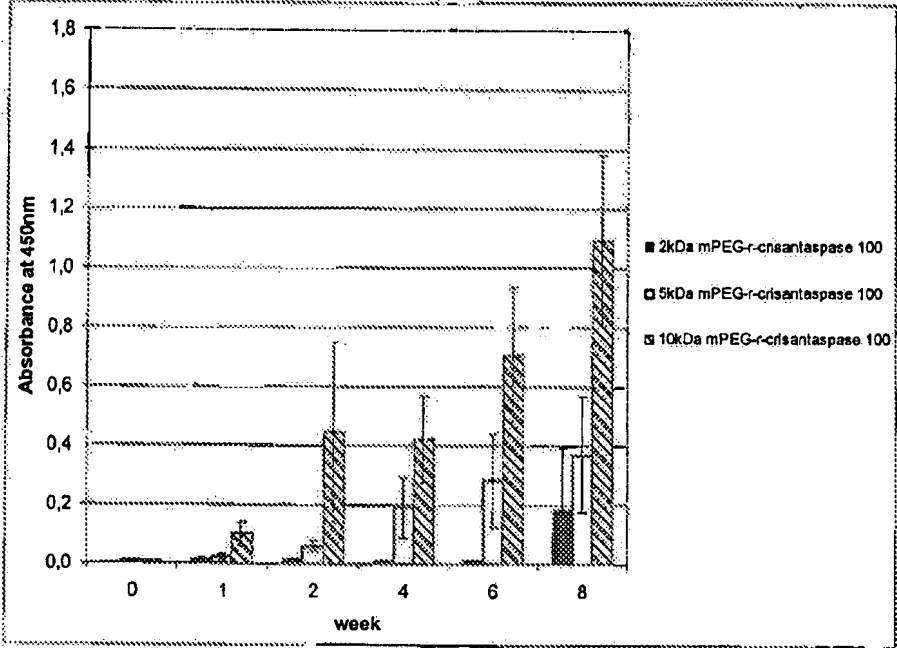
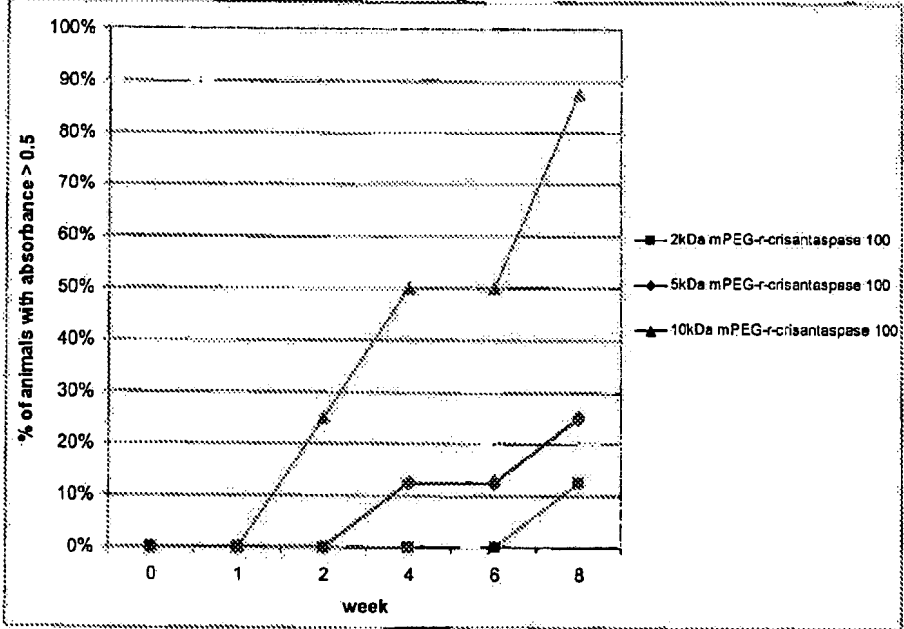


Figure 11

11A



11B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C12N9/82 A61P35/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. V. KUCHUMOVA, Y. V. KRASOTKINA, P. Z. KHASIGOV, N. N. SOKOLOV: "Modification of recombinant asparaginase from Erwinia carotovora with polyethylene glycol 5000" BIOCHEMISTRY (MOSCOW) SUPPLEMENTAL SERIES B: BIOMEDICAL CHEMISTRY, vol. 1, no. 3, 4 September 2007 (2007-09-04), pages 230-232, XP002587203 DOI: 10.1134/S1990750807030092 whole document, in particular conjugate PEG-asparaginase. ----- -/--	1-94



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2010

Date of mailing of the international search report

20/09/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schleifenbaum, A

3A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059599

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	SOKOLOV N N ET AL: "Design of recombinant L-Asparaginase erwinia carotovora drug with an antitumor action" MOLEKULYARNAYA MEDITSINA, IZDATEL'STVO MEDITSINA, RU, vol. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 45-53, XP008123303 ISSN: 1728-2918 figure 2	
T	WO 03/018742 A2 (G UCHREZHDENIE NII BIOMEDITSIN [RU]; G UCHREZHDENIE TS BIOINZHENERI [R] 6 March 2003 (2003-03-06)	
Y	AVRAMIS VASSILIOS I ET AL: "Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future" CLINICAL PHARMACOKINETICS, ADIS INTERNATIONAL LTD., AUCKLAND, NZ LNKD-DOI:10.2165/00003088-200544040-00003, [Online] vol. 44, no. 4, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 367-393, XP008105154 ISSN: 0312-5963 Retrieved from the Internet: URL: http://pharmacokinetics.adisonline.com/pt/re/cpk/abstract.00003088-200544040-00003.htm Chapter 5.3	1-94
Y	ROBERTS M J ET AL: "Chemistry for peptide and protein PEGylation" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL LNKD-DOI:10.1016/S0169-409X(02)00022-4, vol. 54, no. 4, 17 June 2002 (2002-06-17), pages 459-476, XP002293146 ISSN: 0169-409X Whole document, in particular abstract.	1-94
Y	GRAHAM MICHAEL L: "Pegaspargase: a review of clinical studies." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 26 SEP 2003 LNKD- PUBMED:14499708, vol. 55, no. 10, 26 September 2003 (2003-09-26), pages 1293-1302, XP002587206 ISSN: 0169-409X pegaspargase	1-94
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059599

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BILLETT A L ET AL: "Allergic reactions to Erwinia asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to Escherichia coli asparaginase." CANCER 1 JUL 1992 LNKD- PUBMED:1606543, vol. 70, no. 1, 1 July 1992 (1992-07-01), pages 201-206, XP002587207 ISSN: 0008-543X "Discussion"	1-94
Y	DUVAL MICHEL ET AL: "Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial." BLOOD 15 APR 2002 LNKD- PUBMED:11929760, vol. 99, no. 8, 15 April 2002 (2002-04-15), pages 2734-2739, XP002587208 ISSN: 0006-4971 "Discussion"	1-94
Y	KLUG ALBERTSEN B ET AL: "Comparison of intramuscular therapy with Erwinia asparaginase and asparaginase Medac: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system" BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY 2001 GB LNKD- DOI:10.1046/J.1365-2141.2001.03148.X, vol. 115, no. 4, 2001, pages 983-990, XP002587209 ISSN: 0007-1048 "Discussion"	1-94

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/059599

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 03018742	A2	06-03-2003	AU 2002332371 A1	10-03-2003.

L-ASPARAGINASA TRATADA CON PEG

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un conjugado de una proteína que tiene actividad sustancial aminohidrolasa de L-asparagina y polietilenglicol, particularmente en donde el polietilenglicol tiene un peso molecular menor que o igual a aproximadamente 5000 Da, particularmente un conjugado en donde la proteína es una L-asparaginasa de *Erwinia*, y su uso en terapia.

Antecedentes

[0002] Las proteínas con actividad aminohidrolasa de L-asparagina, comúnmente conocidas como L-asparaginasas, han sido exitosamente usadas para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (ALL) en niños durante muchos años. ALL es la neoplasia maligna infantil más común (Avramis y Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393).

[0003] La L-asparaginasa también se ha usado para tratar la enfermedad de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma, reticulosarcoma, y melanoma (Kotzia y Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669). La actividad anti-tumoral de L-asparaginasa se cree que es debida a la inhabilidad o habilidad reducida de ciertas células malignas para sintetizar L-asparagina (Kotzia y Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669). Estas células malignas dependen del suministro extracelular de L-asparagina. Sin embargo, la enzima L-asparaginasa cataliza la hidrólisis de L-asparagina a ácido aspártico y amoníaco, agotando de este modo los depósitos de L-asparagina y matando las células

tumorales que no pueden realizar la síntesis de proteínas sin L-asparagina (Kotzia y Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669).

[0004] La L-asparaginasa de *E. coli* fue la primera enzima usada en terapia de ALL y ha sido comercializada como Elspar® en los EE.UU. o como Kidrolase® y L-asparaginase Medac® en Europa. Las L-asparaginasas también han sido aisladas de otros microorganismos, por ejemplo, una proteína L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*, llamada crisantaspasa, que ha sido comercializada como Erwinase® (Wriston Jr., J.C. (1985) "L-asparaginase" *Meth. Enzymol.* 113, 608-618; Goward, CR. et al. (1992) "Rapid large scale preparation of recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase", *Bioseparation* 2, 335-341). También han sido identificadas L-asparaginasas de otras especies de *Erwinia*, que incluyen, por ejemplo, *Erwinia chrysanthemi* 3937 (# de acceso al GenBank AAS67028), *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125 (# de acceso al GenBank CAA31239), *Erwinia carotovora* (# de acceso al GenBank AAP92666), y *Erwinia carotovora* subesp. *Astroseptica* (# de acceso al GenBank AAS67027). Estas L-asparaginasas de *Erwinia chrysanthemi* tienen aproximadamente entre 91 y 98% de identidad de secuencia de aminoácidos con otra, mientras que las L-asparaginasas de *Erwinia carotovora* tienen aproximadamente entre 75 y 77% de identidad de secuencia de aminoácidos con las L-asparaginasas de *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia y Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669).

[0005] Las L-asparaginasas de origen bacteriano tienen un alto potencial inmunogénico y antigénico y frecuentemente provocan reacciones adversas que varían en un rango entre reacción alérgica leve y shock anafiláctico en pacientes sensibilizados (Wang, B. et al. (2003) "Evaluation of immunologic

cross reaction of anti- asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL and lymphoma patients), *Leukemia* 17, 1583-1588). La L-asparaginasa de *E. coli* es particularmente inmunogénica, con informes de la presencia de anticuerpos anti-asparaginasa dirigidos contra L-asparaginasa de *E. coli* luego de la administración i.v. o i.m. alcanzando tanto como el 78% en adultos y 70% en niños (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588).

[0006] Las L-asparaginases de *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi* difieren en sus propiedades farmacocinéticas y tienen diferentes perfiles inmunogénicos, respectivamente (Klug Albertsen, B. et al. (2001) "Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system" *Brit. J. Haematol.* 115, 983-990). Adicionalmente, se ha mostrado que los anticuerpos que se desarrollan luego de un tratamiento con L-asparaginasa de *E. coli* no reaccionan cruzado con L-asparaginasa de *Erwinia* (Wang, B. et al., *Leukemia* 17 (2003) 1583-1588). Por lo tanto, la L-asparaginasa de *Erwinia* (crisantaspasa) ha sido usada como una segunda línea de tratamiento de ALL en pacientes que reaccionan con L-asparaginasa de *E. coli* (Duval, M. et al. (2002) "Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Children's Leukemia Group phase 3 trial" *Blood* 15, 2734-2739; Avramis y Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393).

[0007] En otro intento por reducir la inmunogenicidad asociada con L-asparaginasas microbianas, se ha desarrollado una L-asparaginasa de *E. coli* que está modificada con metoxipolietilenglicol (mPEG). Este método es comúnmente conocido como "tratamiento con PEG" y se ha mostrado que altera las propiedades inmunológicas de proteínas (Abuchowski, A. et al. (1977) "Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethyenglycol", *J.Biol.Chem.* 252 (11), 3578-3581). Esta llamada mPEG-L-asparaginasa, o pegaspargasa, comercializada como Oncaspar® (Enzon Inc., USA), se aprobó inicialmente en los EE.UU. como segunda línea de tratamiento de ALL en 1994, y ha sido aprobada como primera línea de terapia de ALL en niños y adultos desde 2006. Oncaspar® tiene una vida media *in vivo* prolongada e inmunogenicidad/antigenicidad reducida.

[0008] Oncaspar® es L-asparaginasa de *E. coli* que ha sido modificada en múltiples residuos de lisina usando 5 kDa mPEG-succinimidil succinato (SS-PEG) (Patente de los EE.UU. No. 4.179.337). SS-PEG es un reactivo de PEG de la primera generación que contiene una unión éster inestable que es sensible a hidrólisis por enzimas o a valores de pH levemente alcalinos (Patente de los EE.UU. No. 4.670.417; *Makromol. Chem.* 1986, 187, 1131-1144). Estas propiedades disminuyen la estabilidad *in vitro* e *in vivo* y pueden perjudicar la seguridad de la droga.

[0009] Adicionalmente, se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra L-asparaginasa de *E. coli* reaccionarán cruzado con Oncaspar® (Wang, B. et al. (2003) "Evaluation of immunologic cross-reaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL and lymphoma patients)", *Leukemia* 17,

1583-1588). A pesar de que estos anticuerpos no eran neutralizantes, este hallazgo claramente demuestra el alto potencial para la inactivación cruzada *in vivo*. De hecho, en un informe entre 30 y 41% de los niños que recibieron pegaspargasa tuvieron una reacción alérgica (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588).

[0010] Además de las reacciones alérgicas externas, el problema de "hipersensibilidad silente" se informó recientemente, por la cual los pacientes desarrollan anticuerpos anti-asparaginasa sin mostrar ninguna evidencia clínica de una reacción de hipersensibilidad (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588). Esta reacción puede generar la formación de anticuerpos neutralizantes contra L-asparaginasa de *E. coli* y pegaspargasa; sin embargo, estos pacientes no cambian a L-asparaginasa de *Erwinia* porque no tienen signos externos de hipersensibilidad, y por lo tanto reciben una duración más corta de tratamiento eficaz (Holcenberg, J., *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 26 (2004) 273-274).

[0011] El tratamiento con L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* generalmente se usa en el evento de hipersensibilidad a L-asparaginasas derivadas de *E. coli*. Sin embargo, se ha observado que tanto como entre 30 y 50% de los pacientes que reciben L-asparaginasa de *Erwinia* son anticuerpo positivos (Avramis y Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). Además, debido a que la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* tiene una vida media de eliminación significativamente más corta que las L-asparaginasas de *E. coli*, se debe administrar más frecuentemente (Avramis y Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). En un estudio de Avramis et

al., la asparaginasa de *Erwinia* se asoció con perfiles farmacocinéticos inferiores (Avramis et al., *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 29 (2007) 239-247). Por lo tanto la L-asparaginasa de *E. coli* y pegaspargasa han sido las terapias de primera línea preferidas para ALL respecto a L-asparaginasa de *Erwinia*.

[0012] Numerosos biofármacos han sido exitosamente tratados con PEG y comercializados durante años. Para acoplar PEG a una proteína, el PEG tiene que ser activado en su OH terminal. El grupo de activación se elige en base al grupo reactivo disponible en la proteína que será tratado con PEG. En el caso de proteínas, los aminoácidos más importantes son lisina, cisteína, ácido glutámico, ácido aspártico, ácido carboxílico C-terminal y el grupo amino N-terminal. En vista del amplio rango de grupos reactivos en una proteína cerca casi toda la química de péptidos se ha aplicado para activar el grupo PEG. Los ejemplos de estos reactivos activados con PEG son carbonatos activados, por ejemplo, p-nitrofenil carbonato, carbonato de succinimidilo; ésteres activados, por ejemplo, succinimidil éster; y para acoplamiento específico de sitio se han desarrollado aldehídos y maleimidas (Harris, M., *Adv. Drug Del. Rev.* 54 (2002), 459-476). La disponibilidad de diferentes métodos químicos para modificación con PEG muestra que cada nuevo desarrollo de una proteína tratada con PEG será un estudio caso por caso. Además de la química, el peso molecular del PEG que se une a la proteína tiene un gran impacto sobre las propiedades farmacéuticas de la proteína tratada con PEG. En la mayoría de los casos se espera que, cuanto mayor el peso molecular del PEG, mayor la mejoría de las propiedades farmacéuticas (Sherman, M. R., *Adv. Drug Del. Rev.* 60 (2008), 59-68; Holtsberg, F. W., *Journal of Controlled*

Release 80 (2002), 259-271). Por ejemplo, Holtsberg et al. encontraron que, cuando se conjuga PEG con arginina desaminasas, otra enzima degradadora de aminoácidos aislada de una fuente microbiana, la función farmacocinética y farmacodinámica de la enzima aumenta a medida que aumenta el tamaño de unión de PEG desde un peso molecular de 5000 Da a 20.000 Da (Holtsberg, F.W., *Journal of Controlled Release* 80 (2002), 259-271).

[0013] Sin embargo, en muchos casos, los biofármacos tratados con PEG muestran actividad significativamente reducida en comparación con el biofármaco no modificado (Fishburn, CS. (2008) Review "The Pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics" *J. Pharm. Sci.*, 1-17). En el caso de L-asparaginasa de *Erwinia carotovora*, se ha observado que el tratamiento con PEG redujo su actividad *in vitro* a aproximadamente 57% (Kuchumova, A.V. et al. (2007) "Modification of Recombinant asparaginase from *Erwinia carotovora* with Polyethyleneglycol 5000" *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 1, 230-232). La L-asparaginasa de *Erwinia carotovora* tiene sólo aproximadamente 75% de homología con la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspasa). Para Oncaspar® también se sabe que su actividad *in vitro* es aproximadamente 50% en comparación con la L-asparaginasa de *E. coli* no modificada.

[0014] Las preparaciones de L-asparaginasa actualmente disponibles no proveen terapias alternativas o complementarias - particularmente terapias para tratar ALL- que se caracterizan por alta actividad catalítica y propiedades farmacológicas y farmacocinéticas significativamente mejoradas, así como inmunogenicidad reducida.

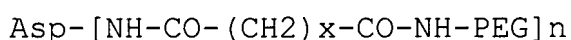
Breve síntesis de la invención

[0015] La presente invención está dirigida a un conjugado de una proteína que tiene actividad sustancial aminohidrolasa de L-asparagina y polietilenglicol, en donde el polietilenglicol tiene un peso molecular menor que o igual a aproximadamente 5000 Da, particularmente un conjugado en donde la proteína es una L-asparaginasa de *Erwinia*. En una forma de realización, el conjugado comprende una L-asparaginasa de *Erwinia* que tiene al menos 80% de identidad con el aminoácido de SEQ ID NO:1 y polietilenglicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular menor que o igual a aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización, la L-asparaginasa tiene al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con el aminoácido de SEQ ID NO:1. En algunas formas de realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 Da, 4000, Da, 3000 Da, 2500 Da, o 2000 Da. En una forma de realización, el conjugado tiene una actividad *in vitro* de al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% en comparación con la L-asparaginasa cuando no está conjugada con PEG. En otra forma de realización, el conjugado tiene una actividad de agotamiento de L-asparagina de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces más potente que la L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG. En otra forma de realización, el conjugado agota los niveles de L-asparagina en plasma hasta un nivel no detectable durante al menos aproximadamente 12, 24, 48, 96, 108, o 120 horas.

[0016] En una forma de realización, el conjugado tiene una vida media de circulación *in vivo* más larga en comparación con la L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG. En una forma de realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ más largo que pegaspargasa (es decir, L-asparaginasa de *E. coli* conjugada con PEG) administrada en una dosis de proteína equivalente (por ejemplo, medido en $\mu\text{g/kg}$). En una forma de realización más específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente entre 58 y aproximadamente 65 horas a una dosis de aproximadamente 50 $\mu\text{g/kg}$ en base a contenido de proteína, y un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente entre 34 y aproximadamente 40 horas a una dosis de aproximadamente 10 $\mu\text{g/kg}$ en base a contenido de proteína, luego de la administración *iv* en ratones. En otra forma de realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente entre 100 y aproximadamente 200 horas a una dosis que varía en un rango entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente entre 20 y 30 mg de proteína/m²). En una forma de realización, el conjugado tiene un área bajo la curva (AUC) mayor en comparación con la L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG. En una forma de realización específica, el conjugado tiene un AUC media que es al menos aproximadamente 3 veces mayor que pegaspargasa a una dosis de proteína equivalente.

[0017] En una forma de realización, el PEG está unido covalentemente a uno o más grupos amino (en donde "grupos amino" incluye residuos de lisina y/o los N-terminal) de la L-asparaginasa. En una forma de realización más específica, el PEG está unido covalentemente a uno o más grupos amino por enlace amida. En otra forma de realización específica, el PEG está unido

covalentemente a al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal de la proteína) o al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente 90% de los grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal de la proteína). En una forma de realización, el conjugado tiene la fórmula:



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

[0018] En otro aspecto, la invención está dirigida a un método para hacer un conjugado que comprende combinar una cantidad de PEG con una cantidad de la L-asparaginasa en una solución amortiguada durante un período de tiempo suficiente para unir covalentemente el PEG a la L-asparaginasa.

[0019] En otro aspecto, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de la invención.

[0020] En otro aspecto, la invención está dirigida a un método para tratar una enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina en un paciente que comprende administrar una cantidad

eficaz del conjugado de la invención. En una forma de realización, la enfermedad es un cáncer. En una forma de realización específica, el cáncer es ALL. En otra forma de realización específica, el conjugado se administra en una cantidad de aproximadamente 5 U/kg de peso corporal y aproximadamente 50 U/kg de peso corporal. En otra forma de realización específica, el conjugado se administra en una dosis que varía en un rango entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente entre 20 y 30 mg proteína/m²). En algunas formas de realización, la administración puede ser intravenosa o intramuscular y puede ser menos que una por semana (por ejemplo, una por mes o una cada dos semanas), una por semana, dos por semana, o tres veces por semana. En otras formas de realización específicas, el conjugado se administra como monoterapia y, más específicamente, sin un inhibidor de asparagina sintetasa. En otras formas de realización, el conjugado se administra como parte de una terapia combinada (pero en algunas formas de realización, la terapia combinada no comprende un inhibidor de asparagina sintetasa). En una forma de realización específica, el paciente que está recibiendo tratamiento ha tenido una hipersensibilidad previa a una asparaginasa de *E. coli* o forma tratada con PEG de la misma o una asparaginasa de *Erwinia*. En otra forma de realización específica, el paciente que recibe tratamiento ha tenido una recaída de la enfermedad, en particular una recaída que se produce luego del tratamiento con una asparaginasa de *E. coli* o forma tratada con PEG de la misma.

