



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 104634

(13) C2

(51) МПК

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 9/82 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2012 01135**
- (22) Дата подання заявки: **06.07.2010**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.02.2014**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/223,320, PCT/EP2010/054156**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **06.07.2009, 30.03.2010**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, EP**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.05.2012, Бюл.№ 9**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.02.2014, Бюл.№ 4**
- (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2010/059599, 06.07.2010**
- (72) Винахідник(и): **Абріба Тьєррі (FR)**
- (73) Власник(и): **АЛІЗЕ ФАРМА II, 15 Chemin Du Saquin Espace Europeen, F-69130 Ecully, France (FR)**
- (74) Представник: **Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
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.  
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.  
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>  
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.  
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.  
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.  
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  
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.  
WO03018742 A2, 06.03.2003.

UA 104634 C2

## (54) ПЕГИЛЬОВАНА L-АСПАРАГІНАЗА

## (57) Реферат:

Винахід належить до кон'югата білка, представленого L-аспарагіназою з *Erwinia*, і поліетиленгліколю. Зокрема, поліетиленгліколь має молекулярну масу, яка менша ніж або дорівнює приблизно 5000 Да, а білок є L-аспарагіназою з *Erwinia*. Кон'югат за винаходом демонструє збереження високого рівня активності *in vitro* і несподіване зростання часу напіввиведення *in vivo*. Також описані способи одержання кон'югата і використання кон'югата в терапії в лікуванні раку, особливо гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ), як терапії другої лінії для пацієнтів, у яких розвинулася гіперчутливість або у яких стався рецидив захворювання після лікування іншими препаратами L-аспарагінази.

Рівень техніки винаходу

Галузь техніки винаходу

Даний винахід стосується кон'югата білка, що має значну аміногідролазну активність відносно L-аспарагіну, і поліетилєнглїколю, особливо, коли поліетилєнглїколь має молекулярну масу, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да, зокрема кон'югата, в якому білок являє собою L-аспарагіназу з *Erwinia*, і його використання в терапії.

Рівень техніки

Білки з аміногідролазною активністю відносно L-аспарагіну, звичайно відомі як L-аспарагінази, протягом багатьох років успішно використовувалися для лікування гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ) у дітей. ГЛЛ є найбільш поширеним злоякісним захворюванням у дітей (Avramis and Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44: 367-393).

L-аспарагіназу також використовували для лікування хвороби Ходжкіна, гострого мієлолейкозу, гострого мієломоноцитарного лейкозу, хронічного лімфолейкозу, лімфосаркоми, ретикулосаркоми і меланоми (Kotzia and Labrou, J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669). Протипухлинна активність L-аспарагінази, як вважають, пояснюється нездатністю або зниженою здатністю деяких злоякісних клітин синтезувати L-аспарагін (Kotzia and Labrou, J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669). Ці злоякісні клітини мають потребу у позаклітинному джерелі L-аспарагіну. Однак фермент L-аспарагінази каталізує гідроліз L-аспарагіну до аспарагінової кислоти і аміаку, тим самим виснажуючи пул циркулюючого L-аспарагіну і знищуючи пухлинні клітини, не здатні здійснювати синтез білка без L-аспарагіну (Kotzia and Labrou, J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669).

L-аспарагіназа з *E. coli* була першим ферментативним лікарським засобом, використаним в терапії ГЛЛ, і була введена на ринок під торговою маркою Elspar® в США або під торговими марками Kidrolase® і L-аспарагіназа Medac® в Європі. L-аспарагінази також були виділені з інших мікроорганізмів, наприклад білок L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi*, названий кризантаспаза, що продається на ринку під торговою маркою 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). Були також ідентифіковані L-аспарагінази з інших видів *Erwinia*, включаючи, наприклад, *Erwinia chrysanthemi* 3937 (реєстраційний № в Genbank AAS67028), *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125 (реєстраційний № в Genbank CAA31239), *Erwinia carotovora* (реєстраційний № в Genbank AAP92666) і *Erwinia carotovora* підвид *Astroseptica* (реєстраційний № в Genbank AAS67027). Ці L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi* мають між собою приблизно 91-98 % ідентичності амінокислотної послідовності, тоді як L-аспарагінази з *Erwinia carotovora* мають приблизно 75-77 % ідентичності амінокислотної послідовності з L-аспарагіназами з *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia and Labrou, J. Biotechnol. 127 (2007) 657-669).

L-аспарагінази бактеріального походження мають сильний імуногенний і антигенний потенціал і часто викликають побічні реакції, починаючи з легких алергічних реакцій до анафілактичного шоку у сенсibilізованих пацієнтів (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). L-аспарагіназа з *E. coli* особливо імуногенна, повідомлялося, що частота появи антиаспарагіназних антитіл до L-аспарагінази *E. coli* після в/в або в/м введення досягала 78 % у дорослих і 70 % у дітей (Wang B. et al. (2003) Leukemia 17, 1583-1588).

L-аспарагінази з *Escherichia coli* і *Erwinia chrysanthemi* розрізняються по своїх фармакокінетичних властивостях і мають різні профілі імуногенності, відповідно (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). Крім того, показано, що антитіла, які розвивалися після лікування L-аспарагіназою з *E. coli*, перехресно не реагують з L-аспарагіназою з *Erwinia* (Wang B. et al., Leukemia 17 (2003) 1583-1588). Таким чином, L-аспарагіназу з *Erwinia* (кризантаспазу) використовували як терапію другої лінії у пацієнтів з ГЛЛ, у яких розвивалася реакція на L-аспарагіназу *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 and Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44: 367-393).

З черговою спробою зменшити імуногенність, пов'язану з введенням мікробних L-аспарагіназ, була створена L-аспарагіназа *E. coli*, модифікована за допомогою метоксиполіетилєнглїколю (мПЕГ) (mPEG). Цей метод широко відомий як "пегілювання" і було

показано, що він змінює імунологічні властивості білків (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). Ця так звана мПЕГ-L-аспарагіназа, або пегаспаргаза, що продається під торговою маркою Oncaspar® (Enzon Inc., USA), була уперше схвалена в США для терапії другої лінії від ГЛЛ в 1994 р. і була схвалена для терапії першої лінії від ГЛЛ у дітей і дорослих з 2006 р. Oncaspar® має тривалий час напіввиведення *in vivo* і знижену імуногенність/антигенність.

Oncaspar® являє собою L-аспарагіназу *E. coli*, модифіковану по множинних залишках лізину за допомогою 5-кДа мПЕГ-сукцинімідилсукцинату (СС-ПЕГ) (SS-PEG) (патент США № 4179337). СС-ПЕГ являє собою реагент ПЕГ першого покоління, що містить нестабільний складноефірний зв'язок, чутливий до гідролізу ферментами або при слабколужних значеннях рН (патент США № 4670417; Makromol. Chem. 1986, 187, 1131-1144). Ці властивості знижують стабільність як *in vitro*, так і *in vivo* і можуть негативно позначатися на безпеці лікарського засобу.

Крім того, показано, що антитіла, які розвиваються проти L-аспарагінази з *E. coli*, перехресно реагують з 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). Навіть якщо ці антитіла не є нейтралізуючими, даний факт чітко продемонстрував високий потенціал для перехресної гіперчутливості або перехресної інактивації *in vivo*. Дійсно, згідно з одним із звітів, 30-41 % дітей, що одержували пегаспаргазу, мали алергічну реакцію (Wang B. et al. (2003) Leukemia 17, 1583-1588).

На доповнення до зовнішніх алергічних реакцій нещодавно також з'явилося повідомлення про проблему "латентної гіперчутливості", коли у пацієнтів розвиваються антиаспарагіназні антитіла без видимих клінічних виявів реакції гіперчутливості (Wang B. et al. (2003) Leukemia 17, 1583-1588). Така реакція може приводити до утворення нейтралізуючих антитіл до L-аспарагінази *E. coli* і пегаспаргази; однак даних пацієнтів не переводять на L-аспарагіназу з Erwinia, оскільки відсутні зовнішні ознаки гіперчутливості, і, отже, вони мають меншу тривалість ефективного лікування (Holcenberg J., J. Pediatr. Hematol. Oncol. 26 (2004) 273-274).

Лікування L-аспарагіназою з Erwinia chrysanthemi часто використовують у випадку гіперчутливості до L-аспарагіназ з *E. coli*. Однак було зазначено, що 30-50 % пацієнтів, що одержують L-аспарагіназу з Erwinia, були позитивними по наявності антитіл (Avramis and Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44: 367-393). Більше того, оскільки L-аспарагіназа з Erwinia chrysanthemi має значно коротший час напіввиведення, ніж L-аспарагінази з *E. coli*, її необхідно вводити частіше (Avramis and Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44: 367-393). В дослідженні Avramis зі співавторами аспарагіназа з Erwinia відрізнялася гіршими за якістю фармакокінетичними профілями (Avramis et al., J. Pediatr. Hematol. Oncol. 29 (2007) 239-247). Внаслідок цього, L-аспарагінази з *E. coli* і пегаспаргазі була віддана перевага як терапії першої лінії при ГЛЛ перед L-аспарагіназою з Erwinia.

За багато років множину біофармацевтичних препаратів було успішно пегильовано і виведено на ринок. Для приєднання ПЕГ до білка ПЕГ треба активувати на його ОН-кінці. Активуючу групу вибирають на основі доступної реакційноздатної групи на білку, який має бути пегильований. У випадку білків, найбільш важливими амінокислотами є лізин, цистеїн, глютамінова кислота, аспарагінова кислота, С-кінцева карбонова кислота і N-кінцева аміногрупа. Враховуючи широкий спектр реакційноздатних груп в білках, майже всі методи білкової хімії застосовують для активації фрагмента ПЕГ. Прикладами реагентів для таких активованих ПЕГ є активовані карбонати, наприклад п-нітрофенілкарбонат, сукцинімідилкарбонат; активні складні ефіри, наприклад сукцинімідильні складні ефіри; і для сайт-специфічного приєднання розроблені альдегіди і малеїміди (Harris M., Adv. Drug Del. Rev. 54 (2002), 459-476). Наявність різних хімічних методів для ПЕГ-модифікації показує, що кожна нова розробка пегильованого білка буде відрізнятися індивідуальним підходом. Крім хімічних методів, сильний вплив на фармацевтичні властивості пегильованого білка має молекулярна маса ПЕГ, приєднаного до білка. У більшості випадків передбачається, що, чим вища молекулярна маса ПЕГ, тим більше поліпшуються фармацевтичні властивості (Sherman M.R., Adv. Drug Del. Rev. 60 (2008), 59-68; Holtsberg F.W., Journal of Controlled Release 80 (2002), 259-271). Наприклад, Holtsberg зі співавторами виявили, що, коли ПЕГ кон'югують з аргініндезаміназою, іншим руйнуючим амінокислоту ферментом, виділеним з мікробного джерела, фармакокінетичні і фармакодинамічні функції ферменту зростають із збільшенням розміру приєднаного ПЕГ від молекулярної маси 5000 Да до 20000 Да (Holtsberg F.W., Journal of Controlled Release 80 (2002), 259-271).

Однак в багатьох випадках пегильовані біофармацевтичні препарати демонструють суттєво знижену активність в порівнянні з немодифікованими біофармацевтичними препаратами

(Fishburn C.S. (2008) огляд "The Pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics", J. Pharm. Sci., 1-17). У випадку L-аспарагінази з *Erwinia carotovora* було виявлено, що пегілювання знижувало її активність *in vitro* до приблизно 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). L-аспарагіназа з *Erwinia carotovora* має тільки приблизно 75 % гомології з L-аспарагіназою *Erwinia chrysanthemi* (кризантаспазою). Для Oncaspar® також відомо, що його активність *in vitro* становить приблизно 50 % в порівнянні з немодифікованою L-аспарагіназою *E. coli*.

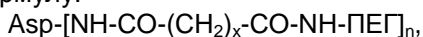
Існуючі на даний час препарати L-аспарагінази не є альтернативними або додатковими лікарськими засобами - особливо засобами для лікування ГЛЛ - відмінними високою каталітичною активністю і значно поліпшеними фармакологічними і фармакокінетичними властивостями, а також зниженою імуногенністю.

Коротка суть винаходу

Даний винахід стосується кон'югата білка, що має значну аміногідролазну активність відносно L-аспарагіну, і поліетиленгліколю, в якому поліетиленгліколь має молекулярну масу, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да, зокрема кон'югата, в якому білок являє собою L-аспарагіназу з *Erwinia*. У одному варіанті здійснення кон'югат містить L-аспарагіназу з *Erwinia*, що має щонайменше 80 % ідентичності амінокислотній послідовності SEQ ID NO:1, і поліетиленгліколь (ПЕГ), при цьому ПЕГ має молекулярну масу, яка менша ніж або дорівнює приблизно 5000 Да. У одному варіанті здійснення L-аспарагіназа має щонайменше приблизно 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 % ідентичності амінокислотній послідовності SEQ ID NO:1. У деяких варіантах здійснення ПЕГ має молекулярну масу приблизно 5000, 4000, 3000, 2500 або 2000 Да. У одному варіанті здійснення кон'югат має активність *in vitro* щонайменше 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 або 100 % в порівнянні з L-аспарагіназою, не кон'югованою з ПЕГ. У іншому варіанті здійснення кон'югат має активність по виснаженню L-аспарагіну щонайменше приблизно в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 разів більшу, ніж у L-аспарагінази, не кон'югованої з ПЕГ. У іншому варіанті здійснення кон'югат виснажує L-аспарагін в плазмі до рівнів, що не піддаються виявленню, щонайменше приблизно на 12, 24, 48, 96, 108 або 120 годин.

У одному варіанті здійснення кон'югат має більш тривалий час напіввиведення при циркуляції *in vivo* в порівнянні з L-аспарагіназою, не кон'югованою з ПЕГ. У конкретному варіанті здійснення кон'югат має більш тривалий  $t_{1/2}$ , ніж пегаспаргаза (тобто кон'югована з ПЕГ L-аспарагіназа з *E. coli*) при введенні в еквівалентній дозі білка (наприклад, виміряній в мкг/кг). У більш конкретному варіанті здійснення кон'югат має  $t_{1/2}$  щонайменше від приблизно 58 до приблизно 65 годин в дозі приблизно 50 мкг/кг, виходячи із вмісту білка, і  $t_{1/2}$  щонайменше від приблизно 34 до приблизно 40 годин в дозі приблизно 10 мкг/кг, виходячи із вмісту білка, після в/в введення миші. У іншому конкретному варіанті здійснення кон'югат має  $t_{1/2}$  щонайменше від приблизно 100 до приблизно 200 годин в діапазоні доз від приблизно 10000 до приблизно 15000 МО/м<sup>2</sup> (приблизно 20-30 мг білка/м<sup>2</sup>). У одному варіанті здійснення кон'югат характеризується більшою площею під кривою (AUC) в порівнянні з L-аспарагіназою, не кон'югованою з ПЕГ. У конкретному варіанті здійснення кон'югат має середню величину AUC, яка щонайменше приблизно в 3 рази більше, ніж у пегаспаргази при еквівалентній дозі білка.

У одному варіанті здійснення ПЕГ ковалентно зв'язаний з однією або більше аміногрупами (де "аміногрупи" включають залишки лізину і/або N-кінець) L-аспарагінази. У більш конкретному варіанті здійснення ПЕГ ковалентно зв'язаний з однією або більше аміногрупами амідним зв'язком. У іншому конкретному варіанті здійснення ПЕГ ковалентно зв'язаний з щонайменше від приблизно 40 % до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця білка) або з щонайменше від приблизно 40 % до приблизно 90 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця білка). У одному варіанті здійснення кон'югат має формулу:



де Asp являє собою L-аспарагіназу, NH являє собою одну або більше з NH-груп залишків лізину і/або N-кінця в Asp, ПЕГ являє собою фрагмент поліетиленгліколю, n являє собою число, відповідне щонайменше від приблизно 40 % до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) в Asp, а x дорівнює цілому числу в діапазоні від приблизно 1 до приблизно 8, більш конкретно від приблизно 2 до приблизно 5. В конкретному варіанті здійснення ПЕГ являє собою монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ).

У іншому аспекті винахід стосується способу одержання кон'югата, який включає об'єднання деякої кількості ПЕГ з деякою кількістю L-аспарагінази в буферному розчині протягом періоду часу, достатнього для ковалентного з'єднання ПЕГ з L-аспарагіназою.

У іншому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить кон'югат за винаходом.

У іншому аспекті винахід стосується способу лікування захворювання, що піддається лікуванню виснаженням L-аспарагіну, у пацієнта, який включає введення ефективної кількості кон'югата за винаходом. У одному варіанті здійснення захворювання являє собою рак. У конкретному варіанті здійснення рак являє собою ГЛЛ. У іншому конкретному варіанті здійснення кон'югат вводять в кількості від приблизно 5 Од/кг маси тіла до приблизно 50 Од/кг маси тіла. У іншому конкретному варіанті здійснення кон'югат вводять в дозі, що знаходиться в діапазоні від приблизно 10000 до приблизно 15000 МО/м<sup>2</sup> (приблизно 20-30 мг білка/м<sup>2</sup>). У деяких варіантах здійснення введення може бути внутрішньовенним або внутрішньом'язовим і може мати місце рідше одного разу на тиждень (наприклад, один раз на місяць або один раз на два тижні), один раз на тиждень, два рази на тиждень або три рази на тиждень. У інших конкретних варіантах здійснення кон'югат вводять як монотерапію і, більш конкретно, без інгібітору аспарагінсинтетази. У інших варіантах здійснення кон'югат вводять в складі комбінованої терапії (але в деяких варіантах здійснення комбінована терапія не включає інгібітору аспарагінсинтетази). У конкретному варіанті здійснення пацієнт, що одержує лікування, раніше мав гіперчутливість до аспарагінази з *E. coli* або її пегильованої форми або до аспарагінази з *Erwinia*. У іншому конкретному варіанті здійснення пацієнт, що одержує лікування, раніше мав рецидив захворювання, зокрема рецидив, що стався після лікування аспарагіназою з *E. coli* або її пегильованою формою.

