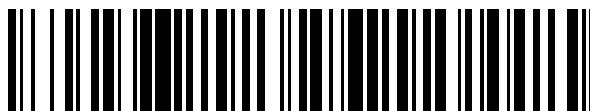


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 216**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2007 E 07725487 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2021032**

54 Título: **Arginina/lisina-óxidorreductasa modificada con PEG**

30 Prioridad:

26.05.2006 EP 06010824

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.07.2014

73 Titular/es:

**RUDEL, THOMAS (100.0%)
Hans-Löffler Strasse 32
97074 Würzburg , DE**

72 Inventor/es:

**HOFMANN, CHRISTIAN, J. y
LINDEMANN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 478 216 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Arginina/lisina-óxidorreductasa modificada con PEG

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una arginina/lisina-óxidorreductasa modificada con polietilenglicol.

5 Fundamento de la invención

Desde hace décadas se vienen realizando tremendos esfuerzos para recoger sustancias farmacológicamente activas de organismos naturales y analizar sus efectos en diversos campos de enfermedades.

10 La liebre de mar, *Aplysia punctata*, produce una tinta de color púrpura que la protege de sus predadores. Se había demostrado que esta tinta contenía una actividad antitumoral (Butzke et al.,). Posteriormente, se realizaron estudios para aislar el factor de la tinta en bruto, dando como resultado el descubrimiento de la toxina de *Aplysia Punctata*, abreviadamente en lo sucesivo APIT (por la expresión inglesa *Aplysia Punctata Ink Toxin*). Recientemente, el factor fue clonado y caracterizado siendo una L-aminoácido-oxidasas de unión a dinucleótido de flavina-adenina (FAD) débilmente glicosilada que cataliza la desaminación oxidante de L-lisina y L-arginina y produce por tanto peróxido de hidrógeno (H₂O₂), amonio (NH₄⁺) y los correspondientes alfa-cetoácidos (Butzke et al.,2005).

15 Las enzimas L-aminoácido-oxidasas (abreviadamente LAAO, EC 1.4.3.2) se pueden encontrar en secreciones y venenos. Los miembros de esta familia de flavoenzimas catalizan la desaminación oxidante estereoespecífica de L-aminoácidos y por tanto producen H₂O₂, amonio y los alfa-cetoácidos correspondientes (Du et al., 2002). Las enzimas LAAO individuales difieren en su especificidad de sustrato: las L-aminoácido-oxidasas de veneno de serpiente (abreviadamente sv-LAAO) que constituyen hasta el 30% (en peso) del veneno en bruto (Ponndurai et al., 2020) poseen una clara preferencia por los aminoácidos hidrófobos. Una LAAO en cápsulas de aceite de pescado denominada proteína inductora de la apoptosis (abreviadamente AIP por la expresión inglesa *Apoptosis Inducing Protein*) que es inducida por infección por larvas de nemátodos de *Scomber japonicus* es altamente específica para la L-lisina (Jung et al., 2000). La achacina una LAAO del moco del caracol africano *Achatina fulica*, metaboliza una gama muy amplia de sustratos, que incluyen aminoácidos hidrófobos junto con L-lisina, L-arginina, L-cisteína, L-asparagina y L-tirosina (Ehara et al., 2002).

En las L-aminoácido-oxidasas no se ha investigado su semivida después de la administración a mamíferos por ninguna vía. Sin embargo, en lo que respecta al desarrollo de fármacos éste es un aspecto importante y un requisito previo para ejercer eficazmente un efecto terapéutico. Los datos a este respecto, sólo están disponibles para un D-aminoácido-oxidasas que emplea D-prolina como sustrato (Fang et al., 2002). Después de la inyección intravenosa, la D-aminoácido-oxidasas natural fue, sin embargo, eliminada rápidamente de la circulación. Un derivado pegilado no produjo un aumento significativo del tiempo de semivida en circulación que estaba muy por debajo de 1 hora. Un producto con un corto tiempo de semivida en circulación no se puede esperar que tenga un beneficio terapéutico importante para terapia, por ejemplo, para la terapia del cáncer. Por lo tanto, de acuerdo con la enseñanza de la técnica anterior había esperar que las aminoácido-oxidasas pegiladas carecerían de eficacia terapéutica.

35 El documento de patente JP 2003 292457 A describe un agente antitumoral que contiene una D-aminoácido-oxidasas, tal como xantinoxidasas, con un polímero, tal como PEG, que se acumula en un tumor.

Sawa et al., (*Cancer Research* 2000; 60(3): 666-671) describen un conjugado de xantinoxidasas-polímero que genera radicales libres de oxígeno en un tejido tumoral.

40 La solicitud de patente EP0898968A1 describe un agente antitumoral que comprende un complejo de una óxidorreductasa y un polímero y un sustrato de la enzima, que tiene actividad citotóxica selectiva para tumores.

Lukasheva et al., (*Biochemistry* 2002; 67(10): 1394-1402) describe las propiedades físico-químicas y biológicas de L-lisina-alfa-oxidasas, que es una enzima obtenida del extracto del cultivo fúngico en salvado de trigo de *Trichoderma viride*.

45 Un objeto de la presente invención era aumentar la eficacia terapéutica de las L-aminoácidos-óxidorreductasas con el fin de proporcionar un producto terapéutico con características mejoradas.

Sumario de la invención

50 La presente invención aborda por primera vez una arginina/lisina-óxidorreductasa modificada con al menos un resto de polietilenglicol y composiciones farmacéuticas que comprenden dicha arginina/lisina-óxidorreductasa modificada, un método de producción de las mismas y métodos para el tratamiento de enfermedades sensibles a la modulación de los niveles de aminoácidos en plasma o/y sensibles a las especies con oxígeno reactivo o/y al amonio, por ejemplo enfermedades proliferantes.

En una realización preferida, una arginina/lisina-óxidorreductasa denominada toxina de la tinta de *Aplysia punctata*

(APIT) está modificada con al menos un resto de polietilenglicol que tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000.

5 Una realización adicional de la invención describe métodos de producción de una arginina/lisina-óxidoreductasa pegilada.

Una realización adicional describe un método para mejorar la actividad enzimática y el tiempo en circulación de una arginina/lisina-óxidoreductasa que comprende la pegilación de una arginina/lisina-óxidoreductasa.

10 Otra realización se refiere a un método para proteger una arginina/lisina-óxidoreductasa contra la inactivación por los fluidos corporales, que comprende la pegilación de una arginina/lisina-óxidoreductasa.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para agotar en un líquido los aminoácidos lisina o/y arginina, que comprende añadir al líquido una arginina/lisina-óxidoreductasa.

15 Incluso otra realización se refiere a un kit que comprende una arginina/lisina-óxidoreductasa de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

20 El objeto de la presente invención se logra modificando covalentemente las arginina/lisina-óxidoreductasas, en particular un conjugado que comprende una arginina/lisina-óxidoreductasa recombinante y al menos un resto de polietilenglicol, en donde la secuencia de aminoácidos de la L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa es la SEQ ID NO:8 y en donde al menos un resto de polietilenglicol tiene un peso molecular medio ponderal de 1.000 Dalton a 10.000 Dalton. La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que las arginina/lisina-óxidoreductasas modificadas con polietilenglicol circulan en el plasma de ratones durante más de 48 horas y retienen su actividad enzimática. En contraste, las arginina/lisina-óxidoreductasas sin modificar son activas en la circulación solamente durante aproximadamente 3 horas a la dosis basadas en actividades equivalentes.

Además, se encontró sorprendentemente que la dosificación de una arginina/lisina-óxidoreductasa modificada con PEG puede ser significativamente reducida en comparación con la arginina/lisina-óxidoreductasa no modificada.

30 Por otra parte, se encontró sorprendentemente que la arginina/lisina-óxidoreductasa modificada con PEG tiene un menor valor de la CI_{50} para la inhibición de células tumorales de pulmón que la arginina/lisina-óxidoreductasa no modificada.

35 Además, las arginina/lisina-óxidoreductasas modificadas con polietilenglicol proporcionan un medio único de disminuir los niveles de los aminoácidos lisina y arginina, produciendo con ello especies con oxígeno reactivo y amonio. Todos estos efectos o partes de ellos son suficientes para tratar ciertos tipos de trastornos. Cuando se compara con una arginina/lisina-óxidoreductasa natural, una arginina/lisina-óxidoreductasa pegilada retiene la mayoría de su actividad enzimática, es capaz de agotar la lisina y arginina en mamíferos durante 48 horas y más, y es mucho más eficaz en el tratamiento de enfermedades sensibles a una modificación de los niveles de aminoácidos y/o especies con oxígeno reactivo o amonio. Por otra parte, la arginina/lisina-óxidoreductasa pegilada es activa incluso en presencia de anticuerpos específicos dirigidos a la arginina/lisina-óxidoreductasa no modificada.

40 "Conjugado" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto que comprende una porción de polipéptido que incluye preferiblemente una coenzima, tal como FAD a la que se ha acoplado, por un enlace covalente, al menos un resto de polietilenglicol.

45 El conjugado de la presente invención puede comprender la L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa, que cataliza la conversión de L-arginina o/y L-lisina en el alfa-iminoácido respectivo. En esta etapa, la enzima produce H_2O_2 en cantidades estequiométricas. En una segunda etapa, el alfa-iminoácido se convierte en un alfa-cetoácido con liberación de amonio. La segunda etapa no es dependiente de la actividad de la arginina/lisina-óxidoreductasa. Detalles de la reacción catalizada por la arginina/lisina-óxidoreductasa se describen en el documento de patente WO 2004/ 065415.

50 De acuerdo con la presente invención, el conjugado comprende una arginina/lisina-óxidoreductasa que es una L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa.

55 En una realización preferida, el conjugado comprende una arginina/lisina-óxidoreductasa que es específica para arginina o/y lisina. En particular, la actividad enzimática para la transformación de lisina o/y arginina, en particular L-lisina o/y L-arginina, es al menos un factor de aproximadamente 3 o aproximadamente 4 mayor que la actividad enzimática para el tratamiento de otros aminoácidos, en particular de alfa- L-aminoácidos presentes de forma natural en los organismos.

Una arginina/lisina-óxidoreductasa puede obtenerse de una especie de *Aplysia*, en particular de *Aplysia punctata*. Por ejemplo, la toxina de tinta de *Aplysia Punctata* (APIT), que es una arginina/lisina-óxidoreductasa de la presente

invención, se puede encontrar en la tinta de la liebre de mar *Aplysia punctata*. Esta enzima y su fabricación se describen en el documento WO 2004/065415.

Además se describe una L-lisina- α -oxidasa en Lucasheva EV, Berezov TT. *L-Lysine alpha-oxidase: physiochemical and biological properties*. Biochemistry (Mosc.) 2002 Oct; 67(10):1152-8.

- 5 La L-arginina/L-lisina-óxidorreductasa es específicamente una molécula recombinante obtenida de una fuente recombinante, por ejemplo, una fuente de origen no natural. El conjugado comprende una L-arginina/L-lisina-óxidorreductasa recombinante.

Las SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8 difieren en varias posiciones de aminoácidos. La SEQ ID NO: 8 describe una arginina/lisina-óxidorreductasa preferida aislada de *Aplysia punctata* (véanse los ejemplos de la presente invención).
 10 Las SEQ ID NO: 2, 4 y 6 describen otras arginina/lisina-óxidorreductasas aisladas de *Aplysia punctata*. Las SEQ ID NO: 2, 4 y 6 se describen en el documento WO 2004/065415.

El conjugado de la presente invención es preferentemente activo en la circulación durante al menos 6 horas, es decir, el conjugado tiene preferiblemente un tiempo de circulación de al menos 6 horas. En el contexto de la presente invención, "tiempo de circulación" se refiere al tiempo en el que el conjugado de la presente invención
 15 retiene su actividad, en particular su actividad enzimática, durante la circulación en un sujeto. En la presente invención, el término "tiempo de circulación" se aplica también a otros compuestos para fines comparativos. Por ejemplo, "el tiempo de circulación" se aplica a la APIT sin modificar. El tiempo de circulación se puede expresar también por el tiempo de semivida en circulación.

El conjugado de la presente invención es más preferiblemente activo en la circulación durante al menos 12 horas,
 20 aún más preferiblemente al menos 24 horas, y lo más preferiblemente al menos 48 horas.

Se encontró sorprendentemente que la dosis del conjugado de la presente invención se puede reducir de manera significativa en comparación con la de la correspondiente arginina/lisina-óxidorreductasa no modificada. Por ejemplo,
 una cantidad de 0,6 unidades/kg de PEG-5000-APIT es capaz de agotar los niveles de lisina y arginina en el plasma
 25 sanguíneo en ratones durante 6 horas. La APIT no modificada requiere 1000 unidades/kg para lograr el mismo efecto. Por lo tanto la dosis de PEG-5000-APIT se puede reducir en un factor de aproximadamente 1667 en comparación con la APIT no pegilada. En otras palabras, la actividad de PEG-5000-APIT es un factor de aproximadamente 1667 mayor que la actividad de la APIT sin modificar.

Por lo tanto, en una realización preferida, la actividad del conjugado de la presente invención es un factor de al
 30 menos 30, preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 300, aún más preferiblemente al menos 1.000, más preferiblemente al menos 1500 mayor que la actividad de la arginina/lisina-óxidorreductasa que no lleva un resto de polietilenglicol. La actividad es en particular la actividad enzimática. Más particularmente, la actividad es la actividad enzimática en el plasma sanguíneo después de la administración a un sujeto, por ejemplo un mamífero, tal como un roedor o un ser humano. La actividad enzimática se puede determinar por determinación de la dosis
 35 necesaria para agotar la arginina o/y lisina en un líquido, por ejemplo un fluido corporal, tal como plasma sanguíneo, durante un periodo predeterminado de tiempo. El periodo de tiempo se puede seleccionar entre los intervalos de aproximadamente 3 a aproximadamente 48 horas, aproximadamente 6 a aproximadamente 24 horas o aproximadamente 12 a aproximadamente 18 horas, o puede ser preferiblemente de aproximadamente 3 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o aproximadamente 48 horas. La arginina o/y lisina pueden ser agotadas hasta un nivel predeterminado, por ejemplo 0 μ M. El nivel predeterminado
 40 se puede seleccionar de un intervalo de 0 μ M a aproximadamente 10 μ M, 0 μ M a 20 μ M o 0 μ M a aproximadamente 100 μ M.

El factor de mejora de la actividad se puede calcular, por ejemplo dividiendo la dosis de la arginina/lisina-óxidorreductasa no pegilada por la dosis del conjugado de la presente invención, siendo ambas dosis las requeridas para el agotamiento de arginina o/y lisina durante una periodo de tiempo predeterminado.