Breve descripción de los/las dibujos/figuras

[0021] Figura 1: Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* recombinante purificada. La L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* recombinante purificada (r-crisantaspasa) se analizó por SDS-PAGE. Las bandas de proteína se tiñeron con nitrato de plata. Calle 1: Marcador de peso molecular (116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, y 14,4kDa), calle 2: L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* recombinante purificada (r-crisantaspasa).

[0022] Figura 2: análisis por SDS-PAGE de conjugados mPEG-r-crisantaspasa.

[0023] Figura 3: Niveles de L-asparagina plasmática luego de una dosis intravenosa de Erwinase® (5U/kg, 25U/kg, 125U/kg y 250U/kg de peso corporal).

[0024] Figura 4: Niveles de L-asparagina plasmática luego de una inyección intravenosa única de conjugados mPEG-r-crisantaspasa en comparación a Erwinase® en ratones. Los números "40%" y "100%" indican un grado aproximado de tratamiento con PEG de, respectivamente, aproximadamente entre 40 y 55% (parcialmente tratado con PEG) y aproximadamente 100% (máximamente tratado con PEG) de los grupos amino accesibles.

[0025] Figura 5: Áreas bajo la curva (AUC) (actividad enzimática residual) calculadas a partir de los perfiles de L-asparaginasa luego de una inyección intravenosa única de conjugados de mPEG-r-crisantaspasa en ratones.

[0026] Figura 6: Niveles de L-asparagina plasmática luego de dosis intravenosa única en ratones de 2 kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa (5U/kg, 25U/kg y 50U/kg de peso corporal) (Figura 6A), 5 kDa- 100% mPEG-r-crisantaspasa (5U/kg, 25U/kg y 50U/kg de peso corporal) (Figura 6B), o 2 kDa- 100% mPEG-r-crisantaspasa

(5U/kg), 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa (5U/kg), y pegaspargasa (Oncaspar®) (1 U/kg) (Figura 6C). La administración de una cantidad equivalente de proteína (10µg/kg) de 2 kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa (5 U/kg), 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa (5 U/kg), o pegaspargasa (Oncaspar®, 1 U/kg), resultó en un agotamiento de L-asparagina similar durante 72 horas.

[0027] Figura 7: Relación dosis-efecto de 2 kDa-100% r-crisantaspasa tratada con PEG en comparación con 5 kDa-100% r-crisantaspasa tratada con PEG. La Figura 7A muestra la actividad enzimática residual en plasma luego de una dosis intravenosa única de 2 kDa-100% r-crisantaspasa tratada con PEG a 5 U/kg (10µg/kg en base al contenido de proteína), 25 U/kg, y 50 U/kg. La Figura 7B muestra la actividad enzimática residual en plasma luego de una dosis intravenosa única de 5 kDa-100% r-crisantaspasa tratada con PEG a 5 U/kg (10 µg/kg en base al contenido de proteína), 25 U/kg, y 50 U/kg.

[0028] Figura 8: Relación dosis-efecto de 2 kDa-100% r-crisantaspasa tratada con PEG en comparación con 5 kDa-100% r-crisantaspasa tratada con PEG. AUC de la actividad enzimática residual medidas en ratones luego de una dosis intravenosa única de 2 kDa-100% o 5 kDa-100% mPEG-conjugados. En general, cuando se compara al mismo nivel de dosis, las AUC medidas para 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa fueron mayores que las observadas para 2-kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa. Se observó una diferencia de 31, 37, y 14% a las dosis de 5, 25, y 50 U/kg, respectivamente.

[0029] Figura 9: Farmacocinética de conjugados de mPEG-r-crisantaspasa vs. pegaspargasa (Oncaspar®) en ratones. La Figura 9A representa la actividad enzimática residual medida en ratones luego de una dosis intravenosa única de 2 kDa-100% mPEG-r-

crisantaspasa, 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa, o pegaspargasa (Oncaspar®). La Figura 9B representa el AUC de la actividad enzimática residual medida en ratones luego de una dosis intravenosa única de 2 kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa, 5 kDa-100% mPEG-r-crisantaspasa, o pegaspargasa (Oncaspar®).

[0030] Figura 10: Niveles séricos de anticuerpos anti-crisantaspasa específicos luego del tratamiento con conjugados mPEG-r-crisantaspasa o Erwinase®. Los anticuerpos están dirigidos contra crisantaspasa. Los datos están expresados como media $\pm$ DE (n=8).

[0031] Figura 11: Niveles séricos de anticuerpos anti-conjugado específicos luego del tratamiento con mPEG-r-crisantaspasa máximamente (100%) conjugados tratados con PEG. Figura 11A: resultados presentados como media $\pm$ DE (n=8); Figura 11B: resultados presentados como el porcentaje de animales con valores de absorbancia mayores a 0,5 en el ELISA anti-conjugado.

Descripción detallada de la invención

[0032] En un aspecto, el problema a ser resuelto por la invención es proveer una preparación de L-asparaginasa con:

- Alta bioactividad *in vitro*;
- Una unión PEG-proteína estable;
- Vida media *in vivo* prolongada;
- Inmunogenicidad significativamente reducida, como se evidencia, por ejemplo, por la reducción o eliminación de la respuesta del anticuerpo contra la preparación de L-asparaginasa luego de administraciones repetidas; y
- Utilidad como una terapia de segunda línea para pacientes que han desarrollado sensibilidad a terapias de primera línea usando, por ejemplo, L-asparaginasa derivadas de *E. coli*.

[0033] Este problema no ha sido resuelto por conjugados de L-asparaginasa conocidos, que tienen significativa reactividad cruzada con preparaciones de L-asparaginasa modificada (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia), o que tiene actividad *in vitro* considerablemente reducida (Kuchumova, A.V. et al. (2007) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 1, 230-232, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Este problema se soluciona de acuerdo a la presente invención por provisión de un conjugado de L-asparaginasa de *Erwinia* con un polímero hidrofílico, más específicamente, un polietilenglicol con un peso molecular de 5000 Da o menor, un método para preparar dicho conjugado y el uso del conjugado.

[0034] En la presente se describe una L-asparaginasa tratada con PEG de *Erwinia* con propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la proteína L-asparaginasa no modificada, así como en comparación con la preparación de pegaspargasa de *E. coli*. El conjugado de L-asparaginasa tratada con PEG descrito en la presente, por ejemplo, L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* tratado con PEG con PEG 5000 Da de peso molecular, sirve como un agente terapéutico particularmente para uso en pacientes que muestran hipersensibilidad (por ejemplo, una reacción alérgica o hipersensibilidad silente) para el tratamiento con L-asparaginasa o L-asparaginasa tratada con PEG de *E. coli*. o L-asparaginasa de *Erwinia* no modificada. El conjugado de L-asparaginasa tratada con PEG descrito en la presente también es útil como agente terapéutico para uso en pacientes que han tenido una recaída de enfermedad, por ejemplo, una recaída de ALL, y han sido

previamente tratados con otra forma de asparaginasa, por ejemplo, con L-asparaginasa o L-asparaginasa de *E. coli* tratada con PEG.

[0035] Como se describe en detalle en la presente, el conjugado de la invención muestra propiedades superiores no esperadas en comparación con preparaciones de L-asparaginasa conocidas tal como pegaspargasa. Por ejemplo, la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspasa) no modificada tiene una vida media significativamente menor que la L-asparaginasa de *E. coli* no modificada (Avramis y Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). El conjugado tratado con PEG de la invención tiene una vida media que es mayor que L-asparaginasa de *E. coli* tratada con PEG en una dosis de proteína equivalente.

Definiciones

[0036] A menos que se definan expresamente de otro modo, los términos usados en la presente se entenderán de acuerdo al significado ordinario en el arte.

[0037] Como se usa en la presente, el término "que incluye" significa "que incluye, sin limitación", y los términos usados en singular deben incluir el plural, y viceversa, a menos que el contexto lo indique de otro modo.

[0038] Como se usa en la presente, el término "enfermedad tratable por agotamiento de asparagina" se refiere a una condición o trastorno en donde las células involucradas o responsables de la condición o trastorno carecen o tienen una capacidad reducida para sintetizar L-asparagina. El agotamiento o privación de L-asparagina puede ser parcial o sustancialmente completa (por ejemplo, a niveles que son indetectables con el uso de métodos y aparatos que son conocidos en el arte).

[0039] Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una proteína (por ejemplo, asparaginasa o conjugado de la misma), requerido para producir un efecto deseado.

Proteína L-asparaginasa

[0040] La proteína de acuerdo a la invención es una enzima con actividad aminohidrolasa de L-asparagina, es decir una L-asparaginasa.

[0041] En el arte se han identificado muchas proteínas L-asparaginastas, aisladas por métodos conocidos a partir de microorganismos. (véase, por ejemplo, Savitri y Azmi, *Indian J. Biotechnol* 2 (2003) 184- 194, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Las L-asparaginastas más ampliamente usadas y comercialmente disponibles son derivadas de *E. coli* o de *Erwinia chrysanthemi*, ambas comparten 50% o menos de homología estructural. En las especies *Erwinia*, típicamente se informó entre un 75 y 77% de identidad de secuencia entre las enzimas derivadas de *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, y se encontró aproximadamente 90% de identidad de secuencia entre diferentes subespecies de *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia GA, Labrou E, *Journal of Biotechnology* (2007) 127:657-669, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Algunas L-asparaginastas de *Erwinia* representativas incluyen, por ejemplo, aquellas provistas en la Tabla 1:

Tabla 1

Especies	No. de acceso a Genbank	% de identidad con <i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPPB 1066
<i>Erwinia</i>	AAS67028	91%

29

<i>chrysanthemi</i> 3937		
<i>Erwinia</i> <i>chrysanthemi</i> NCPFB 1125	CAA31239	98%
<i>Erwinia carotovora</i> subesp. <i>Astroseptica</i>	AAS67027	75%
<i>Erwinia carotovora</i>	AAP92666	77%

[0042] Las secuencias de L-asparaginasas de *Erwinia* y las entradas a GenBank de la Tabla 1 se incorporan a la presente a modo de referencia. Las L-asparaginasas preferidas usadas en terapia son L-asparaginasa aisladas de *E. coli* y de *Erwinia*, específicamente, *Erwinia chrysanthemi*.

[0043] Las L-asparaginasas pueden ser enzimas nativas aisladas de los microorganismos. También pueden ser producidas por tecnologías enzimática recombinante para producir microorganismos tal como *E. coli*. Como ejemplos, la proteína usada en el conjugado de la invención puede ser una forma de proteína de *E. coli* producida por una cepa productora de *E. coli* recombinante, de una proteína de una especie de *Erwinia*, particularmente *Erwinia chrysanthemi*, producida en una cepa productora de *E. coli* recombinante.

[0044] Las enzimas se pueden identificar por sus actividades específicas. Esta definición por lo tanto incluye todos los polipéptidos que tienen actividad específica definida también presente en otros organismos, más particularmente en otros microorganismos. A menudo las enzimas con actividades similares se pueden identificar por su agrupación a ciertas familias

definidas como PFAM o COG. PFAM (base de datos de alineamientos de familias de proteínas y modelos ocultos de Markov; <http://pfam.sanger.ac.uk/>) representa una gran colección de alineamientos de secuencias de proteínas. Cada PFAM hace posible visualizar alineamientos múltiples, ver dominios de proteína, evaluar la distribución entre organismos, ganar acceso a otras bases de datos, y visualizar estructuras conocidas de proteínas. Los COG (Grupos de ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen por comparación de secuencias de proteínas de 43 genomas completamente secuenciados que representan 30 líneas filogenéticas principales. Cada COG se define a partir de al menos tres líneas, que permite la identificación de dominios conservados anteriores.

[0045] Los medios para identificar secuencias homólogas y sus porcentajes de homología y/o identificar son bien conocidos por aquellos con experiencia en el arte, e incluye en particular los programas BLAST, que se pueden usar del sitio web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> con los parámetros por defecto indicados en ese sitio web. Las secuencias obtenidas luego se pueden explotar (por ejemplo, alinear) usando, por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) o MULTALIN con los parámetros por defecto indicados en esos sitios web. Usando las referencias dadas en GenBank para genes conocidos, aquellos con experiencia en el arte tienen la capacidad de determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo de rutina se hace ventajosamente usando secuencias consenso que se pueden determinar realizando alineamientos de secuencias con

genes derivados de otros microorganismos, y diseñando sondas degeneradas para clonar el gen correspondiente en otro organismo. Estos métodos de rutina de biología molecular son bien conocidos por aquellos con experiencia en el arte, y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2da ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York).

[0046] De hecho, una persona con experiencia en el arte entenderá cómo seleccionar y diseñar proteínas homólogas que retengan su actividad L-asparaginasa sustancialmente. Típicamente, se usa un ensayo Nessler para la determinación de la actividad L-asparaginasa de acuerdo a un método descrito por Mashburn y Wriston (Mashburn, L., y Wriston, J. (1963) "Tumor Inhibitory Effect of L- Asparaginase", *Biochem Biophys Res Commun* 12, 50, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia).

[0047] En una forma de realización particular del conjugado de la invención, la proteína L-asparaginasa tiene al menos aproximadamente 80% de homología o identidad con la proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, más específicamente al menos aproximadamente 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de homología o identidad con la proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. La SEQ ID NO:1 es como sigue:

ADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGI

AGMRKAMEKGVVVIRSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIQEYFH
TY (SEQ ID NO:1)

[0048] El término "que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1" significa que la secuencia de aminoácidos de la proteína puede no estar limitada restrictivamente a la SEQ ID NO:1 sino que puede contener aminoácidos adicionales.

[0049] En una forma de realización particular, la proteína es la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, la L-asparaginasa es de *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 (No. de acceso a Genbank CAA32884, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia), con o sin péptidos señal y/o secuencias líder.

[0050] Los fragmentos de la proteína de SEQ ID NO:1 también están comprendidos en la definición de la proteína usada en el conjugado de la invención. El término "un fragmento de SEQ ID NO:1" significa que la secuencia del polipéptido puede incluir menos aminoácidos que SEQ ID NO:1 pero aún suficientes aminoácidos para conferirle actividad L-aminohidrolasa.

[0051] Es bien conocido en el arte que un polipéptido se puede modificar por sustitución, inserción, eliminación y/o adición de uno o más aminoácidos a la vez que retienen su actividad enzimática. Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido en una dada posición por un aminoácido químicamente equivalente que no afecta las propiedades funcionales de una proteína es común. Las sustituciones se pueden definir como intercambios en uno de los siguientes grupos:

- Residuos polares no polares o levemente polares, alifáticos pequeños: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly

- Residuos cargados negativamente, polares, y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln
- Residuos cargados positivamente, polares: His, Arg, Lys
- Residuos no polares, alifáticos grandes: Met, Leu, Ile, Val, Cys
- Residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

[0052] Por lo tanto, se puede esperar que cambios que resultan en la sustitución de un residuo negativamente cargado por otro (tal como ácido glutámico por ácido aspártico) o uno positivamente cargado por otro (tal como lisina por arginina) produzcan un producto funcionalmente equivalente.

[0053] Las posiciones en donde los aminoácidos están modificados y el número de aminoácidos sometidos a modificación en la secuencia de aminoácidos no están particularmente limitados. La persona con experiencia tiene la capacidad de reconocer las modificaciones que se pueden introducir sin afectar la actividad de la proteína. Por ejemplo, se puede esperar que las modificaciones en la porción N- o C-terminal de una proteína no alteren la actividad de una proteína bajo ciertas circunstancias. Con respecto a asparaginasas, en particular, se ha realizado una caracterización extensa, particularmente con respecto a las secuencias, estructuras, y los residuos que forman el sitio catalítico activo. Esto provee orientación respecto a los residuos que se pueden modificar sin afectar la actividad de la enzima. Todas las L-asparaginasas conocidas de fuentes bacterianas tienen características estructurales comunes. Todas son homotetrámeros con cuatro sitios activos entre los dominios N- y C-terminal de dos monómeros adyacentes (Aghaipoor *et al.*, *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Todas tienen un

alto grado de similitud en sus estructuras terciarias y cuaternarias (Papageorgiou et al., FEBS J. 275 (2008) 4306-4316, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Las secuencias de los sitios catalíticos de L-asparaginasa están altamente conservados entre L-asparaginasa II de *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora*, y *E. coli* (Papageorgiou et al., FEBS J. 275 (2008) 4306-4316). El bucle flexible del sitio activo contiene residuos de aminoácidos 14-33, y el análisis estructural muestra que Thr15, Thr95, Ser62, Glu63, Asp96, y Ala120 está en contacto con el ligando (Papageorgiou et al., FEBS J. 275 (2008) 4306-4316). Aghaipoor et al. han realizado un análisis detallado de los cuatro sitios activos de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* por examinación de estructuras cristalinas de alta resolución de la enzima acomplejada con sus sustratos (Aghaipoor et al., Biochemistry 40 (2001) 5655-5664). Kotzia et al. proveen secuencias para L-asparaginasa de varias especies y subespecies de *Erwinia* e, incluso debido a que las proteínas tienen sólo aproximadamente entre 75 y 77% de identidad entre *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, cada una tiene actividad de L-asparaginasa (Kotzia et al., J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Moola et al. realizaron estudios de mapeo de epitope de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* 3937 y fueron capaces de retener la actividad enzimática incluso luego de mutar diferentes secuencias antigénicas en un intento por reducir la inmunogenicidad de la asparaginasa (Moola et al., Biochem. J. 302 (1994) 921-927, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Cada uno de los artículos citados anteriormente se incorpora en

su totalidad a la presente a modo de referencia. En vista de la extensa caracterización que ha sido realizada sobre L-asparaginasas, una persona con experiencia en el arte podría determinar cómo hacer sustituciones de fragmentos y/o secuencias a la vez que se mantenga la actividad enzimática.

Polímeros para uso en el conjugado

[0054] Los polímeros se seleccionan del grupo de polímeros solubles en agua no tóxicos tales como polisacáridos, por ejemplo hidroxietil almidón, poliaminoácidos, por ejemplo polilisina, poliéster, por ejemplo, ácido poliláctico, y polióxidos de alquilenos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

[0055] El polietilenglicol (PEG) o mono-metoxipolietilenglicol (mPEG) es bien conocido en el arte y comprende polímeros lineales y ramificados. Los ejemplos de algunos polímeros, particularmente PEG, se proveen en las siguientes, cada una de las cuales se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia: No. de Patente de los EE.UU. 5.672.662; No. de Patente de los EE.UU. 4.179.337; No. de Patente de los EE.UU. 5.252.714; Publicación de Solicitudes de Patente de los EE.UU. No. 2003/0114647; No. de Patente de los EE.UU. 6.113.906; No. de Patente de los EE.UU. 7.419.600; y Publicación PCT No. WO2004/083258.

[0056] La calidad de dichos polímeros se caracteriza por el índice de polidispersabilidad (PDI). El PDI refleja la distribución de pesos moleculares en una dada muestra de polímero y se calcula a partir del peso molecular promedio ponderado dividido por el peso molecular promedio en número. Indica la distribución de pesos moleculares individuales en un lote de polímeros. El PDI tiene un valor siempre mayor que 1, pero como

las cadenas del polímero se aproximan a la distribución ideal de Gauss (= monodispersabilidad), el PDI se aproxima a 1.

[0057] El polietilenglicol tiene ventajosamente un peso molecular comprendido en un rango entre aproximadamente 500 Da y aproximadamente 9.000 Da. Más específicamente, el polietilenglicol (por ejemplo, mPEG) tiene un peso molecular seleccionado entre el grupo que consiste en polietilenglicoles de 2000 Da, 2500 Da, 3000 Da, 3500 Da, 4000 Da, 4500 Da, y 5000 Da. En una forma de realización particular, el polietilenglicol (por ejemplo, mPEG) tiene un peso molecular de 5000 Da.

Método para preparar el conjugado

[0058] Para el acoplamiento posterior del polímero a proteínas con actividad aminohidrolasa de L-asparagina, el grupo polímero contiene una funcionalidad activada que preferentemente reacciona con grupos amino en la proteína. En un aspecto, la invención está dirigida a un método para hacer un conjugado, el método comprende combinar una cantidad de polietilenglicol (PEG) con una cantidad de L-asparaginasa en una solución amortiguada durante un período de tiempo suficiente para unir covalentemente el PEG a la L-asparaginasa. En una forma de realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización, el PEG es monometoxi-polietilenglicol (mPEG).

[0059] En una forma de realización, la reacción entre el polietilenglicol y L-asparaginasa se realiza en una solución amortiguada. En algunas formas de realización particulares, el valor de pH de la solución amortiguada varía en un rango entre

aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0. El valor pH más preferido varía en un rango entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5, por ejemplo, un valor de pH de aproximadamente 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, o 8,5. En una forma de realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

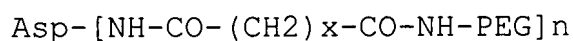
[0060] Adicionalmente, el tratamiento con PEG de L-asparaginasa se realiza a concentraciones de proteína entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 25 mg/mL, más específicamente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 mg/mL y más específicamente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 mg/mL. Por ejemplo, la concentración de proteínas es aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 mg/mL. En una forma de realización particular, el tratamiento con PEG de L-asparaginasa a estas concentraciones de proteína es de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1.

[0061] A concentraciones elevadas de proteína de más de 2 mg/mL la reacción de tratamiento con PEG procede fácilmente, en menos de 2 horas. Adicionalmente, se aplica un exceso molar de polímero sobre grupos amino en L-asparaginasa de menos de aproximadamente 20:1. Por ejemplo, el exceso molar es menor que aproximadamente 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11 :1, 10:1, 9:1, 8:1, 7,5:1, 7:1, 6.5:1, 6:1, 5.5:1, 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1, o 1:1. En una forma de realización específica el exceso molar es menor que

aproximadamente 10:1 y en una forma de realización más específica, el exceso molar es menor que aproximadamente 8:1. En una forma de realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1.