Короткий опис креслень

Фіг. 1. Електрофорез в SDS-поліакриламідному гелі очищеної рекомбінантної L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi*. Очищену рекомбінантну L-аспарагіназу з *Erwinia chrysanthemi* (р-кризантаспазу) аналізували в SDS-ПААГ. Білкові смуги забарвлювали нітратом срібла. Доріжка 1: маркер молекулярної маси (116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4 і 14,4 кДа), доріжка 2: очищена рекомбінантна L-аспарагіназа з *Erwinia chrysanthemi* (р-кризантаспаза).

Фіг. 2. Аналіз в SDS-ПААГ кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази.

Фіг. 3. Рівні L-аспарагіну в плазмі після однієї внутрішньовенної дози Erwinase® (5, 25, 125 і 250 Од/кг маси тіла).

Фіг. 4. Рівні L-аспарагіну в плазмі після однієї внутрішньовенної ін'єкції кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази в порівнянні з Erwinase® у мишей. Цифри "40 %" і "100 %" показують зразкову міру пегілювання, відповідно, приблизно 40-55 % (часткове пегілювання) і приблизно 100 % (максимальне пегілювання) доступних аміногруп.

Фіг. 5. Площа під кривими (AUC) (залишкова ферментативна активність), розрахована з профілів L-аспарагінази після однієї внутрішньовенної ін'єкції кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази у мишей.

Фіг. 6. Рівні L-аспарагіну в плазмі у мишей після однієї внутрішньовенної дози 2-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази (5, 25 і 50 Од/кг маси тіла) (Фіг. 6A), 5-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази (5, 25 і 50 Од/кг маси тіла) (Фіг. 6B) або 2-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази (5 Од/кг), 5-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази (5 Од/кг) і пегаспаргази (Oncaspar®) (1 Од/кг) (Фіг. 6C). Введення еквівалентної кількості білка (10 мкг/кг) або 2-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази (5 Од/кг), 5-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази (5 Од/кг) або пегаспаргази (Oncaspar®) (1 Од/кг) приводило до аналогічного виснаження L-аспарагіну протягом 72 годин.

Фіг. 7. Дозозалежний ефект 2-кДа-100 % пегильованої р-кризантаспази в порівнянні з 5-кДа-100 % пегильованою р-кризантаспазою. На фіг. 7A показана залишкова ферментативна активність в плазмі після однієї внутрішньовенної дози 2-кДа-100 % пегильованої р-кризантаспази в концентрації 5 Од/кг (10 мкг/кг, виходячи із вмісту білка), 25 і 50 Од/кг. На фіг. 7B показана залишкова ферментативна активність в плазмі після однієї внутрішньовенної дози 5-кДа-100 % пегильованої р-кризантаспази в концентрації 5 Од/кг (10 мкг/кг, виходячи із вмісту білка), 25 і 50 Од/кг.

Фіг. 8. Дозозалежний ефект 2-кДа-100 % пегильованої р-кризантаспази в порівнянні з 5-кДа-100 % пегильованою р-кризантаспазою. AUC залишкової ферментативної активності, виміряної у мишей після однієї внутрішньовенної дози 2-кДа-100 % або 5-кДа-100 % мПЕГ-кон'югатів. Загалом, при порівнянні на тому ж рівні дози, AUC, виміряні для 5-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази, були вищими, ніж такі, спостережувані для 2-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази. Різницю в 31, 37 і 14 % спостерігали при дозах 5, 25 і 50 Од/кг, відповідно.

Фіг. 9. Фармакокінетика кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази в порівнянні з пегаспаргазою (Oncaspar®) у мишей. На фіг. 9A представлена залишкова ферментативна активність, виміряна у мишей після однієї внутрішньовенної дози 2-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази або пегаспаргази (Oncaspar®). На фіг. 9B представлені AUC залишкової ферментативної активності, виміряної у мишей після однієї внутрішньовенної дози 2-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази, 5-кДа-100 % мПЕГ-р-кризантаспази або пегаспаргази (Oncaspar®).

Фіг. 10. Рівні в сироватці специфічних антитіл проти кризантаспази після введення кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази або Erwinase®. Антитіла направлені проти кризантаспази. Дані представлені у вигляді середнього  $\pm$  SD (N=8).

Фіг. 11. Рівні в сироватці специфічних антитіл проти кон'югата після введення максимально (100 %) пегільованих кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази. Фіг. 11A: результати представлені у вигляді середнього  $\pm$ SD (n=8). Фіг. 11B: результати представлені у вигляді кількості тварин в процентах з величинами поглинання  $>0,5$  в аналізі ELISA антитіл проти кон'югата.

Докладний опис винаходу

У одному аспекті винахід направлений на розв'язання проблеми створення препарату L-аспарагінази з:

- високою біологічною активністю in vitro;
- стабільним зв'язком ПЕГ-білок;
- пролонгованим часом напіввиведення in vivo;
- значно зниженою імуногенністю, про що свідчить, наприклад, знижена або відсутня продукція антитіл проти препарату L-аспарагінази після повторюваних введень; і
- можливістю застосування як терапії другої лінії для пацієнтів, у яких розвинулася чутливість до терапії першої лінії при використанні, наприклад, L-аспарагіназу з *E. coli*.

Дана проблема не була вирішена за допомогою відомих кон'югатів L-аспарагінази, які або мають значну перехресну реактивність з модифікованими препаратами L-аспарагінази (стаття Wang B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання), або мають суттєво знижену активність in vitro (стаття Kuchumova A.V. et al. (2007) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 1, 230-232, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). Дана проблема вирішується в цьому винаході шляхом пропонування кон'югата L-аспарагінази з *Erwinia* з гідрофільним полімером, більш конкретно поліетиленгліколем з молекулярною масою 5000 Да або менше, способу одержання такого кон'югата і використання кон'югата.

У даному документі описана пегільована L-аспарагіназа з *Erwinia* з поліпшеними фармакологічними властивостями в порівнянні з немодифікованим білком L-аспарагіназою, а також в порівнянні з препаратом пегаспаргази з *E. coli*. Пегільований кон'югат L-аспарагінази, описаний в даному документі, наприклад L-аспарагіназа з *Erwinia chrysanthemi*, пегільована за допомогою ПЕГ з молекулярною масою 5000 Да, служить як терапевтичний засіб, зокрема, для використання у випадку пацієнтів, що демонструють гіперчутливість (наприклад, алергічну реакцію або латентну гіперчутливість) до лікування L-аспарагіназою або пегільованою L-аспарагіназою з *E. coli*, або немодифікованою L-аспарагіназою з *Erwinia*. Пегільований кон'югат L-аспарагінази, описаний в даному документі, також корисний як терапевтичний засіб для використання у випадку пацієнтів, у яких стався рецидив захворювання, наприклад рецидив ГЛЛ, або яких раніше лікували іншою формою аспарагінази, наприклад L-аспарагіназою або пегільованою L-аспарагіназою з *E. coli*.

Як детально описано в даному документі, кон'югат за винаходом несподівано демонструє чудові властивості в порівнянні з відомими препаратами L-аспарагінази, такими як пегаспаргаза. Наприклад, немодифікована L-аспарагіназа з *Erwinia chrysanthemi* (кризантаспаза) має набагато менш тривалий час напіввиведення, ніж немодифікована L-аспарагіназа з *E. coli* (стаття Avramis and Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44: 367-393, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). Пегільований кон'югат за винаходом має час напіввиведення набагато більш тривалий, ніж пегільована L-аспарагіназа з *E. coli* при еквівалентній дозі білка.

Визначення

Якщо прямо не вказане інше, терміни, використовувані в даному документі, потрібно трактувати відповідно до їх загальноприйнятого значення в даній галузі.

Використовуваний в даному документі термін "включаючи" означає "включаючи, без обмежень", і терміни, використовувані в однині, повинні включати множину, і навпаки, якщо з контексту не випливає інше.

Використовуваний в даному документі термін "хвороба, що піддається лікуванню шляхом виснаження аспарагіну", означає патологічний стан або захворювання, при якому клітини,

залучені або відповідальні за патологічний стан або захворювання, або позбавлені, або мають знижену здатність синтезувати L-аспарагін. Виснаження або позбавлення L-аспарагіну може бути частковим або практично повним (наприклад, до рівнів, що не піддаються визначенню методами і приладами, відомими в даній галузі).

5 Використовуваний в даному документі термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість білка (наприклад, аспарагінази або її кон'югата), необхідну для досягнення бажаного терапевтичного ефекту.

Білок L-аспарагіназа

10 Білок за винаходом являє собою фермент з аміногідролазною активністю відносно L-аспарагіну, а саме L-аспарагіназу.

Множина білків L-аспарагінази ідентифікована в даній галузі і виділена відомими методами з мікроорганізмів (дивись, наприклад, статтю Savitri and Azmi, Indian J. Biotechnol 2 (2003) 184-194, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). Найбільш широко використовувані і комерційно доступні L-аспарагінази одержують з *E. coli* або з *Erwinia chrysanthemi*, обидві з яких мають 50 % або менше структурної гомології. Серед видів *Erwinia*, як правило, повідомляють про 75-77 % ідентичність послідовності між ферментами, одержаними з *Erwinia chrysanthemi* і *Erwinia carotovora*, і приблизно 90 % ідентичності послідовності виявлено між різними підвидами *Erwinia chrysanthemi* (стаття Kotzia G.A., Labrou E. Journal of Biotechnology (2007) 127: 657-669, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). Деякі представники L-аспарагіназ з *Erwinia* включають, наприклад, ті, що наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Види	Реєстраційний № в GenBank	% ідентичності з <i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPPB 1066
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	AAS67028	91 %
<i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPPB 1125	CAA31239	98 %
<i>Erwinia carotovora</i> підвид <i>Astroseptica</i>	AAS67027	75 %
<i>Erwinia carotovora</i>	AAP92666	77 %

25 Послідовності L-аспарагіназ з *Erwinia* і реєстраційні номери в GenBank з таблиці 1 включені в даний документ за допомогою посилання. Переважними L-аспарагіназами, використовуваними в терапії, є L-аспарагінази, виділені з *E. coli* і з *Erwinia*, зокрема з *Erwinia chrysanthemi*.

30 L-аспарагінази можуть являти собою природні ферменти, виділені з мікроорганізмів. Їх також можна одержувати методами одержання рекомбінантних ферментів в продукуючих мікроорганізмах, таких як *E. coli*. Як приклади, білок, використовуваний в кон'югаті за винаходом, може являти собою білок з *E. coli*, продукований в рекомбінантному продукуючому штамі *E. coli*, білок з видів *Erwinia*, зокрема з *Erwinia chrysanthemi*, продукований в рекомбінантному продукуючому штамі *E. coli*.

35 Ферменти можна ідентифікувати по їх специфічній активності. Таким чином, це визначення охоплює всі поліпептиди, що мають певну специфічну активність, які також присутні в інших організмах, більш конкретно в інших мікроорганізмах. Часто ферменти зі схожою активністю можна ідентифікувати, групуєчи їх в певні сімейства, що визначаються як PFAM або COG. PFAM (база даних вирівнювань і прихованих моделей Маркова білкових сімейств; <http://pfam.sanger.ac.uk/>) представляє велику колекцію вирівнювань білкових послідовностей. 40 Кожна PFAM дає можливість візуалізувати множину вирівнювань, бачити білкові домени, оцінювати розподіл між організмами, одержувати доступ до інших баз даних і візуалізувати відомі білкові структури. COGs (кластери ортологічних груп білків; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) одержують шляхом порівняння білкових послідовностей з 43 повністю секвованих геномів, що представляють 30 основних філогенетичних ліній. Кожний 45 COG визначають з щонайменше трьох ліній, що дозволяє ідентифікувати колишні консервативні домени.

Способи визначення гомологічних послідовностей і процента їх гомології і/або ідентичності добре відомі фахівцям в даній галузі і включають, зокрема, програми BLAST, які можна знайти за мережевою адресою <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> з параметрами за умовчанням, 50 вказаними на цій мережевій адресі. Одержані послідовності потім можна використовувати (наприклад, вирівнювати) за допомогою, наприклад, програм CLUSTALW



(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) або MULTALIN (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin.html>) з параметрами за умовчанням, вказаними на цих мережових адресах. Використовуючи посилання, надані в GenBank для відомих генів, фахівці в даній галузі здатні визначати еквівалентні гени в інших організмах, штаммах бактерій, дріжджах, грибах, ссавцях, рослинах і так далі. Цю рутинну роботу переважно виконувати, використовуючи консенсусні послідовності, які можна визначати, проводячи вирівнювання послідовностей з генами з інших мікроорганізмів і розробляючи вироджені зонди для клонування відповідного гена в іншому організмі. Дані рутинні методи молекулярної біології добре відомі фахівцям в даній галузі і описані, наприклад, в Sambrook et al. (1989 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2e вид. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York).

Дійсно, фахівцю в даній галузі відомо, як вибирати і розробляти гомологічні білки, які значною мірою зберігають їх L-аспарагіназну активність. Як правило, аналіз Несслера використовують для визначення L-аспарагіназної активності по методу, описаному Mashburn and Wriston (стаття Mashburn L., and Wriston J. (1963) "Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase", Biochem Biophys Res Commun 12, 50, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання).

У конкретному варіанті здійснення кон'югата за винаходом білок L-аспарагіназа має щонайменше приблизно 80 % гомології або ідентичності з білком, що містить послідовність SEQ ID NO:1, більш конкретно щонайменше приблизно 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 % гомології або ідентичності з білком, що містить послідовність SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:1 є наступною:

ADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMT  
GDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDTEESAYFLHLTVKSDKPVVFVAAMRPATAISADGPMN  
LLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIIGNRIYYQNRIKDLH  
TTRSVDVRLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKG  
VVVIRSTRTGNIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIQEFHTY (SEQ ID NO:1).

Термін "що містить послідовність SEQ ID NO:1" означає, що амінокислотна послідовність білка може не бути чітко обмеженою послідовністю SEQ ID NO:1, але може містити додаткові амінокислоти.

У конкретному варіанті здійснення білок являє собою L-аспарагіназу з *Erwinia chrysanthemi*, що має послідовність SEQ ID NO:1. У іншому варіанті здійснення L-аспарагіназа походить з *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 (реєстраційний № в Genbank CAA32884, повний зміст літературного джерела включений в даний документ за допомогою посилання) з наявністю або відсутністю сигнальних пептидів і/або лідерних послідовностей.

Фрагменти білка з SEQ ID NO:1 також входять у визначення білка, використовуваного в кон'югаті за винаходом. Термін "фрагмент SEQ ID NO:1" означає, що послідовність поліпептиду може містити менше амінокислот, ніж SEQ ID NO:1, однак все ще достатньо амінокислот для вияву L-аміногідролазної активності.

У даній галузі добре відомо, що поліпептид можна модифікувати шляхом заміни, вставки, делеції і/або додавання однієї або декількох амінокислот із збереженням його ферментативної активності. Наприклад, заміна однієї амінокислоти в певному положенні еквівалентною з хімічної точки зору амінокислотою, яка не впливає на функціональні властивості білка, є загальноприйнятною. Заміни можна визначити як здійснений обмін всередині однієї з наступних груп:

- невеликі аліфатичні неполярні або слабополярні залишки: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;
- полярні негативно заряджені залишки і їх аміді: Asp, Asn, Glu, Gln;
- полярні позитивно заряджені залишки: His, Arg, Lys;
- великі аліфатичні неполярні залишки: Met, Leu, Ile, Val, Cys;
- великі ароматичні залишки: Phe, Tyr, Trp.

Таким чином, можна очікувати, що внаслідок змін, які приводять до заміни одного негативно зарядженого залишку на інший (наприклад, глютамінова кислота замість аспарагінової кислоти) або одного позитивно зарядженого залишку на інший (наприклад, лізин замість аргініну), буде одержаний функціонально еквівалентний продукт.