45 El conjugado de la presente invención comprende al menos un resto de polietilenglicol que tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 10.000 Dalton, preferiblemente de aproximadamente 3.000 Dalton a aproximadamente 8.000 Dalton, más preferiblemente de aproximadamente 4.000 Dalton a aproximadamente 6.000 Dalton, incluso más preferiblemente de aproximadamente 4.500 Dalton a aproximadamente 5.500 Dalton, y los más preferiblemente aproximadamente 5.000 Dalton.

50 El resto de polietilenglicol como se emplea en la presente invención, incluye restos de polietilenglicol no modificados y modificados adecuados para acoplar a los polipéptidos. Los restos de polietilenglicol modificados incluyen preferentemente restos de polietilenglicol modificados terminalmente, en los que ha sido modificados el grupo OH terminal, por ejemplo por alquilación, acilación y/u oxidación. Más preferiblemente, los restos de polietilenglicol tienen grupos OH terminales o grupos terminales modificados seleccionados de grupos O-alquilo de C₁₋₃ y grupos
 55 acilo o sus combinaciones.

Incluso en otra realización preferida, el conjugado comprende al menos un resto de polietilenglicol que está acoplado

covalentemente a la arginina/lisina-óxidorreductasa por medio de un grupo de unión. El grupo de unión puede ser un grupo succinimida, preferiblemente un grupo succinato de succinimidilo.

5 Todavía en otra realización preferida, el conjugado de la presente invención comprende de 1 a aproximadamente 30 restos de polietilenglicol, preferiblemente de 1a aproximadamente 20 restos de polietilenglicol, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 restos de polietilenglicol.

10 En el conjugado de la presente invención, el al menos grupo de polietilenglicol puede estar acoplado a cualquier aminoácido con una cadena lateral que lleve un grupo funcional reactivo, tal como un grupo carboxilato, un grupo amino, un grupo tiol y/o un grupo hidroxilo, por ejemplo un aminoácido seleccionado de aspartato, glutamato o/y lisina. Una realización preferida se refiere a un conjugado en el que al menos un resto de polietilenglicol está acoplado por medio de un residuo de lisina a la arginina/lisina-óxidorreductasa. Puesto que la SEQ ID NO: 8 comprende 23 residuos de lisina, un conjugado de la presente invención que comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 puede comprender hasta 23 restos de polietilenglicol, preferiblemente hasta aproximadamente 10 restos de polietilenglicol acoplado por medio de un residuo de lisina.

15 Es más preferido que en el conjugado de la presente invención, el al menos un grupo polietilenglicol está acoplado a la lisina por medio de un grupo enlazador, por ejemplo un grupo enlazador de succinimida o cualquier otro grupo enlazador adecuado para el acoplamiento a grupos amino. Es incluso más preferido que en el conjugado de la presente invención, al menos un grupo de polietilenglicol tenga un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 5.500 Dalton y esté acoplado a la lisina por medio de un grupo enlazador, por ejemplo un grupo enlazador de succinimida.

20 El más preferido es un conjugado que comprende una L-arginina/L-lisina-óxidorreductasa que comprende la SEQ ID NO: 8 y al menos un grupo polietilenglicol que tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 4.500 a 5.500 Dalton.

Incluso otro aspecto es un método para producir el conjugado de la presente invención, que comprende las etapas:

- (a) expresar recombinantemente una L-arginina/L-lisina-óxidorreductasa, y
25 (b) acoplar el al menos un resto de polietilenglicol a la L-arginina/L-lisina-óxidorreductasa de (a).

Fuentes naturales alternativas de una arginina/lisina-óxidorreductasa que pueden emplearse en la etapa (a) son como las descritas anteriormente.

La etapa (a) comprende preferiblemente una expresión recombinante de un ácido nucleico que comprende la secuencia SEQ ID NO:7.

30 La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO:8. Las SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7 difieren en varias posiciones de nucleótidos. La SEQ ID NO: 7 describe la secuencia de nucleótidos que codifica una arginina/lisina-óxidorreductasa aislada de *Aplysia punctata* (véanse los ejemplos de la presente invención). Las SEQ ID NO: 1, 3 y 5 describen otras secuencias de nucleótidos que codifican otras arginina/lisina-óxidorreductasas aisladas de *Aplysia punctata*. Las SEQ ID NO: 1,3 y 5 se describen
35 en el documento de patente WO 2004/065415.

40 Los expertos en la técnica conocen métodos para la expresión recombinante de una proteína, el aislamiento, el plegamiento y la introducción de grupos prostéticos, tal como FAD. En los ejemplos de la presente invención se describe la expresión recombinante de la SEQ ID NO: 7 con el fin de obtener un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 8. Las células hospedantes preferidas para la expresión recombinante son células hospedantes procarióticas o eucarióticas, por ejemplo células de levadura o células bacterianas, particularmente células bacterianas Gram-negativas, tal como E. coli.

El método para la preparación del conjugado de la presente invención puede comprender además la introducción de una coenzima, tal como FAD en la arginina/lisina-óxidorreductasa.

45 La etapa (b) del método para la preparación del conjugado de la presente invención se refiere al acoplamiento de al menos resto de polietilenglicol a la arginina/lisina-óxidorreductasa obtenida en la etapa (a). La pegilación en la etapa (b) puede llevarse a cabo mediante procedimientos estándares conocidos por los expertos en la técnica.

50 En la etapa (b), se puede emplear un polietilenglicol que tenga un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 10.000 Dalton, preferiblemente de aproximadamente 3.000 Dalton a aproximadamente 8.000 Dalton, más preferiblemente de aproximadamente 4.000 Dalton a aproximadamente 6.000 Dalton, aún más preferiblemente de aproximadamente de 4.500 Dalton a aproximadamente 5.500 Dalton, más preferiblemente de aproximadamente 5.000 Dalton.

El resto de polietilenglicol puede estar unido covalentemente por medio de un grupo de unión, que puede ser un grupo succinimida, preferiblemente un succinato de succinimidilo. También se pueden emplear otros grupos de

unión. Los expertos en la técnica conocen grupos de unión adecuados.

Se prefiere que el al menos un resto de polietilenglicol esté acoplado a por medio de un residuo de lisina a la arginina/lisina-óxidorreductasa. El acoplamiento a la lisina se puede realizar por aplicación de un grupo enlazador de succinimida. El acoplamiento también se puede realizar a otras cadenas laterales de aminoácidos que lleven un grupo funcional, tal como un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo tiol o/y un grupo hidroxilo, tal como aspartato o glutamato.

Con el fin de proporcionar un conjugado de la presente invención que comprenda de 1 a aproximadamente 30 restos de polietilenglicol, preferiblemente de 1 a aproximadamente 20 restos de polietilenglicol, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 restos de polietilenglicol, se puede emplear en la etapa (b) un exceso de polietilenglicol. El polietilenglicol puede ser proporcionado en una cantidad desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 500 equivalentes, preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 equivalentes con respecto al número de residuos libres disponibles para el acoplamiento, por ejemplo el número de residuos de lisina libres. En particular, se pueden emplear aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 200 o aproximadamente 500 equivalentes de polietilenglicol. Un exceso de 50 equivalentes puede dar como resultado un acoplamiento de aproximadamente 10 moléculas de PEG por molécula de arginina/lisina-óxidorreductasa.

Incluso otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la presente invención opcionalmente junto con vehículos, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser adecuada para la prevención, alivio o/y tratamiento de una enfermedad sensible a las especies con oxígeno reactivo, o/y amonio, o/y sensibles a la modulación de los niveles de aminoácidos en plasma, en particular de los niveles en plasma de lisina o/y arginina. La composición farmacéutica de la presente invención también puede ser adecuada para la prevención, alivio o/y tratamiento de enfermedades proliferantes, tal como cáncer.

La composición farmacéutica de la presente invención es adecuada para el tratamiento de tumores sólidos y leucemias en general, incluyendo las formas de cáncer resistentes a la apoptosis y resistentes a multifármacos.

La enfermedad proliferante que se ha de tratar con la composición farmacéutica de la presente invención puede ser cáncer de pulmón, cáncer de pulmón MDR, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de laringe, cáncer gástrico, cáncer de hígado, sarcoma de Ewings, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda y crónica, leucemia resistente a la apoptosis, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, gliomas, melanomas, leucemia linfocítica crónica o/y linfoma.

Incluso otro aspecto es un método para la prevención, alivio o/y tratamiento de una enfermedad sensible a especies con oxígeno reactivo, a amonio o/y sensibles a la modulación de los niveles de aminoácidos en fluidos corporales, en particular niveles en plasma de lisina o/y de arginina, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz del conjugado de la presente invención o/y una composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que lo necesite. La enfermedad que se ha de tratar por el método es en particular una enfermedad proliferante como se ha definido anteriormente.

Incluso otro aspecto de la presente invención es un kit que comprende el conjugado de la presente invención o/y la composición farmacéutica de la presente invención.

Un aspecto adicional se refiere a un método para mejorar la actividad enzimática o/y el tiempo de circulación de una arginina/lisina-óxidorreductasa, comprendiendo dicho método acoplar al menos un resto de polietilenglicol a la arginina/lisina-óxidorreductasa. En este método, la arginina/lisina-óxidorreductasa puede ser en particular la arginina/lisina-óxidorreductasa, tal como se define en la presente memoria. El resto de polietilenglicol puede ser como se define en la presente memoria.

Incluso otro aspecto es un método para proteger una arginina/lisina-óxidorreductasa contra su inactivación en fluidos corporales, tales como plasma sanguíneo, que comprende acoplar al menos un resto de polietilenglicol a la arginina/lisina-óxidorreductasa. En este método, la arginina/lisina-óxidorreductasa puede ser en particular la arginina/lisina-óxidorreductasa, tal como se define en la presente memoria. El resto de polietilenglicol puede ser como se define en la presente memoria. En particular, la inactivación en los fluidos corporales puede ser la inactivación por anticuerpos.

Un grupo PEG, en particular un grupo PEG como se describe en la presente memoria, se puede utilizar para mejorar la actividad enzimática o/y el tiempo de circulación de una arginina/lisina-óxidorreductasa, en particular de una arginina/lisina-óxidorreductasa, tal como se define en la presente memoria.

Un grupo PEG, en particular un grupo PEG como se describe en la presente memoria, se puede utilizar para proteger una arginina/lisina-óxidorreductasa, en particular una arginina/lisina-óxidorreductasa, tal como se define en

la presente memoria contra la inactivación en fluidos corporales, tal como plasma sanguíneo, en particular por anticuerpos.

- 5 El conjugado de la presente invención como se define en la presente memoria o/y la composición farmacéutica de la presente invención como se define en la presente memoria se pueden utilizar para el agotamiento de lisina o/y arginina en un líquido o/y para la producción en un líquido de peróxido de hidrógeno, amonio o/y metabolitos de lisina o/y arginina El líquido puede ser en particular un fluido corporal de un mamífero.

La invención se demuestra adicionalmente en los siguientes ejemplos y figuras de los dibujos, que tienen fines ilustrativos, y no tienen la intención de limitar el alcance de la presente invención.

10 **Leyendas de las figuras de los dibujos**

Figura 1: Secuencia primaria de aminoácidos de la arginina/lisina-óxidorreductasa, APIT (SEQ ID NO: 8) y una secuencia de nucleótidos que la codifica (SEQ ID NO:7).

Figura 2: Pegilación de la arginina/lisina-óxidorreductasa, APIT con PEG-5000.

Figura 3: Actividad de PEG-5000-APIT en presencia de anticuerpos policlonales anti-APIT.

- 15 Figura 4: Efecto de una sola dosis intravenosa de APIT (250 U/kg) y APIT (1.000 U/kg) sobre los niveles de lisina en plasma en ratones.

Figura 5: Efecto de una sola dosis intravenosa de APIT (250 U/kg) y APIT (1.000 U/kg) sobre los niveles de arginina en plasma en ratones.

- 20 Figura 6: Comparación de una sola dosis intravenosa de APIT (250 U/kg) y PEG-5000-APIT a una dosis equivalente de 250 U/kg sobre los niveles de lisina en plasma en ratones.

Figura 7: Comparación de una sola dosis intravenosa de APIT (250 U/kg) y PEG-5000-APIT a una dosis equivalente de 250 U/kg sobre los niveles de arginina en plasma en ratones.

Figura 8: Agotamiento dependiente de la dosis de los niveles de lisina en plasma después de una sola administración intravenosa a ratones de PEG-5000-APIT.

- 25 Figura 9: Agotamiento dependiente de la dosis de los niveles de arginina en plasma después de una sola administración intravenosa a ratones de PEG -5000-APIT.

Figura 10: Eficacia antitumoral de PEG-5000-APIT.

- 30 Figura 11: Secuencias de nucleótidos de cDNA que codifican las arginina/lisina-óxidorreductasas aisladas de la tinta de *Aplysia punctata* (SEQ ID NO: 1, 3 y 5) y las secuencias de aminoácidos derivadas (SEQ ID NO: 2, 4 y 6). El pliegue de unión de dinucleótidos (28 residuos de aminoácidos) y el resto GG (8 residuos de aminoácidos) se indican por recuadros.

Ejemplos

Ejemplo 1

Método de producción a granel de arginina/lisina-óxidorreductasa recombinante, APIT en *E. coli*

- 35 Se inocula un fermentador B-Braun Biostat B10 con 5.000 mL de medio con un cultivo iniciador de células de trabajo que contienen el cDNA de APIT que comprende la SEQ ID NO: 7 bajo el control de un promotor adecuado (por ejemplo, T7). Las células se cultivan hasta una densidad óptica de 6-8 (a 600 nm) a 37±0,5°C. Posteriormente, las células son inducidas por la adición de IPTG y fermentadas adicionalmente durante 3 horas más a 37±0,5°C.
- 40 Después, las células se recogen por centrifugación y se conservan a ≤ -60°C. Las células puestas de nuevo en suspensión se rompen usando una prensa francesa y los cuerpos de inclusión se separan del líquido sobrenadante por centrifugación. Los cuerpos de inclusión se conservan hasta su posterior procesamiento a ≤ -60°C. La APIT se aísla con urea de los cuerpos de inclusión de la biomasa de *E. coli*. A continuación se vuelve a plegar la proteína solubilizada, se concentra y se desala por filtración con flujo cruzado tangencial (abreviadamente TFF por la expresión inglesa *Tagential Crossflow Filtration*). Posteriormente, la APIT se purifica por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaños (abreviadamente SEC, por la expresión inglesa *Size Exclusion Chromatography*).
- 45

Aislamiento de APIT de los cuerpos de inclusión:

El sedimento se vuelve a poner en suspensión dos veces sucesivas en tampón de lavado, tampón de lavado-NaCl y tampón de lavado-urea. La suspensión se centrifuga después de cada etapa de nueva puesta en suspensión,

mientras que se desecha el líquido restante. Después, se vuelve a poner en suspensión el sedimento en tampón de re suspensión seguido de una etapa de centrifugación final. El líquido sobrenadante se filtra por un filtro de 0,2 µm de abertura de poros y la solución (que contiene APIT) se conserva congelada a < -15°C.