[0062] El número de grupos PEG que se pueden acoplar a la proteína estará sujeto al número de grupos amino libres y, más aún, a cuáles grupos amino son accesibles para una reacción de tratamiento con PEG. En una forma de realización particular, el grado de tratamiento con PEG (es decir, el número de grupos PEG acoplados a grupos amino en la L-asparaginasa) está en un rango entre aproximadamente 10% y aproximadamente 100% de grupos amino libres y/o accesibles (por ejemplo, aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%). El 100% de tratamiento con PEG de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal de la proteína) también se refiere en la presente como "máximamente tratado con PEG". Un método para determinar los grupos amino modificados en conjugados de mPEG-r-crisantaspasa (grado de tratamiento con PEG) es el método descrito por Habeeb (A.F.S.A. Habeeb, "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzensulfonic acid", *Anal. Biochem.* 14 (1966), p. 328, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). En una forma de realización, los grupos PEG se acoplan a uno o más grupos amino (en donde los grupos amino incluyen residuos amino que incluyen residuos de lisina y/o el N-terminal) de la L-asparaginasa. En una forma de realización particular, el grado de tratamiento con PEG está en un rango entre aproximadamente 10% y aproximadamente

100% de los grupos amino totales o accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal), por ejemplo, aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. En una forma de realización específica, aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de los grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están acoplados a un grupo PEG. En otra forma de realización específica, aproximadamente 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están acoplados a un grupo PEG. En una forma de realización específica, entre 40 y 55% o 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están acoplados a un grupo PEG. En algunas formas de realización, los grupos PEG están acoplados a la L-asparaginasa por una unión covalente. En una forma de realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización, el conjugado de la invención puede ser representado por la fórmula



en donde Asp es una proteína L-asparaginasa, NH es el grupo NH de un residuo lisina y/o el N-terminal de la cadena proteica, PEG es

un grupo polietilenglicol y n es un número de al menos 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) en la proteína, todos estando definidos anteriormente y más abajo en los ejemplos, x es un entero que varía en un rango entre 1 y 8 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), preferentemente entre 2 y 5 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5). En una forma de realización particular, la L-asparaginasa es de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1.

[0064] Se proveen otros métodos de tratamiento con PEG que se pueden usar para formar los conjugados de la invención, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. No. 4.179.337, Patente de los EE.UU. No. 5.766.897, Publicación de Solicitudes de Patentes de los EE.UU. No. US 2002/0065397A1, y Publicación de Solicitudes de Patentes de los EE.UU. No. US 2009/0054590A1, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia.

[0065] Las formas de realización específicas incluyen proteínas que tienen actividad sustancial aminohidrolasa de L-asparagina y polietilenglicol, seleccionadas del grupo de conjugados en donde:

(A)

- la proteína tiene al menos 90% de homología de estructura con la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* como se describe en SEQ ID NO:1

- el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 Da,

- la proteína y grupos polietilenglicol están covalentemente unidos a la proteína por enlaces amida, y
- aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) o aproximadamente entre 80 y 90%, en particular, aproximadamente 84%, de los grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están unidos a un grupo polietilenglicol.

(B)

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

(C)

- la proteína tiene al menos 90% de homología con la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* como se describe en SEQ ID NO:1
- el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 2000 Da,
- la proteína y grupos polietilenglicol están unidos covalentemente a la proteína por enlaces amida, y

- aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, uno o más residuos de lisina y/o el N-terminal) o aproximadamente entre 80 y 90%, en particular, aproximadamente 84% de los grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están unidos a un grupo polietilenglicol.

(D)

- la proteína tiene al menos 90% de homología con la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* como se describe en SEQ ID NO:1

- el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 2000 Da,

- la proteína y grupos polietilenglicol están covalentemente unidos a la proteína por enlaces amida, y

- aproximadamente 50% y aproximadamente 60%, y en particular aproximadamente 55% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) o aproximadamente 47% de los grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están unidos a un grupo polietilenglicol.

Conjugados L-asparaginasa-PEG

[0066] Los conjugados de la invención tienen ciertas propiedades ventajosas y no esperadas en comparación con L-asparaginasas no modificadas, particularmente en comparación con L-asparaginasas de *Erwinia* no modificadas, más particularmente en comparación con L-asparaginasa no modificada de *Erwinia chrysanthemi*, y más particularmente en comparación con L-asparaginasa no modificada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

[0067] En algunas formas de realización, el conjugado de la invención reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina durante

un período de tiempo de al menos aproximadamente 12, 24, 48, 72, 96, o 120 horas cuando se administra en una dosis de 5 U/kg de peso corporal (bw) o 10 µg/kg (en base a contenido de proteína). En otras formas de realización, el conjugado de la invención reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina a niveles no detectables durante un período de tiempo de al menos aproximadamente 12, 24, 48, 72, 96, 120, o 144 horas cuando se administra a una dosis de 25 U/kg de peso corporal o 50 µg/kg (en base al contenido de proteínas). En otras formas de realización, el conjugado de la invención reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina durante un período de tiempo de al menos aproximadamente 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, o 240 horas cuando se administra a una dosis de 50 U/kg de peso corporal o 100 µg/kg (en base al contenido de proteínas). En otra forma de realización, el conjugado de la invención reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina a niveles no detectables durante un período de al menos aproximadamente 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, o 240 horas cuando se administra a una dosis que varía en un rango entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente entre 20 y 30 mg proteína/m²). En una forma de realización particular, el conjugado comprende L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular de menos de o igual a aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización más particular, al menos aproximadamente 40% y aproximadamente 100%

de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están tratados con PEG.

[0068] En una forma de realización, el conjugado comprende una relación de mol PEG/mol monómero de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 8,5, particularmente aproximadamente 6,5; una actividad específica de entre aproximadamente 450 y aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 501 U/mg; y una actividad relativa de entre aproximadamente 75% y aproximadamente 85%, particularmente aproximadamente 81% en comparación con la correspondiente L-asparaginasa no modificada. En una forma de realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, con tratamiento con PEG de aproximadamente entre 40 y 55% de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) con 5000 Da mPEG.

[0069] En una forma de realización, el conjugado comprende una relación de mol PEG/mol monómero de entre aproximadamente 12,0 y aproximadamente 18,0, particularmente aproximadamente 15,1; una actividad específica de entre aproximadamente 450 y aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 483 U/mg; y una actividad relativa de aproximadamente 75 y aproximadamente 85%, particularmente aproximadamente 78% en comparación con la correspondiente L-asparaginasa no modificada. En una forma de realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de las especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de

SEQ ID NO:1, con tratamiento con PEG de aproximadamente 100% de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) con 5000 Da mPEG.

[0070] En una forma de realización, el conjugado comprende una relación de mol PEG/mol monómero de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 9,0, particularmente aproximadamente 7,0; una actividad específica de entre aproximadamente 450 y aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 501 U/mg; y una actividad relativa de entre aproximadamente 80 y aproximadamente 90%, particularmente aproximadamente 87% en comparación con la correspondiente L-asparaginasa no modificada. En una forma de realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, con tratamiento con PEG de aproximadamente entre 40 y 55% de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) con 10.000 Da mPEG.

[0071] En una forma de realización, el conjugado comprende una relación de mol PEG/mol monómero de entre aproximadamente 11,0 y aproximadamente 17,0, particularmente aproximadamente 14,1; una actividad específica de aproximadamente 450 y aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 541 U/mg; y una actividad relativa de aproximadamente 80 y aproximadamente 90%, particularmente aproximadamente 87% en comparación con la correspondiente L-asparaginasa no modificada. En una forma de realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente,

la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, con tratamiento con PEG de aproximadamente 100% de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) con 10.000 Da mPEG.

[0072] En una forma de realización, el conjugado comprende una relación de mol PEG/mol monómero de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 10,5, particularmente aproximadamente 8,5; una actividad específica de aproximadamente 450 y aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 524 U/mg; y una actividad relativa de entre aproximadamente 80 y aproximadamente 90%, particularmente aproximadamente 84% en comparación con la correspondiente L-asparaginasa no modificada. En una forma de realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, con tratamiento con PEG de aproximadamente entre 40 y 55% de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) con 2.000 Da mPEG.

[0073] En una forma de realización, el conjugado comprende una relación de mol PEG/mol monómero de entre aproximadamente 12,5 y aproximadamente 18,5, particularmente aproximadamente 15,5; una actividad específica de aproximadamente 450 y aproximadamente 550 U/mg, particularmente aproximadamente 515 U/mg; y una actividad relativa de entre aproximadamente 80 y aproximadamente 90%, particularmente aproximadamente 83% en comparación a la correspondiente L-asparaginasa no modificada. En una forma de realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*,

más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, con tratamiento con PEG de aproximadamente 100% de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) con 2.000 Da mPEG.

[0074] En otras formas de realización, el conjugado de la invención tiene una potencia aumentada de al menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces luego de inyección simple en comparación con la correspondiente L-asparaginasa no modificada. En una forma de realización específica, el conjugado con estas propiedades comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular de menos de o igual a aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización más particular, al menos aproximadamente 40% y aproximadamente 100% de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están tratados con PEG.

[0075] En un aspecto el conjugado de la invención tiene un perfil farmacocinético de acuerdo a los siguientes parámetros:

Parámetro	Definición
A_{max}	Actividad enzimática residual máxima
t_{Amax}	Tiempo a A_{max} luego de exposición a ítem de ensayo
d_{Amax}	Duración máxima de A_{max} o A por encima de cero

El tiempo de vida media de la actividad residual en plasma deriva de la siguiente fórmula:

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

donde $t_{1/2}$ es la vida media, t es el punto en el tiempo, c_t es la actividad plasmática residual en el punto en el tiempo y C_0 la actividad plasmática residual al inicio. El área bajo la curva (AUC) se calcula usando un programa de computación para farmacocinética, por ejemplo, SigmaPlot Versión 11.

[0076] En una forma de realización, el conjugado de la invención tiene un perfil farmacocinético de dosis única de acuerdo a lo siguiente, específicamente en donde el conjugado comprende mPEG con un peso molecular de menos de o igual a 2000 Da y una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1:

$A_{\max}$: entre aproximadamente 150 U/L y aproximadamente 250 U/L;

$T_{\max}$: entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 8 horas, específicamente aproximadamente 6 horas;

$d_{\max}$: entre aproximadamente 220 horas y aproximadamente 250 horas, específicamente, aproximadamente 238,5 horas (por encima de cero, entre aproximadamente 90 minutos y aproximadamente 240 horas);

AUC: entre aproximadamente 12000 y aproximadamente 30000; y

$t_{1/2}$: entre aproximadamente 50 horas y aproximadamente 90 horas.

[0077] En una forma de realización, el conjugado de la invención tiene un perfil farmacocinético de dosis única de

acuerdo a lo siguiente, específicamente cuando el conjugado comprende mPEG con un peso molecular de menos de o igual a 5000 Da y una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1:

$A_{\max}$: entre aproximadamente 18 U/L y aproximadamente 250 U/L;

$T_{\max}$: entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 50 horas;

$d_{\max}$: entre aproximadamente 90 horas y aproximadamente 250 horas, específicamente, aproximadamente 238,5 horas (por encima de cero, entre aproximadamente 90 minutos y aproximadamente 240 horas);

AUC: entre aproximadamente 500 y aproximadamente 35000; y

$t_{1/2}$: entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 120 horas.

[0078] En una forma de realización, el conjugado de la invención da como resultado un nivel similar de agotamiento de L-asparagina durante un período de tiempo (por ejemplo, 24, 48, o 72 horas) luego de una dosis única en comparación con una cantidad equivalente de proteína de pegaspargasa. En una forma de realización específica, el conjugado comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular de menos de o igual a aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización más particular, al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino

accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están tratados con PEG, más particularmente aproximadamente entre 40 y 55% o 100%.

[0079] En una forma de realización, el conjugado de la invención tiene un $t_{1/2}$ más largo que pegaspargasa administrada a una dosis de proteína equivalente. En una forma de realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, o 65 horas a una dosis de aproximadamente 50 $\mu\text{g/kg}$ (en base al contenido de proteínas). En otra forma de realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39, o 40 horas a una dosis de aproximadamente 10 $\mu\text{g/kg}$ (en base al contenido de proteínas). En otra forma de realización específica, el conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 horas a una dosis que varía en un rango entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 15.000 UI/ m^2 (aproximadamente entre 20 y 30 mg proteína/ m^2).

[0080] En una forma de realización, el conjugado de la invención tiene un AUC media que es al menos aproximadamente 2, 3, 4 ó 5 veces mayor que pegaspargasa a una dosis de proteína equivalente.

[0081] En una forma de realización, el conjugado de la invención no genera ninguna respuesta de anticuerpo significativa durante un período particular de tiempo luego de la administración de una dosis única, por ejemplo, mayor de aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4, semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, etc. En una forma de realización particular el conjugado de la invención no genera ninguna

respuesta de anticuerpos significativa durante al menos 8 semanas. En un ejemplo, "no genera ninguna respuesta de anticuerpos significativa" significa que el sujeto que recibe el conjugado se identifica dentro de los parámetros reconocidos por el arte como "anticuerpos negativos". Los niveles de anticuerpo se pueden determinar por métodos conocidos en el arte, por ejemplo ensayos de ELISA o resonancia de plasmón superficial (SPR-Biacore) (Zalewska-Szewczyk et al., *Clin. Exp. Med.* (2009) 9:113-116; Avramis et al., *Anticancer Research* 29 (2009) 299-302, cada uno de los cuales se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia). Los conjugados de la invención pueden tener cualquier combinación de estas propiedades.

Métodos de tratamiento y uso del conjugado

[0082] Los conjugados de la invención se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad tratable por agotamiento de asparagina. Por ejemplo, el conjugado es útil en el tratamiento o la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (ALL) en adultos y niños, así como otras condiciones en donde se espera que el agotamiento de asparagina tenga un efecto útil. Dichas condiciones incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, los siguientes: neoplasias, o cánceres, que incluyen pero no se limitan a neoplasias hematológicas, linfomas no Hodgkin, linfoma de NK, cáncer pancreático, enfermedad de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfosarcoma, reticulosarcoma, y melanosarcoma. Las enfermedades hematológicas no malignas representativas que responden al agotamiento de asparagina incluyen enfermedades mediadas por el sistema inmune, por ejemplo, enfermedades infecciosas tales como

aquellas causadas por infección con VIH (es decir, SIDA). Las enfermedades no hematológicas asociadas con dependencia de asparagina incluyen enfermedades autoinmunes, por ejemplo artritis reumatoide, SLE, autoinmunes, enfermedades vasculares de colágeno, SIDA, etc. Otras enfermedades autoinmunes incluyen osteoartritis, síndrome de Issac, psoriasis, diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, panencefalitis esclerosante, lupus eritematoso sistémico, fiebre reumática, enfermedad inflamatoria de los intestino (por ejemplo, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn), cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica, glomerulonefritis, miastenia gravis, pénfigo vulgar, y enfermedad de Graves. Las células sospechadas de provocar la enfermedad se pueden estudiar para la dependencia de asparagina en cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo* adecuado, por ejemplo, en un ensayo *in vitro* en donde el medio de crecimiento carece de asparagina. Por lo tanto, en un aspecto, la invención está dirigida a un método para tratar una enfermedad tratable en un paciente, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un conjugado de la invención. En una forma de realización específica, la enfermedad es ALL. En una forma de realización particular, el conjugado usando en el tratamiento de una enfermedad tratable por agotamiento de asparagina comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular de menos de o igual a aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización más particular, al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente

100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están tratados con PEG, más particularmente entre aproximadamente 40 y 55% o 100%.

[0083] En una forma de realización, el tratamiento con un conjugado de la invención será administrado como una terapia de primera línea. En otra forma de realización, el tratamiento con un conjugado de la invención será administrado como una terapia de segunda línea en pacientes, particularmente pacientes con ALL, en donde se han desarrollado signos objetivo de alergia o hipersensibilidad, que incluyen "hipersensibilidad silente", a otras preparaciones de asparaginasa, en particular, la L-asparaginasa nativa derivada de *Escherichia coli* o su variante tratada con PEG (pegaspargasa). Los ejemplos no limitantes de signos objetivo de alergia o hipersensibilidad incluyen ensayar "anticuerpo positivo" para una enzima asparaginasa. En una forma de realización específica, el conjugado de la invención se usa en una terapia de segunda línea luego del tratamiento con pegaspargasa. En una forma de realización más específica, el conjugado usado en terapia de segunda línea comprende una L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización más específica, el conjugado además comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular de menos de o igual a aproximadamente 5000 Da, más específicamente aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización incluso más preferida, al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de

lisina y/o el N-terminal) están tratados con PEG, más particularmente entre aproximadamente 40 y 55% o 100%.

[0084] En otro aspecto, la invención está dirigida a un método para tratar leucemia linfoblástica aguda que comprende administrar a un paciente con necesidad del tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de la invención. En una forma de realización específica, se administrará el tratamiento a una dosis que varía en un rango entre aproximadamente 1500 UI/m² y aproximadamente 15.000 UI/m², típicamente entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente entre 20 y 30 mg proteína/m²), en un esquema que varía en un rango entre aproximadamente dos veces por semana y aproximadamente una vez por mes, típicamente una vez por semana o una vez semana por medio, como un agente único (por ejemplo, monoterapia) o como parte de una combinación de drogas para quimioterapia, que incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, glucocorticoides, corticoesteroides, compuestos anticancerígenos u otros agentes, que incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, metotrexato, dexametasona, prednisona, prednisolona, vincristina, ciclofosfamida, y antraciclina. Como un ejemplo, se administrará el conjugado de la invención a pacientes con ALL como un componente de quimioterapia multiagente durante 3 fases de quimioterapia que incluyen inducción, consolidación o intensificación, y mantenimiento. En un ejemplo específico, el conjugado no se administra con un inhibidor de asparagina sintetasa (por ejemplo, tal como se describe en La Publicación PCT No. WO 2007/103290, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). En otro ejemplo específico, el conjugado no se administra con un inhibidor de asparagina

sintetasa, pero se administra con otras drogas para quimioterapia. El conjugado se puede administrar antes, después, o simultáneamente con otros compuestos como parte de un régimen de quimioterapia multiagente. En una forma de realización particular, el conjugado comprende L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular de menos de o igual a aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización más particular, al menos aproximadamente 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están tratados con PEG, más particularmente entre aproximadamente 40 y 55% o 100%.

[0085] En una forma de realización específica, el método comprende la administración de un conjugado de la invención en una cantidad de entre aproximadamente 1 U/kg y aproximadamente 25 U/kg (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 U/kg) o una cantidad equivalente del mismo (por ejemplo, en base al contenido de proteína). En una forma de realización más específica, el conjugado se administra en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 5, aproximadamente 10, y aproximadamente 25 U/kg. En otra forma de realización específica, el conjugado se administra en una dosis que varía en un rango entre aproximadamente 1.000 UI/m² y aproximadamente 20.000 UI/m² (por ejemplo, 1.000 UI/m², 2.000 UI/m², 3.000 UI/m², 4.000 UI/m², 5.000 UI/m², 6.000 UI/m², 7.000 UI/m², 8.000 UI/m², 9.000 UI/m², 10.000 UI/m², 11.000 UI/m²,

12.000 UI/m², 13.000 UI/m², 14.000 UI/m², 15.000 UI/m², 16.000 UI/m², 17.000 UI/m², 18.000 UI/m², 19.000 UI/m², o 20.000 UI/m²). En otra forma de realización específica, el conjugado se administra en una dosis que agota L-asparagina a niveles no detectables usando métodos y aparatos conocidos en el arte durante un período de entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 10 días (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 días) durante una dosis única. En otra forma de realización, el método comprende administrar un conjugado de la invención que produce una respuesta inmunogénica menor en un paciente en comparación con una L-asparaginasa no conjugada. En otra forma de realización, el método comprende administrar un conjugado de la invención que tiene una vida media de circulación *in vivo* más larga luego de una dosis única en comparación a L-asparaginasa no conjugada. En una forma de realización, el método comprende administrar un conjugado que tiene un $t_{1/2}$ más largo que pegaspargasa administrada a una dosis de proteína equivalente. En una forma de realización específica, el método comprende administrar un conjugado que tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, o 65 horas en una dosis de aproximadamente 50 µg/kg (en base al contenido de proteínas). En otra forma de realización específica, el método comprende administrar un conjugado que tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 30, 32, 34, 36, 37, 37, 39, o 40 horas a una dosis de aproximadamente 10 µg/kg (en base al contenido de proteínas). En otra forma de realización específica, el método comprende administrar un conjugado que tiene un $t_{1/2}$ de al menos entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 horas a una dosis que varía en un rango entre aproximadamente 10.000 y

aproximadamente 15.000 UI/m² (aproximadamente entre 20 y 30 mg proteína/m²). En una forma de realización, el método comprende administrar un conjugado que tiene un AUC media que es al menos aproximadamente 2, 3, 4 ó 5 veces mayor que pegaspargasa a una dosis de proteína equivalente. En otra forma de realización, el método comprende administrar un conjugado de la invención que tiene un valor de AUC mayor luego de una dosis única en comparación con la L-asparaginasa no conjugada. En una forma de realización particular, el conjugado comprende L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular de menos de o igual a aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización más particular, al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están tratados con PEG, más particularmente entre aproximadamente 40 y 55% o 100%.

[0086] La incidencia de recaída en pacientes con ALL luego del tratamiento con L-asparaginasa permanece elevado, con aproximadamente entre 10 y 25% de los pacientes con ALL pediátricos que tienen una recaída temprana (por ejemplo, algunos durante la fase de mantenimiento entre los 30 y 36 meses postinducción) (Avramis y Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). Si un paciente tratado con L-asparaginasa derivada de *E. coli* tiene una recaída, el tratamiento posterior con preparaciones de *E. coli* podría llevar a un efecto "vacunación", por el cual la preparación de *E. coli* ha aumentado la

inmunogenicidad durante las administraciones posteriores. En una forma de realización, el conjugado de la invención se puede usar en un método para tratar pacientes con recaída de ALL quienes han sido previamente tratados con otras preparaciones de asparaginasa, en particular aquellos que fueron previamente tratados con asparaginasas derivadas de *E. coli*.

[0087] En algunas formas de realización, los usos y métodos de tratamiento de la invención comprenden administrar un conjugado de L-asparaginasa que tiene propiedades o combinaciones de propiedades descritas en la presente anteriormente (por ejemplo, en la sección bajo el título "conjugados de L-asparaginasa PEG") o más abajo en la presente.

Composiciones, formulaciones, y rutas de administración

[0088] La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la invención. En una forma de realización específica la composición farmacéutica está contenida en un vial como un polvo liofilizado para ser reconstituido con un solvente, tal como las L-asparaginasas nativas actualmente disponibles, sin importar la fuente bacteriana usada para su producción (Kidrolase®, Elspar®, Erwinase®...). En otra forma de realización, la composición farmacéutica es una solución "lista para usar", tal como pegaspargasa (Oncaspar®) que permite, además de un manejo apropiado, una administración, por ejemplo, por ruta intramuscular, intravenosa (infusión y/o bolo), intra-cerebro-ventricular (icv), subcutánea.

[0089] Los conjugados de la invención, que incluyen composiciones comprenden conjugados de la invención (por ejemplo, una composición farmacéutica) se pueden administrar a un paciente

usando técnicas estándares. Las técnicas y formulaciones generalmente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ta ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990 (incorporado a la presente a modo de referencia).