Положення, в яких амінокислоти піддаються модифікації, і число амінокислот, що піддаються модифікації, в амінокислотній послідовності не мають конкретних обмежень. Кваліфіковані фахівці в даній галузі здатні визначати модифікації, які можна вносити без впливу на активність білка. Наприклад, можна чекати, що модифікації в N- або C-кінцевій частині білка не будуть впливати на активність білка при певних обставинах. Зокрема, що стосується аспарагіназ, було одержано багато інформації, особливо відносно послідовностей, структур і залишків, що створюють активний каталітичний центр. З цих даних можна одержати указання на

те, які залишки можна модифікувати без впливу на активність ферменту. Всі відомі L-аспарагінази з бактеріальних джерел мають загальні структурні особливості. Всі є гомотетрамерами з чотирма активними центрами між N- і C-кінцевими доменами двох сусідніх мономерів (стаття Aghaipoor et al., *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). Всі мають високу міру схожості їх третинних і четвертинних структур (стаття Papageorgiou et al., *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). Послідовності каталітичних центрів L-аспарагіназ є висококонсервативними у L-аспарагінази II *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* і *E. coli* (Papageorgiou et al., *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). Гнучка петля активного центра містить амінокислотні залишки 14-33, і структурний аналіз показує, що Thr15, Thr95, Ser62, Glu63, Asp96 і Ala120 контактують з лігандом (Papageorgiou et al., *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). Aghaipoor зі співавторами провели докладний аналіз чотирьох активних центрів L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi* шляхом вивчення одержаних з високим розрізненням кристалічних структур ферменту в комплексі з його субстратами (Aghaipoor et al., *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664). Kotzia зі співавторами надали послідовності L-аспарагіназ з декількох видів і підвидів *Erwinia* і, хоч білки мають тільки приблизно 75-77 % ідентичності між *Erwinia chrysanthemi* і *Erwinia carotovora*, кожна з них все ще має L-аспарагіназну активність (стаття Kotzia et al., *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). Moola зі співавторами провели дослідження по картуванню епітопів L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi* 3937 і показали можливість збереження ферментативної активності навіть після внесення мутацій в різні антигенні послідовності в спробі знизити імуногенність аспарагінази (стаття Moola et al., *Biochem. J.* 302 (1994) 921-927, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). Повний зміст кожної з наведених вище статей включений в даний документ за допомогою посилань. Враховуючи всебічне дослідження L-аспарагіназ, фахівець в даній галузі зможе визначати, як створювати фрагменти і/або вносити заміни в послідовності без втрати ферментативної активності.

Полімери для використання в кон'югатах

Полімери вибирають з групи нетоксичних водорозчинних полімерів, таких як полісахариди, наприклад гідроксіетилкрахмаль, поліамінокислоти, наприклад полілізін, складні поліефіри, наприклад полімолочна кислота, і поліалкіленокси, наприклад поліетиленгліколь (ПЕГ).

Поліетиленгліколь (ПЕГ) або монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ) добре відомі в даній галузі і включають лінійні і розгалужені полімери. Приклади деяких полімерів, зокрема ПЕГ, наведені в наступних літературних джерелах, повний зміст яких включений в даний документ за допомогою посилань: патент США № 5672662; патент США № 4179337; патент США № 5252714; публікація патентної заявки США № 2003/0114647; патент США № 6113906; патент США № 7419600 і PCT публікація № WO2004/083258.

Якість таких полімерів характеризується індексом полідисперсності (PDI). PDI відображає розподіл молекулярної маси в даному зразку полімеру і розраховується як відношення середньомасової молекулярної маси до середньочислової молекулярної маси. Він вказує на розподіл окремої молекулярної маси в партії полімерів. Значення PDI завжди більше 1, але у міру наближення полімерних ланцюгів до ідеального розподілу Гаусса (= монодисперсності), PDI наближається до 1.

Переважно, поліетиленгліколь має молекулярну масу, що знаходиться в діапазоні від приблизно 500 до приблизно 9000 Да. Більш конкретно, поліетиленгліколь (наприклад, мПЕГ) має молекулярну масу, вибрану з групи, що складається з поліетиленгліколів з масою 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 і 5000 Да. У конкретному варіанті здійснення поліетиленгліколь (наприклад, мПЕГ) має молекулярну масу 5000 Да.

Спосіб одержання кон'югата

Для подальшого приєднання полімеру до білків з аміногідролазною активністю відносно L-аспарагіну полімерний фрагмент містить активовану функціональну групу, яка переважно вступає в реакцію з аміногрупами в білку. У одному аспекті винахід стосується способу одержання кон'югата, який включає об'єднання деякої кількості поліетиленгліколю (ПЕГ) з деякою кількістю L-аспарагінази в буферному розчині протягом періоду часу, достатнього для ковалентного з'єднання ПЕГ з L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення L-аспарагіназа походить з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназа містить послідовність SEQ ID NO:1. У одному варіанті здійснення ПЕГ являє собою монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ).

У одному варіанті здійснення реакцію між поліетиленгліколем і L-аспарагіназою проводять в буферному розчині. У деяких конкретних варіантах здійснення значення pH буферного розчину

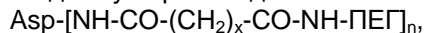
знаходиться в діапазоні від приблизно 7,0 до приблизно 9,0. Найбільш переважно значення pH знаходиться в діапазоні від приблизно 7,5 до приблизно 8,5, наприклад значення pH дорівнює приблизно 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 або 8,5. У конкретному варіанті здійснення L-аспарагіназа походить з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназа містить послідовність SEQ ID NO:1.

Крім того, пегілювання L-аспарагінази проводять при концентраціях білка від приблизно 0,5 до приблизно 25 мг/мл, більш конкретно від приблизно 2 до приблизно 20 мг/мл і найбільш конкретно від приблизно 3 до приблизно 15 мг/мл. Наприклад, концентрація білка становить приблизно 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 мг/мл. У конкретному варіанті здійснення при даних концентраціях білка пегілюють L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1.

При підвищених концентраціях білка, що складають більше ніж 2 мг/мл, реакція пегілювання відбувається швидко, протягом менше ніж 2 годин. Крім того, використовують молярний надлишок полімеру над аміногрупами в L-аспарагіназі менше ніж приблизно 20:1. Наприклад, використовують молярний надлишок менше ніж приблизно 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 або 1:1. У конкретному варіанті здійснення молярний надлишок складає менше ніж приблизно 10:1 і, в більш конкретному варіанті здійснення, молярний надлишок складає менше ніж приблизно 8:1. У конкретному варіанті здійснення L-аспарагіназа походить з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназа містить послідовність SEQ ID NO:1.

Число фрагментів ПЕГ, які можна приєднувати до білка, буде залежати від числа вільних аміногруп і, навіть більше того, тих аміногруп, які доступні для реакції пегілювання. У конкретному варіанті здійснення міра пегілювання (тобто число фрагментів ПЕГ, приєднаних до аміногруп на L-аспарагіназі) знаходиться в діапазоні від приблизно 10 до приблизно 100 % вільних і/або доступних аміногруп (наприклад, приблизно 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 %). 100 % пегілювання доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця білка) також називають в даному документі "максимальним пегілюванням". Одним з методів визначення модифікованих аміногруп в кон'югатах мПЕГ-р-кризантаспази (міри пегілювання) є метод, описаний Habeeb (стаття A.F.S.A. Habeeb, "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzensulfonic acid", Anal. Biochem. 14 (1966), p. 328, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). У одному варіанті здійснення фрагменти ПЕГ зв'язані з однією або більше аміногрупами (які включають залишки лізину і/або N-кінець) L-аспарагінази. У конкретному варіанті здійснення міра пегілювання знаходиться в діапазоні від приблизно 10 до приблизно 100 % всіх або доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця), наприклад приблизно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 100 %. У конкретному варіанті здійснення приблизно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) зв'язано з фрагментом ПЕГ. У іншому конкретному варіанті здійснення приблизно 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 або 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) зв'язано з фрагментом ПЕГ. У конкретному варіанті здійснення 40-55 або 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) зв'язано з фрагментом ПЕГ. У деяких варіантах здійснення фрагменти ПЕГ зв'язані з L-аспарагіназою ковалентним зв'язком. У конкретному варіанті здійснення L-аспарагіназа походить з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназа містить послідовність SEQ ID NO:1.

У одному варіанті здійснення кон'югат за винаходом можна представити формулою



де Asp являє собою білок L-аспарагіназу, NH являє собою NH-групу залишку лізину і/або N-кінця білкового ланцюга, ПЕГ являє собою фрагмент поліетиленгліколю і n являє собою число, відповідне щонайменше від 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) в білку, все це визначено вище або нижче в прикладах, x дорівнює цілому числу в діапазоні від 1 до 8 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), переважно від 2 до 5 (наприклад, 2, 3, 4, 5). У конкретному варіанті здійснення L-аспарагіназа походить з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназа містить послідовність SEQ ID NO:1.

Інші способи пегилування, які можна використовувати для одержання кон'югатів за винаходом, запропоновані, наприклад, в патенті США № 4179337, патенті США № 5766897, публікації патентної заявки США № US 2002/0065397A1 і публікаціях патентної заявки США № US 2009/0054590A1, повний зміст яких включений в даний документ за допомогою посилання.

5 Конкретні варіанти здійснення включають білки, що мають значну аміногідролазну активність відносно L-аспарагіну, і поліетиленгліколь, вибрані з групи кон'югатів, в яких:

(A)

- білок має щонайменше 90 % гомології структури з L-аспарагіназою з *Erwinia chrysanthemi*, що описується в SEQ ID NO:1,

10 - поліетиленгліколь має молекулярну масу приблизно 5000 Да,

- білок і фрагменти поліетиленгліколю ковалентно зв'язані амідними зв'язками, і

- приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) або приблизно 80-90 %, зокрема приблизно 84 %, всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) зв'язані з фрагментом поліетиленгліколю.

15 (B)

- білок має щонайменше 90 % гомології структури з L-аспарагіназою з *Erwinia chrysanthemi*, що описується в SEQ ID NO:1,

- поліетиленгліколь має молекулярну масу приблизно 5000 Да,

- білок і фрагменти поліетиленгліколю ковалентно зв'язані амідними зв'язками, і

20 - приблизно від 40 до приблизно 45 % і, зокрема, приблизно 43 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) або приблизно 36 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) зв'язані з фрагментом поліетиленгліколю.

(C)

25 - білок має щонайменше 90 % гомології структури з L-аспарагіназою з *Erwinia chrysanthemi*, що описується в SEQ ID NO:1,

- поліетиленгліколь має молекулярну масу приблизно 2000 Да,

- білок і фрагменти поліетиленгліколю ковалентно зв'язані амідними зв'язками, і

30 - приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, один або більше залишків лізину і/або N-кінця) або приблизно 80-90 %, зокрема приблизно 84 %, всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) зв'язані з фрагментом поліетиленгліколю.

(D)

- білок має щонайменше 90 % гомології структури з L-аспарагіназою з *Erwinia chrysanthemi*, що описується в SEQ ID NO:1,

- поліетиленгліколь має молекулярну масу приблизно 2000 Да,

35 - білок і фрагменти поліетиленгліколю ковалентно зв'язані амідними зв'язками, і

- приблизно від 50 до приблизно 60 % і, зокрема, приблизно 55 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) або приблизно 47 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) зв'язані з фрагментом поліетиленгліколю.

Кон'югати L-аспарагінази з ПЕГ

40 Кон'югати за винаходом мають певні переваги і несподівані властивості в порівнянні з немодифікованими L-аспарагіназами, зокрема в порівнянні з немодифікованими L-аспарагіназами з *Erwinia*, більш конкретно в порівнянні з немодифікованою L-аспарагіназою з *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно в порівнянні з немодифікованою L-аспарагіназою, що має послідовність SEQ ID NO:1.

45 У деяких варіантах здійснення кон'югат за винаходом знижує рівні L-аспарагіну в плазмі на період часу щонайменше приблизно 12, 24, 48, 72, 96 або 120 годин при введенні в дозі 5 Од/кг маси тіла (bw) або 10 мкг/кг (виходячи із вмісту білка). У інших варіантах здійснення кон'югат за винаходом знижує рівні L-аспарагіну в плазмі до рівнів, що не піддаються визначенню, на період часу щонайменше приблизно 12, 24, 48, 72, 96, 120 або 144 годин при введенні в дозі 25 Од/кг bw або 50 мкг/кг (виходячи із вмісту білка). У інших варіантах здійснення кон'югат за винаходом знижує рівні L-аспарагіну в плазмі на період часу щонайменше приблизно 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 або 240 годин при введенні в дозі 50 Од/кг bw або 100 мкг/кг (виходячи із вмісту білка). У іншому варіанті здійснення кон'югат за винаходом знижує рівні L-аспарагіну в плазмі до рівнів, що не піддаються визначенню, на період часу щонайменше приблизно 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 або 240 годин при введенні в діапазоні доз від приблизно 10000 до приблизно 15000 МО/м<sup>2</sup> (приблизно 20-30 мг білка/м<sup>2</sup>). У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить ПЕГ (наприклад, мПЕГ) з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да. У більш конкретному варіанті здійснення щонайменше від

60

приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) є пегільованими.

У одному варіанті здійснення кон'югат має співвідношення моль ПЕГ/моль мономера від приблизно 4,5 до приблизно 8,5, зокрема приблизно 6,5; специфічну активність від приблизно 450 до приблизно 550 Од/мг, зокрема приблизно 501 Од/мг; і відносну активність від приблизно 75 до приблизно 85 %, зокрема приблизно 81 %, в порівнянні з відповідною немодифікованою L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення кон'югат з такими властивостями містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1, з пегілюванням приблизно 40-55 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) за рахунок 5000 Да мПЕГ.

У одному варіанті здійснення кон'югат має співвідношення моль ПЕГ/моль мономера від приблизно 12,0 до приблизно 18,0, зокрема приблизно 15,1; специфічну активність від приблизно 450 до приблизно 550 Од/мг, зокрема приблизно 483 Од/мг; і відносну активність від приблизно 75 до приблизно 85 %, зокрема приблизно 78 %, в порівнянні з відповідною немодифікованою L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення кон'югат з такими властивостями містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1, з пегілюванням приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) за рахунок 5000 Да мПЕГ.

У одному варіанті здійснення кон'югат має співвідношення моль ПЕГ/моль мономера від приблизно 5,0 до приблизно 9,0, зокрема приблизно 7,0; специфічну активність від приблизно 450 до приблизно 550 Од/мг, зокрема приблизно 501 Од/мг; і відносну активність від приблизно 80 до приблизно 90 %, зокрема приблизно 87 %, в порівнянні з відповідною немодифікованою L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення кон'югат з такими властивостями містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1, з пегілюванням приблизно 40-55 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) за рахунок 10000 Да мПЕГ.

У одному варіанті здійснення кон'югат має співвідношення моль ПЕГ/моль мономера від приблизно 11,0 до приблизно 17,0, зокрема приблизно 14,1; специфічну активність від приблизно 450 до приблизно 550 Од/мг, зокрема приблизно 541 Од/мг; і відносну активність від приблизно 80 до приблизно 90 %, зокрема приблизно 87 %, в порівнянні з відповідною немодифікованою L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення кон'югат з такими властивостями містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1, з пегілюванням приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) за рахунок 10000 Да мПЕГ.

У одному варіанті здійснення кон'югат має співвідношення моль ПЕГ/моль мономера від приблизно 6,5 до приблизно 10,5, зокрема приблизно 8,5; специфічну активність від приблизно 450 до приблизно 550 Од/мг, зокрема приблизно 524 Од/мг; і відносну активність від приблизно 80 до приблизно 90 %, зокрема приблизно 84 %, в порівнянні з відповідною немодифікованою L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення кон'югат з такими властивостями містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1, з пегілюванням приблизно 40-55 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) за рахунок 2000 Да мПЕГ.

У одному варіанті здійснення кон'югат має співвідношення моль ПЕГ/моль мономера від приблизно 12,5 до приблизно 18,5, зокрема приблизно 15,5; специфічну активність від приблизно 450 до приблизно 550 Од/мг, зокрема приблизно 515 Од/мг; і відносну активність від приблизно 80 до приблизно 90 %, зокрема приблизно 83 %, в порівнянні з відповідною немодифікованою L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення кон'югат з такими властивостями містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1, з пегілюванням приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) за рахунок 2000 Да мПЕГ.

У інших варіантах здійснення кон'югат за винаходом має ефективність, підвищену щонайменше приблизно в 10 разів, 20 разів, 30 разів, 40 разів, 50 разів, 60 разів, 70 разів, 80 разів, 90 разів або 100 разів після однієї ін'єкції в порівнянні з відповідною немодифікованою L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення кон'югат з такими властивостями містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить ПЕГ (наприклад, мПЕГ) з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює приблизно

5000 Да. У більш конкретному варіанті здійснення щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) є пегільованими.

У одному аспекті кон'югат за винаходом має фармакокінетичний профіль згідно з наступними параметрами.

5

Параметр	Визначення
$A_{\max}$	Максимальна залишкова ферментативна активність
$t_{A_{\max}}$	Час до $A_{\max}$ після впливу тестованою речовиною
$d_{A_{\max}}$	Максимальна тривалість $A_{\max}$ або $A$ вище нуля

Час напіввиведення залишкової ферментативної активності в плазмі виводять з наступної формули:

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

10 де  $t_{1/2}$  являє собою час напіввиведення,  $t$  являє собою момент часу,  $c_t$  являє собою залишкову активність в плазмі в момент часу  $t$  і  $c_0$  являє собою залишкову активність в плазмі в початковий момент часу. Площу під кривою (AUC) розраховують за допомогою комп'ютерної програми для фармакокінетики, наприклад SigmaPlot версія 11.

15 У одному варіанті здійснення кон'югат за винаходом має фармакокінетичний профіль однієї дози згідно з представленими далі параметрами, особливо коли кон'югат містить мПЕГ з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює 2000 Да, і L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1.