- 5 Replegamiento: Esta etapa del proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente (22-25°C). 200 mL de la APIT aislada de *E.coli* (en tampón de resuspensión) se mezclan con 200 mL de guanidina.HCl. Esta mezcla se inyecta en 20 L de tampón de replegamiento que contiene L-arginina y FAD, usando una bomba. La etapa de mezcla/dilución es soportada por un agitador magnético (a la máxima actividad). La dilución se realiza por 4 sitios de inyección.

Purificación por TFF:

- 10 La mezcla de replegamiento (RF) se filtra usando TFF (0,2 µm) para separar la proteína no plegada. A continuación, el sistema se lava con 1,6 L de tampón Tris. La APIT se concentra usando una membrana de 10 kDa. Después, el tampón de RF se dializa contra el tampón Tris. Durante esta etapa, se mide la conductividad de la mezcla de RF y la mezcla tamponada con Tris. Se mantiene la membrana de 10 kDa para cambiar el tampón y continuar la etapa de concentración. El nivel de disminución de la conductividad en la solución de APIT concentrada indica la duración del método.

- 15 Cromatografía de cambio aniónico:

La muestra que contiene la APIT se purifica adicionalmente por cromatografía de cambio aniónico (columna SOURCE 30Q). La elución del producto de la columna se realiza usando un gradiente de sal (NaCl 0-500 mM) a pH 8,0. El eluato se recoge en fracciones.

Cromatografía de exclusión por tamaños:

- 20 La muestra que contiene APIT se desala usando una cromatografía de exclusión por tamaños (Sephadex G25). La purificación se realiza con D-PBS. El producto eluido se recoge en fracciones.

Carga y conservación:

La carga del producto a granel se hace en recipientes de polietileno (PE) estériles a un volumen 1.000 µL y se conserva a 2-8°C. La secuencia primaria de aminoácidos de la APIT recombinante se muestra en la Figura 1.

25 Ejemplo 2

Pegilación de arginina/lisina-óxidorreductasa, APIT con PEG-5.000.

- La arginina/lisina-óxidorreductasa purificada, APIT del Ejemplo 1 se desaló con la columna *HiPrep Desalting 26/10* y se llevó a un tampón de reacción de pegilación que contenía bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,5. Las reacciones de pegilación se realizaron añadiendo un éster succinimidílico de polietilenglicol polidisperso lineal, de peso molecular 5000 Da (PEG-5000-SS) en relaciones variables de PEG-5000-SS a arginina/lisina-óxidorreductasa (basándose en los residuos de lisina libres de la APIT) desde 10 a 50 equivalentes (eq.) y agitando durante 1 hora a 800 rpm y 25°C. Las variantes de arginina/lisina-óxidorreductasas conjugadas con PEG, PEG-5000-APIT (10 eq), PEG-5000-APIT (20 eq), PEG-5000-APIT (40 eq), PEG-5000-APIT (50 eq) se purificaron individualmente por filtración en gel de los productos de reacción y el reactivo de PEG no conjugado y el tampón se sometieron a intercambio con solución salina tamponada con fosfato, (pH 7). Los productos finales se analizaron por SDS-PAGE y se determinó su actividad enzimática (Figura 2). Un exceso de 50 eq. de PEG dio como resultado el acoplamiento de aproximadamente 10 moléculas de PEG a una molécula de APIT.

- La Figura 2 muestra que las PEG-5000-APIT tenían un peso molecular aparente que variaba de 60 kDa a >212 kDa. Todas las variantes de PEG-5000-APIT eran enzimáticamente activas en comparación con la APIT no conjugada. Las actividades enzimáticas relativas de PEG-5000-APIT (10 eq), PEG-5000-APIT (20 eq), PEG-5000-APIT (40 eq), PEG-5000-APIT (50 eq) variaban desde 58% hasta 72%.

Ejemplo 3

Actividad en presencia de anticuerpos policlonales anti-APIT.

- Se produjo en conejos un suero de anticuerpos policlonales contra APIT de alto título (> 1:200.000). Con el fin de investigar si PEG-5000-APIT es inactivada por anticuerpos contra APIT, se incubaron suero de conejo pre-inmunitario y suero de conejo inmunitario anti-APIT con PEG-5000-APIT durante 1 hora a 37°C, seguido por el análisis de los niveles de los aminoácidos lisina y arginina. La Figura 3 muestra que los niveles de lisina y arginina en suero de conejo pre-inmunitario y suero de conejo inmunitario anti-APIT eran normales (lisina: 238 µM y 265 µM respectivamente; arginina 207 µM y 179 µM respectivamente). La incubación con PEG-5000-APIT dio como resultado niveles de lisina y arginina de 0 µM tanto en el suero de conejo pre-inmunitario como en el suero de conejo inmunitario anti-APIT, demostrando que PEG-5000- APIT es enzimáticamente activa en presencia de anticuerpos policlonales anti-APIT y permite el agotamiento completo de lisina y arginina en líquidos.

Ejemplo 4**Aplicación a ratones**

Los ratones recibieron una sola administración intravenosa (en la vena de la cola) de APIT no conjugada (250 U/kg o 1000 U/kg) o PEG-5000-APIT (250 U/kg, 79 U/kg, 11 U/kg, 2 U/kg, 0,6 U/kg) o D-PBS (vehículo de control) respectivamente. De cada animal se recogieron por el seno orbital muestras de sangre en serie bajo esterización a un tiempo anterior a la dosis de 1 hora y después de las dosis en los momentos de tiempo indicados y se transfirieron a tubos que contenían anticoagulante (heparina). Cada muestra de sangre se centrifugó a 4°C para preparar plasma para el análisis de los niveles de aminoácidos en plasma.

Para el análisis de aminoácidos, se mezclaron 25 µL de muestras de plasma que contenían heparina con 4 µL de tampón de precipitación que contenía ácido sulfosalicílico. Luego se añadieron 6 µL de tampón de dilución de muestras que contenía el patrón interno norleucina (Nle, c: 1 nmol/µL) y las muestras se completaron hasta un volumen final de 60 µL con tampón de dilución de muestras. Después, las muestras se mezclaron (con vórtice) y se centrifugaron. Los líquidos sobrenadantes se pasaron a través de un filtro de centrifuga para centrifugación. El material centrifugado se transfirió a un vial de muestra y se analizó con el analizador de aminoácidos A200 usando un programa fisiológico.

La Figura 4 y la Figura 5 muestran el efecto de la APIT a una sola dosis intravenosa de 250 U/kg y 1000 U/kg en ratones sobre los niveles en plasma de arginina o los niveles en plasma de lisina, respectivamente. Un aumento de 4 veces en la dosis APIT desde 250 U/kg hasta 1000 U/kg da como resultado una prolongación del agotamiento de lisina o arginina desde 3 horas hasta 6 horas después de la dosis.

Las Figuras 6 y 7 muestran una comparación directa del efecto de APIT no conjugada y de PEG-5000-APIT en una sola dosis intravenosa de 250 U/kg. Mientras que la APIT no conjugada media el agotamiento de lisina (Figura 6) y de arginina (Figura 7) sólo 3 horas después de la dosis, la PEG-5000-APIT agota ambos aminoácidos durante al menos 48 horas después de la dosis.

Los niveles plasmáticos de lisina y arginina después de una sola administración intravenosa de diferentes dosis de PEG-5000- APIT a ratones se muestran en la Figura 8 y la Figura 9, respectivamente.

La Figura 8 demuestra que en ratones una sola dosis intravenosa de 11 unidades/kg o 25 U/kg o 79 U/kg de PEG-5000-APIT agota completamente los niveles de lisina en plasma. Una dosis de 0,6 U/kg o 2 U/kg todavía media un agotamiento completo de la lisina en ratones durante 6 horas, que es el efecto de 1000 U/kg de APIT no conjugada. La Figura 9 demuestra que en ratones una sola dosis intravenosa de 79 unidades/kg de PEG-5000-APIT agota completamente los niveles de arginina en plasma. En ratones, una dosis de 25 U/kg u 11 U/kg media un agotamiento completo de arginina durante 24 horas. En ratones, una dosis de 0,6 U/kg o 2 U/kg todavía media un agotamiento completo de arginina durante 6 horas, que es el efecto de 1000 U/kg de APIT no conjugada.

Tomados en conjunto, estos hallazgos inesperados demostrados en las Figuras 8 y 9, significan que menos del 0,1 % de PEG-5000-APIT con relación a dosis de APIT no conjugada media efectos equivalentes en los niveles de lisina y de arginina en mamíferos.

Ejemplo 5**Eficacia antitumoral de PEG-5000-APIT.**

La eficacia antitumoral de PEG-5000-APIT se determinó por comparación con APIT no conjugada sobre células de cáncer de pulmón A549 por el ensayo MTT. El ensayo MTT se basa en la escisión de la sal de tetrazolio amarilla MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio] por células metabólicamente activas para dar cristales de formazán de color púrpura. Las células tumorales se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas antes de la adición de la APIT o PEG-5000-APIT durante otras 96 horas. Después del tratamiento, se añadieron a cada pocillo 20 µL de reactivo marcador MTT y las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas. Después de la incubación con MTT, se incubaron los cultivos con DMSO y se detectó la absorbancia espectrofotométrica de las muestras usando un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de 550 nm. A continuación, el resultado se representó gráficamente frente a la concentración de sustancia de ensayo para obtener una curva de dosis-respuesta. Se determinó gráficamente la concentración de la sustancia de ensayo que conduce a una inhibición del 50% (CI₅₀) de la actividad metabólica y se muestra en la Figura 10 para la APIT no conjugada o para PEG-5000-API. Inesperadamente, la CI₅₀ de PEG-5000-APIT era menor (633 µU/mL) que la CI₅₀ con APIT no conjugada (717 µU/mL) en células A549, lo que indica un efecto antitumoral superior de la PEG-5000-APIT en comparación con el efecto de la APIT no conjugada.

Referencias bibliográficas

Butzke, D., Machuy,N., Thiede,B., Hurwitz,R., Goedert,S., & Rudel,T. (2004) Hydrogen peroxide produced by Aplysia ink toxin kills tumor cells independent of apoptosis via peroxiredoxin I sensitive pathways. *Cell Death. Differ.*, 11, 608-617.

Butzke, D. Hurwitz,R., Thiede,B., Goedert,S., and Rudel,T. (2005) Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. *Toxicon*, 46, 479-489.

Du,X.Y. & Clemetson,K.J. (2002) Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, 40, 659-665.

Ponnudurai,G., Chung,M.C., & Tan,N.H. (1994) Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 313, 373-378.

Jung,S.K., Mai,A., Iwamoto,M., Arizono,N., Fujimoto,D., Sakamaki,K., & Yonehara,S.(2000) Purification and cloning of an apoptosis-inducing protein derived from fish infected with *Anisakis simplex*, a causative nematode of human anisakiasis. *J. Immunol.*, 165, 1491-1497.

Ehara,T., Kitajima,S., Kanzawa,N., Tamiya,T., & Tsuchiya,T. (2002) Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS Lett.*, 531, 509-512.

Fang J, Sawa T, Akaike T, Maeda H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res.* 2002 Jun 1;62 (11):3138-43.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> APIT Laboratories GmbH	
	<120> Arginina/lisina-óxidorreductasa modificada con PEG	
	<130> 38057P EP	
10	<160> 8	
	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
15	<211> 1608	
	<212> DNA	
	<213> Aplysia punctata	
	<220>	
20	<221> CDS	
	<222> (1)..(1608)	
	<400> 1	
	atg tcg tct gct gtg ctt ctc ctg gct tgt gcg ttg gtc atc tct gtc	48
	Met Ser Ser Ala Val Leu Leu Leu Ala Cys Ala Leu Val Ile Ser Val	
	1 5 10 15	
	cac gcc gac ggt atc tgc aga aac aga cgt caa tgt aac aga gag gtg	96
	His Ala Asp Gly Ile Cys Arg Asn Arg Arg Gln Cys Asn Arg Glu Val	
	20 25 30	
	tgc ggt tct acc tac gat gtg gcc gtc gtg ggg gcg ggg cct ggg gga	144
	Cys Gly Ser Thr Tyr Asp Val Ala Val Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly	
	35 40 45	
	gct aac tcc gcc tac atg ctg agg gac tcc ggc ctg gac atc gct gtg	192
	Ala Asn Ser Ala Tyr Met Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ala Val	
	50 55 60	
	ttc gag tac tcg gac cga gtg ggc ggc cgg ctg ttc acc tac cag ctg	240
	Phe Glu Tyr Ser Asp Arg Val Gly Gly Arg Leu Phe Thr Tyr Gln Leu	
	65 70 75 80	
	ccc aac aca ccc gac gtt aac ctg gag att ggc ggc atg agg ttc atc	288
	Pro Asn Thr Pro Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Gly Met Arg Phe Ile	
	85 90 95	
	gaa ggc gcc atg cac agg ctc tgg agg gtc att tca gaa ctc ggc cta	336
	Glu Gly Ala Met His Arg Leu Trp Arg Val Ile Ser Glu Leu Gly Leu	
	100 105 110	
	acc ccc aag gtg ttc aag gaa ggt ttc ggc aag gag ggc aga caa aga	384
	Thr Pro Lys Val Phe Lys Glu Gly Phe Gly Lys Glu Gly Arg Gln Arg	
	115 120 125	
	ttt tac ctg cgg gga cag agc ctg acc aag aaa cag gtc aag agt ggg	432
	Phe Tyr Leu Arg Gly Gln Ser Leu Thr Lys Lys Gln Val Lys Ser Gly	
	130 135 140	