[0090] Las formas de dosificación adecuadas, en parte, dependen del uso o ruta de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica, transmucosa, o por inyección (parenteral). Dichas formas de dosificación deben permitir que el agente alcance la célula blanco o de otro modo tener el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas inyectadas en el torrente sanguíneo preferentemente son solubles.

[0091] Los conjugados y/o composiciones farmacéuticas de acuerdo a la invención pueden ser formulados como sales farmacéuticamente aceptables y complejos de las mismas. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales no tóxicas presentes en las cantidades y concentraciones a la cual se administran. La preparación de dichas sales puede facilitar el uso farmacéutico por alteración de las características físicas del compuesto sin prevenir que ejerza su efecto fisiológico. Las alteraciones útiles en las propiedades físicas incluyen disminuir el punto de fusión para facilitar la administración transmucosa y aumentar la solubilidad para facilitar la administración de concentraciones más altas de la droga. La sal farmacéuticamente aceptable de una asparaginasa puede estar presente como un complejo, como apreciarán aquellos con experiencia en el arte.

[0092] Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición ácida tal como aquellas que contienen sulfato, clorhidrato, fumarato, maleato, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanesulfonato,

bencenosulfonato, p-toluensulfonato, ciclohexilsulfamato, y quinato. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener a partir de ácidos, que incluyen ácido clorhídrico, ácido maleico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido sulfámico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido ciclohexilsulfámico, ácido fumárico, y ácido quínico.

[0093] Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición básica tales como aquellas que contienen benzatina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenediamina, meglumina, procaína, aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, amonio, alquilamina, y zinc, cuando están presentes grupos funcionales ácidos, tal como ácido carboxílico o fenol. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente. Dichas sales se pueden preparar usando las correspondientes bases apropiadas.

[0094] Los vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables también se pueden incorporar a una composición farmacéutica de acuerdo a la invención para facilitar la administración de la asparaginasa particular. Los ejemplos de vehículos adecuados para usar en la práctica de la invención incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares tales como lactosa, glucosa, o sacarosa, o tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles, y solventes fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de solventes fisiológicamente compatibles incluyen soluciones estériles de agua para inyección (WFI), solución salina y dextrosa.

[0095] Las composiciones farmacéuticas de acuerdo a la invención se pueden administrar por diferentes rutas, que incluyen administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral, tópica (transdérmica), o transmucosa. Para la administración sistémica, se prefiere la administración oral. Para la administración oral, por ejemplo, los compuestos se pueden formular en formas de dosificación oral convencionales tales como cápsulas, tabletas, y preparaciones líquidas tales como jarabes, elixires, y gotas concentradas.

[0096] Como alternativa, se puede usar inyección (administración parenteral), por ejemplo, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, e inyección subcutánea. Para inyección, las composiciones farmacéuticas están formuladas en soluciones líquidas, preferentemente en soluciones amortiguadoras o soluciones fisiológicamente compatibles, tal como solución salina, solución de Hank, solución de Ringer. Además, los compuestos se pueden formular en forma sólida y redisolverlos o suspenderlos inmediatamente antes de usarlos. Por ejemplo, se pueden producir formas liofilizadas. En una forma de realización específica, el conjugado se administra intramuscularmente. En otra forma de realización específica, el conjugado se administra en forma intravenosa.

[0097] La administración sistémica también se puede lograr por medios transmucoso o transdérmico. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para permear la barrera. Dichos penetrantes son bien conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. Además, se pueden usar detergentes para facilitar el

permeado. La administración transmucosa, por ejemplo, puede ser a través de rociadores nasales, inhaladores (para administración pulmonar), supositorios rectales, o supositorios vaginales. Para la administración tópica, los compuestos se pueden formular en ungüentos, bálsamos, geles, o cremas, como es bien conocido en el arte.

[0098] Las cantidades del conjugado a ser administradas dependerán de muchos factores, por ejemplo, la IC_{50} , EC_{50} , la vida media biológica del compuesto, la edad, tamaño, peso, y condición física del paciente, y la enfermedad o trastorno a ser tratado. La importancia de estos y otros factores a ser considerados son bien conocidos por aquellos con experiencia ordinaria en el arte. Generalmente, la cantidad del conjugado a ser administrado variará en un rango entre aproximadamente 10 Unidades Internacionales por metro cuadrado del área superficial del cuerpo del paciente (UI/m^2) y $50.000 UI/m^2$, prefiriendo un rango de dosificación de entre aproximadamente $1.000 UI/m^2$ y aproximadamente $15.000 UI/m^2$, y siendo más preferido un rango entre aproximadamente $6.000 UI/m^2$ y aproximadamente $15.000 UI/m^2$, y siendo un rango entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente $15.000 UI/m$ (aproximadamente entre 20 y 30 mg proteína/ m^2) particularmente preferido para tratar una enfermedad hematológica maligna, por ejemplo, leucemia. Típicamente, estas dosificaciones se administran a través de una inyección intramuscular o intravenosa en un intervalo de entre aproximadamente 3 veces por semana y aproximadamente una vez por mes, típicamente una vez por semana o una vez cada dos semanas durante el curso de la terapia. Por supuesto que se pueden usar otros regímenes de dosificaciones y/o tratamiento, como lo determina el médico tratante.

[0099] En formas de realización particulares, el conjugado y/o composición farmacéutica o formulación a ser administrado como se describe en la presente comprende L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización particular, el conjugado comprende L-asparaginasa de especies de *Erwinia*, más específicamente *Erwinia chrysanthemi*, y más específicamente, la L-asparaginasa que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1. En una forma de realización particular, el conjugado comprende PEG (por ejemplo, mPEG) que tiene un peso molecular de menos de o igual a aproximadamente 5000 Da. En una forma de realización más particular, al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) están tratados con PEG.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de crisantaspasa recombinante

[0100] La cepa bacteriana recombinante usada para la fabricación de la proteína L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* recombinante desnuda (también referida en la presente como "r-crisantaspasa") fue una cepa *E. coli* BL21 con un gen *ansB* eliminado (el gen que codifica para la L-asparaginasa tipo II endógena de *E. coli*) para evitar la contaminación potencial de la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* recombinante con esta enzima. La eliminación del gen *ansB* se basa en métodos de recombinación homóloga y transducción de fagos realizados de acuerdo a los tres pasos siguientes:

- 1) se transformó una cepa bacteriana (NM1100) que expresa un fago lambda defectuoso que provee funciones que protegen y recombina

sustrato de ADN lineal electroporado en la célula bacteriana con un plásmido lineal (casete de kanamicina) que contiene el gen de kanamicina flanqueado por una secuencia blanco de reconocimiento FLP (FRT). La recombinación se produce para remplazar el gen *ansB* por el casete de kanamicina en el genoma bacteriano, que da como resultado una cepa $\Delta ansB$; 2) se usó la transducción de fagos para integrar la región de casete de kanamicina de la cepa $\Delta ansB$ NM1100 al locus *ansB* en la cepa BL21. Esto resulta en una cepa BL21 *E. coli* con un gen *ansB* eliminado y resistente a kanamicina; 3) esta cepa se transformó con un plásmido colaborador FLP para eliminar el gen de kanamicina por recombinación homóloga en la secuencia FRT. Se secuenció el genoma de la cepa final (cepa $\Delta ansB$ BL21), confirmando la eliminación completa del gen *ansB* endógeno.

[0101] La secuencia de ADN optimizada de *E. coli* que codifica para la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* madura fusionada con el péptido señal ENX de *Bacillus subtilis* se insertó en un vector de expresión. Este vector permite la expresión de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* recombinante bajo el control del promotor T5/lac híbrido inducido por el agregado de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y confiere resistencia a kanamicina.

[0102] Se transformó la cepa $\Delta ansB$ BL21 con este vector de expresión. Las células transformadas se usaron para la producción de la r-crisantaspasa por fermentación discontinua con glucosa en medio Reisenberg. La inducción de la célula se hizo durante 16 horas a 23°C con IPTG como inductor. Luego de recolectar las células y lisar por homogeneización en solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 6 EDTA 5 mM (Solución amortiguadora A),

se clarificó la solución de proteína por centrifugación dos veces a 15000g, seguido por pasos de filtración a 0,45µm y 0,22µm. La L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* recombinante luego se purificó usando una secuencia de pasos de cromatografía y concentración. Brevemente, el punto isoeléctrico teórico de la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (7,23) permite que la enzima recombinante se adsorba a las resinas de intercambio catiónico a pH 6. Por lo tanto, la enzima recombinante se captura sobre una columna Capto S (cromatografía de intercambio catiónico) y se eluye con un gradiente de sal en Solución amortiguadora A. Se combinaron las fracciones que contenían la enzima recombinante. Luego se purificó la solución combinada sobre una columna Capto MMC (cromatografía de intercambio catiónico) en Solución amortiguadora A con gradiente de sal. Las fracciones eluidas que contienen L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* se combinaron y se concentraron antes de la separación de proteína por cromatografía de exclusión molecular en Superdex 200 pg como paso de acabado final. Las fracciones que contienen las enzimas recombinantes se combinaron, se concentraron, y se diafiltraron contra solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM pH8. La pureza de la preparación final de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* se evaluó por SDS-PAGE (Figura 1) y RP-HPLC y fue al menos 90%. La integridad de la enzima recombinante se verificó por secuenciamiento N-terminal y LC-MS. La actividad enzimática se midió a 37°C usando reactivo de Nessler. La actividad específica de la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* recombinante purificada fue alrededor de 600 U/mg. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de amoníaco de L-asparagina por minuto a 37°C.

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

[0103] Se agitó una solución de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM a pH 8,0, con una concentración de proteína entre 2,5 y 4 mg/mL, en presencia de 150 mg/mL o 36 mg/mL de 10 kDa mPEG-NHS, durante 2 horas a 22°C. La 10 kDa mPEG-L-asparaginasa cruda resultante se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando una columna de Superdex 200 pg en un sistema Akta purifier UPC 100. Se combinaron las fracciones conteniendo proteína y se concentraron para dar una concentración de proteína entre 2 y 8 mg/mL. Se prepararon dos conjugados 10 kDa mPEG-L-asparaginasa de este modo, que diferían en su grado de tratamiento con PEG según lo determinado por el ensayo TNBS con L-asparaginasa no modificada como referencia, uno que correspondía al tratamiento con PEG completo (100% de los residuos de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) estando conjugados correspondiente al tratamiento con PEG del 78% de los grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal)); correspondiendo el segundo al tratamiento parcial con PEG (39% de grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) o aproximadamente 50% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal)). El análisis por SDS-PAGE de los conjugados se muestra en la Figura 2. Los conjugados resultantes aparecen como una banda esencialmente homogénea y no contienen r-crisantaspasa no modificada detectable.

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

[0104] Se agitó una solución de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM a pH 8,0, a una concentración de proteína de 4 mg/mL, en presencia de 150 mg/mL o 22,5 mg/mL de 5 kDa mPEG-NHS, durante 2 horas a 22°C. La 5 kDa mPEG-L-asparaginasa cruda resultante se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando una columna de Superdex 200 pg en un sistema Akta purifier UPC 100. Se combinaron las fracciones que contenían proteína y se concentraron para dar una concentración de proteína entre 2 y 8 mg/mL. Se prepararon dos conjugados de 5 kDa mPEG-L-asparaginasa de este modo, que diferían en su grado de tratamiento con PEG determinado por el ensayo TNBS con L-asparaginasa no modificada como referencia, uno que correspondía al tratamiento con PEG completo (100% de los residuos de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) estando conjugados correspondiente al tratamiento con PEG del 84% de los grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal)); correspondiendo el segundo al tratamiento parcial con PEG (36% de grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) o aproximadamente 43% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal)). El análisis por SDS-PAGE de los conjugados se muestra en la Figura 2. Los conjugados resultantes aparecen como una banda esencialmente homogénea y no contienen r-crisantaspasa no modificada detectable.

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

[0105] Se agitó una solución de L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* en una solución amortiguadora de fosfato de sodio

100 mM pH 8,0 a una concentración de proteína de 4 mg/mL en presencia de 150 mg/mL o 22,5 mg/mL de 2 kDa mPEG-NHS durante 2 horas a 22°C. La 2 kDa mPEG-L-asparaginasa cruda resultante se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando una columna de Superdex 200 pg en un sistema Akta purifier UPC 100. Se combinaron las fracciones que contenían proteína y se concentraron para dar una concentración de proteína entre 2 y 8 mg/mL. Se prepararon dos conjugados de 2 kDa mPEG-L-asparaginasa de este modo, que diferían en su grado de tratamiento con PEG determinado por el ensayo TNBS con L-asparaginasa no modificada como referencia, uno que correspondía al tratamiento con PEG completo (100% de los residuos de grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) estando conjugados correspondiente al tratamiento con PEG del 86% de los grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal)); correspondiendo el segundo al tratamiento parcial con PEG (47% de grupos amino totales (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) o aproximadamente 55% de los grupos amino accesibles (por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal)). El análisis por SDS-PAGE de los conjugados se muestra en la Figura 2. Los conjugados resultantes aparecen como una banda esencialmente homogénea y no contienen r-crisantaspasa no modificada detectable.

Ejemplo 5: Actividad de conjugados mPEG-r-crisantaspasa

[0106] La actividad aminohidrolasa de L-asparaginasa de cada conjugado descrita en los siguientes ejemplos se determinó por Nesslerización de amoníaco que se libera de L-asparagina por actividad enzimática. Brevemente, se mezclaron 50µL de solución enzimática con 20 mM de L-asparagina en una solución

amortiguadora de borato de sodio 50 mM de pH 8,6 y se incubó durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por agregado de 200µL de reactivo de Nessler. Se midió la absorbancia de esta solución a 450 nm. La actividad se calculó a partir de una curva de calibración que se obtuvo de sulfato de amonio como referencia. Los resultados se resumen en la Tabla 2, más abajo:

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

Muestra*	mol PEG/mol monómero**	Actividad específica [U/mg]	Actividad relativa %
10 KDa mPEG-r-crisantaspasa 40%	7,0	543	87
10 KDa mPEG-r-crisantaspasa 100%	14.1	541	87
5 KDa mPEG-r-crisantaspasa 40%	6.5	501	81
5 KDa mPEG-r-crisantaspasa 100%	15.1	483	78
2 KDa mPEG-r-crisantaspasa 40%	8.5	524	84
2 KDa mPEG-r-crisantaspasa 100%	15.5	515	83
r-crisantaspasa	-	622	100

* los números "40%" y "100%" indican un grado aproximado de tratamiento con PEG de entre respectivamente 40 y 55% y 100% de grupos amino accesibles (véase Ejemplo 2-4, anteriormente).

** la relación mol PEG/mol monómero se extrapoló a partir de los datos usando el ensayo TNBS, que asume que todos los grupos amino

de la proteína (por ejemplo, residuos de lisina y the N-terminal) son accesibles.

[0107] La actividad residual de los conjugados de mPEG-r-crisantaspasa variaron entre 483 y 543 Unidades/mg. Esto corresponde a entre 78 y 87% de actividad aminohidrolasa de L-asparagina de la enzima no modificada.

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

[0108] El perfil farmacocinético de Erwinase® se determinó en híbridos B6D2F1 (hembras, inmunocompetentes), Charles River Alemania. Erwinase® es una crisantaspasa (L-asparaginasa derivada de *Erwinia chrysanthemi*) comercialmente disponible. Brevemente, 2 animales por grupo recibieron una inyección i.v. única de 5, 25, 125, o 250 Unidades/kg de peso corporal de Erwinase® a 1 hora predosis y 6 horas, 12 horas, 24 horas, y 48 horas postdosis, se colectaron muestras de plasma del seno orbital y se analizaron los niveles plasmáticos de L-asparagina.

[0109] Los niveles de aminoácidos plasmáticos se determinaron con un conjunto de elementos para análisis de aminoácidos PICO-TAG (Waters). Brevemente, las muestras de plasma de desproteinizaron por precipitación con metanol. Se derivatizaron los aminoácidos libres en el sobrenadante on fenilisotiocianato y se cuantificaron por RP-HPLC.

[0110] Como se muestra en la Figura 3, las dosis de 5 y 25 U/kg no fueron eficaces para agotar los niveles de L-asparagina en ratones luego de la administración iv. Sólo la dosis de 250 U/kg indujo un agotamiento completo durante 48 horas.

[0111] Este resultado ilustra las limitaciones clínicas de Erwinase®, una crisantaspasa no modificada, que necesita ser

administrada hasta 3 veces por semanas como inyecciones indoloras en pacientes que sufren de ALL, y en dosis altas que dan como resultado reacciones alérgicas frecuentes e inmunogenicidad.

Ejemplo 7: Efecto de agotamiento de L-asparagina y actividad de L-asparaginasa plasmática luego de la administración simple de seis conjugados de mPEG-r-crisantaspasa

[0112] Se determinaron los perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos de 6 conjugados de mPEG-r-crisantaspasa en híbridos B6D2F1 (hembras inmunocompetentes), Charles River Alemania. Los seis conjugados ensayados difirieron en el tamaño molecular del PEG (2, 5 ó 10 kDa) y en el grado de tratamiento con PEG (tratamiento con PEG máximo vs. parcial). Se usó crisantaspasa no modificada (Erwinase®) como referencia. Brevemente, 4 animales por grupo recibieron una inyección i.v. única de 5 Unidades/kg de peso corporal conjugado vs. 250 Unidades/kg de peso corporal de Erwinase®. A 1 hora predosis y 6 horas, 24 horas, 48 horas, 96 horas y 192 horas luego de la inyección, se colectaron las muestras de plasma del seno orbital de cada animal y se analizaron los niveles plasmáticos de L-asparagina y actividad enzimática residual, respectivamente.

[0113] Se determinaron los niveles de aminoácidos plasmáticos con un conjunto de elementos para análisis de aminoácidos PICO-TAG (Waters). Brevemente, las muestras de plasma se desproteinizaron por precipitación con metanol. Se derivatizaron los aminoácidos libres en el sobrenadante con fenilisotiocianato y se cuantificó por RP-HPLC.

[0114] Se determinó la actividad enzimática en plasma con un ensayo cromogénico. Se usó L-aspartico β -hidroxamato (AHA) como sustrato. Las enzimas hidrolizaron AHA a L-Asp e hidroxilamina,

que se determinó a 710 nm luego de la condensación con 8-hidroxiquinolina y oxidación a indooxina. (*Analytical Biochemistry* 309 (2002): 117-126, que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia).

[0115] Como se muestra en la Figura 4, los conjugados administrados a 5 U/kg mostraron una potencia de agotamiento de L-asparagina al menos tan buena como la de Erwinase® 250 U/kg, sugiriendo que el tratamiento con PEG aumentó la potencia de la proteína en al menos 50 veces. Todos los conjugados exhibieron una potencia similar, agotando los niveles plasmáticos de L-asparagina durante 2 días, excepto para el conjugado 5 kDa-100% que mostró mayor duración de acción (96 horas = 4 días en comparación con 48 horas = 2 días para otros conjugados).

[0116] Por lo tanto, el aumento del tamaño del conjugado de PEG con r-crisantaspasa entre 2 kDa y 5 kDa dio como resultado un aumento en la potencia y duración de la acción. Sin embargo, sorprendentemente, el aumento en el tamaño de PEG a 10 kDa no mejoró adicionalmente la potencia ni la duración de la acción del conjugado, incluso dio como resultado una disminución en comparación con el del conjugado 5 kDa máximamente tratado con PEG.

[0117] La actividad enzimática fue consistente con el agotamiento de L-asparagina. Como se muestra en la Figura 5, el conjugado 5 kDa-100% exhibió la mayor AUC, reflejando una vida media más larga. Se observó una AUC más corta con conjugados PEG-40% (parcialmente tratado con PEG) vs. PEG-100% (máximamente tratado con PEG) para los candidatos 2 kDa y 5 kDa y no se observó diferencia para los candidatos 10 kDa.

[0118] Consistente con los datos de agotamiento de L-asparagina, el aumento del tamaño molecular del PEG conjugado con la r-crisantaspasa de 2 kDa a 5 kDa dio como resultado una actividad de L-asparaginasa circulante más larga. Sin embargo, sorprendentemente, el aumento del tamaño del PEG a 10 kDa no mejoró adicionalmente la actividad enzimática *in vivo* del conjugado, incluso dio como resultado una disminución en comparación con el conjugado 5 kDa máximamente tratado con PEG. Además, notablemente, cuando r-crisantaspasa se mono-trató con PEG en el N-terminal con mPEG de alto peso molecular (es decir, 40 kDa), no tuvo impacto significativo sobre la estabilidad *in vitro* de la enzima frente a proteólisis (datos no mostrados).

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

[0119] Se determinó el perfil farmacocinético de 2 conjugados mPEG-r-crisantaspasa en comparación con pegaspargasa (Oncaspar®) en híbridos B 6D2F1 (hembras inmunocompetentes), Charles River Alemania. Los conjugados ensayados fueron las 2 kDa r-crisantaspasa máximamente (100%) tratada con PEG y la 5 kDa r-crisantaspasa máximamente (100%) tratada con PEG en 3 dosis. Brevemente, 8 animales por grupo recibieron una inyección i.v. única de 5, 25 ó 50 Unidades/kg de peso corporal de los conjugados de r-crisantaspasa, que correspondía a 10, 50 ó 100 µg proteína/kg. Como un brazo comparativo, se ensayó Oncaspar® a 1 Unidad/kg, que correspondía a 10 µg proteína/kg. Se colectaron muestras de plasma a 1 hora predosis y a 90 minutos, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 144 horas, 192 horas y 240 horas postdosis del seno orbital y se analizaron los niveles plasmáticos de L-asparagina.

[0120] Se determinaron los niveles plasmáticos de aminoácidos con un conjunto de elementos para análisis de aminoácidos PICO-TAG (Waters). Brevemente, las muestras de plasma se desproteinizaron por precipitación con metanol. Se derivatizaron los aminoácidos libres en el sobrenadante con fenilisotiocianato y se cuantificó por RP-HPLC.