20  $A_{\max}$ : від приблизно 150 до приблизно 250 Од/л;  
 $T_{A_{\max}}$ : від приблизно 4 до приблизно 8 год., зокрема приблизно 6 год.;  
 $d_{A_{\max}}$ : від приблизно 220 до приблизно 250 год., зокрема приблизно 238,5 год. (вище нуля, від приблизно 90 хв. до приблизно 240 год.);  
AUC: від приблизно 12000 до приблизно 30000; і  
 $t_{1/2}$ : від приблизно 50 до приблизно 90 год.

25 У одному варіанті здійснення кон'югат за винаходом має фармакокінетичний профіль однієї дози згідно з представленими далі параметрами, особливо коли кон'югат містить мПЕГ з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює 5000 Да, і L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1.

30  $A_{\max}$ : від приблизно 18 до приблизно 250 Од/л;  
 $T_{A_{\max}}$ : від приблизно 1 до приблизно 50 год.;  
 $d_{A_{\max}}$ : від приблизно 90 до приблизно 250 год., зокрема приблизно 238,5 год. (вище нуля, від приблизно 90 хв. до приблизно 240 год.);  
AUC: від приблизно 500 до приблизно 35000; і  
35  $t_{1/2}$ : від приблизно 30 до приблизно 120 год.

У одному варіанті здійснення кон'югат за винаходом приводить до одержання такого ж рівня виснаження L-аспарагіну протягом періоду часу (наприклад, 24, 48 або 72 годин) після однієї дози, що і еквівалентна кількість білка пегаспаргази. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить ПЕГ (наприклад, мПЕГ) з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да. У більш конкретному варіанті здійснення щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) є пегільованими, більш конкретно приблизно 40-55 або 100 %.

45 У одному варіанті здійснення кон'югат за винаходом має більш тривалий  $t_{1/2}$ , ніж пегаспаргаза, введена в еквівалентній дозі білка. У конкретному варіанті здійснення кон'югат має  $t_{1/2}$ , що дорівнює щонайменше приблизно 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 або 65 годин при дозі приблизно 50 мкг/кг (виходячи із вмісту білка). У іншому конкретному варіанті здійснення кон'югат має  $t_{1/2}$ , що дорівнює щонайменше приблизно 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39 або 40 годин при дозі приблизно 10 мкг/кг (виходячи із вмісту білка). У іншому конкретному варіанті здійснення кон'югат має  $t_{1/2}$ , що дорівнює щонайменше від приблизно 100 до приблизно 200

годин в діапазоні доз від приблизно 10000 до приблизно 15000 МО/м<sup>2</sup> (приблизно 20-30 мг білка/м<sup>2</sup>).

У одному варіанті здійснення кон'югат за винаходом має середню величину AUC, яка щонайменше приблизно в 2, 3, 4 або 5 разів вище, ніж у пегаспаргази при еквівалентній дозі білка.

У одному варіанті здійснення кон'югат за винаходом не викликає суттєвої продукції антитіл протягом конкретного періоду часу після введення однієї дози, наприклад, більшого ніж приблизно 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів, 6 тижнів, 7 тижнів, 8 тижнів, 9 тижнів, 10 тижнів, 11 тижнів, 12 тижнів і так далі. У конкретному варіанті здійснення кон'югат за винаходом не викликає суттєвої продукції антитіл протягом щонайменше 8 тижнів. У одному прикладі "не викликає суттєвої продукції антитіл" означає, що суб'єкта, який одержує кон'югат, визначають відповідно до визнаних в даній галузі параметрів як "негативного по наявності антитіл". Рівні антитіл можна визначати методами, відомими в даній галузі, наприклад методом ELISA або методом поверхневого плазмонного резонансу (SPR-Biacore) (статті Zalewska-Szewczyk et al., Clin. Exp. Med. (2009) 9: 113-116; Avramis et al., Anticancer Research 29 (2009) 299-302, повний зміст кожної з яких включений в даний документ за допомогою посилання). Кон'югати за винаходом можуть мати будь-яке поєднання даних властивостей.

Способи лікування і використання кон'югата

Кон'югати за винаходом можна використовувати в лікуванні захворювання, що піддається лікуванню шляхом виснаження аспарагіну. Наприклад, кон'югат корисний при лікуванні або виробництві лікарського засобу для використання в лікуванні гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ) як у дорослих, так і у дітей, а також інших патологічних станів, де, як очікується, виснаження аспарагіну буде мати корисний ефект. Такі патологічні стани включають, але не обмежуються ними, наступні: злоякісні захворювання або рак, включаючи, але не обмежуючись ними, гематологічні злоякісні захворювання, неходжкінську лімфому, НК лімфому, рак підшлункової залози, хворобу Ходжкіна, гострий мієлолейкоз, гострий мієломоноцитарний лейкоз, хронічний лімфолейкоз, лімфосаркому, ретикулосаркому і меланому. Типові незлоякісні гематологічні захворювання, що відповідають на виснаження аспарагіну, включають опосередковані імунною системою захворювання крові, наприклад інфекційні захворювання, такі як ті, що викликані інфекцією ВІЛ (тобто СНІД). Негематологічні захворювання, пов'язані із залежністю від аспарагіну, включають аутоімунні захворювання, наприклад ревматоїдний артрит, аутоімунні колагенози судин, СНІД і так далі. Інші аутоімунні захворювання включають остеоартрит, синдром Ісаака, псоріаз, інсулінозалежний цукровий діабет, розсіяний склероз, склерозуючий паненцефаліт, системний червоний вовчак, ревматизм, запальне захворювання кишечника (наприклад, неспецифічний виразковий коліт і хвороба Крона), первинний біліарний цироз, хронічний активний гепатит, гломерулонефрит, важку міастенію, звичайну пухирчатку і хворобу Грейвса. Клітини, що передбачувано викликають захворювання, можна перевіряти на аспарагінову залежність в будь-якому придатному *in vitro* або *in vivo* аналізі, наприклад в *in vitro* аналізі, в якому в ростовому середовищі відсутній аспарагін. Таким чином, в одному аспекті винахід стосується способу лікування захворювання, що піддається лікуванню, у пацієнта, який включає введення пацієнту ефективної кількості кон'югата за винаходом. У конкретному варіанті здійснення захворювання являє собою ГЛЛ. У конкретному варіанті здійснення кон'югат, використовуваний в лікуванні захворювання, що піддається лікуванню шляхом виснаження аспарагіну, містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить ПЕГ (наприклад, мПЕГ) з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да. У більш конкретному варіанті здійснення щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) є пегільованими, більш конкретно приблизно 40-55 або 100 %.

У одному варіанті здійснення лікування кон'югатом за винаходом буде проводитися як терапія першої лінії. У іншому варіанті здійснення лікування кон'югатом за винаходом буде проводитися як терапія другої лінії у пацієнтів, зокрема у пацієнтів з ГЛЛ, у яких розвинулися об'єктивні ознаки алергії або гіперчутливості, включаючи "латентну гіперчутливість", на інші препарати аспарагінази, зокрема природну L-аспарагіназу з *Escherichia coli* або її пегільований варіант (пегаспаргазу). Необмежувальні приклади об'єктивних ознак алергії або гіперчутливості включають "позитивний тест на антитіла" до ферменту аспарагінази. У конкретному варіанті здійснення кон'югат за винаходом використовують в терапії другої лінії після лікування пегаспаргазою. У більш конкретному варіанті здійснення кон'югат, використовуваний в терапії другої лінії, містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті

здійснення кон'югат містить ПЕГ (наприклад, мПЕГ) з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да. У більш конкретному варіанті здійснення щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) є пегільованими, більш конкретно приблизно 40-55 або 100 %.

У іншому аспекті винахід стосується способу лікування гострого лімфобластного лейкозу, який включає введення пацієнту, потребує лікування, терапевтично ефективної кількості кон'югата за винаходом. У конкретному варіанті здійснення терапевтичний засіб вводять в дозі, що знаходиться в діапазоні від приблизно 1500 до приблизно 15000 МО/м<sup>2</sup>, як правило від приблизно 10000 до приблизно 15000 МО/м<sup>2</sup> (приблизно 20-30 мг білка/м<sup>2</sup>) по схемі лікування в діапазоні від приблизно двох разів на тиждень до приблизно одного разу на місяць, як правило один раз на тиждень або один раз на два тижні, у вигляді одного засобу (наприклад, монотерапія) або як частину комбінації хімотерапевтичних лікарських засобів, включаючи, але не обмежуючись ними, глюкокортикоїди, кортикостероїди, протиракові сполуки або інші засоби, включаючи, але не обмежуючись ними, метотрексат, дексаметазон, преднізон, преднізолон, вінкрисдин, циклофосфамід і антрациклін. Як приклад, пацієнтам з ГЛЛ будуть вводити кон'югат за винаходом як компонент багатокомпонентної терапії протягом 3 фаз хімотерапії, включаючи індукцію, консолідацію або інтенсифікацію і підтримуючу фазу. У конкретному прикладі кон'югат не вводять з інгібітором аспарагінсинтетази (наприклад, таким, який описаний в РСТ публікації № WO 2007/103290, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання). У іншому конкретному прикладі кон'югат не вводять з інгібітором аспарагінсинтетази, але вводять з іншими хімотерапевтичними лікарськими засобами. Кон'югат можна водити до, після або одночасно з іншими сполуками як частину схеми багатокомпонентної хімотерапії. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить ПЕГ (наприклад, мПЕГ) з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да. У більш конкретному варіанті здійснення щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) є пегільованими, більш конкретно приблизно 40-55 або 100 %.

У конкретному варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата за винаходом в кількості від приблизно 1 до приблизно 25 Од/кг (наприклад, приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 Од/кг) або еквівалентній цій кількості (наприклад, виходячи із вмісту білка). У більш конкретному варіанті здійснення кон'югат вводять в кількості, вибраній з групи, що складається з приблизно 5, приблизно 10 і приблизно 25 Од/кг. У іншому конкретному варіанті здійснення кон'югат вводять в дозі, що знаходиться в діапазоні від приблизно 1000 до приблизно 20000 МО/м<sup>2</sup> (наприклад, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000 або 20000 МО/м<sup>2</sup>). У іншому конкретному варіанті здійснення кон'югат вводять в дозі, яка приводить до виснаження L-аспарагіну до рівнів, що не піддаються визначенню за допомогою методів і приладів, відомих в даній галузі, на період часу від приблизно 3 днів до приблизно 10 днів (наприклад, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 днів) при введенні однієї дози. У іншому варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата за винаходом, який викликає більш слабу імуногенну відповідь у пацієнта в порівнянні з некон'югованою L-аспарагіназою. У іншому варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата за винаходом, який має більш тривалий час напіввиведення при циркуляції *in vivo* після однієї дози в порівнянні з некон'югованою L-аспарагіназою. У одному варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата, що має більш тривалий  $t_{1/2}$ , ніж пегаспаргаза, введена в еквівалентній дозі білка. У конкретному варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата з  $t_{1/2}$ , що складає щонайменше приблизно 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 або 65 годин при дозі приблизно 50 мкг/кг (виходячи із вмісту білка). У іншому конкретному варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата з  $t_{1/2}$ , що складає щонайменше приблизно 30, 32, 34, 36, 37, 37, 39 або 40 годин при дозі приблизно 10 мкг/кг (виходячи із вмісту білка). У іншому конкретному варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата з  $t_{1/2}$ , що складає щонайменше від приблизно 100 до приблизно 200 годин при дозі, що знаходиться в діапазоні від приблизно 10000 до приблизно 15000 МО/м<sup>2</sup> (приблизно 20-30 мг білка/м<sup>2</sup>). У одному варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата, що має середню величину AUC, яка щонайменше приблизно в 2, 3, 4 або 5 разів вище, ніж у пегаспаргази при еквівалентній дозі білка. У іншому конкретному варіанті здійснення спосіб включає введення кон'югата за винаходом з більшою величиною AUC після однієї дози в порівнянні з некон'югованою L-аспарагіназою. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш



конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить ПЕГ (наприклад, мПЕГ) з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да. У більш конкретному варіанті здійснення щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) є пегільованими, більш конкретно приблизно 40-55 або 100 %.

Частота рецидивів у пацієнтів з ГЛЛ після лікування L-аспарагіназою залишається високою, становлячи приблизно 10-25 % у педіатричних пацієнтів з ГЛЛ з раннім рецидивом (наприклад, протягом підтримуючої фази через 30-36 місяців після індукції) (Avramis and Panosyan, Clin. Pharmacokinet. (2005) 44: 367-393). Якщо у пацієнта, що проходить лікування L-аспарагіназою з E. coli, стається рецидив, подальше лікування препаратами з E. coli може приводити до ефекту "вакцинації", при якому препарати з E. coli мають підвищену імуногенність при подальших введеннях. У одному варіанті здійснення кон'югат за винаходом можна використовувати в способі лікування пацієнтів з рецидивом ГЛЛ, яких раніше лікували іншими препаратами аспарагінази, зокрема тих, яких раніше лікували аспарагіназами з E. coli.

У деяких варіантах здійснення варіанти застосування і способи лікування за винаходом включають введення кон'югата L-аспарагінази, що має властивості або поєднання властивостей, описаних вище в даному документі (наприклад, в розділі, озаглавленому "Кон'югати L-аспарагінази з ПЕГ") або нижче в даному документі.

Композиції, препарати і способи введення

Винахід також включає фармацевтичну композицію, що містить кон'югат за винаходом. У конкретному варіанті здійснення фармацевтична композиція знаходиться у флаконі у вигляді ліофілізованого порошку, який знову розчиняють в розчиннику, так само, як і доступні на даний час природні L-аспарагінази, незалежно від того, яке бактеріальне джерело використовували для їх одержання (Kidrolase<sup>®</sup>, Elspar<sup>®</sup>, Erwinase<sup>®</sup>, ...). У іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція являє собою "готовий до вживання" розчин, такий як пегаспаргаза (Oncaspar<sup>®</sup>), який можна, після відповідної підготовки, вводити, наприклад, внутрішньом'язово, внутрішньовенно (інфузією і/або болюсною ін'єкцією), інтрацеребровентрикулярно (icv), підшкірно.

Кон'югати за винаходом, включаючи композиції, що містять кон'югати за винаходом (наприклад, фармацевтичну композицію), можна вводити пацієнту стандартними методами. Методи і препарати, як правило, можна знайти в книзі Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е вид., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990 (включений в даний документ за допомогою посилання).

Придатні лікарські форми частково залежать від застосування або способу введення, наприклад перорального, трансдермального, через слизову оболонку або шляхом ін'єкції (парентеральної). Такі лікарські форми повинні дозволяти терапевтичному засобу досягати клітини-мішені або іншим чином здійснювати бажаний терапевтичний ефект. Наприклад, фармацевтичні композиції, що вводяться ін'єкцією в кровотік, переважно є розчинними.

Кон'югати і/або фармацевтичні композиції за винаходом можна одержувати у вигляді фармацевтично прийнятних солей або їх комплексів. Фармацевтично прийнятні солі являють собою солі, нетоксичні в кількостях і концентраціях, в яких їх вводять. Препарат таких солей може полегшувати фармацевтичне застосування шляхом зміни фізичних характеристик сполуки без перешкоди для надання нею фізіологічного ефекту. Корисні зміни фізіологічних властивостей включають зниження температури плавлення для полегшення введення через слизову оболонку і збільшення розчинності для полегшення введення лікарського засобу в більш високих концентраціях. Фармацевтично прийнятна сіль аспарагінази може бути присутньою у вигляді комплексу, визнаного в даній галузі.

Фармацевтично прийнятні солі включають кислотно-адитивні солі, наприклад, що включають сульфат, гідрохлорид, фумарат, малеат, фосфат, сульфамат, ацетат, цитрат, лактат, тартрат, метансульфонат, етансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, циклогексилсульфамат і хінат. Фармацевтично прийнятні солі можна одержувати з кислот, включаючи соляну кислоту, малеїнову кислоту, сірчану кислоту, фосфорну кислоту, сульфамінову кислоту, оцтову кислоту, лимонну кислоту, молочну кислоту, винну кислоту, малонову кислоту, метансульфонову кислоту, етансульфонову кислоту, бензолсульфонову кислоту, п-толуолсульфонову кислоту, циклогексилсульфамову кислоту, фумарову кислоту і хінну кислоту.

Фармацевтично прийнятні солі також включають основно-адитивні солі, наприклад, що включають бензатин, хлорпрокаїн, холін, діетаноламін, етилендіамін, меглумін, прокаїн, алюміній, кальцій, літій, магній, калій, натрій, амоній, алкіламін і цинк, якщо присутні кислоти

функціональні групи, такі як карбонова кислота або фенол. Наприклад, дивись Remington's Pharmaceutical Sciences, вище. Такі солі можна одержувати, використовуючи відповідні основи.

Фармацевтично прийнятні носії і/або ексципієнти можна також включати в фармацевтичну композицію за винаходом для полегшення введення конкретної аспарагінази. Приклади носіїв, придатних для використання в практиці винаходу, включають карбонат кальцію, фосфат кальцію, різні цукри, такі як лактоза, глюкоза або сахароза, або різні типи крохмалю, похідні целюлози, желатин, рослинні олії, поліетиленгліколи і фізіологічно сумісні розчинники. Приклади фізіологічно сумісних розчинників включають стерильні розчини води для ін'єкцій (WFI), соловий розчин і декстрозу.