25

ES 2 478 216 T3

gac gta ccc tat gac ctc agc ccg gag gag aaa gaa aac cag gga aat	480
Asp Val Pro Tyr Asp Leu Ser Pro Glu Glu Lys Glu Asn Gln Gly Asn	
145 150 155 160	
ctg gtc gaa tac tac ctg gag aaa ctg aca ggt cta caa ctc aac ggc	528
Leu Val Glu Tyr Tyr Leu Glu Lys Leu Thr Gly Leu Gln Leu Asn Gly	
165 170 175	
gag ccg ctc aaa cgt gag gtt gcg ctt aaa cta acc gtg ccg gac ggc	576
Glu Pro Leu Lys Arg Glu Val Ala Leu Lys Leu Thr Val Pro Asp Gly	
180 185 190	
aga ttc ctc tat gac ctc tcg ttt gac gaa gcc atg gat ctg gtt gcc	624
Arg Phe Leu Tyr Asp Leu Ser Phe Asp Glu Ala Met Asp Leu Val Ala	
195 200 205	
tcc cct gag ggc aaa gag ttc acc cga gac acg cac gtc ttc aca gga	672
Ser Pro Glu Gly Lys Glu Phe Thr Arg Asp Thr His Val Phe Thr Gly	
210 215 220	
gag gtc acc ctg gac gcg tcg gct gtc tcc ctc ttc gac gac cac ctg	720
Glu Val Thr Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Leu Phe Asp Asp His Leu	
225 230 235 240	
gga gag gac tac tat ggc agt gag atc tac acc cta aag gaa gga ctg	768
Gly Glu Asp Tyr Tyr Gly Ser Glu Ile Tyr Thr Leu Lys Glu Gly Leu	
245 250 255	
tct tcc gtc cca caa ggg ctc cta cag gct ttt ctg gac gcc gca gac	816
Ser Ser Val Pro Gln Gly Leu Leu Gln Ala Phe Leu Asp Ala Ala Asp	
260 265 270	
tcc aac gag ttc tat ccc aac agc cac ctg aag gcc ctg aga cgt aag	864
Ser Asn Glu Phe Tyr Pro Asn Ser His Leu Lys Ala Leu Arg Arg Lys	
275 280 285	
acc aac ggt cag tat gtt ctt tac ttt gag ccc acc acc tcc aag gat	912
Thr Asn Gly Gln Tyr Val Leu Tyr Phe Glu Pro Thr Thr Ser Lys Asp	
290 295 300	
gga caa acc aca atc aac tat ctg gaa ccc ctg cag gtt gtg tgt gca	960
Gly Gln Thr Thr Ile Asn Tyr Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Cys Ala	
305 310 315 320	
caa aga gtc atc ctg gcc atg ccg gta tac gct ctg aac caa cta gac	1008
Gln Arg Val Ile Leu Ala Met Pro Val Tyr Ala Leu Asn Gln Leu Asp	
325 330 335	
tgg aat cag ctc aga aat gac cga gcc acc caa gcg tac gct gcc gtt	1056
Trp Asn Gln Leu Arg Asn Asp Arg Ala Thr Gln Ala Tyr Ala Ala Val	
340 345 350	
cgc ccg att cct gca agt aag gtg ttc atg tcc ttt gat cag ccc tgg	1104
Arg Pro Ile Pro Ala Ser Lys Val Phe Met Ser Phe Asp Gln Pro Trp	
355 360 365	
tgg ttg gag aac gag agg aaa tcc tgg gtc acc aag tcg gac gcg ctt	1152

ES 2 478 216 T3

Trp Leu Glu Asn Glu Arg Lys Ser Trp Val Thr Lys Ser Asp Ala Leu
 370 375 380

ttc agc caa atg tac gac tgg cag aag tct gag gcg tcc gga gac tac 1200
 Phe Ser Gln Met Tyr Asp Trp Gln Lys Ser Glu Ala Ser Gly Asp Tyr
 385 390 395 400

atc ctg atc gcc agc tac gcc gac ggc ctc aaa gcc cag tac ctg cgg 1248
 Ile Leu Ile Ala Ser Tyr Ala Asp Gly Leu Lys Ala Gln Tyr Leu Arg
 405 410 415

gag ctg aag aat cag gga gag gac atc cca ggc tct gac cca ggc tac 1296
 Glu Leu Lys Asn Gln Gly Glu Asp Ile Pro Gly Ser Asp Pro Gly Tyr
 420 425 430

aac cag gtt acc gaa ccc ctc aag gac acc att ctt gac cac ctc act 1344
 Asn Gln Val Thr Glu Pro Leu Lys Asp Thr Ile Leu Asp His Leu Thr
 435 440 445

gag gct tat ggc gtg gag cga gac tcg atc ccg gaa ccc gtg acc gcc 1392
 Glu Ala Tyr Gly Val Glu Arg Asp Ser Ile Pro Glu Pro Val Thr Ala
 450 455 460

gct tcc cag ttc tgg aca gac tac ccg ttt ggc tgt gga tgg atc acc 1440
 Ala Ser Gln Phe Trp Thr Asp Tyr Pro Phe Gly Cys Gly Trp Ile Thr
 465 470 475 480

tgg agg gcc ggc ttc cat ttc gat gac gtc atc agc acc atg cgt cgc 1488
 Trp Arg Ala Gly Phe His Phe Asp Asp Val Ile Ser Thr Met Arg Arg
 485 490 495

ccg tca ctg aaa gat gag gta tac gtg gtg gga gcc gac tac tcc tgg 1536
 Pro Ser Leu Lys Asp Glu Val Tyr Val Val Gly Ala Asp Tyr Ser Trp
 500 505 510

gga ctt atc tcc tcc tgg ata gag ggc gct ctg gag acc tcg gaa aac 1584
 Gly Leu Ile Ser Ser Trp Ile Glu Gly Ala Leu Glu Thr Ser Glu Asn
 515 520 525

gtc atc aac gac tac ttc ctc taa 1608
 Val Ile Asn Asp Tyr Phe Leu
 530 535

<210> 2
 <211> 535
 5 <212> PRT
 <213> Aplysia punctata

<400> 2

Met Ser Ser Ala Val Leu Leu Leu Ala Cys Ala Leu Val Ile Ser Val
 1 5 10 15

His Ala Asp Gly Ile Cys Arg Asn Arg Arg Gln Cys Asn Arg Glu Val
 20 25 30

10

ES 2 478 216 T3

Cys Gly Ser Thr Tyr Asp Val Ala Val Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly
 35 40 45

Ala Asn Ser Ala Tyr Met Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ala Val
 50 55 60

Phe Glu Tyr Ser Asp Arg Val Gly Gly Arg Leu Phe Thr Tyr Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Asn Thr Pro Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Gly Met Arg Phe Ile
 85 90 95

Glu Gly Ala Met His Arg Leu Trp Arg Val Ile Ser Glu Leu Gly Leu
 100 105 110

Thr Pro Lys Val Phe Lys Glu Gly Phe Gly Lys Glu Gly Arg Gln Arg
 115 120 125

Phe Tyr Leu Arg Gly Gln Ser Leu Thr Lys Lys Gln Val Lys Ser Gly
 130 135 140

Asp Val Pro Tyr Asp Leu Ser Pro Glu Glu Lys Glu Asn Gln Gly Asn
 145 150 155 160

Leu Val Glu Tyr Tyr Leu Glu Lys Leu Thr Gly Leu Gln Leu Asn Gly
 165 170 175

Glu Pro Leu Lys Arg Glu Val Ala Leu Lys Leu Thr Val Pro Asp Gly
 180 185 190

Arg Phe Leu Tyr Asp Leu Ser Phe Asp Glu Ala Met Asp Leu Val Ala
 195 200 205

Ser Pro Glu Gly Lys Glu Phe Thr Arg Asp Thr His Val Phe Thr Gly
 210 215 220

Glu Val Thr Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Leu Phe Asp Asp His Leu
 225 230 235 240

Gly Glu Asp Tyr Tyr Gly Ser Glu Ile Tyr Thr Leu Lys Glu Gly Leu
 245 250 255

Ser Ser Val Pro Gln Gly Leu Leu Gln Ala Phe Leu Asp Ala Ala Asp

ES 2 478 216 T3

	260		265		270														
Ser	Asn	Glu	Phe	Tyr	Pro	Asn	Ser	His	Leu	Lys	Ala	Leu	Arg	Arg	Lys				
	275						280					285							
Thr	Asn	Gly	Gln	Tyr	Val	Leu	Tyr	Phe	Glu	Pro	Thr	Thr	Ser	Lys	Asp				
	290					295					300								
Gly	Gln	Thr	Thr	Ile	Asn	Tyr	Leu	Glu	Pro	Leu	Gln	Val	Val	Cys	Ala				
305					310					315					320				
Gln	Arg	Val	Ile	Leu	Ala	Met	Pro	Val	Tyr	Ala	Leu	Asn	Gln	Leu	Asp				
				325					330						335				
Trp	Asn	Gln	Leu	Arg	Asn	Asp	Arg	Ala	Thr	Gln	Ala	Tyr	Ala	Ala	Val				
			340					345						350					
Arg	Pro	Ile	Pro	Ala	Ser	Lys	Val	Phe	Met	Ser	Phe	Asp	Gln	Pro	Trp				
	355						360					365							
Trp	Leu	Glu	Asn	Glu	Arg	Lys	Ser	Trp	Val	Thr	Lys	Ser	Asp	Ala	Leu				
	370					375					380								
Phe	Ser	Gln	Met	Tyr	Asp	Trp	Gln	Lys	Ser	Glu	Ala	Ser	Gly	Asp	Tyr				
385					390					395					400				
Ile	Leu	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	Asp	Gly	Leu	Lys	Ala	Gln	Tyr	Leu	Arg				
				405					410					415					
Glu	Leu	Lys	Asn	Gln	Gly	Glu	Asp	Ile	Pro	Gly	Ser	Asp	Pro	Gly	Tyr				
			420					425					430						
Asn	Gln	Val	Thr	Glu	Pro	Leu	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Asp	His	Leu	Thr				
		435					440					445							
Glu	Ala	Tyr	Gly	Val	Glu	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Ala				
	450					455					460								
Ala	Ser	Gln	Phe	Trp	Thr	Asp	Tyr	Pro	Phe	Gly	Cys	Gly	Trp	Ile	Thr				
465					470					475					480				
Trp	Arg	Ala	Gly	Phe	His	Phe	Asp	Asp	Val	Ile	Ser	Thr	Met	Arg	Arg				
				485					490					495					

ES 2 478 216 T3

Pro Ser Leu Lys Asp Glu Val Tyr Val Val Gly Ala Asp Tyr Ser Trp
 500 505 510

Gly Leu Ile Ser Ser Trp Ile Glu Gly Ala Leu Glu Thr Ser Glu Asn
 515 520 525

Val Ile Asn Asp Tyr Phe Leu
 530 535

<210> 3
 <211> 1605
 5 <212> DNA
 <213> Aplysia punctata

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(1605)

<400> 3
 tcg tct gct gtg ctt ctc ctg gct tgt gcg ttg gtc atc tct gtc cac 48
 Ser Ser Ala Val Leu Leu Leu Ala Cys Ala Leu Val Ile Ser Val His
 1 5 10 15
 gcc gac ggt gtc tgc aga aac aga cgt caa tgt aac aga gag gtg tgc 96
 Ala Asp Gly Val Cys Arg Asn Arg Arg Gln Cys Asn Arg Glu Val Cys
 20 25 30
 ggt tct acc tac gat gtg gcc gtc gtg ggg gcg ggg cct ggg gga gct 144
 Gly Ser Thr Tyr Asp Val Ala Val Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala
 35 40 45
 aac tcc gcc tac atg ctg agg gac tcc ggc ctg gac atc gct gtg ttc 192
 Asn Ser Ala Tyr Met Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ala Val Phe
 50 55 60
 gag tac tca gac cga gtg ggc ggc cgg ctg ttc acc tac cag ctg ccc 240
 Glu Tyr Ser Asp Arg Val Gly Gly Arg Leu Phe Thr Tyr Gln Leu Pro
 65 70 75 80
 aac aca ccc gac gtt aat ctc gag att ggc ggc atg agg ttc atc gag 288
 Asn Thr Pro Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Gly Met Arg Phe Ile Glu
 85 90 95
 ggc gcc atg cac agg ctc tgg agg gtc att tca gaa ctc ggc cta acc 336
 Gly Ala Met His Arg Leu Trp Arg Val Ile Ser Glu Leu Gly Leu Thr
 100 105 110
 ccc aag gtg ttc aag gaa ggt ttc gga aag gag ggc aga cag aga ttt 384
 Pro Lys Val Phe Lys Glu Gly Phe Gly Lys Glu Gly Arg Gln Arg Phe
 115 120 125
 tac ctg cgg gga cag agc ctg acc aag aaa cag gtc aag agt ggg gac 432
 Tyr Leu Arg Gly Gln Ser Leu Thr Lys Lys Gln Val Lys Ser Gly Asp

ES 2 478 216 T3

130	135	140	
gta ccc tat gac ctc agc ccg gag gag aaa gaa aac cag gga aat ctg			480
Val Pro Tyr Asp Leu Ser Pro Glu Glu Lys Glu Asn Gln Gly Asn Leu			
145	150	155	160
gtc gaa tac tac ctg gag aaa ctg aca ggt cta caa ctc aat ggt gaa			528
Val Glu Tyr Tyr Leu Glu Lys Leu Thr Gly Leu Gln Leu Asn Gly Glu			
	165	170	175
ccg ctc aaa cgt gag gtt gcg ctt aaa cta acc gtg ccg gac ggc aga			576
Pro Leu Lys Arg Glu Val Ala Leu Lys Leu Thr Val Pro Asp Gly Arg			
	180	185	190
ttc ctc tat gac ctc tcg ttt gag gaa gcc atg gat ctg gtt gcc tcc			624
Phe Leu Tyr Asp Leu Ser Phe Asp Glu Ala Met Asp Leu Val Ala Ser			
	195	200	205
cct gag ggc aaa gag ttc acc cga gac acg cac gtc ttc acc gga gag			672
Pro Glu Gly Lys Glu Phe Thr Arg Asp Thr His Val Phe Thr Gly Glu			
	210	215	220
gtc acc ctg ggc gcg tcg gct gtc tcc ctc ttc gac gac cac ctg gga			720
Val Thr Leu Gly Ala Ser Ala Val Ser Leu Phe Asp Asp His Leu Gly			
	225	230	235
gag gac tac tac ggc agt gag atc tac acc ctc aag gaa gga ctg tct			768
Glu Asp Tyr Tyr Gly Ser Glu Ile Tyr Thr Leu Lys Glu Gly Leu Ser			
	245	250	255
tcc gtc cct caa ggg ctc cta cag gct ttt ctg gac gcc gca gac tcc			816
Ser Val Pro Gln Gly Leu Leu Gln Ala Phe Leu Asp Ala Ala Asp Ser			
	260	265	270
aac gag ttc tat ccc aac agc cac ctg aag gcc ctg aga cgt aag acc			864
Asn Glu Phe Tyr Pro Asn Ser His Leu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Thr			
	275	280	285
aac ggt cag tat gtt ctt tac ttt gag ccc acc acc tcc aag gat gga			912
Asn Gly Gln Tyr Val Leu Tyr Phe Glu Pro Thr Thr Ser Lys Asp Gly			
	290	295	300
caa acc aca atc aac tat ctg gaa ccc ctg cag gtt gtg tgt gca cag			960
Gln Thr Thr Ile Asn Tyr Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Cys Ala Gln			
	305	310	315
aga gtc att ctg gcc atg ccg gtc tac gct ctc aac cag ttg gat tgg			1008
Arg Val Ile Leu Ala Met Pro Val Tyr Ala Leu Asn Gln Leu Asp Trp			
	325	330	335
aat cag ctc aga aat gac cga gcc acc caa gcg tac gct gcc gtg cgc			1056
Asn Gln Leu Arg Asn Asp Arg Ala Thr Gln Ala Tyr Ala Ala Val Arg			
	340	345	350
ccg att cct gca agt aag gtg ttc atg acc ttt gat cag ccc tgg tgg			1104
Pro Ile Pro Ala Ser Lys Val Phe Met Thr Phe Asp Gln Pro Trp Trp			
	355	360	365