[0121] Los efectos relacionados con la dosis de los conjugados sobre los niveles plasmáticos de L-asparagina se muestran en la Figura 6. Como se muestra en las Figuras 6A y 6B, ambos conjugados fueron altamente eficaces para agotar la L-asparagina circulante. Para el conjugado 2 kDa 100%, el agotamiento total se observó durante 3, 6 y al menos 10 días con las dosis de 5 U, 25 U y 50 U/kg, respectivamente. Para el conjugado 5 kDa 100%, el agotamiento total se observó durante 3, 10 y 10 días para las dosis de 5 U, 25 U y 50 U/kg, respectivamente. Para ambos conjugados ensayados, las dosis de 5, 25 y 50 U/kg ensayadas se correspondieron con 10, 50 y 100 µg/kg en base al contenido de proteína, que es una cantidad muy baja de proteína en comparación con otras preparaciones de L-asparaginasa. De hecho, 250 U/kg Erwinase® corresponde a aproximadamente 520 µg/kg, y 1 U/kg de Oncaspar® corresponde aproximadamente a 10 µg/kg (en base al contenido de proteínas). La Figura 6C muestra que la administración de una cantidad equivalente de proteína (10 µg/kg) del conjugado 2 kDa-100%, el conjugado 5 kDa-100% o Oncaspar® dio como resultado un agotamiento similar de L-asparagina durante 72 horas.

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

[0122] Se determinó el perfil farmacocinético de conjugados mPEG-r-crisantaspasa en híbridos B6D2F1 (hembras inmunocompetentes), Charles River Alemania. Los conjugados ensayados fueron las r-crisantaspasa 2 kDa máximamente (100%) tratada con PEG y la r-crisantaspasa 5 kDa máximamente (100%) r-crisantaspasa completamente tratada con PEG a 3 dosis. También se ensayaron crisantaspasa no modificada (Erwinase®) a 250 U/kg y Oncaspar® y 1 U/kg como controles. Brevemente, 8 animales por grupo recibieron una inyección i.v. única de 5, 25 ó 50 Unidades/kg de peso corporal de cada conjugado mPEG-r-crisantaspasa en comparación con Erwinase® y Oncaspar®. Se colectaron muestras de plasma a 1 hora predosis y a los 90 minutos, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 144 horas, 192 horas y 240 horas postdosis del seno orbital y se analizaron los niveles plasmáticos de la actividad enzimática residual.

[0123] Se determinó la actividad enzimática en plasma con un ensayo cromogénico. Se usó L-aspartico β-hidroxamato (AHA) como sustrato. Las enzimas hidrolizaron AHA a L-Asp e hidroxilamina, lo que se determinó a 710 nm luego de la condensación con 8-hidroxiquinolina y oxidación a indooxina. (*Analytical Biochemistry* 309 (2002): 117-126).

[0124] Para el cálculo del tiempo de vida media, se derivaron las líneas de mejor ajuste exponencial de las actividades plasmáticas residuales respectivas usando una herramienta de funciones de MS-excel. Los valores negativos de actividad se excluyeron del cálculo.

Parámetro	Definición
A _{max}	Actividad enzimática residual máxima

$t_{A_{max}}$	Tiempo a A_{max} luego de exposición a ítem de ensayo
$d_{A_{max}}$	Duración máxima de A_{max} o A por encima de cero

[0125] El tiempo de vida media de la actividad enzimática residual en plasma se derivaron de la siguiente fórmula usando la herramienta de funciones de MS-excel y la respectiva fórmula de las líneas de mejor ajuste exponencial:

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

$\ln(c_t/c_0)$

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

[0126] Las áreas bajo las curvas (AUC) se calcularon usando SigmaPlot Versión 11. Los datos farmacocinéticos se resumen en las Tablas 3 y 4, más abajo, y las Figuras 7-9.

Tabla 3: Farmacocinética principal de un tratamiento simple con 250 U/kg de peso corporal de Erwinase®, 1 U/kg de peso corporal de Pegaspargasa (Oncaspar®), o conjugados 2 kDa mPEG-r-crisantaspasa 100% (actividad enzimática residual plasmática)

Parámetro	Erwinase®	Pegaspargasa 1 U/Kg de peso corporal	2kDa/100% 5 U/Kg de peso corporal	2kDa/100% 25 U/Kg de peso corporal	2kDa/100% 50 U/Kg de peso corporal
A_{max}	83,9 U/L	6 U/L	14 U/L	153 U/L	208 U/L
$t_{A_{max}}$	6 h	90 min	90 min	6 h	6 h
$d_{A_{max}}$ por encima de cero	18 h Entre 6 h - 24 h	46,5 90 min - 48 h	70,5 90 min - 72 h	238,5 90 min - 240 h	238,5 90 min - 240 h
AUC	1205	222	627	12446	28349

68

(media)					
$t_{1/2}$	6 h	28 h	31 h	55 h	85 h

Tabla 4: Farmacocinética principal de un tratamiento simple con 250 U/kg de peso corporal de Erwinase®, 1 U/kg de peso corporal de Pegaspargasa (Oncaspar®), o conjugados 5 kDa mPEG-r-crisantaspasa 100% (actividad enzimática residual plasmática)

Parámetro	Erwinase®	Pegaspargasa 1 U/Kg de peso corporal	5kDa/100% 5 U/Kg de peso corporal	5kDa/100% 25 U/Kg de peso corporal	5kDa/100% 50 U/Kg de peso corporal
A_{max}	83,9 U/L	6 U/L	18 U/L	188 U/L	226 U/L
t_{Amax}	6 h	90 min	90 min	6 h	48 h
d_{Amax} por encima de cero	18 h Entre 6 h - 24 h	46,5 90 min - 48 h	94,5 90 min - 96 h	238,5 90 min - 240 h	238,5 90 min - 240 h
AUC (media)	1205	222	728	19748	33151
$t_{1/2}$	6 h	28 h	38 h	63 h	104 h

[0127] Los datos muestran que el tratamiento con PEG de r-crisantaspasa prolonga significativamente la vida media en comparación con crisantaspasa no modificada, y de un modo dependiente de la dosis (Tablas 3 y 4, Figuras 7-9). Adicionalmente, cuando se compara al mismo nivel de dosis, las AUC medidas para el conjugado 5 kDa-100% fueron mayores que aquellas observadas para el 2 kDa-100%. Consistentemente se encontró una diferencia de 21%, 37% y 14% a favor del conjugado 5 kDa-100%, a las dosis de 5, 25 y 50 U/kg, respectivamente (Figura 8). El conjugado 5 kDa-100% también parece tener una vida media más prolongada que Oncaspar® cuando se ensayó a la misma dosis en

base al contenido de proteína, como se muestra en la Figura 9 y en los parámetros farmacocinéticos derivados mostrados en la Tabla 4. Los perfiles farmacocinéticos superiores para los conjugados de *Erwinia* son sorprendentes, debido a que se conoce que la L-asparaginasa derivada de *E. coli* tiene una vida media más larga en humanos y en animales que la L-asparaginasa derivada de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspasa). Por lo tanto, lógicamente se podría haber predicho una vida media más larga para la L-asparaginasa de *E. coli* tratada con PEG (pegaspargasa) en comparación con r-crisantaspasa tratada con PEG. Sin embargo, inesperada y ventajosamente, la r-crisantaspasa tratada con PEG tiene una vida media más larga que pegaspargasa.

[0128] La Tabla 5, más abajo, resume los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos reunidos de varios experimentos, que incluyen aquellos descritos en los Ejemplos 7-9 en la presente, mostrando que: 1) ambos conjugados 2 kDa-100% y 5 kDa-100% fueron muy potentes para aumentar la potencia y duración de la acción de crisantaspasa, como lo muestran las marcadas diferencias observadas en comparación con Erwinase®; 2) el conjugado 5 kDa-100% fue de acción más prolongada que el conjugado 2 kDa-100% y Oncaspar®, como lo muestra la vida media más prolongada observada a todas las dosis ensayadas. En vista de los resultados sorprendentemente inferiores obtenidos con el conjugado 10 kDa-100%, estos datos sugieren que el beneficio del tratamiento con PEG aumenta con el tamaño del grupo PEG unido a la crisantaspasa hasta 5 kDa. El PEG de mayor peso molecular no agregó ningún beneficio adicional, y, al menos en el caso de 10 kDa, podría incluso ser perjudicial. Esto es inesperado y contrario a los resultados que fueron vistos por ejemplo, cuando

Holtsberg et al. conjugó pesos moleculares variables de PEG a arginina desaminasa, otra enzima degradadora de aminoácidos aislada de una fuente microbiana. En aquellos estudios la función farmacocinética y farmacodinámica de la enzima arginina desaminasa aumentó a medida que aumentó el tamaño del PEG unido desde un peso molecular de entre 5000 Da y 20.000 Da (Holtsberg, F. W., *Journal of Controlled Release* 80 (2002), 259-271), que se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia).

Tabla 5

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

[0129] Adicionalmente, como se ve con más detalle más abajo, los datos de inmunogenicidad muestran que el 10 kDa-100% exhibió un perfil de inmunogenicidad inaceptable, una desventaja importante cuando se considera la administración del compuesto a pacientes que son alérgicos a L-asparaginasa de *E. coli* o que han desarrollado anticuerpos anti-L-asparaginasa. Respecto a esto, el conjugado 10 kDa-100% no es realmente adecuado. Se prefieren el 2

kDa-100% y el 5 kDa-100%, y el conjugado 5 kDa-100% es particularmente preferido.

Ejemplo 10: Inmunogenicidad

[0130] Se determinó la inmunogenicidad de conjugados mPEG-r-crisantaspasa en híbridos B6D2F1 (hembras inmunocompetentes), Charles River Alemania. Los animales se trataron dos veces por semana en las semanas 1, 2, 3, 4, y 8 por inyección i.v. de 250 U/kg de peso corporal para Erwinase® y 5 U/kg de peso corporal para todos los conjugados r-crisantaspasa. Las muestras de suero se colectaron a 1 hora predosis y luego de 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 6 semanas y 8 semanas del seno orbital. Se determinaron los niveles de anticuerpos anti-crisantaspasa o anti-mPEG-r-crisantaspasa en suero por ELISA. Los resultados se resumen en las Figuras 10 y 11.

[0131] Se observaron títulos altos de anticuerpos anti-crisantaspasa para Erwinase® iniciando en la semana 2 y se mantuvieron durante todo el período de estudio. Por el contrario, se observaron niveles no significativos de anticuerpos para conjugados r-crisantaspasa (Figura 10).

[0132] Como se muestra en la Figura 11, la producción de anticuerpos anti-conjugado permaneció en baja intensidad y frecuencia para los conjugados 2 kDa y 5 kDa mPEG-r-crisantaspasa, y aumento con valores más altos y frecuencia para los conjugados 10 kDa mPEG-r-crisantaspasa. No se notó ninguna diferencia clara entre los conjugados completamente y parcialmente tratados con PEG (no mostrado).

[0133] Por lo tanto, estos datos demostraron que la estrategia de tratamiento con PEG que se seleccionó redujo la inmunogenicidad de los conjugados en comparación con la L-

asparaginasa no modificada, disminuyendo marcadamente la respuesta a anticuerpos anti-crisantaspasa. Sin embargo, se detectaron anticuerpos anti-conjugado, especialmente con los conjugados 10 kDa, y con una menor intensidad con los conjugados 2 kDa y 5 kDa.

[0134] En conclusión, parece que, hasta 5 kDa, el tratamiento con PEG tuvo éxito en mejorar el perfil farmacocinético, potencia y duración de la acción de r-crisantaspasa, a la vez que reduce la inmunogenicidad en comparación con la proteína no modificada, con una potencia y duración de acción que aumenta con el tamaño del polímero usado, siendo el conjugado 5 kDa mPEG-r-crisantaspasa levemente más potente que el conjugado 2 kDa mPEG-r-crisantaspasa. Sin embargo, el aumento adicional del tamaño del PEG a 10 kDa falló en mejorar adicionalmente la potencia y duración de la acción, ya que el conjugado 10 kDa mPEG-r-crisantaspasa fue menos potente *in vivo* que el conjugado 5 kDa mPEG-r-crisantaspasa, a pesar de sus potencias *in vitro* similares. Adicionalmente, los conjugados de 10 kDa mPEG-r-crisantaspasa exhibieron un perfil de inmunogenicidad inaceptable, un resultado inesperado en vista de los resultados publicados con otras proteínas.

[0135] Si bien se han descripto las formas de realización y aplicaciones de la presente invención con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo, podría resultar evidente para aquellos con experiencia en el arte que podrían ser posibles muchas modificaciones adicionales sin apartarse de los conceptos inventivos contenidos en la presente. Todas las referencias citadas en la presente se incorporan aquí en su totalidad.

Reivindicaciones

1. Un conjugado que comprende una L-asparaginasa de *Erwinia* que tiene al menos 80% de identidad con el aminoácido de SEQ ID NO:1 y polietilenglicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular menor que o igual a aproximadamente 5000 Da.

2. El conjugado de la reivindicación 1, en donde dicha L-asparaginasa tiene al menos 90% de identidad con el aminoácido de SEQ ID NO:1.

3. El conjugado de la reivindicación 1, en donde dicha L-asparaginasa tiene al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

4. El conjugado de la reivindicación 1, en donde dicha L-asparaginasa es idéntica a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.

5. El conjugado de cualquier reivindicación 1-4, en donde dicho PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 Da.

6. El conjugado de cualquier reivindicación 1-4, en donde dicho PEG tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5000 Da.

7. El conjugado de cualquier reivindicación 1-4, en donde dicho PEG tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 4000 Da.

8. El conjugado de cualquier reivindicación 1-4, en donde dicho PEG tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 3000 Da.

9. El conjugado de cualquier reivindicación 1-4, en donde dicho PEG tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2500 Da.

10. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho conjugado tiene una actividad *in vitro* de al menos 60% en comparación a L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

11. El conjugado de la reivindicación 10, en donde dicho conjugado tiene una actividad *in vitro* de al menos 70% en comparación a L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

12. El conjugado de la reivindicación 11, en donde dicho conjugado tiene una actividad *in vitro* de al menos 78% en comparación a L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

13. El conjugado de la reivindicación 10, en donde dicho conjugado tiene una actividad *in vitro* de al menos 80% en comparación a L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

14. El conjugado de la reivindicación 10, en donde dicho conjugado tiene una actividad *in vitro* de al menos 87% en comparación a L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

15. El conjugado de la reivindicación 10, en donde dicho conjugado tiene una actividad *in vitro* de al menos 90% en comparación a L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

16. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde dicho conjugado tiene una actividad de agotamiento de L-asparagina al menos aproximadamente 50 veces más potente que la L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

17. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde dicho conjugado agota los niveles plasmáticos de L-asparagina a un nivel indetectable durante al menos 48 horas.

18. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde dicho conjugado agota los niveles plasmáticos de L-asparagina a un nivel indetectable durante al menos 96 horas.

19. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde dicho conjugado tiene una vida media de circulación más larga en comparación a la L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

20. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ más largo que pegaspargasa en una dosis de proteína equivalente.

21. El conjugado de la reivindicación 20, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 58 horas en una dosis de aproximadamente 50 μg de proteína/kg.

22. El conjugado de la reivindicación 20, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 60 horas a una dosis de aproximadamente 50 μg de proteína/kg.

23. El conjugado de la reivindicación 20, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 63 horas a una dosis de aproximadamente 50 μg de proteína/kg.

24. El conjugado de la reivindicación 20, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 65 horas a una dosis de aproximadamente 50 μg de proteína/kg.

25. El conjugado de la reivindicación 20, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 34 horas a una dosis de aproximadamente 10 μg de proteína/kg.

26. El conjugado de la reivindicación 20, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 36 horas a una dosis de aproximadamente 10 μg de proteína/kg.

27. El conjugado de la reivindicación 20, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 38 horas a una dosis de aproximadamente 10 μg de proteína/kg.

28. El conjugado de la reivindicación 20, en donde dicho conjugado tiene un $t_{1/2}$ de al menos aproximadamente 40 horas a una dosis de aproximadamente 10 μg de proteína/kg.

29. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en donde dicho conjugado tiene un AUC mayor en comparación con la L-asparaginasa cuando no está conjugada a PEG.

30. El conjugado de la reivindicación 29, en donde dicho conjugado tiene un AUC media que es al menos aproximadamente 3 veces mayor que pegaspargasa a una dosis de proteína equivalente.

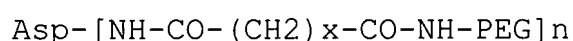
31. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30 en donde el PEG está unido covalentemente a uno o más aminos de dicha L-asparaginasa.

32. El conjugado de la reivindicación 31, en donde el PEG está unido covalentemente a dicho uno o más grupos amino por un enlace amida.

33. El conjugado de la reivindicación 31 ó 32, en donde el PEG está unido covalentemente a al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles.

34. El conjugado de la reivindicación 31, en donde el PEG está unido covalentemente a al menos entre aproximadamente 40% y aproximadamente 90% de los grupos amino totales.

35. El conjugado de una de las reivindicaciones 1 a 34 que tiene la fórmula:



en donde Asp es la L-asparaginasa, NH es uno o más de los grupos NH de los residuos de lisina y/o el N-terminal en la Asp, PEG es un grupo polietilenglicol, n es un número que representa al menos entre 40% y aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles

(por ejemplo, residuos de lisina y/o el N-terminal) en la Asp, y x es un entero que varía en un rango entre 1 y 8.

36. El conjugado de la reivindicación 35, en donde x es un entero que varía en un rango entre 2 y 5.

37. El conjugado de la reivindicación 35, en donde n es un número que representa al menos aproximadamente 40% de los grupos amino accesibles en la Asp.

38. El conjugado de la reivindicación 37, en donde n es un número que representa aproximadamente 100% de los grupos amino accesibles en la Asp.

39. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-38, en donde dicho PEG es monometoxi-polietilenglicol.

40. Un método para hacer el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-39, en donde dicho método comprende combinar una cantidad de dicho PEG con una cantidad de dicha L-asparaginasa en una solución amortiguada durante un período de tiempo suficiente para unir covalentemente dicho PEG a dicha L-asparaginasa

41. El método de la reivindicación 40, en donde dicha solución amortiguada tiene un valor de pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0

42. El método de la reivindicación 41, en donde dicha solución amortiguadora tiene un valor de pH de entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5.

43. El método de la reivindicación 40, en donde la cantidad de dicha L-asparaginasa es una concentración de proteína de entre aproximadamente 0,5 mg/mL y aproximadamente 25 mg/mL.

44. El método de la reivindicación 43, en donde la cantidad de dicha L-asparaginasa es una concentración de proteína de entre aproximadamente 2 mg/mL y aproximadamente 20 mg/mL.

45. El método de la reivindicación 43, en donde la cantidad de dicha L-asparaginasa es una concentración de proteína de entre aproximadamente 3 mg/mL y aproximadamente 15 mg/mL.

46. El método de la reivindicación 40, en donde la cantidad de dicho PEG es un exceso molar de polímero respecto a los grupos amino en dicha L-asparaginasa de menos de aproximadamente 20:1.

47. El método de la reivindicación 46, en donde la cantidad de dicho PEG es un exceso molar de polímero respecto a los grupos amino en dicha L-asparaginasa de menos de aproximadamente 10:1.

48. El método de la reivindicación 46, en donde la cantidad de dicho PEG es un exceso molar de polímero respecto a los grupos amino en dicha L-asparaginasa de menos de aproximadamente 8:1.

49. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 40-48, en donde dicho PEG es monometoxi-polietilenglicol.

50. Un método para tratar una enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina en un paciente, dicho método comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz del conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-39.

51. El método de la reivindicación 50, en donde dicha enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina es un cáncer.

52. El método de la reivindicación 51, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma de no Hodgkin, linfoma de NK, y cáncer pancreático.

53. El método de la reivindicación 52, en donde dicho cáncer es ALL.

54. El método de la reivindicación 53, en donde dicho conjugado se administra en una cantidad de entre aproximadamente 5 U/kg y aproximadamente 25 U/kg.

55. El método de la reivindicación 54, en donde dicho conjugado se administra en una cantidad de aproximadamente 25U/kg.

56. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53-55, en donde dicho conjugado se administra en una dosis que agota la L-asparagina a niveles indetectables durante un período de entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 10 días.

57. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53-56, en donde dicho conjugado genera una respuesta inmunogénica menor en dicho paciente en comparación con la L-asparaginasa no conjugada.

58. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53-57, en donde dicho conjugado tiene una vida media de circulación más larga luego de una dosis única en comparación con la L-asparaginasa no conjugada.

59. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53-58, en donde dicho conjugado tiene un valor de AUC mayor luego de una dosis única en comparación con la L-asparaginasa no conjugada.

60. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50-59, en donde dicho conjugado se administra intravenosamente.

61. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50-59, en donde dicho conjugado se administra intramuscularmente.

62. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50-61, en donde dicho conjugado se administra una vez por semana.

63. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50-61, en donde dicho conjugado se administra dos veces por semana.

64. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50-61, en donde dicho conjugado se administra menos de una vez por semana.

65. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50-64, en donde dicho conjugado se administra como monoterapia.

66. El método de la reivindicación 65, en donde dicho conjugado no se administra con un inhibidor de asparagina sintetasa.

67. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 66, en donde dicho paciente ha tenido una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa de *E. coli* o forma tratada con PEG de la misma.

68. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 66, en donde dicho paciente ha tenido una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa de L-asparaginasa de *Erwinia*.

69. El método de la reivindicación 67 ó 68, en donde dicha hipersensibilidad se selecciona del grupo que consiste en reacción alérgica, shock anafiláctico, e hipersensibilidad silente.

70. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 69, en donde dicho paciente ha tenido una recaída de una enfermedad.

71. El método de la reivindicación 70, en donde dicha recaída de la enfermedad ocurre luego del tratamiento con una L-asparaginasa de *E. coli* o forma tratada con PEG de la misma.

72. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-39.

73. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-39 para usar en terapia.

74. El conjugado de la reivindicación 73 para su uso en el tratamiento de una enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina.

75. El conjugado de la reivindicación 74, en donde dicha enfermedad es cáncer.

76. El conjugado de la reivindicación 75, en donde dicho cáncer es ALL.

77. El conjugado de la reivindicación 76, en donde dicho conjugado genera una respuesta inmunogénica menor en un paciente en comparación con la L-asparaginasa no conjugada.

78. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 73-77, en donde dicho medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un paciente el cual ha tenido una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa de *E. coli* o forma tratada con PEG de la misma.

79. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 73-77, en donde dicho medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un paciente el cual ha tenido una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa de *Erwinia*.

80. El conjugado de la reivindicación 78 ó 79, en donde dicha hipersensibilidad se selecciona del grupo que consiste en reacción alérgica, shock anafiláctico, e hipersensibilidad silente.

81. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 73 a 80, en donde dicho medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un paciente el cual ha tenido una recaída de una enfermedad.

82. El conjugado de la reivindicación 81, en donde dicha recaída de una enfermedad ocurre luego del tratamiento con una L-asparaginasa de *E. coli* o forma tratada con PEG de la misma.

83. Un método para el tratamiento de una enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina en un paciente, en donde dicho método comprende seleccionar un paciente con necesidad de un tratamiento, en donde dicho paciente ha tenido una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa de *E. coli* o forma tratada con PEG de la misma, y/o en donde dicho paciente ha tenido una hipersensibilidad previa a una L-asparaginasa de *Erwinia*, y/o dicho paciente ha tenido una recaída de una enfermedad, y administrar a dicho paciente una cantidad eficaz del conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-39.