Фармацевтичні композиції за винаходом можна водити різними способами, включаючи внутрішньовенне, внутрішньоочеревинне, підшкірне, внутрішньом'язове, пероральне, місцеве (трансдермальне) або через слизову оболонку введення. Як системне введення переважним є пероральне введення. Для перорального введення, наприклад, сполуки можна формувати у вигляді загальноприйнятих пероральних лікарських форм, таких як капсули, таблетки і рідкі препарати, наприклад сиропи, еліксири і концентровані краплі.

Альтернативно, можна використовувати ін'єкції (парентеральне введення), наприклад внутрішньом'язові, внутрішньовенні, внутрішньоочеревинні і підшкірні ін'єкції. Для ін'єкцій фармацевтичні композиції формують у вигляді рідких розчинів, переважно в фізіологічно сумісних буферах або розчинах, таких як фізіологічний розчин, розчин Хенкса або розчин Рінгера. Крім того, сполуки можна формувати в твердій формі і розчиняти або суспендувати безпосередньо перед використанням. Наприклад, можна одержувати ліофілізовані форми кон'югата. У конкретному варіанті здійснення кон'югат вводять внутрішньом'язово. У іншому конкретному варіанті здійснення кон'югат вводять внутрішньовенно.

Системне введення можна також здійснювати через слизову оболонку або трансдермально. Для введення через слизову оболонку або трансдермального введення в препараті використовують змочувальні реагенти, відповідні бар'єру, що долається. Такі змочувальні реагенти добре відомі в даній галузі і включають, наприклад, у випадку введення через слизову оболонку, солі жовчних кислот і похідні фузидієвої кислоти. Крім того, для полегшення проникнення можна використовувати детергенти. Для введення через слизову оболонку можна використовувати, наприклад, назальні спреї, інгалятори (для доставки в легені), ректальні супозиторії або вагінальні супозиторії. Для місцевого введення сполуки можна формувати у вигляді розтирань, мазей, гелів або кремів, добре відомих в даній галузі.

Кількість кон'югата, що доставляється, буде залежати від множини факторів, наприклад  $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ , біологічного часу напіввиведення сполуки, віку, розмірів, ваги і фізичного стану пацієнта, а також від захворювання або розладу, від якого буде потрібне лікування. Важливість цих і інших факторів, які потрібно враховувати, добре відомі рядовим фахівцям в даній галузі. Як правило, кількість кон'югата для введення буде знаходитися в діапазоні від приблизно 10 міжнародних одиниць на квадратний метр площі поверхні тіла пацієнта ( $MO/m^2$ ) до  $50000 MO/m^2$ , з переважним діапазоном доз від приблизно 1000 до приблизно  $15000 MO/m^2$ , з більш переважним діапазоном доз від приблизно 6000 до приблизно  $15000 MO/m^2$  і з особливо переважним діапазоном доз від приблизно 10000 до приблизно  $15000 MO/m^2$  (приблизно 20-30 мг білка/ $m^2$ ) для лікування зл�якісних гематологічних захворювань, наприклад лейкозу. Як правило, такі дози вводять за допомогою внутрішньом'язової або внутрішньовенної ін'єкції з інтервалом від приблизно 3 разів на тиждень до приблизно одного разу на місяць, як правило один раз на тиждень або один раз на два тижні в ході терапії. Зрозуміло, можна використовувати інше дозування і/або схеми лікування, що визначаються лікуючим спеціалістом.

У конкретних варіантах здійснення кон'югат і/або фармацевтична композиція або препарат для введення, описані в даному документі, містять L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить L-аспарагіназу з видів *Erwinia*, більш конкретно *Erwinia chrysanthemi* і ще більш конкретно L-аспарагіназу, що містить послідовність SEQ ID NO:1. У конкретному варіанті здійснення кон'югат містить ПЕГ (наприклад, мПЕГ) з молекулярною масою, яка менше ніж або дорівнює приблизно 5000 Да. У більш конкретному варіанті здійснення щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) є пегільованими.

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Одержання рекомбінантної кризантаспази

Рекомбінантним штамом бактерій, використовуваним для виробництва "голого" рекомбінантного білка L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi* (також званого в даному документі

"р-кризантаспаза"), був штам BL21 *E. coli* з делетованим геном *ansB* (ген, що кодує ендogenous L-аспарагіназу типу II *E. coli*), щоб уникнути потенційного забруднення рекомбінантної L-аспарагінази *Erwinia chrysanthemi* цим ферментом. Для делеції гена *ansB* використовують методи гомологічної рекомбінації і фагової трансдукції, що виконується згідно з наступними трьома етапами:

1) бактеріальний штам (NM 1100), експресуючий дефектний фаг лямбда, який забезпечує функції захисту і рекомбінації введеного електропорацією лінійного ДНК-субстрату в бактеріальній клітині, трансформували лінійною плазмідною (канаміцинова касета), що містить ген канаміцину, фланкований цільовою послідовністю упізнання FLP (FRT). Відбувалася рекомбінація для заміни гена *ansB* канаміциновою касетою в бактеріальному геномі, що приводить до створення штаму  $\Delta ansB$ ; 2) фагову трансдукцію використовували для інтеграції області інтегрованої канаміцинової касети зі штаму  $\Delta ansB$  NM 1100 в локус *ansB* штаму BL21. Це привело до створення штаму BL21 *E. coli* з делетованим геном *ansB*, що має стійкість до канаміцину; 3) цей штам трансформували FLP-хелперною плазмідною для видалення гена канаміцину шляхом гомологічної рекомбінації по послідовності FRT. Геном кінцевого штаму секвенували (штам BL21  $\Delta ansB$ ), підтверджуючи повну делецію ендogenous гена *ansB*.

Оптимізовану послідовність ДНК *E. coli*, що кодує зрілу L-аспарагіназу з *Erwinia chrysanthemi*, злили з сигнальним пептидом ENX з *Bacillus subtilis*, вбудовували в експресійний вектор. Цей вектор робить можливою експресію рекомбінантної L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi* під контролем гібридного промотору T5/lac, індукованого додаванням ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG), і надає стійкість до канаміцину.

Штам BL21  $\Delta ansB$  трансформували даним експресійним вектором. Трансформовані клітини використовували для продукції р-кризантаспази шляхом ферментації глюкози по технології "feed-batch" в середовищі Рейзенберга. Індукцію клітин проводили протягом 16 год. при 23 °C з IPTG як індуктором. Після збирання клітин і лізису шляхом гомогенізації в 10 мМ натрійфосфатному буфері, pH 6, 5 мМ ЕДТО (буфер А), розчин білка прояснювали центрифугуванням двічі при 15000 g, з подальшими етапами фільтрування через 0,45-мкм і 0,22-мкм фільтри. Потім рекомбінантну L-аспарагіназу з *Erwinia chrysanthemi* очищали за допомогою послідовних етапів хроматографії і концентрування. Коротко, теоретична ізоелектрична точка L-аспарагінази *Erwinia chrysanthemi* (7,23) дозволяє рекомбінантному ферменту адсорбуватися на катіонообмінних смолах при pH 6. Таким чином, рекомбінантний фермент залишався на колонці Capto S (катіонообмінна хроматографія) і елюювався градієнтом солі в буфері А. Фракції, що містять рекомбінантний фермент, об'єднували. Потім об'єднаний розчин очищали на колонці Capto MMC (катіонообмінна хроматографія) в буфері А з градієнтом солі. Елюйовані фракції, що містять L-аспарагіназу *Erwinia chrysanthemi*, об'єднували і концентрували перед розділенням білків методом гель-фільтрації на колонці з Superdex 200 пг як завершальний етап очищення. Фракції, що містять рекомбінантний фермент, об'єднували, концентрували і діалізували проти 100 мМ натрійфосфатного буфера, pH 8. Чистоту кінцевого препарату L-аспарагінази *Erwinia chrysanthemi* оцінювали методом SDS-ПААГ (Fig. 1) і ОФ-ВЕРХ, і вона складала щонайменше 90 %. Цілісність рекомбінантного ферменту перевіряли N-кінцевим секвенуванням і РХ-МС. Активність ферменту вимірювали при 37 °C за допомогою реагенту Несслера. Специфічна активність очищеної рекомбінантної L-аспарагінази *Erwinia chrysanthemi* становила приблизно 600 Од/мг. Одну одиницю ферментативної активності визначають як кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль аміаку з L-аспарагіну на хвилину при 37 °C.

Приклад 2: Одержання кон'югатів 10-кДа мПЕГ-L-аспарагінази

Розчин L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi* перемішували в 100 мМ натрійфосфатному буфері при pH 8,0, з концентрацією білка від 2,5 до 4 мг/мл в присутності 150 або 36 мг/мл 10-кДа мПЕГ-NHS протягом 2 годин при 22 °C. Одержану неочищену 10-кДа мПЕГ-L-аспарагіназу очищали гель-хроматографією на колонці з Superdex 200 пг, використовуючи систему Äkta purifier UPC 100. Фракції, що містять білок, об'єднували і концентрували, одержуючи концентрацію білка від 2 до 8 мг/мл. Таким способом одержували два кон'югати 10-кДа мПЕГ-L-аспарагінази, що розрізняються по мірі пегілювання, що визначали аналізом TNBS з немодифікованою L-аспарагіназою як зразком порівняння, один з них відповідав повному пегілюванню (100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця), при цьому кон'юговані залишки відповідали пегілюванню 78 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця)), а другий відповідав частковому пегілюванню (39 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) або приблизно 50 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця)). Аналіз в SDS-ПААГ кон'югатів представлений на фіг. 2. Одержані

кон'югати виглядали як практично гомогенні смуги і не містили немодифікованої р-кризантаспази, що піддається визначенню.

#### Приклад 3: Одержання кон'югатів 5-кДа мПЕГ-L-аспарагінази

Розчин L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi* перемішували в 100 мМ натрійфосфатному буфері при pH 8,0, з концентрацією білка 4 мг/мл в присутності 150 або 22,5 мг/мл 5-кДа мПЕГ-NHS протягом 2 годин при 22 °С. Одержану неочищену 5-кДа мПЕГ-L-аспарагіназу очищали гель-хроматографією на колонці з Superdex 200 пг, використовуючи систему Äkta purifier UPC 100. Фракції, що містять білок, об'єднували і концентрували, одержуючи концентрацію білка від 2 до 8 мг/мл. Таким способом одержували два кон'югати 5-кДа мПЕГ-L-аспарагінази, що розрізняються по мірі пегілювання, що визначали аналізом TNBS з немодифікованою L-аспарагіназою як зразком порівняння, один з них відповідав повному пегілюванню (100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця), при цьому кон'юговані залишки відповідали пегілюванню 84 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця)), а другий відповідав частковому пегілюванню (36 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) або приблизно 43 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця)). Аналіз в SDS-ПААГ кон'югатів представлений на фіг. 2. Одержані кон'югати виглядали як практично гомогенні смуги і не містили немодифікованої р-кризантаспази, що піддається визначенню.

#### Приклад 4: Одержання кон'югатів 2-кДа мПЕГ-L-аспарагінази

Розчин L-аспарагінази з *Erwinia chrysanthemi* перемішували в 100 мМ натрійфосфатному буфері при pH 8,0, з концентрацією білка 4 мг/мл в присутності 150 або 22,5 мг/мл 2-кДа мПЕГ-NHS протягом 2 годин при 22 °С. Одержану неочищену 2-кДа мПЕГ-L-аспарагіназу очищали гель-хроматографією на колонці з Superdex 200 пг, використовуючи систему Äkta purifier UPC 100. Фракції, що містять білок, об'єднували і концентрували, одержуючи концентрацію білка від 2 до 8 мг/мл. Таким способом одержували два кон'югати 2-кДа мПЕГ-L-аспарагінази, що розрізняються по мірі пегілювання, що визначали аналізом TNBS з немодифікованою L-аспарагіназою як зразком порівняння, один з них відповідав повному пегілюванню (100 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця), при цьому кон'юговані залишки відповідали пегілюванню 86 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця)), а другий відповідав частковому пегілюванню (47 % всіх аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця) або приблизно 55 % доступних аміногруп (наприклад, залишків лізину і/або N-кінця)). Аналіз в SDS-ПААГ кон'югатів представлений на фіг. 2. Одержані кон'югати виглядали як практично гомогенні смуги і не містили немодифікованої р-кризантаспази, що піддається визначенню.

#### Приклад 5: Активність кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази

Аміногідролазну активність L-аспарагінази кожного кон'югата, описаного в попередніх прикладах, визначали методом Несслера на основі кількості аміаку, що вивільняється з L-аспарагіну внаслідок ферментативної активності. Коротко, 50 мкл розчину ферменту змішували з 20 мМ L-аспарагіном в 50 мМ натрійборатному буфері, pH 8,6, і інкубували протягом 10 хв. при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 200 мкл реактиву Несслера. Поглинання цього розчину вимірювали при 450 нм. Активність розраховували на основі калібрувальної кривої, одержаної з сульфатом амонію як зразком порівняння. Результати наведені в таблиці 2 нижче.

Таблиця 2

Активність кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази

Зразок*	Моль ПЕГ/моль мономера**	Специфічна активність [Од/мг]	Відносна активність %
10-кДа мПЕГ-р-кризантаспаза 40 %	7,0	543	87
10-кДа мПЕГ-р-кризантаспаза 100 %	14,1	541	87
5-кДа мПЕГ-р-кризантаспаза 40 %	6,5	501	81
5-кДа мПЕГ-р-кризантаспаза 100 %	15,1	483	78
2-кДа мПЕГ-р-кризантаспаза 40 %	8,5	524	84
2-кДа мПЕГ-р-кризантаспаза 100 %	15,5	515	83
р-кризантаспаза	-	622	100

\*цифри "40 %" і "100 %" вказують зразкову міру пегілювання, відповідно, 40-55 і 100 % доступних аміногруп (див. приклади 2-4, вище).

\*\*відношення моль ПЕГ/моль мономера екстрапольовано з даних аналізу TNBS, який передбачає, що всі аміногрупи з білка (наприклад, залишки лізину і N-кінець) доступні.

Залишкова активність кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази знаходилася в діапазоні від 483 до 543 Од/мг. Це відповідає 78-87 % аміногідролазної активності відносно L-аспарагіну немодифікованого ферменту.

Приклад 6: L-аспарагін-виснажуючий ефект немодифікованої кризантаспази

Фармакодинамічний профіль Erwinase<sup>®</sup> визначали у гібридів B6D2F1 (імунокомпетентних самиць), придбаних у компанії Charles River, Німеччина. Erwinase<sup>®</sup> є комерційно доступною кризантаспазою (L-аспарагіназою з *Erwinia chrysanthemi*). Коротко, 2 тварини в групі одержували одну в/в ін'єкцію 5, 25, 125 або 250 Од/кг bw Erwinase<sup>®</sup>. У моменти часу -1 год. до введення і 6, 12, 24 і 48 год. після введення зразки плазми збирали з орбітального синуса і аналізували на рівні L-аспарагіну в плазмі.

Рівні амінокислот в плазмі визначали за допомогою набору для аналізу амінокислот PICO-TAG (Waters). Коротко, зразки плазми депротейнізували осадженням метанолом. Вільні амінокислоти в супернатанті дериватизували фенілізотіоціанатом і кількісно визначали методом ОФ-ВЕРХ.

Як показано на фіг. 3, дози 5 і 25 Од/кг не були ефективні у виснаженні рівнів L-аспарагіну у мишей після в/в введення. Тільки доза 250 Од/кг викликала повне виснаження протягом 48 годин.

Цей результат свідчить про клінічні обмеження Erwinase<sup>®</sup>, немодифікованої кризантаспази, яку необхідно вводити аж до 3 разів на тиждень болісними ін'єкціями пацієнтам, що страждають на ГЛЛ, і яка у високих дозах приводить до швидкої появи алергічних реакцій і імуногенності.

Приклад 7: L-аспарагін-виснажуючий ефект і активність L-аспарагіну в плазмі після однократного введення шести кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази

Фармакодинамічні і фармакокінетичні профілі 6 різних кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази визначали у гібридів B6D2F1 (імунокомпетентних самиць), придбаних у компанії Charles River, Німеччина. Шість тестованих кон'югатів відрізнялися молекулярним розміром ПЕГ (2, 5 або 10 кДа) і мірою пегілювання (максимальне проти часткового пегілювання). Немодифіковану кризантаспазу (Erwinase<sup>®</sup>) використовували як зразок порівняння. Коротко, 4 тварини в групі одержували одну в/в ін'єкцію 5 Од/кг bw кон'югата проти 250 Од/кг bw Erwinase<sup>®</sup>. У моменти часу -1 год. до введення і 6, 12, 24, 48, 96 і 192 год. після ін'єкції зразки плазми збирали з орбітального синуса кожної тварини і аналізували на рівні L-аспарагіну в плазмі і залишкову ферментативну активність, відповідно.

Рівні амінокислот в плазмі визначали за допомогою набору для аналізу амінокислот PICO-TAG (Waters). Коротко, зразки плазми депротейнізували осадженням метанолом. Вільні амінокислоти в супернатанті дериватизували фенілізотіоціанатом і кількісно визначали методом ОФ-ВЕРХ.

Ферментативну активність в плазмі визначали хромогенним аналізом. β-гідроксамат L-аспарагінової кислоти (АНА) використовували як субстрат. Ферменти гідролізували АНА до L-Asp і гідроксиламіну, який визначали при 710 нм після конденсації з 8-гідроксихіноліном і окислення до індооксину (стаття Analytical Biochemistry 309 (2002): 117-126, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання).