ES 2 478 216 T3

ttg gag aac gag agg aaa tcc tgg gtc acc aag tcg gac gcg ctt ttc 1152
 Leu Glu Asn Glu Arg Lys Ser Trp Val Thr Lys Ser Asp Ala Leu Phe
 370 375 380

agt caa atg tac gac tgg cag aag tct gag gcg tcc gga gac tac atc 1200
 Ser Gln Met Tyr Asp Trp Gln Lys Ser Glu Ala Ser Gly Asp Tyr Ile
 385 390 395 400

ctg atc gcc agc tac gcc gac ggc ctc aaa gcc cag tac ctg cgg gag 1248
 Leu Ile Ala Ser Tyr Ala Asp Gly Leu Lys Ala Gln Tyr Leu Arg Glu
 405 410 415

ctg aag aat cag gga gag gac atc cca ggc tct gac cca ggc tac aac 1296
 Leu Lys Asn Gln Gly Glu Asp Ile Pro Gly Ser Asp Pro Gly Tyr Asn
 420 425 430

cag gtc acc gaa ccc ctc aag gac acc att ctt gac cac ctc act gag 1344
 Gln Val Thr Glu Pro Leu Lys Asp Thr Ile Leu Asp His Leu Thr Glu
 435 440 445

gcc tat ggc gtg gag cga gac tcg atc cgg gaa ccc gtg acc gcc gct 1392
 Ala Tyr Gly Val Glu Arg Asp Ser Ile Arg Glu Pro Val Thr Ala Ala
 450 455 460

tcc cag ttc tgg aca gac tac ccg ttt ggc tgt gga tgg atc acc tgg 1440
 Ser Gln Phe Trp Thr Asp Tyr Pro Phe Gly Cys Gly Trp Ile Thr Trp
 465 470 475 480

agg gcc ggc ttc cat ttc gat gac gtc atc agc acc atg cgt cgc ccg 1488
 Arg Ala Gly Phe His Phe Asp Asp Val Ile Ser Thr Met Arg Arg Pro
 485 490 495

tca ctg aaa gat gag gtc tac gtg gtg gga gcc gat tac tcc tgg gga 1536
 Ser Leu Lys Asp Glu Val Tyr Val Val Gly Ala Asp Tyr Ser Trp Gly
 500 505 510

ctt atc tcc tcc tgg ata gag ggc gct ctg gag acc tca gaa aac gtc 1584
 Leu Ile Ser Ser Trp Ile Glu Gly Ala Leu Glu Thr Ser Glu Asn Val
 515 520 525

atc aac gac tac ttc ctc taa 1605
 Ile Asn Asp Tyr Phe Leu
 530

<210> 4
 <211> 534
 5 <212> PRT
 <213> Aplysia punctata

<400> 4
 Ser Ser Ala Val Leu Leu Leu Ala Cys Ala Leu Val Ile Ser Val His
 1 5 10 15

Ala Asp Gly Val Cys Arg Asn Arg Arg Gln Cys Asn Arg Glu Val Cys
 20 25 30

10

ES 2 478 216 T3

Gly Ser Thr Tyr Asp Val Ala Val Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala
 35 40 45

Asn Ser Ala Tyr Met Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ala Val Phe
 50 55 60

Glu Tyr Ser Asp Arg Val Gly Gly Arg Leu Phe Thr Tyr Gln Leu Pro
 65 70 75 80

Asn Thr Pro Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Gly Met Arg Phe Ile Glu
 85 90 95

Gly Ala Met His Arg Leu Trp Arg Val Ile Ser Glu Leu Gly Leu Thr
 100 105 110

Pro Lys Val Phe Lys Glu Gly Phe Gly Lys Glu Gly Arg Gln Arg Phe
 115 120 125

Tyr Leu Arg Gly Gln Ser Leu Thr Lys Lys Gln Val Lys Ser Gly Asp
 130 135 140

Val Pro Tyr Asp Leu Ser Pro Glu Glu Lys Glu Asn Gln Gly Asn Leu
 145 150 155 160

Val Glu Tyr Tyr Leu Glu Lys Leu Thr Gly Leu Gln Leu Asn Gly Glu
 165 170 175

Pro Leu Lys Arg Glu Val Ala Leu Lys Leu Thr Val Pro Asp Gly Arg
 180 185 190

Phe Leu Tyr Asp Leu Ser Phe Asp Glu Ala Met Asp Leu Val Ala Ser
 195 200 205

Pro Glu Gly Lys Glu Phe Thr Arg Asp Thr His Val Phe Thr Gly Glu
 210 215 220

Val Thr Leu Gly Ala Ser Ala Val Ser Leu Phe Asp Asp His Leu Gly
 225 230 235 240

Glu Asp Tyr Tyr Gly Ser Glu Ile Tyr Thr Leu Lys Glu Gly Leu Ser
 245 250 255

ES 2 478 216 T3

Ser Val Pro Gln Gly Leu Leu Gln Ala Phe Leu Asp Ala Ala Asp Ser
 260 265 270

Asn Glu Phe Tyr Pro Asn Ser His Leu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Thr
 275 280 285

Asn Gly Gln Tyr Val Leu Tyr Phe Glu Pro Thr Thr Ser Lys Asp Gly
 290 295 300

Gln Thr Thr Ile Asn Tyr Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Cys Ala Gln
 305 310 315 320

Arg Val Ile Leu Ala Met Pro Val Tyr Ala Leu Asn Gln Leu Asp Trp
 325 330 335

Asn Gln Leu Arg Asn Asp Arg Ala Thr Gln Ala Tyr Ala Ala Val Arg
 340 345 350

Pro Ile Pro Ala Ser Lys Val Phe Met Thr Phe Asp Gln Pro Trp Trp
 355 360 365

Leu Glu Asn Glu Arg Lys Ser Trp Val Thr Lys Ser Asp Ala Leu Phe
 370 375 380

Ser Gln Met Tyr Asp Trp Gln Lys Ser Glu Ala Ser Gly Asp Tyr Ile
 385 390 395 400

Leu Ile Ala Ser Tyr Ala Asp Gly Leu Lys Ala Gln Tyr Leu Arg Glu
 405 410 415

Leu Lys Asn Gln Gly Glu Asp Ile Pro Gly Ser Asp Pro Gly Tyr Asn
 420 425 430

Gln Val Thr Glu Pro Leu Lys Asp Thr Ile Leu Asp His Leu Thr Glu
 435 440 445

Ala Tyr Gly Val Glu Arg Asp Ser Ile Arg Glu Pro Val Thr Ala Ala
 450 455 460

Ser Gln Phe Trp Thr Asp Tyr Pro Phe Gly Cys Gly Trp Ile Thr Trp
 465 470 475 480

Arg Ala Gly Phe His Phe Asp Asp Val Ile Ser Thr Met Arg Arg Pro
 485 490 495

Ser Leu Lys Asp Glu Val Tyr Val Val Gly Ala Asp Tyr Ser Trp Gly
 500 505 510

Leu Ile Ser Ser Trp Ile Glu Gly Ala Leu Glu Thr Ser Glu Asn Val
 515 520 525

Ile Asn Asp Tyr Phe Leu
 530

<210> 5
 <211> 1554
 5 <212> DNA
 <213> Aplysia punctata

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(1554)

<400> 5

gac ggt atc tgc aga aac aga cgt caa tgt aac aga gag gtg tgc ggt 48
 Asp Gly Ile Cys Arg Asn Arg Arg Gln Cys Asn Arg Glu Val Cys Gly
 1 5 10 15

tct acc tac gat gtg gct gtc gtg ggg gcg ggg cct ggg gga gct aac 96
 Ser Thr Tyr Asp Val Ala Val Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala Asn
 20 25 30

tcc gcc tac atg ctg agg gac tcc ggc ctg gac atc gct gtg ttc gag 144
 Ser Ala Tyr Met Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ala Val Phe Glu
 35 40 45

tac tca gac cga gtg ggc ggc cgg ctg ttc acc tac cag ctg ccc aac 192
 Tyr Ser Asp Arg Val Gly Gly Arg Leu Phe Thr Tyr Gln Leu Pro Asn
 50 55 60

aca ccc gac gtt aat ctc gag att ggc ggc atg agg ttc atc gag ggc 240
 Thr Pro Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Gly Met Arg Phe Ile Glu Gly
 65 70 75 80

gcc atg cac agg ctc tgg agg gtc att tca gaa ctc ggc cta acc ccc 288
 Ala Met His Arg Leu Trp Arg Val Ile Ser Glu Leu Gly Leu Thr Pro
 85 90 95

aag gtg ttc aag gaa ggt ttc gga aag gag ggc aga cag aga ttt tac 336
 Lys Val Phe Lys Glu Gly Phe Gly Lys Glu Gly Arg Gln Arg Phe Tyr
 100 105 110

ctg cgg gga cag agc ctg acc aag aaa cag gtc aag agt ggg gac gta 384
 Leu Arg Gly Gln Ser Leu Thr Lys Lys Gln Val Lys Ser Gly Asp Val
 115 120 125

ccc tat gac ctc agc ccg gag gag aaa gaa aac cag gga aat ctg gtc 432

15

ES 2 478 216 T3

Pro Tyr Asp Leu Ser Pro Glu Glu Lys Glu Asn Gln Gly Asn Leu Val 130 135 140	
gaa tac tac ctg gag aaa ctg aca ggt cta aaa ctc aac ggc gga ccg Glu Tyr Tyr Leu Glu Lys Leu Thr Gly Leu Lys Leu Asn Gly Gly Pro 145 150 155 160	480
ctc aaa cgt gag gtt gcg ctt aaa cta acc gtg ccg gac ggc aga ttc Leu Lys Arg Glu Val Ala Leu Lys Leu Thr Val Pro Asp Gly Arg Phe 165 170 175	528
ctc tat gac ctc tcg ttt gac gaa gcc atg gac ctg gtt gcc tcc cct Leu Tyr Asp Leu Ser Phe Asp Glu Ala Met Asp Leu Val Ala Ser Pro 180 185 190	576
gag ggc aaa gag ttc acc cga gac acg cac gtg ttc acc gga gaa gtc Glu Gly Lys Glu Phe Thr Arg Asp Thr His Val Phe Thr Gly Glu Val 195 200 205	624
acc ctg gac gcg tcg gct gtc tcc ctc ttc gac gac cac ctg gga gag Thr Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Leu Phe Asp Asp His Leu Gly Glu 210 215 220	672
gac tac tat ggc agt gag atc tac acc cta aag gaa gga ctg tct tcc Asp Tyr Tyr Gly Ser Glu Ile Tyr Thr Leu Lys Glu Gly Leu Ser Ser 225 230 235 240	720
gtc cca caa ggg ctc cta cag act ttt ctg gac gcc gca gac tcc aac Val Pro Gln Gly Leu Leu Gln Thr Phe Leu Asp Ala Ala Asp Ser Asn 245 250 255	768
gag ttc tat ccc aac agc cac ctg aag gcc ctg aga cgt aag acc aac Glu Phe Tyr Pro Asn Ser His Leu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Thr Asn 260 265 270	816
ggt cag tat gtt ctt tac ttt gag ccc acc acc tcc aag gat gga caa Gly Gln Tyr Val Leu Tyr Phe Glu Pro Thr Thr Ser Lys Asp Gly Gln 275 280 285	864
acc aca atc aac tat ctg gaa ccc ctg cag gtt gtg tgt gca cag aga Thr Thr Ile Asn Tyr Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Cys Ala Gln Arg 290 295 300	912
gtc atc ctg gcc atg ccg gtc tac gct ctc aac caa ctg gac tgg aat Val Ile Leu Ala Met Pro Val Tyr Ala Leu Asn Gln Leu Asp Trp Asn 305 310 315 320	960
cag ctc aga aat gac cga gcc acc caa gcg tac gct gcc gtg cgc ccg Gln Leu Arg Asn Asp Arg Ala Thr Gln Ala Tyr Ala Ala Val Arg Pro 325 330 335	1008
att cct gca agt aaa gtg ttc atg acc ttt gat cag ccc tgg tgg ttg Ile Pro Ala Ser Lys Val Phe Met Thr Phe Asp Gln Pro Trp Trp Leu 340 345 350	1056
gag aac gag agg aaa tcc tgg gtc acc aag tcg gac gcg ctt ttc agc Glu Asn Glu Arg Lys Ser Trp Val Thr Lys Ser Asp Ala Leu Phe Ser 355 360 365	1104

ES 2 478 216 T3

caa atg tac gac tgg cag aag tct gag gcg tcc gga gac tac atc ctg 1152
 Gln Met Tyr Asp Trp Gln Lys Ser Glu Ala Ser Gly Asp Tyr Ile Leu
 370 375 380

atc gcc agc tac gcc gac ggc ctc aaa gcc cag tac ctg cgg gag ctg 1200
 Ile Ala Ser Tyr Ala Asp Gly Leu Lys Ala Gln Tyr Leu Arg Glu Leu
 385 390 395 400

aag aat cag gga gag gac atc cca ggc tct gac cca ggc tac aac cag 1248
 Lys Asn Gln Gly Glu Asp Ile Pro Gly Ser Asp Pro Gly Tyr Asn Gln
 405 410 415

gtc acc gaa ccc ctc aag gac acc att ctt gac cac ctc act gag gct 1296
 Val Thr Glu Pro Leu Lys Asp Thr Ile Leu Asp His Leu Thr Glu Ala
 420 425 430

tat ggc gtg gaa cga gac tcg atc ccg gaa ccc gtg acc gcc gct tcc 1344
 Tyr Gly Val Glu Arg Asp Ser Ile Pro Glu Pro Val Thr Ala Ala Ser
 435 440 445

cag ttc tgg acc gac tac ccg ttc ggc tgt gga tgg atc acc tgg agg 1392
 Gln Phe Trp Thr Asp Tyr Pro Phe Gly Cys Gly Trp Ile Thr Trp Arg
 450 455 460

gca ggc ttc cat ttt gat gac gtc atc agc acc atg cgt cgc ccg tca 1440
 Ala Gly Phe His Phe Asp Asp Val Ile Ser Thr Met Arg Arg Pro Ser
 465 470 475 480

ctg aaa gat gag gtc tac gtg gtg gga gcc gat tac tcc tgg gga ctt 1488
 Leu Lys Asp Glu Val Tyr Val Val Gly Ala Asp Tyr Ser Trp Gly Leu
 485 490 495

atc tcc tcc tgg ata gag ggc gct ctg gag acc tcg gaa aac gtc atc 1536
 Ile Ser Ser Trp Ile Glu Gly Ala Leu Glu Thr Ser Glu Asn Val Ile
 500 505 510

aac gac tac ttc ctc taa 1554
 Asn Asp Tyr Phe Leu
 515

<210> 6
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Aplysia punctata

5

<400> 6
 Asp Gly Ile Cys Arg Asn Arg Arg Gln Cys Asn Arg Glu Val Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Thr Tyr Asp Val Ala Val Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala Asn
 20 25 30