84. El método de la reivindicación 83, en donde dicha hipersensibilidad se selecciona del grupo que consiste en reacción alérgica, shock anafiláctico, e hipersensibilidad silente.

85. El método de la reivindicación 83, en donde dicha recaída de una enfermedad ocurre luego del tratamiento con una L-asparaginasa de *E. coli* o forma tratada con PEG de la misma.

86. El método de una de las reivindicaciones 83 a 85, en donde dicha enfermedad tratable por agotamiento de L-asparagina es un cáncer, particularmente seleccionado del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma de no Hodgkin, Lde NK, y cáncer pancreático.

87. El método de una de las reivindicaciones 83 a 86, en donde dicho conjugado se administra en una cantidad de entre aproximadamente 5 U/kg y aproximadamente 25 U/kg, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 25U/kg.

88. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 83 a 87, en donde dicho conjugado se administra en una dosis que agota la L-asparagina a niveles indetectables durante un período de entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 10 días.

89. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 83 a 88, en donde dicho conjugado se administra intravenosa o intramuscularmente.

90. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 83 a 89, en donde dicho conjugado se administra una vez por semana.

91. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 83 a 89, en donde dicho conjugado se administra dos veces por semana.

92. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 83 a 89, en donde dicho conjugado se administra menos de una vez por semana.

93. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 83 a 92, en donde dicho conjugado se administra como monoterapia.

94. El método de la reivindicación 93, en donde dicho conjugado no se administra con un inhibidor de asparagina sintetasa.

Resumen

Se describe un conjugado de una proteína que tiene actividad sustancial de aminohidrolasa de L-asparagina y polietilenglicol. En particular, El polietilenglicol tiene un peso molecular menor de o igual a aproximadamente 5000 Da y la proteína es una L-asparaginasa de *Erwinia*. El conjugado de la invención ha mostrado propiedades superiores tal como mantenimiento de un nivel alto de actividad *in vitro* y un aumento inesperado de la vida media *in vivo*. También se describen métodos para producir el conjugado y uso del conjugado en terapia. En particular, se describe un método para usar el conjugado en el tratamiento de cáncer, particularmente leucemia linfoblástica aguda (ALL). Más específicamente, se describe un método para usar el conjugado como una segunda línea de terapia para pacientes que han desarrollado hipersensibilidad o han tenido una recaída de una enfermedad luego del tratamiento con otras preparaciones de L-asparaginasa.

as-95980 trad del listado de secuencias
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALIZE PHARMA II
ABRIBAT, THIERRY

<120> L-ASPARAGINASA TRATADA CON PEG

<130> 356729D28474

<150> US 61/223,320

<151> 06-07-2009

<150> PCT/EP2010/054156

<151> 30-03-2010

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 327

<212> PRT

<213> Erwinia chrysanthemi

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

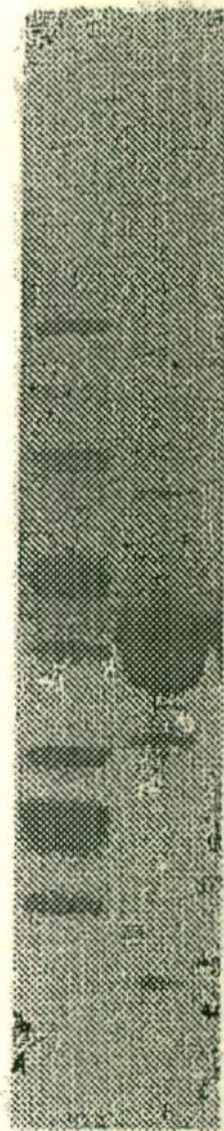
Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
180 185 190

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

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

77

Gly 225	Tyr	Gln	Asp	Asp	Pro 230	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Asp 235	Ala	Ala	Ile	Gln	His 240
Gly	Val	Lys	Gly	Ile 245	Val	Tyr	Ala	Gly	Met 250	Gly	Ala	Gly	Ser	Val 255	Ser
Val	Arg	Gly	Ile 260	Ala	Gly	Met	Arg	Lys 265	Ala	Met	Glu	Lys	Gly 270	Val	Val
Val	Ile	Arg 275	Ser	Thr	Arg	Thr	Gly 280	Asn	Gly	Ile	Val	Pro 285	Pro	Asp	Glu
Glu	Leu 290	Pro	Gly	Leu	Val	Ser 295	Asp	Ser	Leu	Asn	Pro 300	Ala	His	Ala	Arg
Ile 305	Leu	Leu	Met	Leu	Ala 310	Leu	Thr	Arg	Thr	Ser 315	Asp	Pro	Lys	Val	Ile 320
Gln	Glu	Tyr	Phe	His 325	Thr	Tyr									



1 2

FIGURA 1

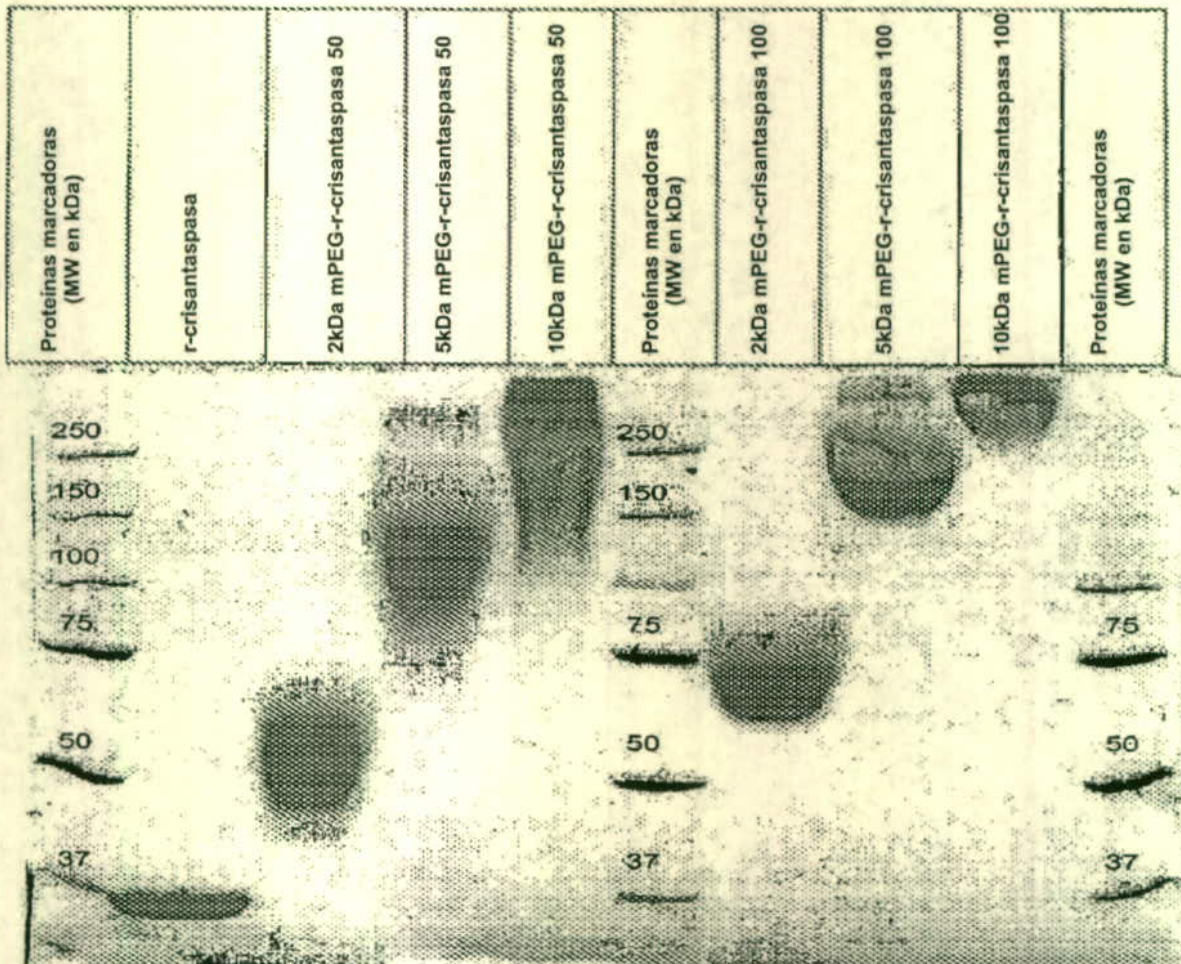


FIGURA 2

28

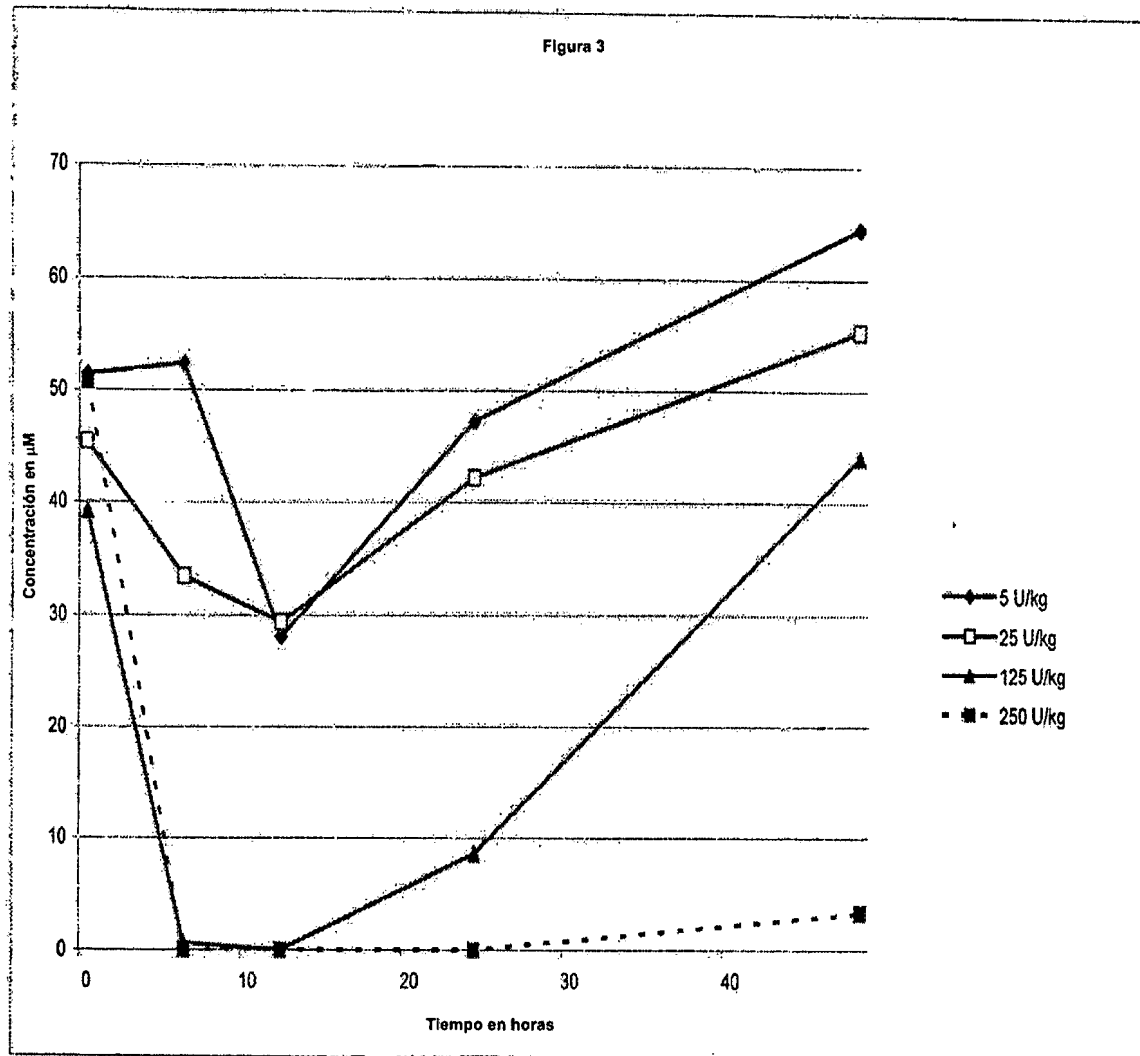
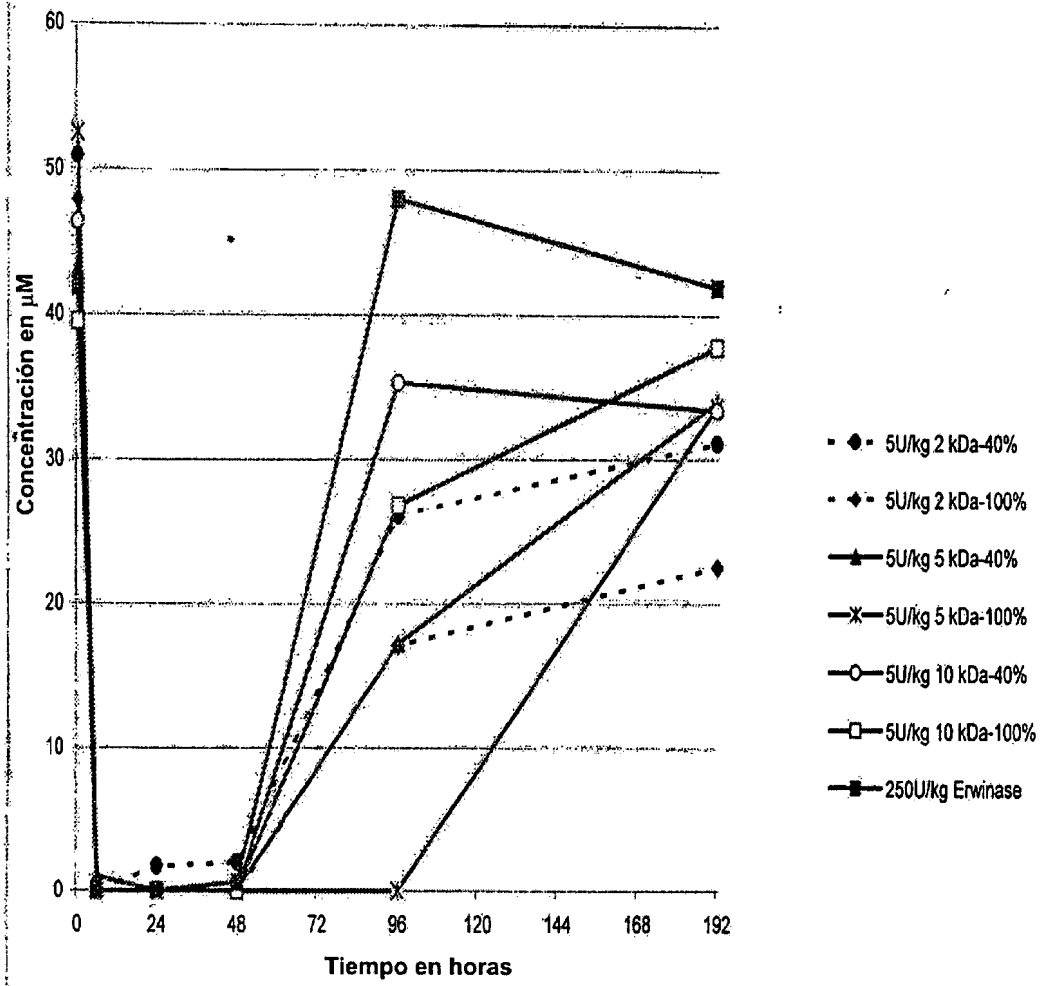
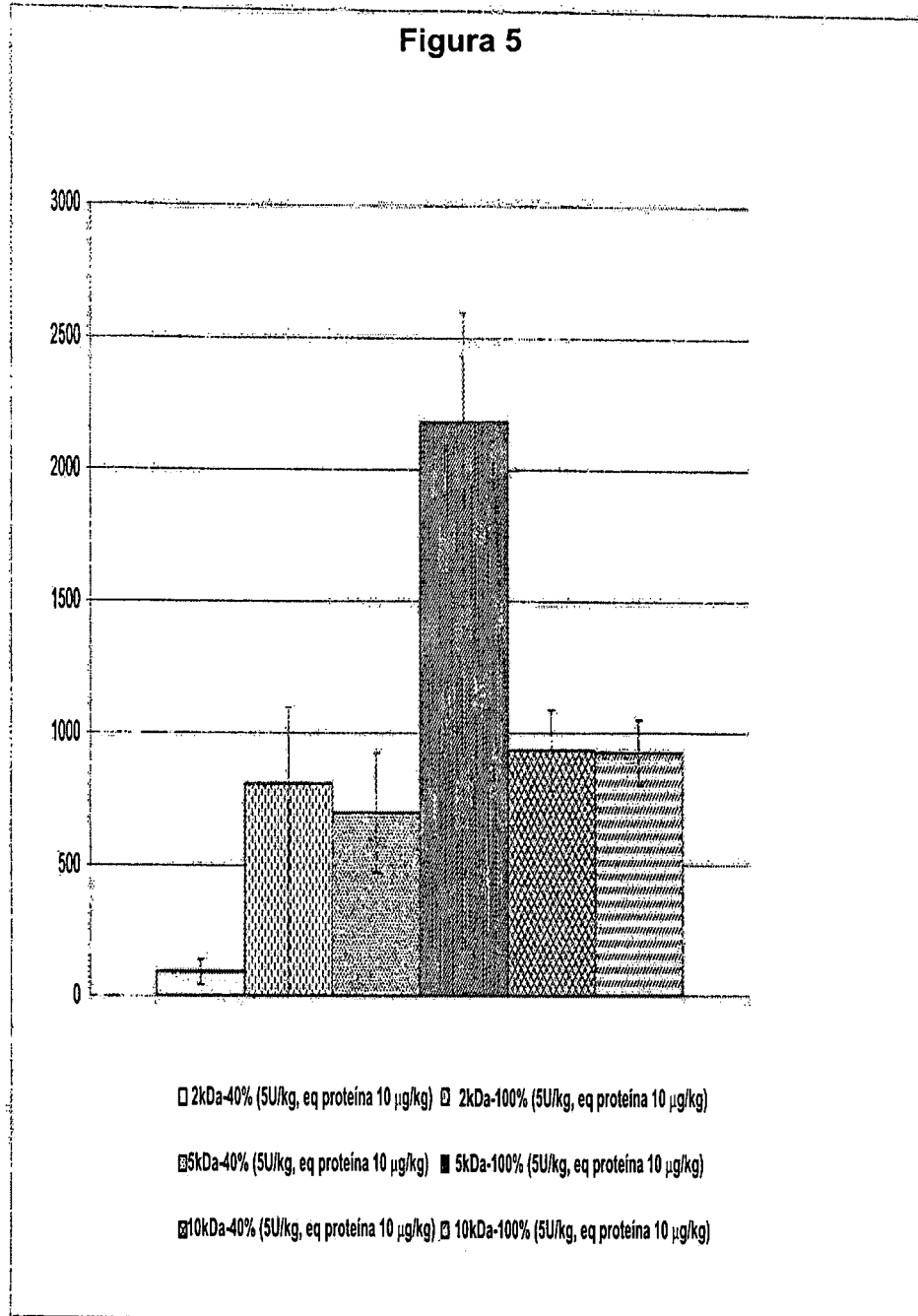