Як показано на фіг. 4, кон'югати, введені в дозі 5 Од/кг, демонстрували ефективність виснаження L-аспарагіну, щонайменше таку ж високу, як і у Erwinase<sup>®</sup> 250 Од/кг, з чого випливає, що пегілювання підвищує ефективність білка щонайменше в 50 разів. Всі кон'югати демонстрували схожу ефективність, виснажуючи рівні L-аспарагіну в плазмі протягом 2 днів, за винятком 5-кДа-100 % кон'югата, який відрізнявся більш тривалою дією (96 год. = 4 дні в порівнянні з 48 год. = 2 дні для інших кон'югатів).

Таким чином, збільшення розміру ПЕГ, кон'югованого з р-кризантаспазою, з 2 до 5 кДа приводило до зростання ефективності і тривалості дії. Однак, на здивування, збільшення розміру ПЕГ до 10 кДа більше не збільшувало ефективність і тривалість дії кон'югата, це навіть приводило до зниження в порівнянні з 5-кДа максимально пегільованим кон'югатом.

Ферментативна активність узгоджувалася з виснаженням L-аспарагіну. Як показано на фіг. 5, 5-кДа-100 % кон'югат відрізнявся найбільшою величиною AUC, що відображало більш тривалий час напіввиведення. Більш низькі величини AUC спостерігали у випадку ПЕГ - 40 % (частково пегільованих) проти ПЕГ - 100 % (максимально пегільованих) кон'югатів для 2-кДа і 5-кДа кандидатів і не спостерігали ніякої різниці у випадку 10-кДа кандидатів.

Відповідно до даних по виснаженню L-аспарагіну, збільшення молекулярного розміру ПЕГ, кон'югованого з р-кризантаспазою, з 2 до 5 кДа приводило до більш тривалої циркуляції L-

аспарагіназної активності. Однак, на здивування, збільшення розміру ПЕГ до 10 кДа більше не збільшувало ферментативну активність кон'югата *in vivo*, це навіть приводило до зниження в порівнянні з 5-кДа максимально пегільованим кон'югатом. Крім того, примітно, що, коли р-кризантаспаза була монопегільована по N-кінцю за допомогою мПЕГ з високою молекулярною масою (тобто 40 кДа), не було ніякого суттєвого впливу на стійкість ферменту до протеолізу *in vitro* (дані не представлені).

Приклад 8: Дозозалежні ефекти двох кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази на L-аспарагін в плазмі

Фармакодинамічний профіль 2 кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази в порівнянні з пегаспаргазою (Oncaspar®) визначали у гібридів B6D2F1 (імунокомпетентних самиць), придбаних у компанії Charles River, Німеччина. Тестованими кон'югатами були 2-кДа максимально (100 %) пегільована р-кризантаспаза і 5-кДа максимально (100 %) пегільована р-кризантаспаза в 3 дозах. Коротко, 8 тварин в групі одержували одну в/в ін'єкцію 5, 25 або 50 Од/кг бм кон'югатів р-кризантаспази, що відповідало 10, 50 або 100 мкг білка/кг. Для порівняння тестували Oncaspar® в дозі 1 Од/кг, що відповідало 10 мкг білка/кг. У моменти часу -1 год. до введення і 90 хв., 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192 і 240 год. після введення зразки плазми збирали з орбітального синуса і аналізували на рівні L-аспарагіну в плазмі.

Рівні амінокислот в плазмі визначали за допомогою набору для аналізу амінокислот PICO-TAG (Waters). Коротко, зразки плазми депротейнізували осадженням метанолом. Вільні амінокислоти в супернатанті дериватизували фенолізотіоціанатом і кількісно визначали методом ОФ-ВЕРХ.

Дозозалежні ефекти кон'югатів на рівні L-аспарагіну в плазмі представлені на фіг. 6. Як показано на фігурах 6А і 6В, обидва кон'югати були високоефективні у виснаженні циркулюючого L-аспарагіну. У випадку 2-кДа-100 % кон'югата, повне виснаження спостерігали протягом 3, 6 і щонайменше 10 днів при дозах 5, 25 і 50 Од/кг, відповідно. У випадку 5-кДа-100 % кон'югата, повне виснаження спостерігали протягом 3, 10 і 10 днів при дозах 5, 25 і 50 Од/кг, відповідно. У випадку обох протестованих кон'югатів дози 5, 25 і 50 Од/кг відповідали 10, 50 і 100 мкг/кг, виходячи із вмісту білка, що є дуже малою кількістю білка в порівнянні з іншими препаратами L-аспарагінази, що є в продажу. Дійсно, 250 Од/кг Erwinase® відповідає приблизно 520 мкг/кг, а 1 Од/кг Oncaspar® відповідає приблизно 10 мкг/кг (виходячи із вмісту білка). На фіг. 6С показано, що введення еквівалентної кількості білка (10 мкг/кг) або 2-кДа-100 % кон'югата, 5-кДа-100 % кон'югата, або Oncaspar® приводило до схожого виснаження L-аспарагіну протягом 72 годин.

Приклад 9: Фармакокінетичні профілі двох кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази

Фармакокінетичний профіль кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази визначали у гібридів B6D2F1 (імунокомпетентних самиць), придбаних у компанії Charles River, Німеччина. Тестованими кон'югатами були 2-кДа максимально (100 %) пегільована р-кризантаспаза і 5-кДа максимально (100 %) пегільована р-кризантаспаза в 3 дозах. Немодифіковану кризантаспазу (Erwinase®) в дозі 250 Од/кг і Oncaspar® в дозі 1 Од/кг також тестували як контролі. Коротко, 8 тварин в групі одержували одну в/в ін'єкцію 5, 25 або 50 Од/кг бм кожного з кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази в порівнянні з Erwinase® і Oncaspar®. У моменти часу -1 год. до введення і 90 хв., 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192 і 240 год. після введення зразки плазми збирали з орбітального синуса і аналізували на рівні в плазмі залишкової ферментативної активності.

Ферментативну активність в плазмі визначали хромогенним аналізом.  $\beta$ -гідроксамат L-аспарагінової кислоти (АНА) використовували як субстрат. Ферменти гідролізували АНА до L-Asp і гідроксиламіну, який визначали при 710 нм після конденсації з 8-гідроксихіноліном і окислення до індооксину (Analytical Biochemistry 309 (2002): 117-126).

Для розрахунку часу напіввиведення будували експонентні найкращі емпіричні криві відповідної залишкової активності в плазмі, використовуючи функціональні можливості і інструменти MS-excel. Негативні значення активності виключали з розрахунків.

Параметр	Визначення
$A_{\max}$	Максимальна залишкова ферментативна активність
$t_{A_{\max}}$	Час до $A_{\max}$ після впливу тестованою речовиною
$d_{A_{\max}}$	Максимальна тривалість $A_{\max}$ або $A$ вище нуля

Час напіввиведення залишкової ферментативної активності в плазмі виводили з наступної формули, використовуючи функціональні можливості, інструменти MS-excel і відповідні формули експонентних найкращих емпіричних кривих:

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

- 5 де  $t_{1/2}$  являє собою час напіввиведення,  $t$  являє собою момент часу,  $c_t$  являє собою залишкову активність в плазмі в момент часу і  $c_0$  являє собою залишкову активність в плазмі в початковий момент часу.

Площу під кривою (AUC) розраховували за допомогою програми SigmaPlot версія 11. Фармакокінетичні дані наведені в таблицях 3 і 4 нижче і на фіг. 7-9.

10

Таблиця 3

Первинна фармакокінетика при однократному впливі 250 Од/кг bw Erwinase<sup>®</sup>,  
1 Од/кг bw пегаспаргази (Oncaspar<sup>®</sup>) або 100 % кон'югатів 2-кДа  
мПЕГ-р-кризантаспази (залишкова ферментативна активність в плазмі)

Параметр	Erwinase <sup>®</sup>	Пегаспаргаза 1 Од/кг bw	2-кДа/100 % 5 Од/кг bw	2-кДа/100 % 25 Од/кг bw	2-кДа /100 % 50 Од/кг bw
A <sub>max</sub>	83,9 Од/л	6 Од/л	14 Од/л	153 Од/л	208 Од/л
t <sub>Amax</sub>	6 год.	90 хв.	90 хв.	6 год.	6 год.
d <sub>Amax</sub> вище нуля	18 год. 6 год. - 24 год.	46,5 год. 90 хв. - 48 год.	70,5 год. 90 хв. - 72 год.	238,5 год. 90 хв. - 240 год.	238,5 год. 90 хв. - 240 год.
AUC (середня)	1205	222	627	12446	28349
t <sub>1/2</sub>	6 год.	28 год.	31 год.	55 год.	85 год.

Таблиця 4

Первинна фармакокінетика при однократному впливі 250 Од/кг bw Erwinase<sup>®</sup>,  
1 Од/кг bw пегаспаргази (Oncaspar<sup>®</sup>) або 100 % кон'югатів 5-кДа  
мПЕГ-р-кризантаспази (залишкова ферментативна активність в плазмі)

Параметр	Erwinase <sup>®</sup>	Пегаспаргаза 1 Од/кг bw	5-кДа/100 % 5 Од/кг bw	5-кДа/100 % 25 Од/кг bw	5-кДа/100 % 50 Од/кг bw
A <sub>max</sub>	83,9 Од/л	6 Од/л	18 Од/л	188 Од/л	226 Од/л
t <sub>Amax</sub>	6 год.	90 хв.	90 хв.	6 год.	48 год.
d <sub>Amax</sub> вище нуля	18 год. 6 год. - 24 год.	46,5 год. 90 хв. - 48 год.	94,5 год. 90 хв. - 96 год.	238,5 год. 90 хв. - 240 год.	238,5 год. 90 хв. - 240 год.
AUC (середня)	1205	222	798	19748	33151
t <sub>1/2</sub>	6 год.	28 год.	38 год.	63 год.	104 год.

- Дані свідчать про те, що пегілювання р-кризантаспази значно продовжує час напіввиведення в порівнянні з немодифікованою кризантаспазою, до того ж дозозалежним чином (таблиці 3 і 4, фіг. 7-9). Крім того, при порівнянні в однакових рівнях доз, величини AUC, виміряні для 5-кДа-100 %, були вище ніж такі, спостережувані у випадку 2-кДа-100 % кон'югатів. Постійно спостерігали різницю в 21, 37 і 14 % на користь 5-кДа-100 % кон'югата при дозах 5, 25 і 50 Од/кг, відповідно (Фіг. 8). 5-кДа-100 % кон'югат, судячи з усього, також мав більш тривалий час напіввиведення в порівнянні з власне Oncaspar<sup>®</sup> при тестуванні в тій же дозі, виходячи із вмісту білка, як показано на фіг. 9 і у виведених фармакокінетичних параметрах, наведених в таблиці 4. Переважаючи фармакокінетичні профілі для кон'югатів з Erwinia були несподіваними, оскільки відомо, що L-аспарагіназа з E. coli має більш тривалий час напіввиведення в організмі людини і тварин, ніж L-аспарагіназа з Erwinia chrysanthemi (кризантаспаза). Отже, логічно було б передбачити, що у пегілюваної L-аспарагінази з E. coli (пегаспаргази) буде більш тривалий час напіввиведення в порівнянні з пегілюваною р-кризантаспазою. Однак несподіваним і сприятливим фактом виявилось те, що пегілювана р-кризантаспаза має більш тривалий час напіввиведення, ніж пегаспаргаза.

15

20

25

Нижче в таблиці 5 наведені фармакокінетичні і фармакодинамічні дані, зібрані з декількох експериментів, включаючи ті, які описані в прикладах 7-9 в даному документі, які демонструють, що: 1) як 2-кДа-100 %, так і 5-кДа-100 % кон'югати були високоефективними з точки зору зростання ефективності і тривалості дії кризантаспази, про що свідчать помітні відмінності, спостережувані в порівнянні з Erwinase®; 2) 5-кДа-100 % кон'югат діяв більш тривалий час, ніж обидва 2-кДа-100 % кон'югат і Oncaspar®, про що свідчить більш тривалий час напіввиведення, спостережуваний при всіх тестованих дозах. З урахуванням дивно невисоких результатів, одержаних з 10-кДа-100 % кон'югатом, ці дані свідчать про те, що перевага від пегілювання зростає із збільшенням розміру фрагмента ПЕГ, заякореного на кризантаспазі, аж до 5 кДа. Більш висока молекулярна маса ПЕГ не додає додаткових переваг і, щонайменше у випадку 10 кДа, може навіть завдавати шкоди. Це несподівано і суперечить результатам, одержаним, наприклад, коли Holtsberg зі співавторами кон'югували ПЕГ, що має різну молекулярну масу, з аргініндезаміназою, іншим руйнуючим амінокислоту ферментом, виділеним з мікробного джерела. У цих дослідженнях фармакокінетична і фармакодинамічна функція ферменту аргініндезамінази зростала із збільшенням розміру приєднаного фрагмента ПЕГ від молекулярної маси 5000 до 20000 Да (стаття Holtsberg F.W., Journal of Controlled Release 80 (2002), 259-271, повний зміст якої включений в даний документ за допомогою посилання).

Таблиця 5

	Erwinase®	2-кДа-100 % мПЕГ- р-кризантаспаза		5-кДа-100 % мПЕГ- р-кризантаспаза		Oncaspar®	
Доза (мкг/кг)	520	10	50	10	50	10	50
Доза (Од/кг)	250	5	25	5	25	1	5
t <sub>1/2</sub> (год.)	6	31	55	38	63	28	51
Тривалість виснаження L-аспарагіну (дні)	2	2-3	6	3-4	10+	3	8+

Крім того, як показано нижче більш детально, дані по імуногенності свідчать про те, що 10-кДа-100 % кон'югат відрізнявся неприйнятним профілем імуногенності, основним недоліком з точки зору введення сполуки пацієнтам, які страждають на алергію до L-аспарагінази E. coli або виробляють антитіла проти L-аспарагінази. У цьому відношенні 10-кДа-100 % кон'югат дійсно не придатний. Переважними є 2-кДа-100 % і 5-кДа-100 % кон'югати, і 5-кДа-100 % кон'югат є особливо переважним.

#### Приклад 10: Імуногенність

Імуногенність кон'югатів мПЕГ-р-кризантаспази визначали у гібридів B6D2F1 (імунокомпетентних самиць), придбаних у компанії Charles River, Німеччина. Тварини одержували двічі на тиждень в тижні 1, 2, 3, 4 і 8 введені внутрішньовенною ін'єкцією 250 Од/кг bw Erwinase® і по 5 Од/кг bw всіх кон'югатів р-кризантаспази. Зразки сироватки збирали в моменти часу -1 год. до введення і через 1 тиждень, 2 тижні, 4 тижні, 6 тижнів і 8 тижнів з орбітального синуса. Рівні в сироватці антитіл проти кризантаспази або проти мПЕГ-р-кризантаспази визначали методом ELISA. Результати наведені на фігурах 10 і 11.

Високі титри антикризантаспазних антитіл були виявлені у випадку Erwinase®, починаючи з тижня 2, і зберігалися протягом всього періоду дослідження. Навпаки, ніяких суттєвих рівнів антитіл не спостерігали у випадку кон'югатів р-кризантаспази (Фіг. 10).

Як показано на фіг.11, продукція антитіл проти кон'югата відрізнялася низькою інтенсивністю і частотою у випадку кон'югатів 2-кДа і 5-кДа мПЕГ-р-кризантаспази, і більш високі значення і частота спостерігалися у випадку кон'югатів 10-кДа мПЕГ-р-кризантаспази. Не було помічено чітких відмінностей між повністю і частково пегілюваними кон'югатами (не показано).

Таким чином, ці дані свідчать про те, що вибрана стратегія пегілювання знижувала імуногенність кон'югатів в порівнянні з немодифікованою L-аспарагіназою, значно зменшуючи продукцію антикризантаспазних антитіл. Однак антитіла проти кон'югатів були виявлені, особливо у випадку 10-кДа кон'югатів, і з меншою інтенсивністю у випадку 2кДа і 5-кДа кон'югатів.

На закінчення, представляється, що пегілювання аж до 5 кДа було здатне поліпшувати фармакокінетичний профіль, ефективність і тривалість дії р-кризантаспази, при цьому знижуючи імуногенність в порівнянні з немодифікованим білком, причому ефективність і тривалість дії зростали із збільшенням розміру використовуваного полімеру і кон'югат 5-кДа мПЕГ-р-кризантаспази був трохи більш ефективним, ніж кон'югат 2-кДа мПЕГ-р-кризантаспази. Однак подальше збільшення розміру ПЕГ до 10 кДа більше не збільшувало ефективність і тривалість



дії, оскільки кон'югат 10-кДа мПЕГ-р-кризантаспази був менш ефективний *in vivo*, ніж кон'югат 5-кДа мПЕГ-р-кризантаспази, незважаючи на схожу ефективність *in vitro*. Крім того, кон'югати 10-кДа мПЕГ-р-кризантаспази демонстрували неприйнятний профіль імуногенності, несподіваний результат з урахуванням опублікованих результатів з іншими білками.