Ser Ala Tyr Met Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ala Val Phe Glu

10

ES 2 478 216 T3

	35						40					45					
Tyr	Ser	Asp	Arg	Val	Gly	Gly	Arg	Leu	Phe	Thr	Tyr	Gln	Leu	Pro	Asn		
	50					55					60						
Thr	Pro	Asp	Val	Asn	Leu	Glu	Ile	Gly	Gly	Met	Arg	Phe	Ile	Glu	Gly		
65					70					75					80		
Ala	Met	His	Arg	Leu	Trp	Arg	Val	Ile	Ser	Glu	Leu	Gly	Leu	Thr	Pro		
				85					90					95			
Lys	Val	Phe	Lys	Glu	Gly	Phe	Gly	Lys	Glu	Gly	Arg	Gln	Arg	Phe	Tyr		
			100					105						110			
Leu	Arg	Gly	Gln	Ser	Leu	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Val		
		115					120					125					
Pro	Tyr	Asp	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Lys	Glu	Asn	Gln	Gly	Asn	Leu	Val		
	130					135					140						
Glu	Tyr	Tyr	Leu	Glu	Lys	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	Pro		
145					150					155					160		
Leu	Lys	Arg	Glu	Val	Ala	Leu	Lys	Leu	Thr	Val	Pro	Asp	Gly	Arg	Phe		
				165					170					175			
Leu	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Asp	Glu	Ala	Met	Asp	Leu	Val	Ala	Ser	Pro		
			180					185					190				
Glu	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Arg	Asp	Thr	His	Val	Phe	Thr	Gly	Glu	Val		
		195					200					205					
Thr	Leu	Asp	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Leu	Phe	Asp	Asp	His	Leu	Gly	Glu		
	210					215					220						
Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Glu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Lys	Glu	Gly	Leu	Ser	Ser		
225					230					235					240		
Val	Pro	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Thr	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Asp	Ser	Asn		
				245					250					255			
Glu	Phe	Tyr	Pro	Asn	Ser	His	Leu	Lys	Ala	Leu	Arg	Arg	Lys	Thr	Asn		
			260					265					270				

ES 2 478 216 T3

Gly Gln Tyr Val Leu Tyr Phe Glu Pro Thr Thr Ser Lys Asp Gly Gln
 275 280 285

Thr Thr Ile Asn Tyr Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Cys Ala Gln Arg
 290 295 300

Val Ile Leu Ala Met Pro Val Tyr Ala Leu Asn Gln Leu Asp Trp Asn
 305 310 315 320

Gln Leu Arg Asn Asp Arg Ala Thr Gln Ala Tyr Ala Ala Val Arg Pro
 325 330 335

Ile Pro Ala Ser Lys Val Phe Met Thr Phe Asp Gln Pro Trp Trp Leu
 340 345 350

Glu Asn Glu Arg Lys Ser Trp Val Thr Lys Ser Asp Ala Leu Phe Ser
 355 360 365

Gln Met Tyr Asp Trp Gln Lys Ser Glu Ala Ser Gly Asp Tyr Ile Leu
 370 375 380

Ile Ala Ser Tyr Ala Asp Gly Leu Lys Ala Gln Tyr Leu Arg Glu Leu
 385 390 395 400

Lys Asn Gln Gly Glu Asp Ile Pro Gly Ser Asp Pro Gly Tyr Asn Gln
 405 410 415

Val Thr Glu Pro Leu Lys Asp Thr Ile Leu Asp His Leu Thr Glu Ala
 420 425 430

Tyr Gly Val Glu Arg Asp Ser Ile Pro Glu Pro Val Thr Ala Ala Ser
 435 440 445

Gln Phe Trp Thr Asp Tyr Pro Phe Gly Cys Gly Trp Ile Thr Trp Arg
 450 455 460

Ala Gly Phe His Phe Asp Asp Val Ile Ser Thr Met Arg Arg Pro Ser
 465 470 475 480

Leu Lys Asp Glu Val Tyr Val Val Gly Ala Asp Tyr Ser Trp Gly Leu
 485 490 495

Ile Ser Ser Trp Ile Glu Gly Ala Leu Glu Thr Ser Glu Asn Val Ile
 500 505 510

Asn Asp Tyr Phe Leu
 515

5 <210> 7
 <211> 1554
 <212> DNA

ES 2 478 216 T3

<213> Aplysia punctata

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(1554)

<400> 7

atg gac ggt gtc agc aga aac aga cgt caa tgt aac aga gag gtg tgc	48
Met Asp Gly Val Ser Arg Asn Arg Arg Gln Cys Asn Arg Glu Val Cys	
1 5 10 15	
ggt tct acc tac gat gtg gcc gtc gtg ggg gcg ggg cct ggg gga gct	96
Gly Ser Thr Tyr Asp Val Ala Val Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala	
20 25 30	
aac tcc gcc tac atg ctg agg gac tcc ggc ctg gac atc gct gtg ttc	144
Asn Ser Ala Tyr Met Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ala Val Phe	
35 40 45	
gag tac tca gac cga gtg ggc ggc cgg ctg ttc acc tac cag ctg ccc	192
Glu Tyr Ser Asp Arg Val Gly Gly Arg Leu Phe Thr Tyr Gln Leu Pro	
50 55 60	
aac aca ccc gac gtt aac ctg gag att gga ggc atg agg ttc atc gaa	240
Asn Thr Pro Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Gly Met Arg Phe Ile Glu	
65 70 75 80	
ggc gcc atg cac agg ctc tgg agg gtc att tca gaa ctc ggc cta acc	288
Gly Ala Met His Arg Leu Trp Arg Val Ile Ser Glu Leu Gly Leu Thr	
85 90 95	
ccc aag gtg ttc aag gaa ggt ttc ggc aag gag ggc aga caa aga ttc	336
Pro Lys Val Phe Lys Glu Gly Phe Gly Lys Glu Gly Arg Gln Arg Phe	
100 105 110	
tac ctg cgg gga cag agc ctg acc aag aaa cag gtc aag agt ggg gac	384
Tyr Leu Arg Gly Gln Ser Leu Thr Lys Lys Gln Val Lys Ser Gly Asp	
115 120 125	
gta ccc tat gac ctc agc ccg gag gag aaa gaa aac cag gga aat ctg	432
Val Pro Tyr Asp Leu Ser Pro Glu Glu Lys Glu Asn Gln Gly Asn Leu	
130 135 140	
gtc gaa tac tac ctg gag aaa ctg aca ggt cta caa ctc aac ggc gag	480
Val Glu Tyr Tyr Leu Glu Lys Leu Thr Gly Leu Gln Leu Asn Gly Glu	
145 150 155 160	

10

ES 2 478 216 T3

ccg ctc aaa cgt gag gtt gcg ctt aaa cta acc gtg ccg gac ggc aga	528
Pro Leu Lys Arg Glu Val Ala Leu Lys Leu Thr Val Pro Asp Gly Arg	
165 170 175	
ttc ctc tat gac ctc tcg ttt gac gaa gcc atg gat ctg gtt gcc tcc	576
Phe Leu Tyr Asp Leu Ser Phe Asp Glu Ala Met Asp Leu Val Ala Ser	
180 185 190	
cct gag ggc aaa gag ttc acc cga gac acg cac gtc ttc aca gga gag	624
Pro Glu Gly Lys Glu Phe Thr Arg Asp Thr His Val Phe Thr Gly Glu	
195 200 205	
gtc acc ctg gac gcg tcg gct gtc tcc ctc ttc gac gac cac ctg gga	672
Val Thr Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Leu Phe Asp Asp His Leu Gly	
210 215 220	
gag gac tac tat ggc agt gag atc tac acc cta aag gaa gga ctg tct	720
Glu Asp Tyr Tyr Gly Ser Glu Ile Tyr Thr Leu Lys Glu Gly Leu Ser	
225 230 235 240	
tcc gtc cca caa ggg ctc cta cag gct ttt ctg gac gcc gca gac tcc	768
Ser Val Pro Gln Gly Leu Leu Gln Ala Phe Leu Asp Ala Ala Asp Ser	
245 250 255	
aac gag ttc tat ccc aac agc cac ctg aag gcc ctg aga cgt aag acc	816
Asn Glu Phe Tyr Pro Asn Ser His Leu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Thr	
260 265 270	
aac ggt cag tat gtt ctt tac ttt gag ccc acc acc tcc aag gat gga	864
Asn Gly Gln Tyr Val Leu Tyr Phe Glu Pro Thr Thr Ser Lys Asp Gly	
275 280 285	
caa acc aca atc aac tat ctg gaa ccc ctg cag gtt gtg tgt gca cag	912
Gln Thr Thr Ile Asn Tyr Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Cys Ala Gln	
290 295 300	
aga gtc atc ctg gcc atg ccg gta tac gct ctg aac caa cta gac tgg	960
Arg Val Ile Leu Ala Met Pro Val Tyr Ala Leu Asn Gln Leu Asp Trp	
305 310 315 320	
aat cag ctc aga aat gac cga gcc acc caa gcg tac gct gcc gtt cgc	1008
Asn Gln Leu Arg Asn Asp Arg Ala Thr Gln Ala Tyr Ala Ala Val Arg	
325 330 335	
ccg att cct gca agt aag gtg ttc atg acc ttt gat cag ccc tgg tgg	1056
Pro Ile Pro Ala Ser Lys Val Phe Met Thr Phe Asp Gln Pro Trp Trp	
340 345 350	
ttg gag aac gag agg aaa tcc tgg gtc acc aag tcg gac gcg ctt ttc	1104
Leu Glu Asn Glu Arg Lys Ser Trp Val Thr Lys Ser Asp Ala Leu Phe	
355 360 365	
agc caa atg tac gac tgg cag aag tct gag gcg tcc gga gac tac atc	1152
Ser Gln Met Tyr Asp Trp Gln Lys Ser Glu Ala Ser Gly Asp Tyr Ile	
370 375 380	
ctg atc gcc agc tac gcc gac gcc ctc aaa gcc cag tac ctg cgg gag	1200
Leu Ile Ala Ser Tyr Ala Asp Gly Leu Lys Ala Gln Tyr Leu Arg Glu	

ES 2 478 216 T3

385		390		395		400														
ctg aag aat cag gga gag gac atc cca ggc tct gac cca ggc tac aac																				1248
Leu Lys Asn Gln Gly Glu Asp Ile Pro Gly Ser Asp Pro Gly Tyr Asn																				
		405		410		415														
cag gtc acc gaa ccc ctc aag gac acc att ctt gac cac ctc act gag																				1296
Gln Val Thr Glu Pro Leu Lys Asp Thr Ile Leu Asp His Leu Thr Glu																				
		420		425		430														
gct tat ggc gtg gaa cga gac tcg atc ccg gaa ccc gtg acc gcc gct																				1344
Ala Tyr Gly Val Glu Arg Asp Ser Ile Pro Glu Pro Val Thr Ala Ala																				
		435		440		445														
tcc cag ttc tgg aca gac tac ccg ttt ggc tgt gga tgg atc acc tgg																				1392
Ser Gln Phe Trp Thr Asp Tyr Pro Phe Gly Cys Gly Trp Ile Thr Trp																				
		450		455		460														
agg gcc ggc ttc cat ttc gat gac gtc atc agc acc atg cgt cgc ccg																				1440
Arg Ala Gly Phe His Phe Asp Asp Val Ile Ser Thr Met Arg Arg Pro																				
		465		470		475														
tca ctg aaa gat gag gta tac gtg gtg gga gcc gac tac tcc tgg gga																				1488
Ser Leu Lys Asp Glu Val Tyr Val Val Gly Ala Asp Tyr Ser Trp Gly																				
		485		490		495														
ctt atc tcc tcc tgg ata gag ggc gct ctt gag acc tcg gaa aac gtc																				1536
Leu Ile Ser Ser Trp Ile Glu Gly Ala Leu Glu Thr Ser Glu Asn Val																				
		500		505		510														
atc aac gac tac ttc ctc																				1554
Ile Asn Asp Tyr Phe Leu																				
		515																		

<210> 8
 <211> 518
 5 <212> PRT
 <213> Aplysia punctata

<400> 8

Met Asp Gly Val Ser Arg Asn Arg Arg Gln Cys Asn Arg Glu Val Cys
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Tyr Asp Val Ala Val Val Gly Ala Gly Pro Gly Gly Ala
 20 25 30

Asn Ser Ala Tyr Met Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ala Val Phe
 35 40 45

Glu Tyr Ser Asp Arg Val Gly Gly Arg Leu Phe Thr Tyr Gln Leu Pro
 50 55 60

10

ES 2 478 216 T3

Asn Thr Pro Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Gly Met Arg Phe Ile Glu
65 70 75 80

Gly Ala Met His Arg Leu Trp Arg Val Ile Ser Glu Leu Gly Leu Thr
85 90 95

Pro Lys Val Phe Lys Glu Gly Phe Gly Lys Glu Gly Arg Gln Arg Phe
100 105 110

Tyr Leu Arg Gly Gln Ser Leu Thr Lys Lys Gln Val Lys Ser Gly Asp
115 120 125

Val Pro Tyr Asp Leu Ser Pro Glu Glu Lys Glu Asn Gln Gly Asn Leu
130 135 140

Val Glu Tyr Tyr Leu Glu Lys Leu Thr Gly Leu Gln Leu Asn Gly Glu
145 150 155 160

Pro Leu Lys Arg Glu Val Ala Leu Lys Leu Thr Val Pro Asp Gly Arg
165 170 175

Phe Leu Tyr Asp Leu Ser Phe Asp Glu Ala Met Asp Leu Val Ala Ser
180 185 190

Pro Glu Gly Lys Glu Phe Thr Arg Asp Thr His Val Phe Thr Gly Glu
195 200 205

Val Thr Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Leu Phe Asp Asp His Leu Gly
210 215 220

Glu Asp Tyr Tyr Gly Ser Glu Ile Tyr Thr Leu Lys Glu Gly Leu Ser
225 230 235 240

Ser Val Pro Gln Gly Leu Leu Gln Ala Phe Leu Asp Ala Ala Asp Ser
245 250 255

Asn Glu Phe Tyr Pro Asn Ser His Leu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Thr
260 265 270