Figura 4



81

Figura 5



82

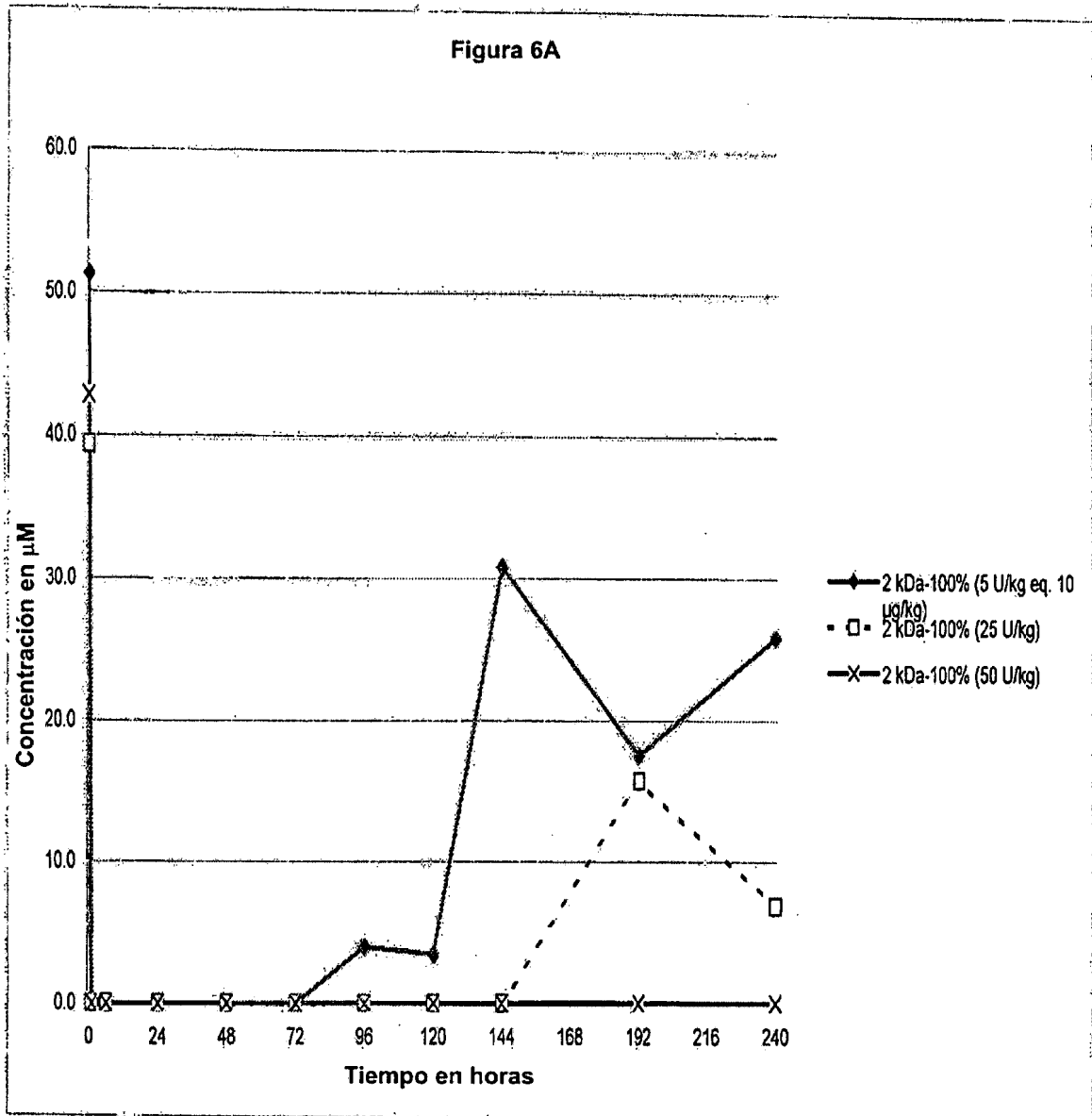
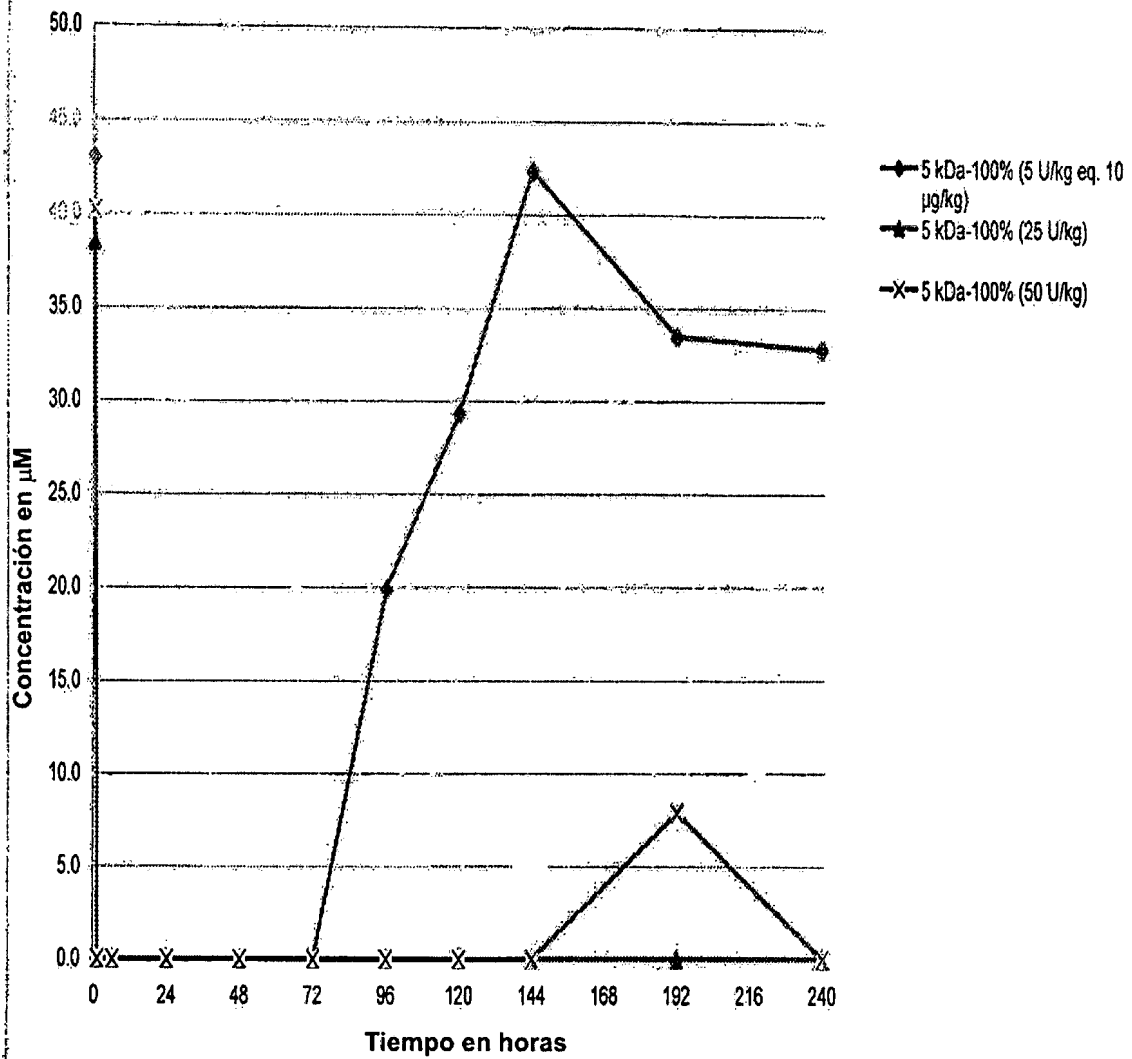
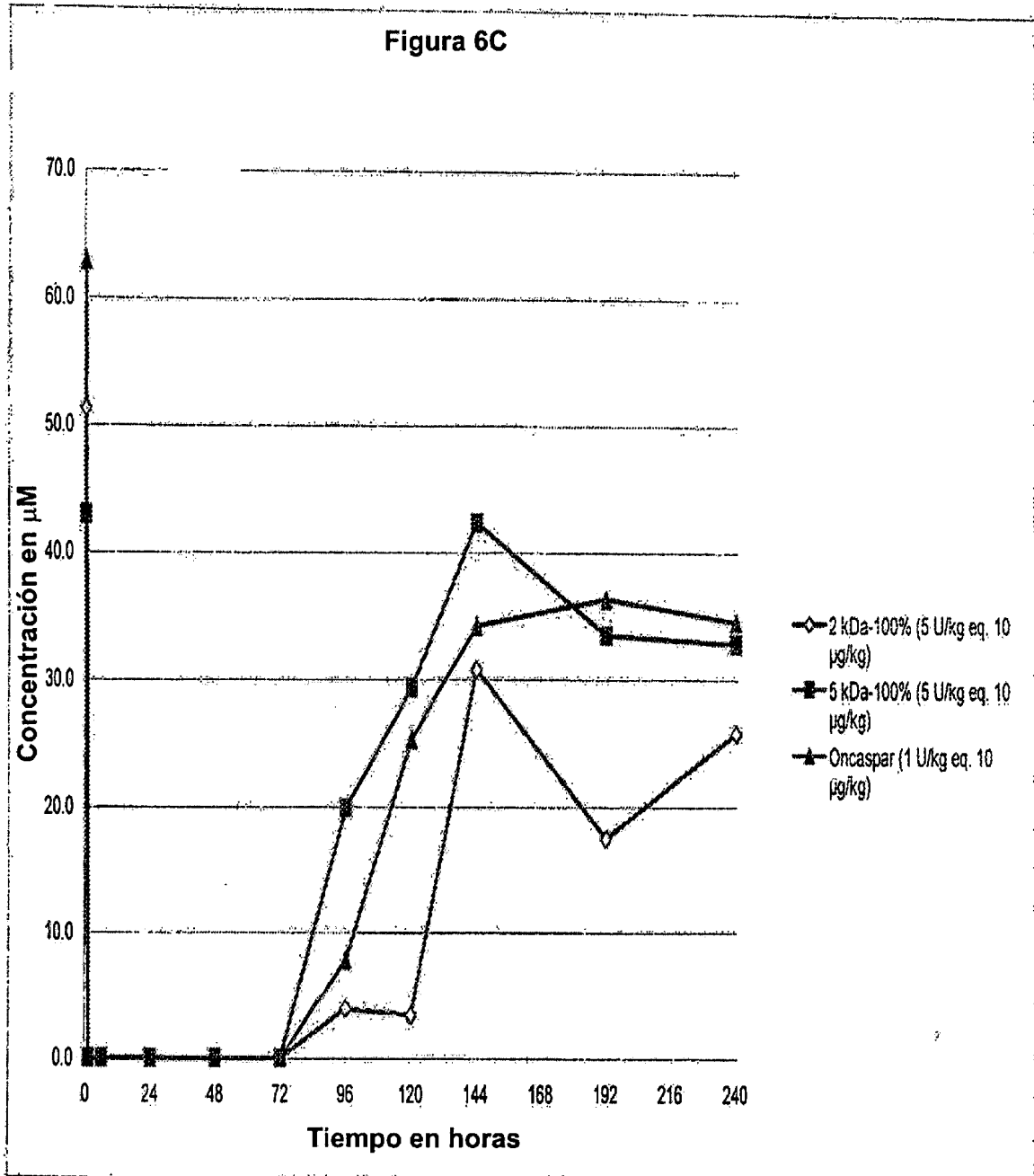