Хоч варіанти здійснення і застосування даного винаходу були описані більш детально як ілюстрації і приклади, для фахівців в даній галузі очевидно, що можливі різні додаткові модифікації без відхилення від концепцій винаходу, що містяться в даному документі. Повний зміст всіх цитованих в даному документі літературних джерел включений в нього за допомогою посилань.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Кон'югат, який містить L-аспарагіназу з Erwinia, що має щонайменше 80 % ідентичності амінокислотній послідовності SEQ ID NO:1, і поліетиленгліколь (ПЕГ), де ПЕГ має молекулярну масу, яка менша ніж або дорівнює приблизно 5000 Да.

2. Кон'югат за п. 1, де вказана L-аспарагіназа має щонайменше від 90 % до 99 % ідентичності амінокислотній послідовності SEQ ID NO:1.

3. Кон'югат за п. 1, де вказана L-аспарагіназа являє собою амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1.

4. Кон'югат за п. 1, який має активність виснаження L-аспарагіну, щонайменше приблизно в 50 разів сильнішу, ніж у L-аспарагінази, некон'югованої з ПЕГ.

5. Кон'югат за п. 1, який знижує рівні L-аспарагіну в плазмі до величин, що не піддаються визначенню, протягом щонайменше від 48 годин до 96 годин.

6. Кон'югат за п. 1, де ПЕГ ковалентно зв'язаний з однією або більше аміногрупами вказаної L-аспарагінази.

7. Кон'югат за п. 6, де ПЕГ ковалентно зв'язаний з вказаними однією або більше аміногрупами амідним зв'язком.

8. Кон'югат за п. 6, де ПЕГ ковалентно зв'язаний з щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп.

9. Кон'югат за п. 1, який має формулу:

$\text{Asp}[\text{NH-CO}-(\text{CH}_2)_x\text{-CO-NH- ПЕГ}]_n$ ,

де Asp являє собою L-аспарагіназу, NH являє собою одну або більше з NH-груп залишків лізину і/або N-кінця в Asp, ПЕГ являє собою фрагмент поліетиленгліколю, n являє собою число, що відповідає щонайменше від приблизно 40 до приблизно 100 % доступних аміногруп в Asp, а x дорівнює цілому числу в діапазоні від 1 до 8.

10. Кон'югат за п. 1, де вказаний ПЕГ являє собою монометоксиполіетиленгліколь.

11. Спосіб одержання кон'югата за п. 1, який включає об'єднання деякої кількості вказаного ПЕГ з деякою кількістю вказаної L-аспарагінази в буферному розчині протягом періоду часу, достатнього для ковалентного зв'язування вказаного ПЕГ зі вказаною L-аспарагіназою.

12. Спосіб за п. 11, де вказаний буферний розчин має величину pH від приблизно 7,0 до приблизно 9,0.

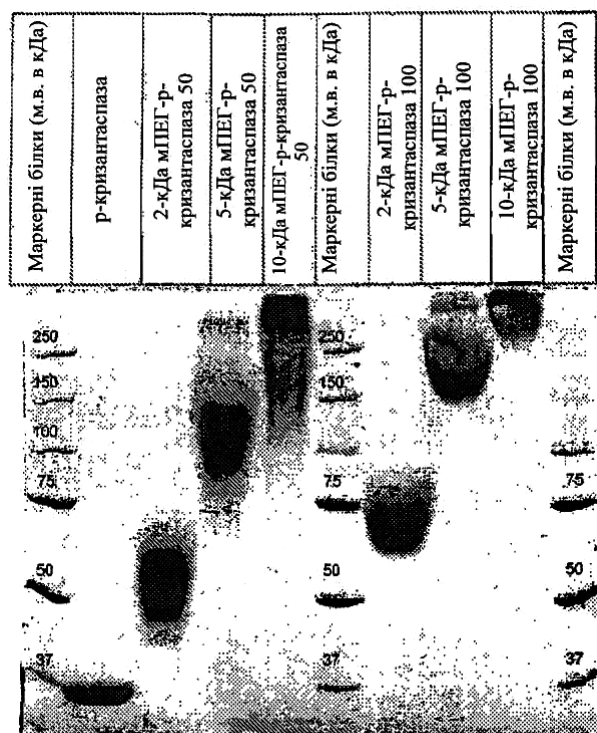
13. Спосіб за п. 11, де кількість вказаного ПЕГ відповідає молярному надлишку полімеру над аміногрупами у вказаній L-аспарагіназі, меншому ніж приблизно 20:1.

14. Спосіб за п. 11, де вказаний ПЕГ являє собою монометоксиполіетиленгліколь.