Asn Gly Gln Tyr Val Leu Tyr Phe Glu Pro Thr Thr Ser Lys Asp Gly
275 280 285

Gln Thr Thr Ile Asn Tyr Leu Glu Pro Leu Gln Val Val Cys Ala Gln
290 295 300

ES 2 478 216 T3

Arg Val Ile Leu Ala Met Pro Val Tyr Ala Leu Asn Gln Leu Asp Trp
305 310 315 320

Asn Gln Leu Arg Asn Asp Arg Ala Thr Gln Ala Tyr Ala Ala Val Arg
325 330 335

Pro Ile Pro Ala Ser Lys Val Phe Met Thr Phe Asp Gln Pro Trp Trp
340 345 350

Leu Glu Asn Glu Arg Lys Ser Trp Val Thr Lys Ser Asp Ala Leu Phe
355 360 365

Ser Gln Met Tyr Asp Trp Gln Lys Ser Glu Ala Ser Gly Asp Tyr Ile
370 375 380

Leu Ile Ala Ser Tyr Ala Asp Gly Leu Lys Ala Gln Tyr Leu Arg Glu
385 390 395 400

Leu Lys Asn Gln Gly Glu Asp Ile Pro Gly Ser Asp Pro Gly Tyr Asn
405 410 415

Gln Val Thr Glu Pro Leu Lys Asp Thr Ile Leu Asp His Leu Thr Glu
420 425 430

Ala Tyr Gly Val Glu Arg Asp Ser Ile Pro Glu Pro Val Thr Ala Ala
435 440 445

Ser Gln Phe Trp Thr Asp Tyr Pro Phe Gly Cys Gly Trp Ile Thr Trp
450 455 460

Arg Ala Gly Phe His Phe Asp Asp Val Ile Ser Thr Met Arg Arg Pro
465 470 475 480

Ser Leu Lys Asp Glu Val Tyr Val Val Gly Ala Asp Tyr Ser Trp Gly
485 490 495

Leu Ile Ser Ser Trp Ile Glu Gly Ala Leu Glu Thr Ser Glu Asn Val
500 505 510

Ile Asn Asp Tyr Phe Leu
515

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado que comprende una L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa recombinante y al menos un resto de polietilenglicol, en donde la secuencia de aminoácidos de la L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa es la SEQ ID NO: 8, y en donde el al menos un resto de polietilenglicol tiene un peso molecular medio ponderal de 1.000 Dalton a 10.000 Dalton.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el al menos un resto de polietilenglicol está acoplado covalentemente a la L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa por medio de un grupo de unión, preferiblemente un grupo succinimida.
- 10 3. El conjugado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende de 1 a 30, preferiblemente de 1 a 10, restos de polietilenglicol.
4. Composición farmacéutica que comprende un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, opcionalmente junto con vehículos, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 15 5. Un método para producir el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:
(a) expresar recombinantemente la L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa, y
(b) acoplar c al menos un resto de polietilenglicol a la L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa de (a), en donde al menos un resto de polietilenglicol tiene un peso molecular medio ponderal de 1.000 Dalton a 10.000 Dalton.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en donde la etapa (a) comprende una expresión recombinante de un ácido nucleico, en donde la secuencia del ácido nucleico es SEQ ID NO: 7.
7. Un kit que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o/y la composición farmacéutica de la reivindicación 4.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde el conjugado se caracteriza por una actividad enzimática o/y un tiempo en circulación mejorados de la L-arginina/L-lisina-óxidoreductasa.
- 25 9. Composición farmacéutica de la reivindicación 4, para uso en la prevención, alivio, o/y tratamiento de una enfermedad proliferante, tal como cáncer.

Figura 1

Secuencia primaria de aminoácidos de arginina/lisina-óxidorreductasa , APIT (SEQ ID NO:8)

1	MDGVSRRRQ	CNREVCSTY	DVAVVGAGPG	GANSAYMLRD	SGLDIAVFY	SDRVGGRLFT
61	YQLPNTPDVN	LEIGGMRFIE	GAMHRLWRVI	SELGLTPKVF	KEFGKKEGRQ	RFYLRGQSLT
121	KKQVKSGDVP	YDLSPEEKEN	QGNLVEYYLE	KLTLGLQLNGE	PLKREVALKL	TVPDGRFLYD
181	LSFDEAMDLV	ASPEGKEFTR	DTHVFTGEVT	LDASAVSLFD	DHLGEDYYGS	EIYTLKEGLS
241	SVPQGLLOAF	LDAADSNEFY	PNSHLKALRR	KTNGQYVLYF	EPTTSKDGQT	TINYLEPLQV
301	VCAQRVILAM	PVYALNQLDW	NQLRNDRATQ	AYA AVRPIPA	SKVFMTFDQP	WWLENERKSW
361	VTKSDALFSQ	MYDWQKSEAS	GDYILIASYA	DGLKAQYLRE	LKNQGEDIPG	SDPGYNQVTE
421	PLKDTILDHL	TEAYGVERDS	IPEPVTAASQ	FWDYPPFGCG	WITWRAGHFH	DDVISTMRRP
481	SLKDEVYVVG	ADYSWGLISS	WIEGALETSE	NVINDYFL		

Secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:7 que codifica la SEQ ID NO: 8

ATGGACGGTGTTCAGCAGAAACAGACGTCAATGTAACAGAGAGGTGTGCGGTTCTACCTACGATG
TGGCCGTCGTGGGGGCGGGGCTGGGGGAGCTAACTCCGCCTACATGCTGAGGGACTCCGGCCT
GGACATCGCTGTGTTTCGAGTACTCAGACCGAGTGGGCGCCGGCTGTTACCTACCAGCTGCC
AACACACCCGACGTTAACCTGGAGATTGGAGGCATGAGGTTTCATCGAAGGCGCCATGCACAGGC
TCTGGAGGGTCATTTCAGAACTCGGCCAACCCTCAAGGTGTTCAAGGAAGGTTTCGGCAAGGA
GGGCAGACAAAGATTCTACCTGCGGGGACAGAGCCTGACCAAGAAACAGGTCAAGAGTGGGGAC
GTACCCTATGACCTCAGCCCGGAGGAGAAAGAAAACCAGGGAAATCTGGTTCGAATACTACCTGG
AGAACTGACAGGTCTACAACCTCAACGGCGAGCCGCTCAAACGTGAGGTTGCGCTTAACTAAC
CGTGCCGGACGGCAGATTCTCTATGACCTCTCGTTTGACGAAGCCATGGATCTGGTTGCCTCC
CCTGAGGGCAAAGAGTTCACCCGAGACACGCACGCTTTCACAGGAGAGGTCACCCTGGACGCGT
CGGCTGTCTCCCTCTTCGACGACCACCTGGGAGAGGACTACTATGGCAGTGAGATCTACACCCT
AAAGGAAGGACTGTCTTCCGTCCACAAGGGCTCCTACAGGCTTTTCTGGACGCCGCAGACTCC
AACGAGTTCATCCCAACAGCCACCTGAAGGCCCTGAGACGTAAGACCAACGGTCAGTATGTTC
TTTACTTTGAGCCACCACCTCCAAGGATGGACAAACCACAATCAACTATCTGGAACCCCTGCA
GGTTGTGTGTGCACAGAGAGTCATCCTGGCCATGCCGGTATACGCTCTGAACCAACTAGACTGG
AATCAGCTCAGAAATGACCGAGCCACCCAAGCGTACGCTGCCGTTCCGCCGATTCTGCAAGTA
AGGTGTTTCATGACCTTTGATCAGCCCTGGTGGTTGGAGAACGAGAGGAAATCCTGGGTCACCAA
GTCGGACGCGCTTTTCAGCCAAATGTACGACTGGCAGAAGTCTGAGGCGTCCGGAGACTACATC
CTGATCGCCAGCTACGCCGACGGCCTCAAAGCCAGTACCTGCGGGAGCTGAAGAATCAGGGAG
AGGACATCCCAGGCTCTGACCCAGGCTACAACCAGGTCACCGAACCCTCAAGGACACCATTCT
TGACCACCTCACTGAGGCTTATGGCGTGGAACGAGACTCGATCCCGGAACCCGTGACCGCCGCT
TCCAGTTCCTGGACAGACTACCCGTTTGGCTGTGGATGGATCACCTGGAGGGCCGGCTTCCATT
TCGATGACGTCATCAGCACCATGCGTCGCCCGTCACTGAAAGATGAGGTATACGTGGTGGGAGC
CGACTACTCTGGGGACTTATCTCCTCCTGGATAGAGGGCGCTCTTGAGACCTCGGAAAACGTC
ATCAACGACTACTTCTCCT

Figura 2

Pegilación de arginina/lisina-óxidorreductasa, APIT con PEG-5000

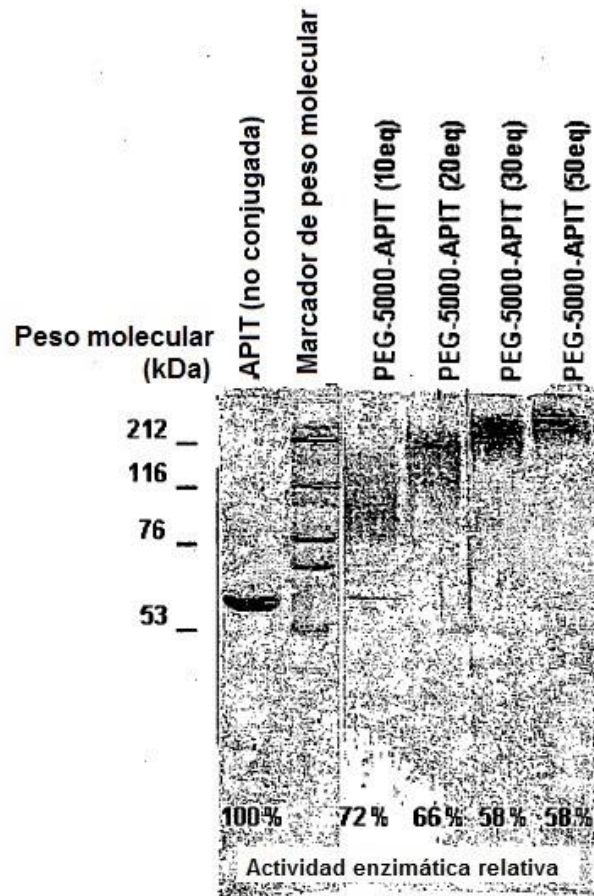


Figura 3

Actividad de PEG-5000-APIT en presencia de anticuerpos policlonales anti-APIT

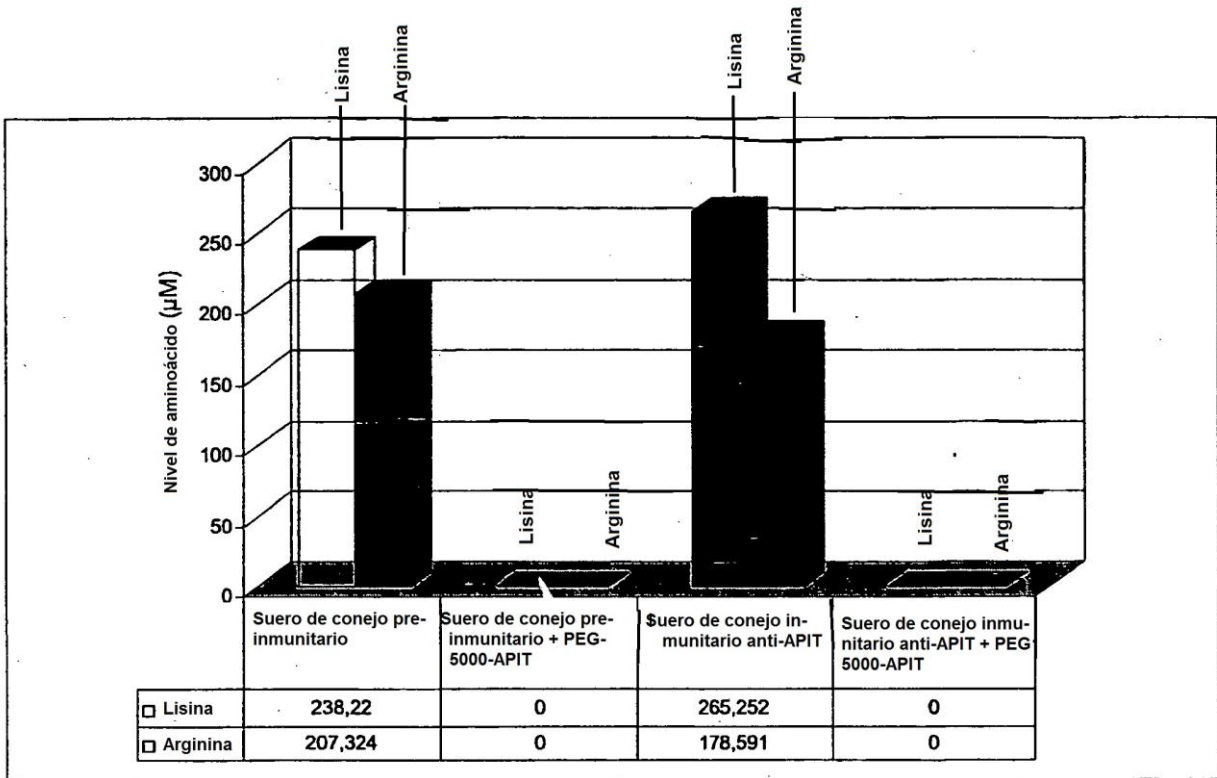
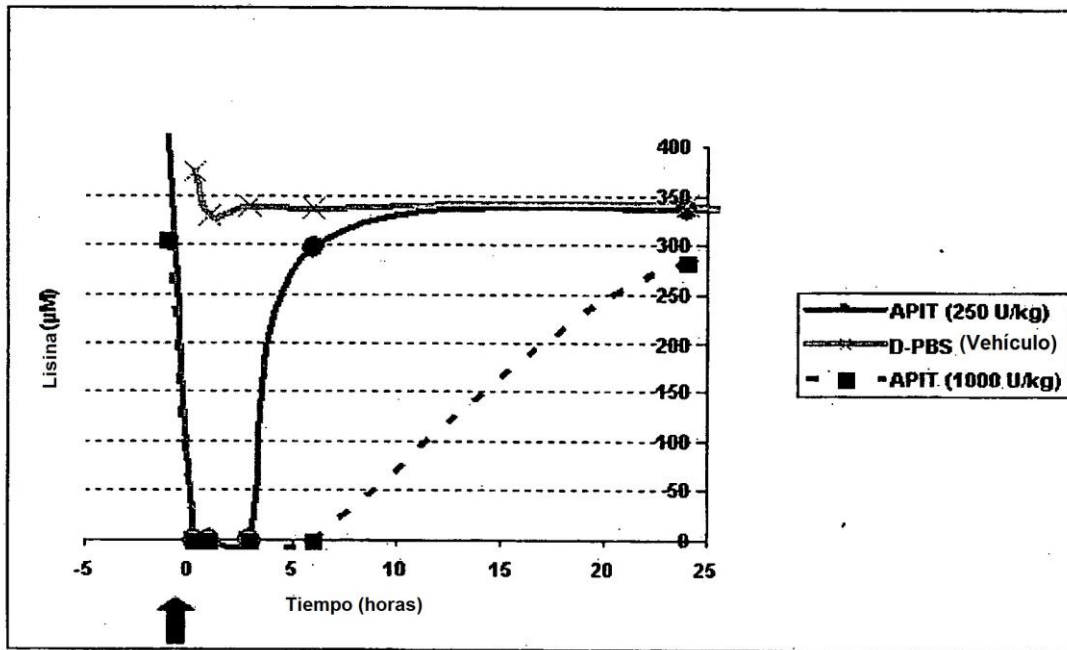