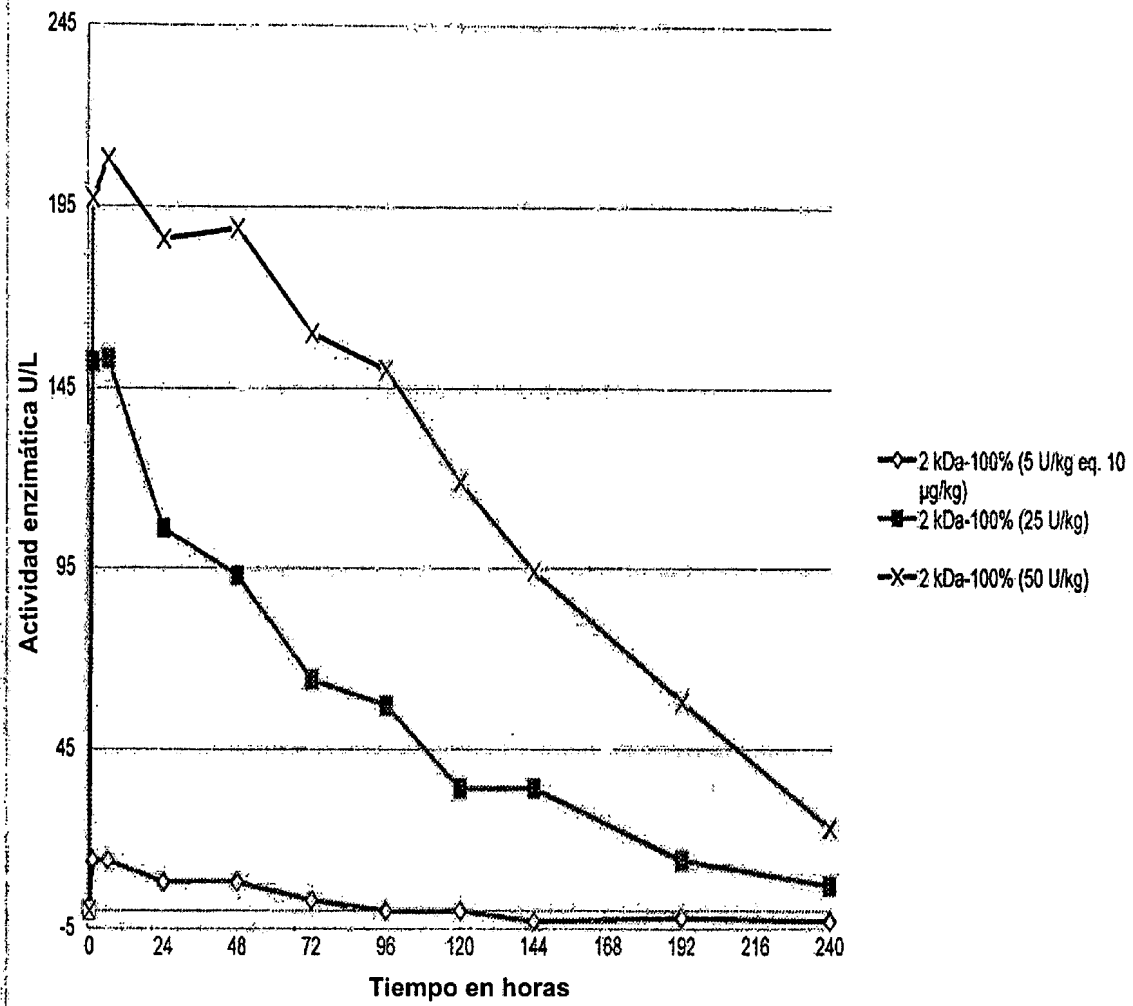
Figura 6B



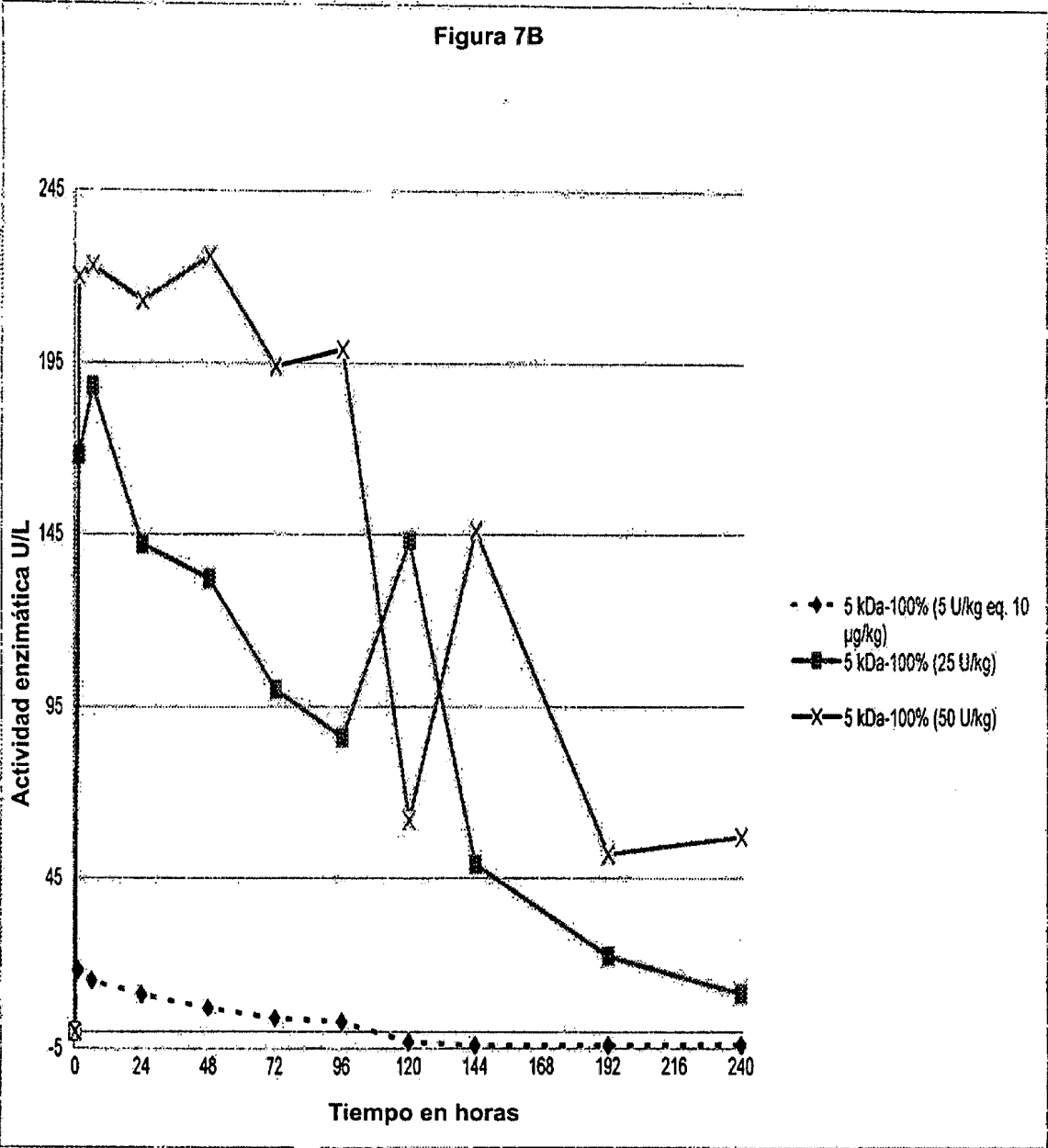


85

Figura 7A

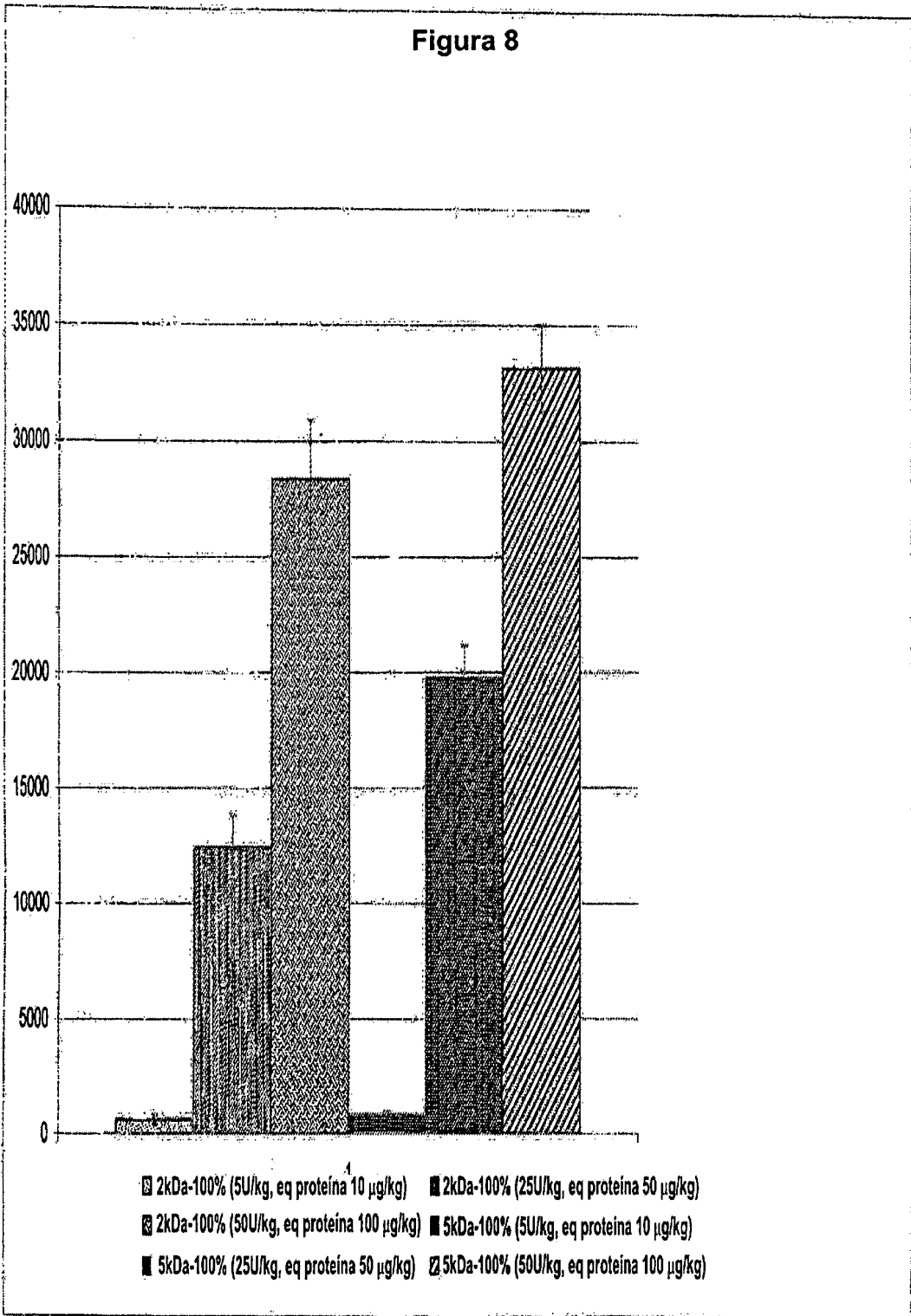


46

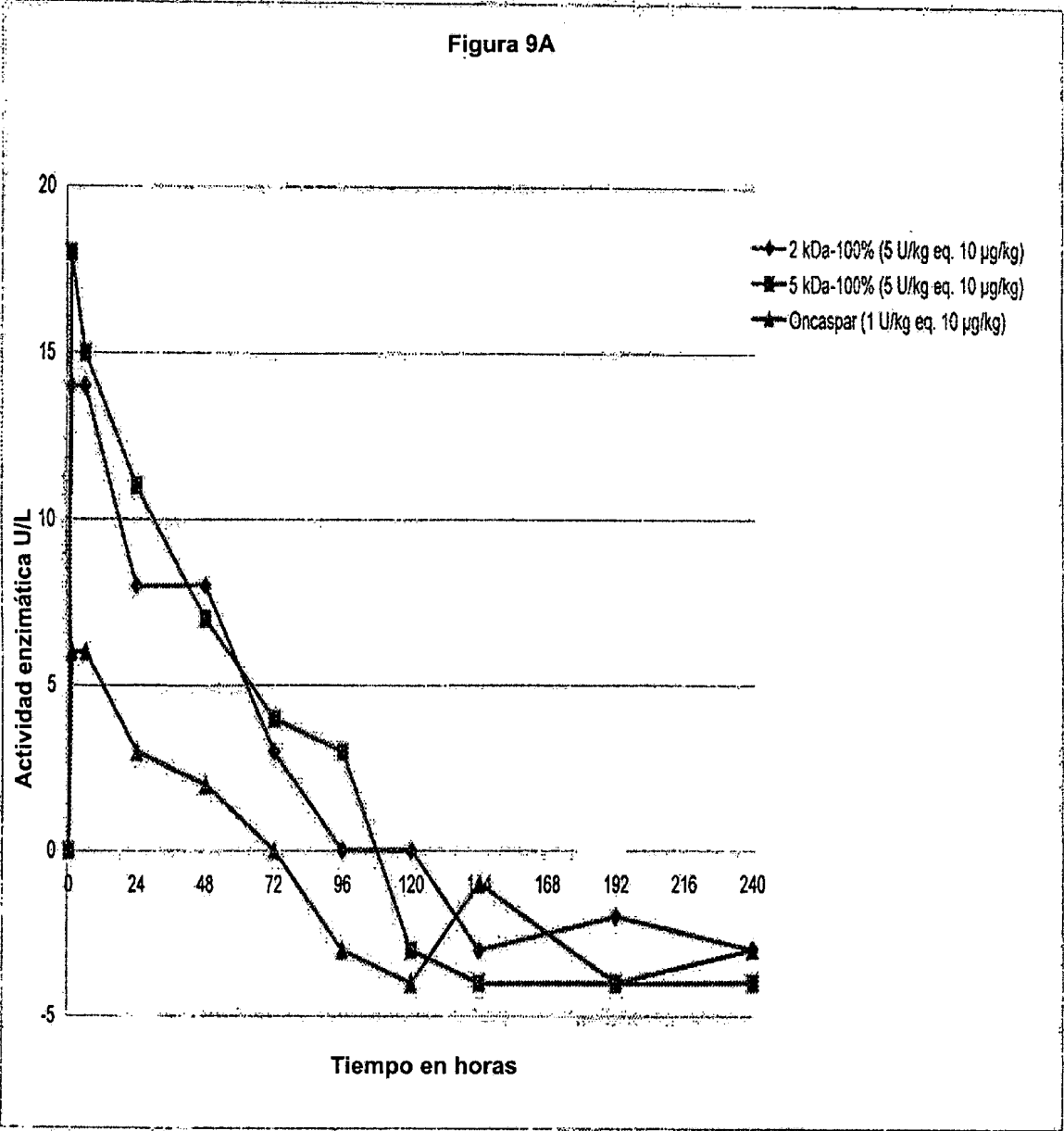


87

Figura 8

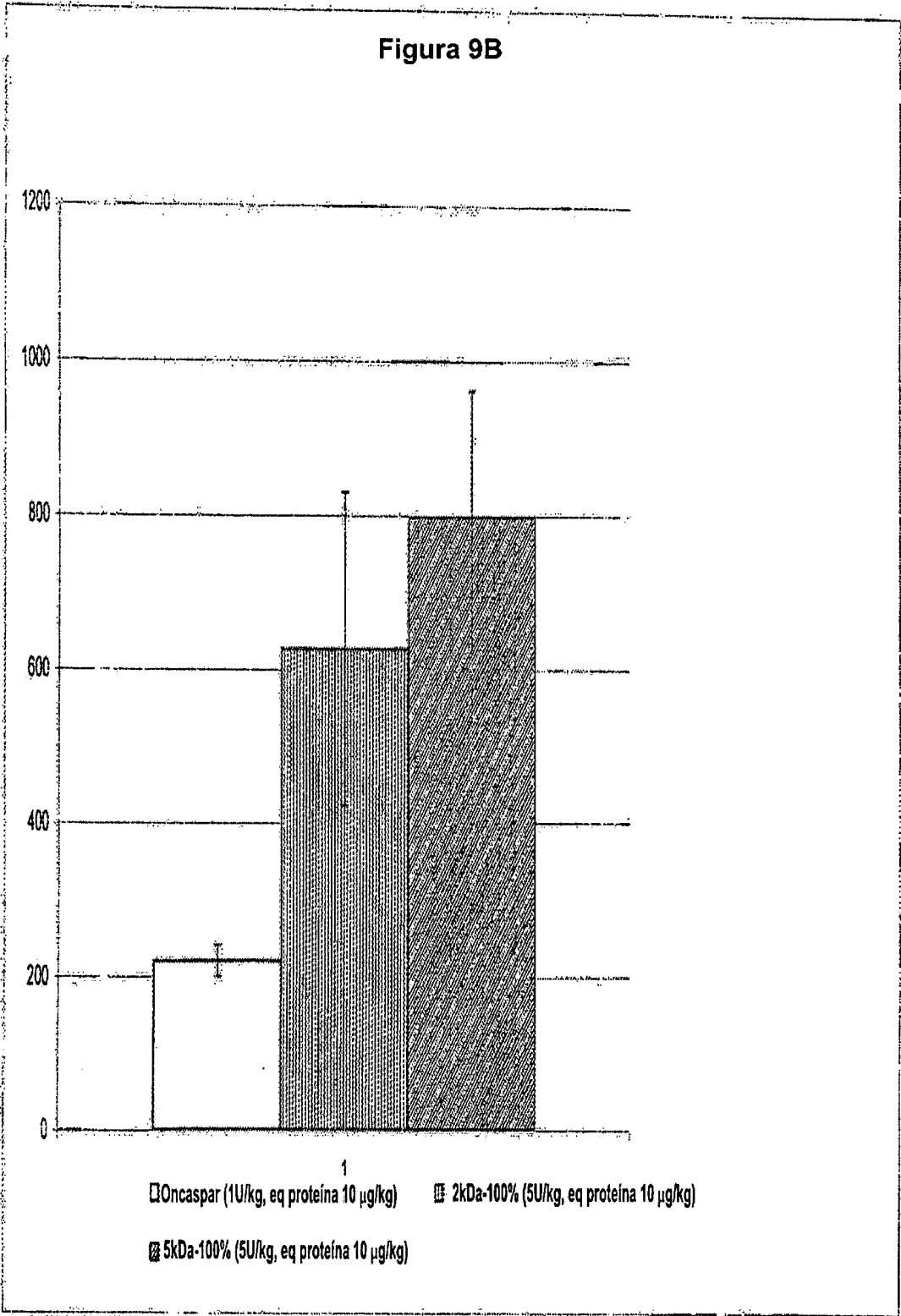


87

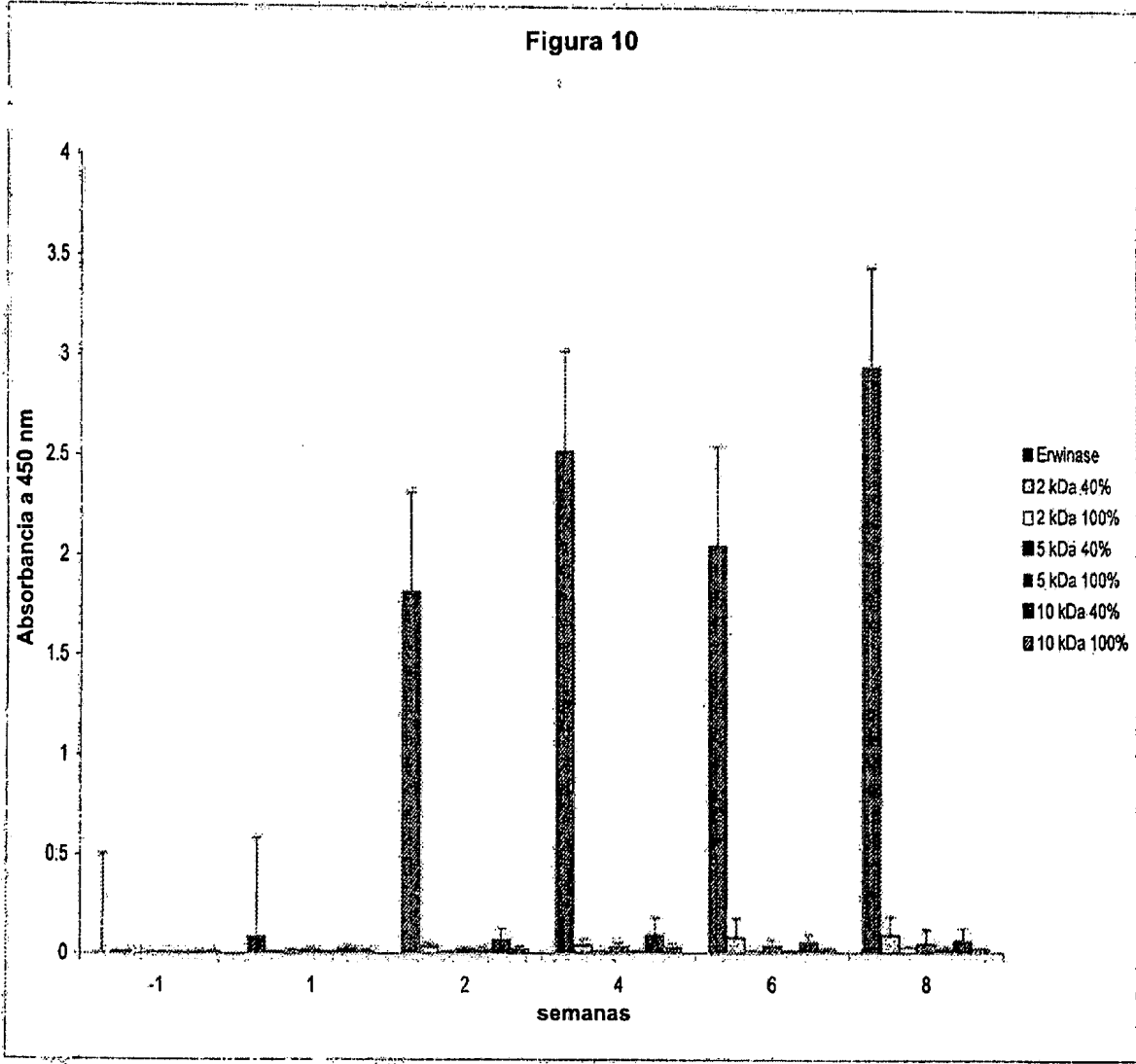


89

Figura 9B

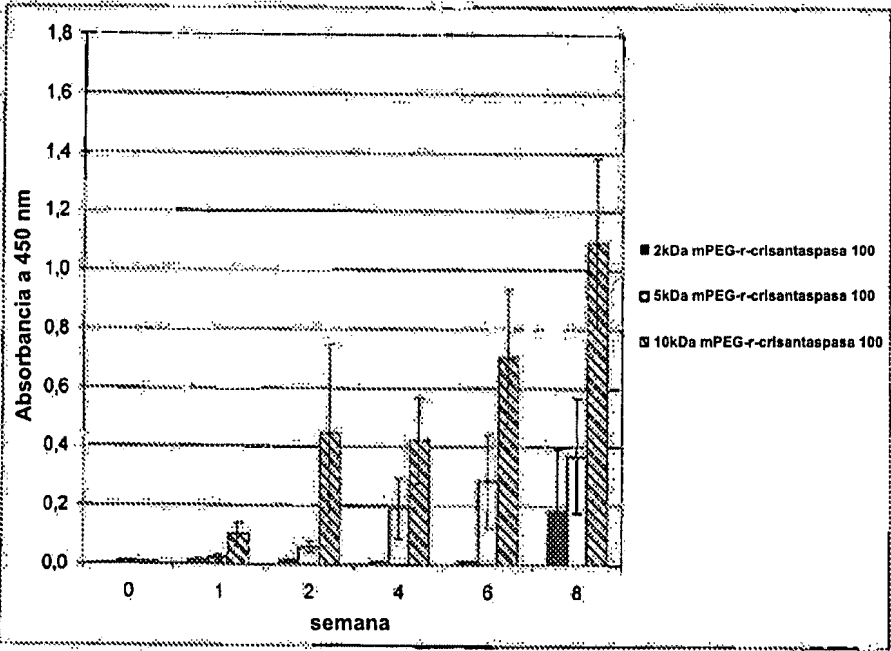


90

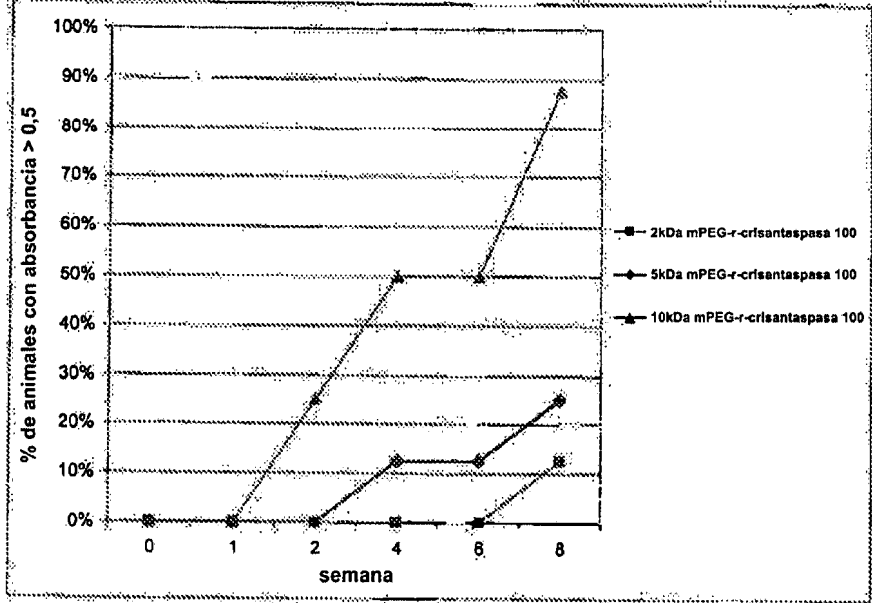


AK

11A



11B



ar

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES
PCT

Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente 356729D28474	PROCEDER Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo	
Referencia Internacional PCT/EP 2010/059599	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 06/07/2010	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 06/07/2009
Solicitante ALIZE PHARMA II		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 6 hojas.

☒ Además se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica mencionados en este informe

1. Fundamentos del Informe

- a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre la base de:
- ☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada
 - ☐ una traducción de la solicitud internacional al , que es el idioma de una traducción suministrada a los fines de la búsqueda internacional (reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).
- b. ☐ Este informe de búsqueda internacional ha sido confeccionado teniendo en consideración la rectificación de un error obvio, autorizada por o notificada a este organismo según la regla 91 (regla 43.6bis(b))
- c. ☒ Con respecto a los nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional, ver campo N° 1

2. ☐ Determinadas reivindicaciones no eran investigables (ver campo II).

3. ☐ La invención carece de unidad (ver campo III).

4. Con respecto al título,
- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
 - ☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al resumen,
- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
 - ☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo durante el transcurso de un mes a partir de la fecha de envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las ilustraciones

- a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las ilustraciones: figura N° .
- ☐ sugerida por el solicitante.
 - ☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.
 - ☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.
- b. ☒ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

23

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2010/059599

Campo I: secuencias de nucleótidos o aminoácidos (continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional ha sido llevada a cabo basada sobre:
- b. Medios
- ☐ en papel
- ☒ en forma electrónica
- c. Momento de la presentación/suministro
- ☒ comprendida en la solicitud internacional tal como fue presentada
- ☐ presentada junto con la solicitud internacional en forma electrónica
- ☐ suministrada subsiguientemente a este Organismo a los fines de la búsqueda
2. ☐ Adicionalmente, en el caso de haberse presentado o suministrado más de una versión o copia del listado de secuencias y/o tabla(s) relacionada(s) con el mismo, se suministra(n), apropiadamente, la(s) declaración(iones) requerida(s) de que la información exhibida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica o no supera a la de la solicitud tal como fue presentada.
3. Comentarios adicionales

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Referencia Internacional PCT/EP 2010/059599
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD INV. A61K47/48 C12N9/82 A61P35/02 ADD.		
Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o las clasificaciones nacional e IPC		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS Documentación mínima investigada (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación) A61K C12N		
Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado		
Banco electrónico de datos consultado durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación N°
X	A. V. KUCHUMOVA, Y.V. KRASOTKINA, P.Z. KHASIGOV, N. N. SOKOLOV: "Modification of recombinant asparaginase from Erwinia carotovora with polyethyleneglycol 5000" BIOCHEMISTRY (MOSCOW) SUPPLEMENTAL SERIES B: BIOMEDICAL CHEMISTRY, vol. 1, N° 3 4 de septiembre de 2007 (04.09.2007), pp. 230-232, XP002587203 DOI: 10.1134/S1990750807030092 todo el documento, en particular, PEG-asparaginasa conjugada ----- -----//----	1-94
☒ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C		☒ Ver familia de patentes en el anexo
Categorías particulares indicadas en publicaciones "A" publicación que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante "B" documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional "L" publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada) "O" publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones "P" publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada		"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa "X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva "Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista "&" publicación que es miembro de la misma familia
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 13 de septiembre de 2010		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 20/09/2010
Nombre y Dirección Postal del ISA/ Oficina de Patentes Europea NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040. Fax N° (+31-70) 340-3016		Funcionario Apoderado Schleifenbaum, A

98

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Referencia Internacional
		PCT/EP 2010/059599
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación N°
T	SOKOLOV N. N. ET AL: "Design of recombinant L-asparaginase erwinia carotovora drug with an antitumor action" MOLEKULYARNAYA MEDITSINA, IZDATEL'STVO MEDITSINA, RU vol. 1, 1 de enero de 2005 (2005-01-01), pp. 45-53, XP008123303 ISSN: 1728-2918 figura 2	
T	WO 03/028742 A2 (G UCHREZH DENIE NII BIOMEDITSIN [RU]; G UCHREZH DENIE BIOINZHENERI TS [R]) 6 de marzo de 2003 (2003-03-06)	
Y	AVRAMIS VASSILIOS I ET AL: "Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the present recommendations for the future" CLINICAL PHARMACOKINETICS, ADIS INTERNATIONAL LTD., AUKLAND, NZ LNKD- DOI: 102165/00003088-200544040-00003, [online] vol 44, N° 4, 1 de abril de 2005 (2005-04-01), pp. 367-393, XP008105154 ISSN: 0312-5963 recuperado de Internet: URL: http://pharmacokinetics.adisonline.com/pt/re/cpk/abstract.00003088-200544040-00003.htm > capítulo 5.3	1-94
Y	ROBERTS M J ET AL: "Chemistry for peptide and protein PEGylation" ADVANCED DRUG DELIVERY REWIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI: 10.1016/S0169-409X(02)000022-4, vol. 54, N° 4, 17 de junio de 2002 (2002-06-17) pp. 459-476, XP002293146 ISSN: 0169-409X todo el documento, en particular, resumen	1-94
Y	GRAHAM MICHAEL L; "Pegaspargase: a review of clinical studies." ADVANCED DRUG DELIVERY REWIEWS 26 SEP 2003 LNKD- PUBMED: 14499708, vol. 55, N° 10, 26 de septiembre de 2003 (2003-09-26), pp. 1293-1302, XP002587206 ISSN: 0169-409X pegaspargase	1-94
	----- -----//-----	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/EP 2010/059599

Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación Nº
Y	<i>BILLET A L ET AL "Allergic reactions to erwinia asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to Escherichia coli asparaginase"</i> CANCER 1 JUL 1992 LNKD- PUBMED: 1606543, vol. 70, Nº 1, 1 de julio de 1992 (1992-07-01) pp. 201-206, XP002587207 ISSN: 0008-543X "Discussion" -----	1-94
Y	<i>DUVAL MICHEL ET AL: "Comparison of Escherichia coli-aparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignandies: results of a randomized European Organisation for Researvh and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial"</i> BLOOD 15 APR 2002 LNKD- PUBMED: 11929760, vol. 99, Nº 8, 15 de abril de 2002 (2002-04-15) pp. 2734-2739, XP002587208 ISSN: 0006-4971 "Discussion" -----	1-94
Y	<i>KLUG ALBERTSEN B ET AL: "Comparison of intramuscular therapy with erwinia asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system"</i> BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY 2001 GB LNKD- DOI: 10.1046/J.1365-2141.2001.03148.X, vol. 115, Nº 4, 2001, pp. 983-990, XP002587209 ISSN: 0007-1048 "Discussion" -----	1-94

91

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Detalle de publicaciones que pertenecen a la misma familia de patentes		Referencia Internacional <i>PCT/EP 2010/059599</i>	
Documentos de Patente citados en el Informe de Búsqueda	Fecha de la publicación	Miembros de la familia de patentes	Fecha de la publicación
WO 03018742 A2	06-03-2003	AU 2002332371 A1	10.03.2003

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 356729D28474	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2010/059599	International filing date (day/month/year) 06/07/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 06/07/2009
Applicant ALIZE PHARMA II		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2010/059599

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)
☐ on paper
☒ in electronic form
 - b. (time)
☒ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C12N9/82 A61P35/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. V. KUCHUMOVA, Y. V. KRASOTKINA, P. Z. KHASIGOV, N. N. SOKOLOV: "Modification of recombinant asparaginase from Erwinia carotovora with polyethylene glycol 5000" BIOCHEMISTRY (MOSCOW) SUPPLEMENTAL SERIES B: BIOMEDICAL CHEMISTRY, vol. 1, no. 3, 4 September 2007 (2007-09-04), pages 230-232, XP002587203 DOI: 10.1134/S1990750807030092 whole document, in particular conjugate PEG-asparaginase. ----- -/--	1-94

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2010

Date of mailing of the international search report

20/09/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schleifenbaum, A

CPX

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059599

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	SOKOLOV N N ET AL: "Design of recombinant L-Asparaginase erwinia carotovora drug with an antitumor action" MOLEKULYARNAYA MEDITSINA, IZDATEL'STVO MEDITSINA, RU, vol. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 45-53, XP008123303 ISSN: 1728-2918 figure 2	
T	WO 03/018742 A2 (G UCHREZH DENIE NII BIOMEDITSIN [RU]; G UCHREZH DENIE TS BIOINZHENERI [R] 6 March 2003 (2003-03-06)	
Y	AVRAMIS VASSILIOS I ET AL: "Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future" CLINICAL PHARMACOKINETICS, ADIS INTERNATIONAL LTD., AUCKLAND, NZ LNKD-DOI:10.2165/00003088-200544040-00003, [Online] vol. 44, no. 4, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 367-393, XP008105154 ISSN: 0312-5963 Retrieved from the Internet: URL: http://pharmacokinetics.adisonline.com/pt/re/cpk/abstract.00003088-200544040-00003.htm Chapter 5.3	1-94
Y	ROBERTS M J ET AL: "Chemistry for peptide and protein PEGylation" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL LNKD-DOI:10.1016/S0169-409X(02)00022-4, vol. 54, no. 4, 17 June 2002 (2002-06-17), pages 459-476, XP002293146 ISSN: 0169-409X Whole document, in particular abstract.	1-94
Y	GRAHAM MICHAEL L: "Pegaspargase: a review of clinical studies." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 26 SEP 2003 LNKD- PUBMED:14499708, vol. 55, no. 10, 26 September 2003 (2003-09-26), pages 1293-1302, XP002587206 ISSN: 0169-409X pegaspargase	1-94
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059599

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BILLET A L ET AL: "Allergic reactions to Erwinia asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to Escherichia coli asparaginase." CANCER 1 JUL 1992 LNKD- PUBMED:1606543, vol. 70, no. 1, 1 July 1992 (1992-07-01), pages 201-206, XP002587207 ISSN: 0008-543X "Discussion"	1-94
Y	DUVAL MICHEL ET AL: "Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial." BLOOD 15 APR 2002 LNKD- PUBMED:11929760, vol. 99, no. 8, 15 April 2002 (2002-04-15), pages 2734-2739, XP002587208 ISSN: 0006-4971 "Discussion"	1-94
Y	KLUG ALBERTSEN B ET AL: "Comparison of intramuscular therapy with Erwinia asparaginase and asparaginase Medac: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system" BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY 2001 GB LNKD- DOI:10.1046/J.1365-2141.2001.03148.X, vol. 115, no. 4, 2001, pages 983-990, XP002587209 ISSN: 0007-1048 "Discussion"	1-94

98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/059599

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 03018742	A2	06-03-2003	AU	2002332371 A1		10-03-2003



No. 12-020409- -00000-0000

Fecha: 2012-02-06 16:36:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 98

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

Art 33 Decisión 486/00

☒	Indicación que se solicita una patente.
☒	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☒	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa	☐
Incompleta	☐

PATENTE DE INVENCION PCT

☐

MODELO DE UTILIDAD PCT

☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa	☐
Incompleta	☐

DISEÑO INDUSTRIAL

☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa	☐
Incompleta	☐

ESQUEMA DE TRAZADO

☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa	☐
Incompleta	☐