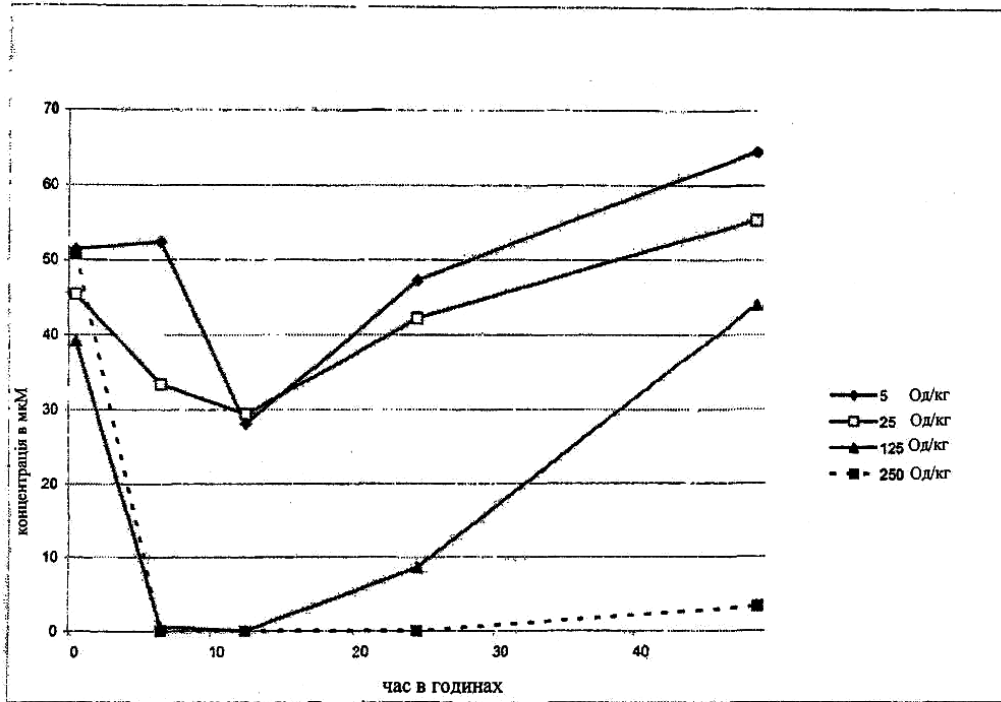


1 2

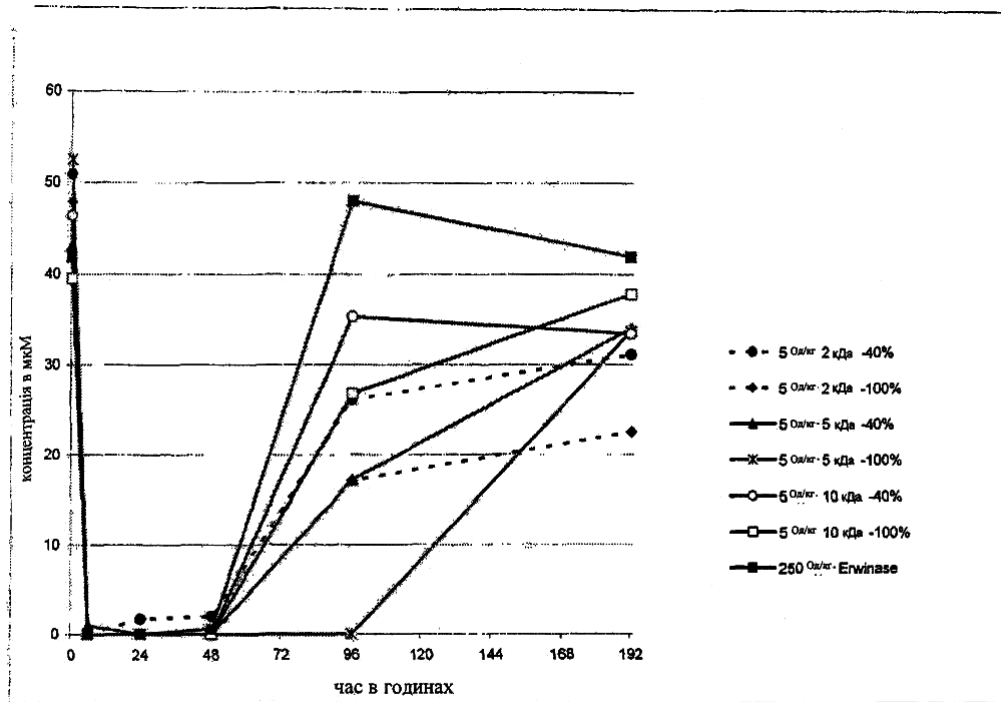
Фіг. 1



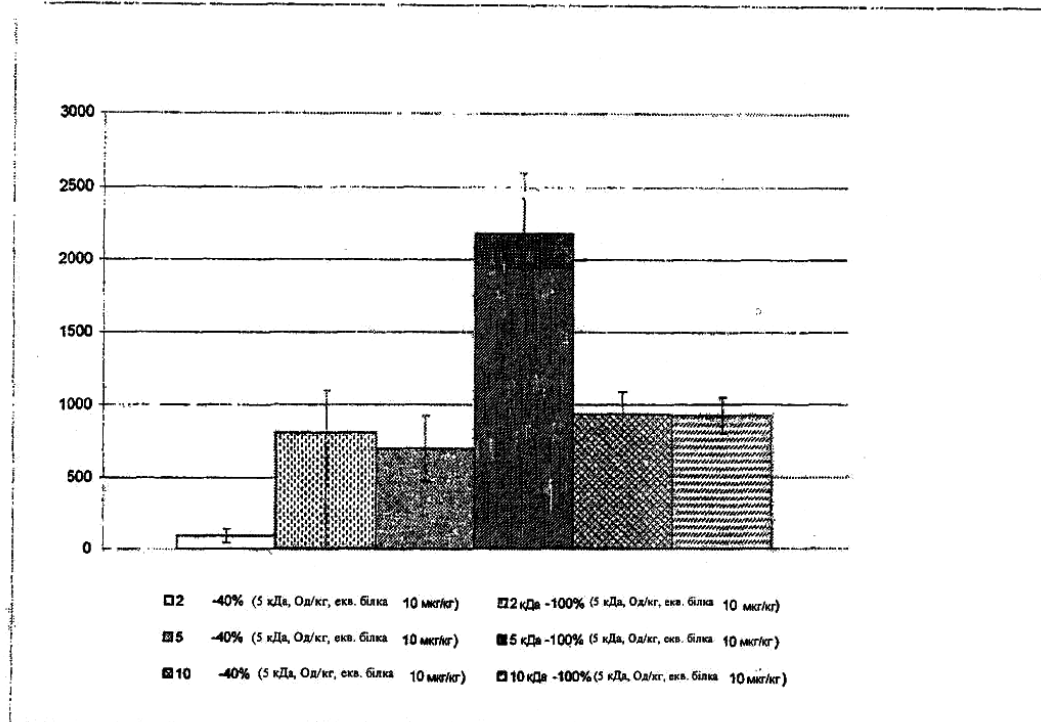
Фіг. 2



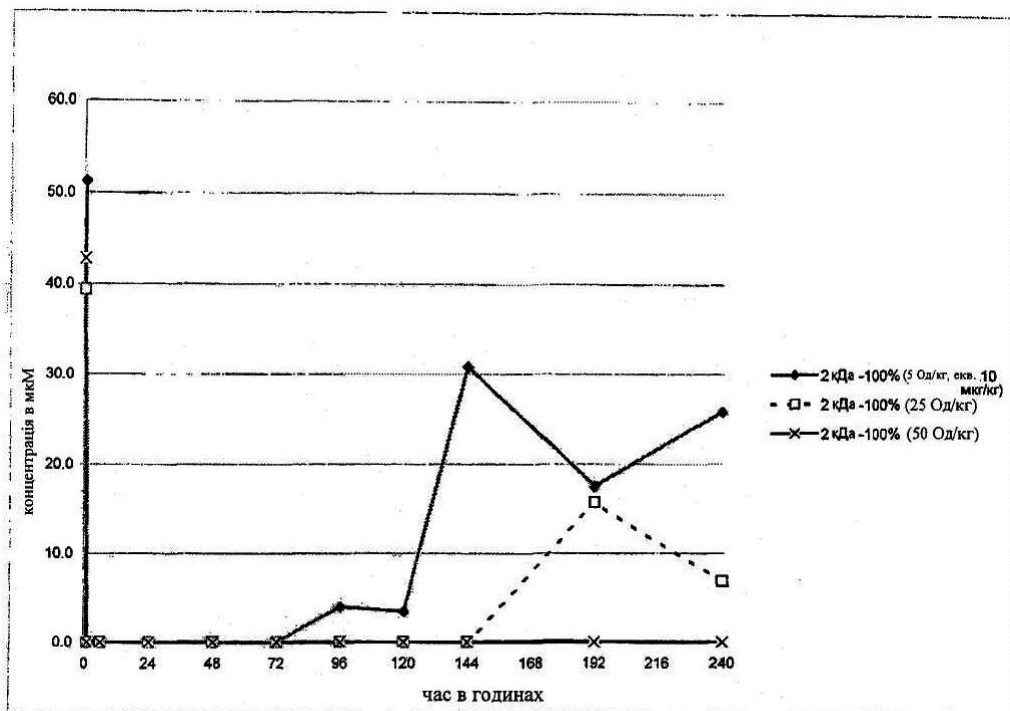
Фіг. 3



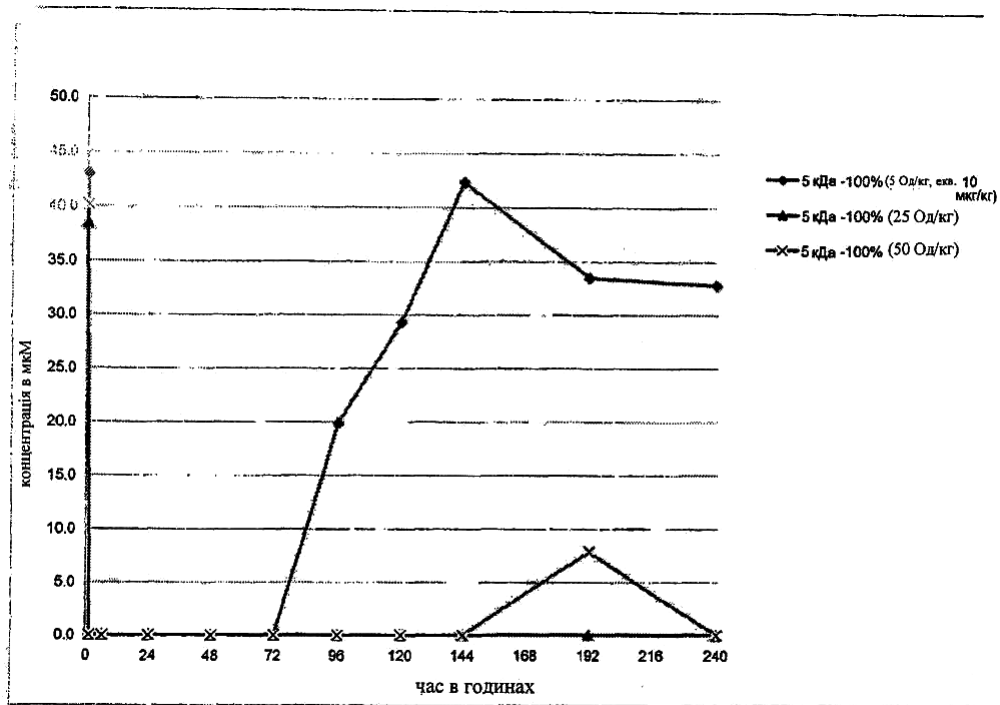
Фіг. 4



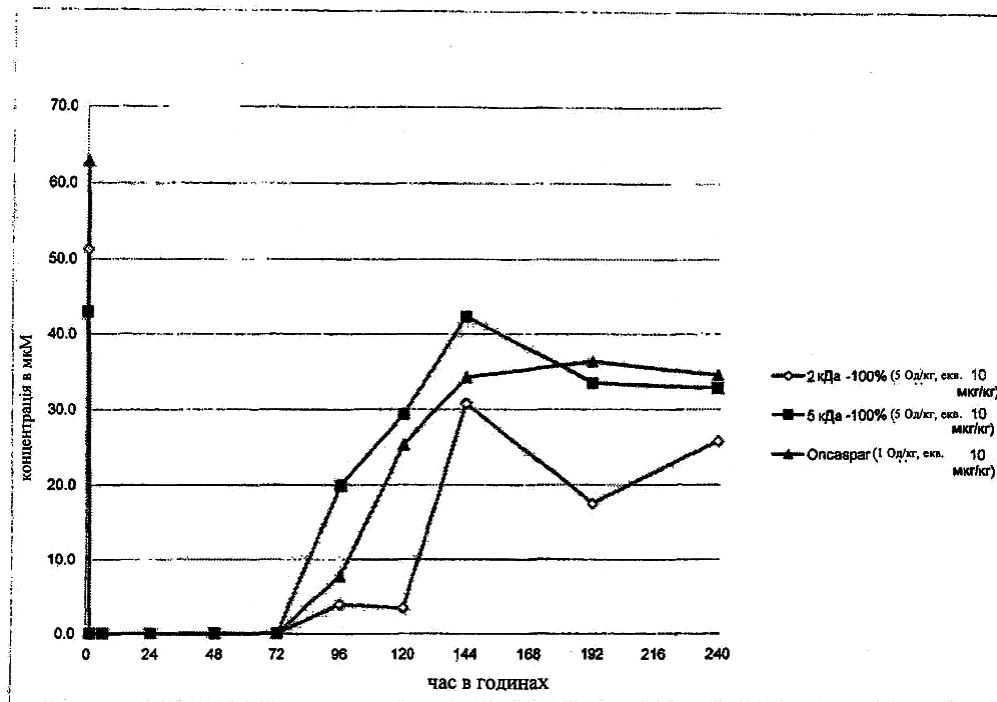
Фиг. 5



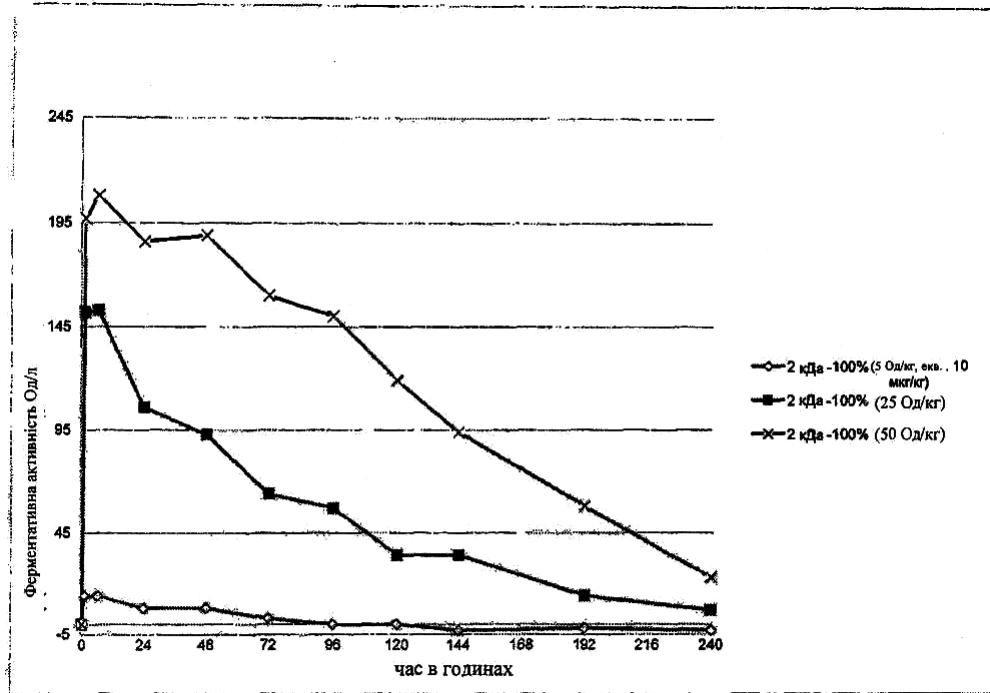
Фиг. 6А



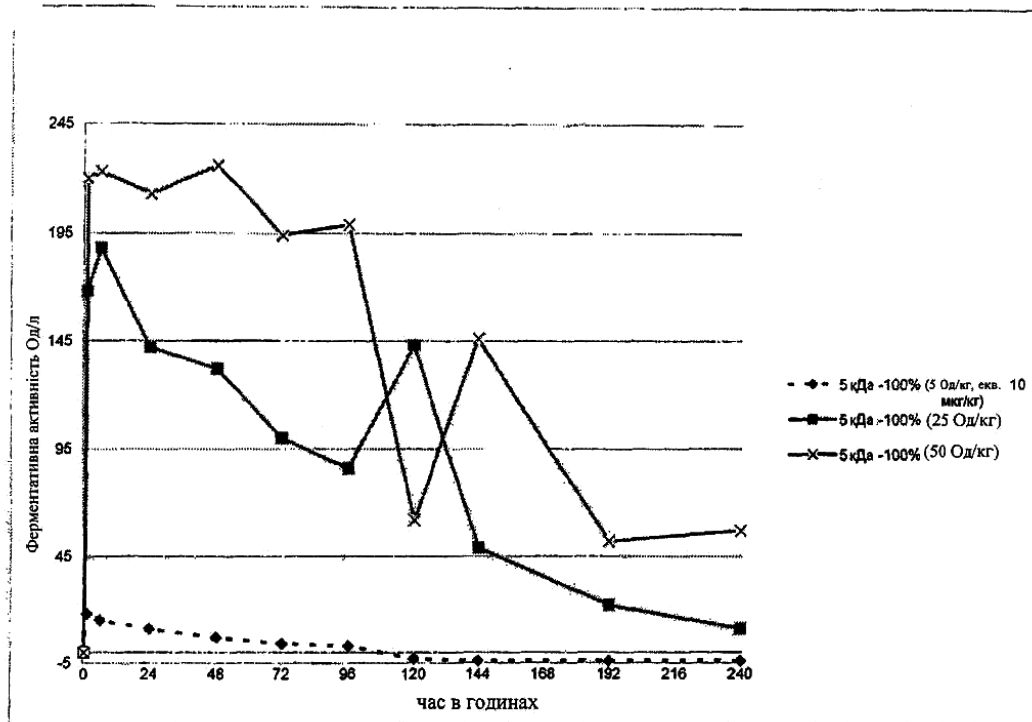
Фиг. 6В



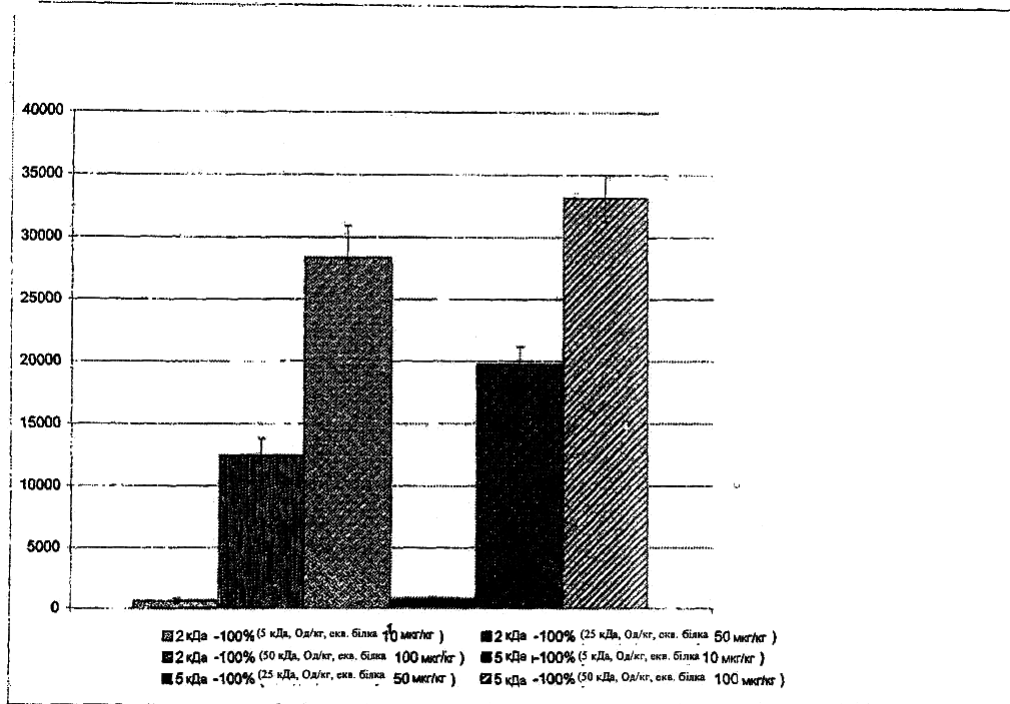
Фиг. 6С



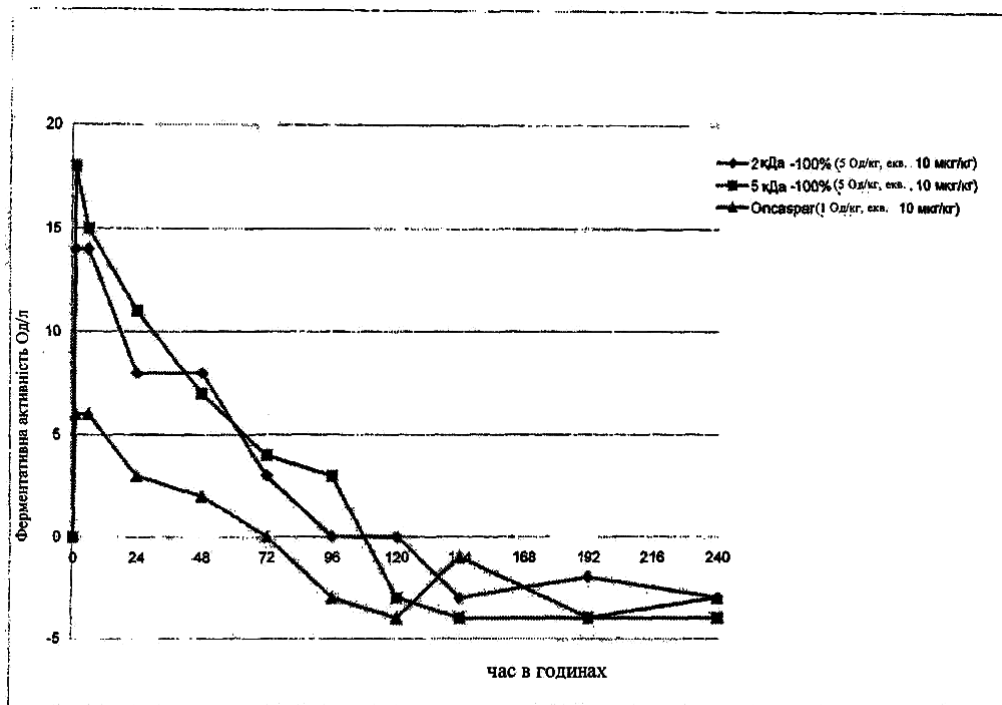
Фиг. 7А



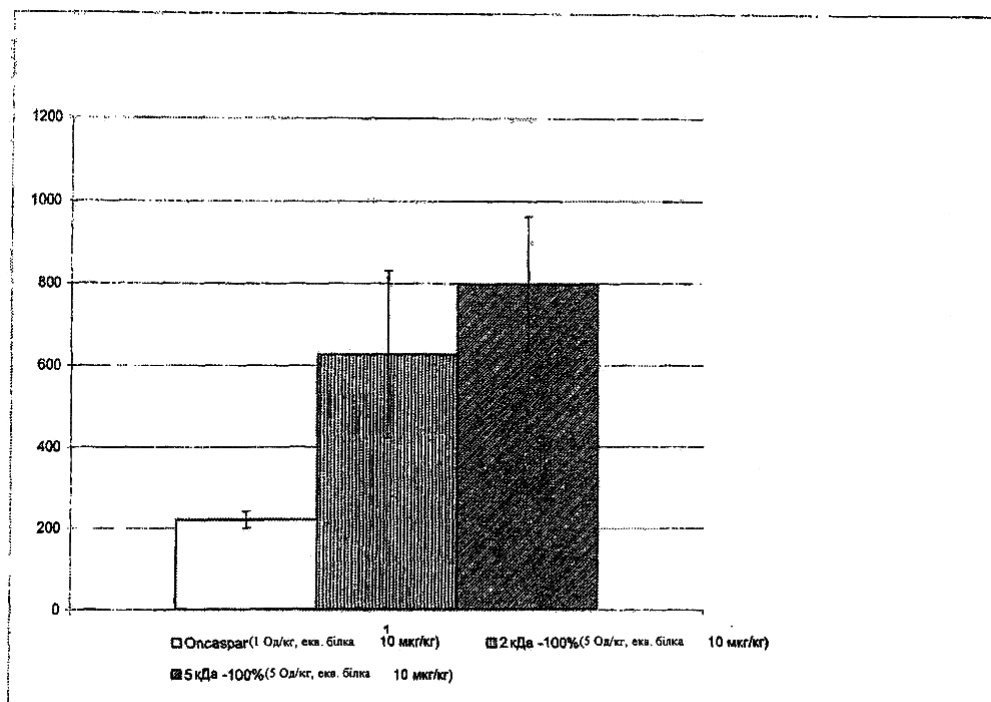
Фиг. 7В



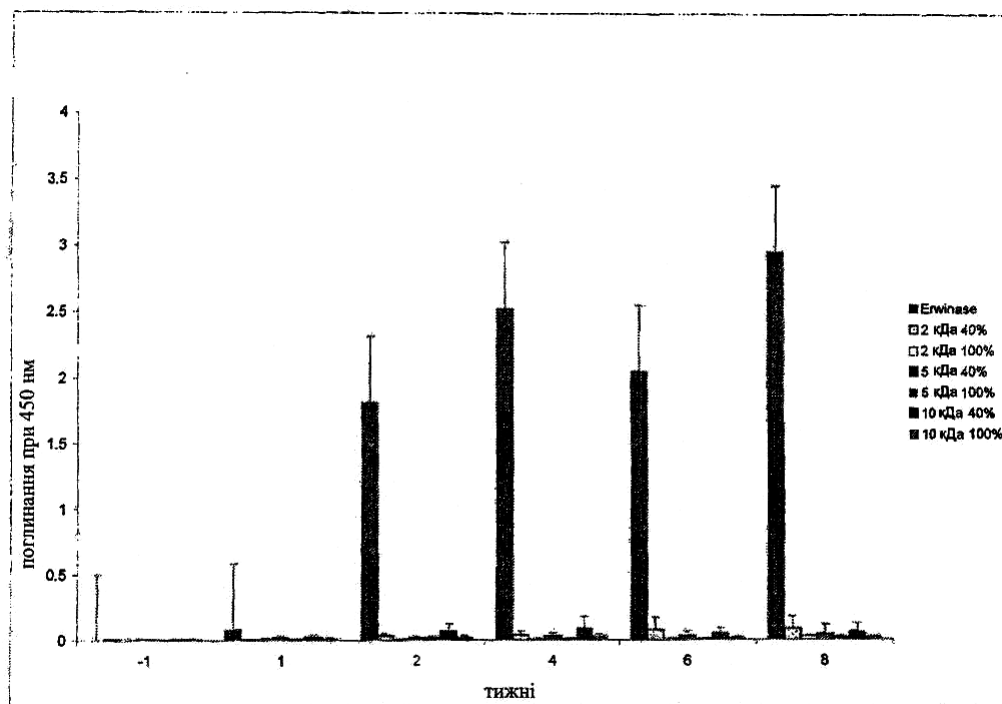
Фиг. 8



Фиг. 9А



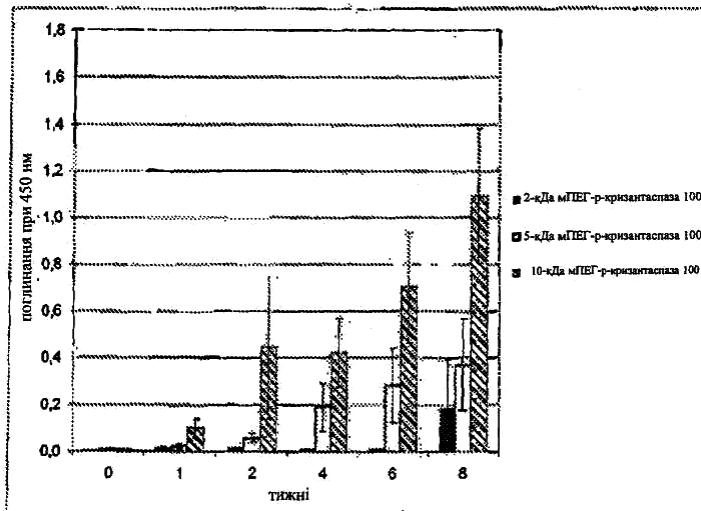
Фіг. 9В



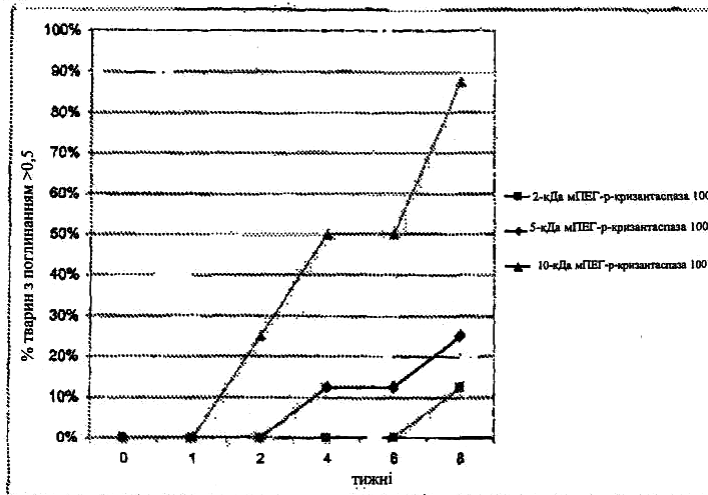
Фіг. 10



11A



11B



Фіг. 11

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601