Figura 4

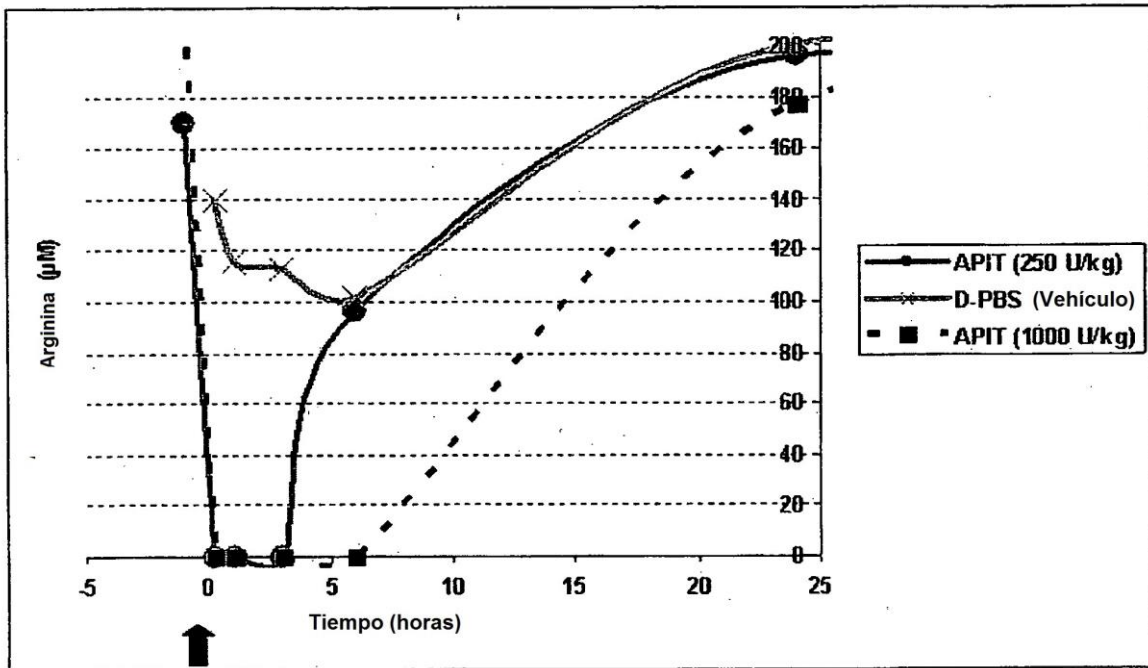
Efecto de una sola dosis intravenosa de APIT (250 U/kg) y APIT (1000 U/kg) sobre los niveles de lisina en plasma en ratones



Administración

Figura 5

Efecto de una sola dosis intravenosa de APIT (250 U/kg) y APIT (1000 U/kg) sobre los niveles de arginina en plasma en ratones



Administración

Figura 6

Comparación entre una sola dosis intravenosa de APIT (250 U/kg) y PEG-5000-APIT a una dosis equivalente de 250 U/kg sobre los niveles de lisina en plasma en ratones

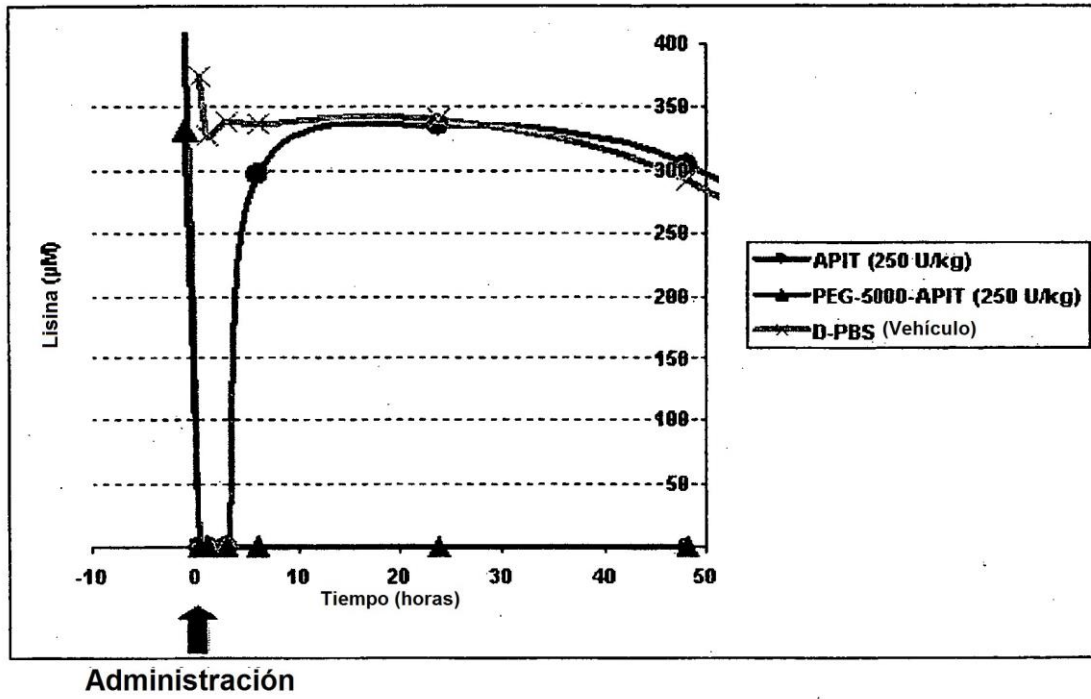


Figura 7

Comparación de una sola dosis intravenosa de APIT (250 U/kg) y PEG-5000-APIT a una dosis equivalente de 250 U/kg sobre los niveles de arginina en plasma en ratones.

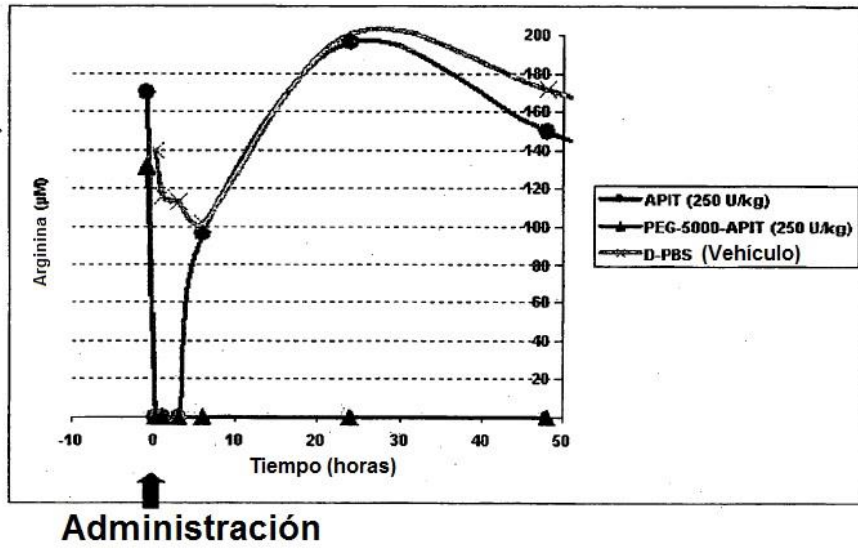


Figura 8

Agotamiento dependiente de la dosis de los niveles de lisina en plasma después de una sola administración intravenosa de PEG-5000-API a ratones

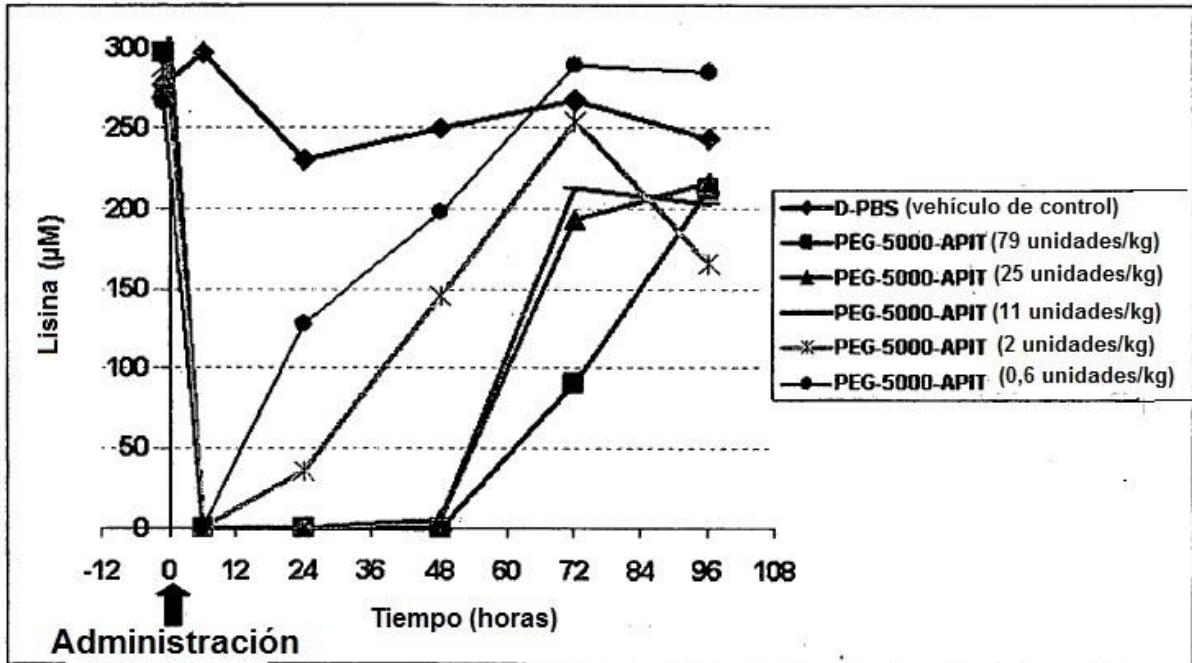


Figura 9

Agotamiento dependiente de la dosis de los niveles de arginina en plasma después de una sola administración intravenosa de PEG-5000-APIT a ratones

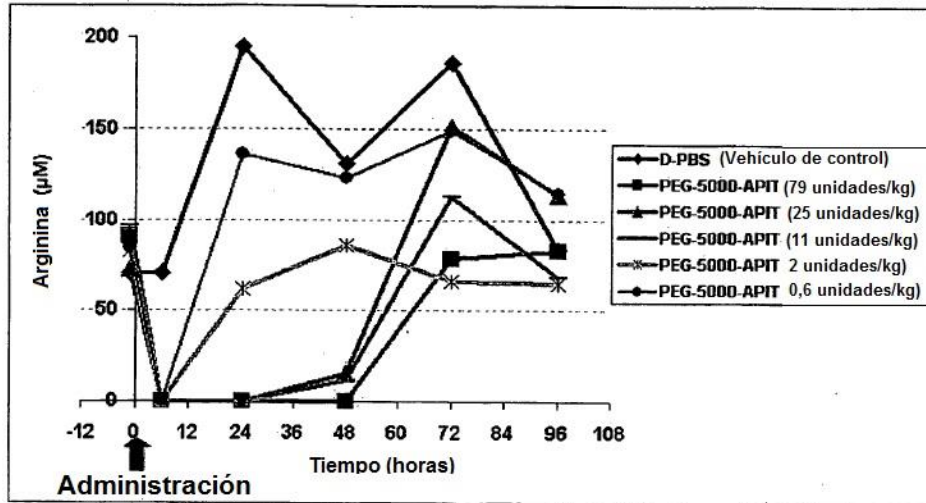


Figura 10

Eficacia antitumoral de PEG-5000-APIT

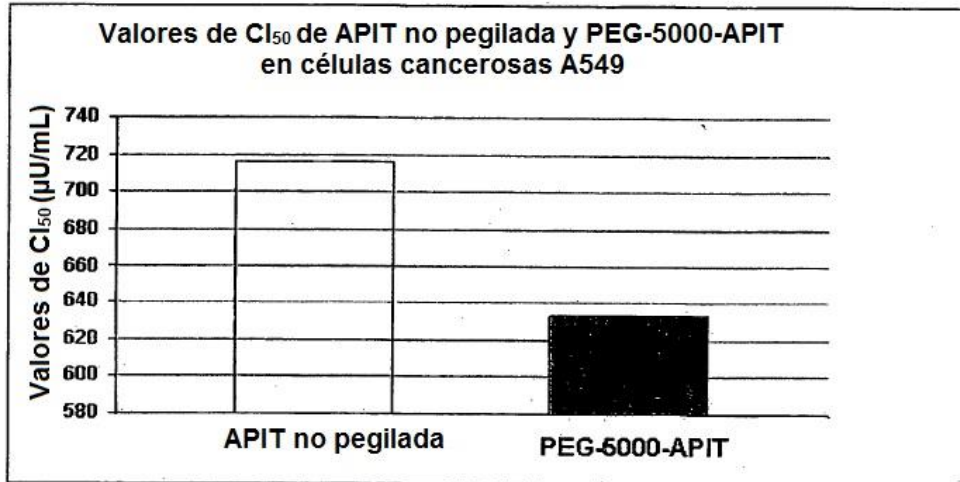


Figura 11

M S S A V L L L A C A L V I S V H A D G IV C
 ATGTCGTCTGCTGTGCTTCTCCTGGCTTGTGCGTTGGTCATCTCTGTCCACGCCGACGGTATCTGC
 ...TCGTCTGCTGTGCTTCTCCTGGCTTGTGCGTTGGTCATCTCTGTCCACGCCGACGGTCTCTGC
GACGGTATCTGC

 R N R R Q C N R E V C G S T Y D V A V V G A
 AGAAACAGACGTC AATGTAACAGAGAGGTTGTGCGTTCTACCTACGATGTGGCCGTCGTGGGGGGCG
 AGAAACAGACGTC AATGTAACAGAGAGGTTGTGCGTTCTACCTACGATGTGGCCGTCGTGGGGGGCG
 AGAAACAGACGTC AATGTAACAGAGAGGTTGTGCGTTCTACCTACGATGTGGCCTGTCTGTGGGGGGCG

 G P G G A N S A Y M L R D S G L D I A V F E
 GGGCCTGGGGGAGCTAACTCCGCCTACATGCTGAGGGACTCCGGCCTGGACATCGCTGTGTTTCGAG
 GGGCCTGGGGGAGCTAACTCCGCCTACATGCTGAGGGACTCCGGCCTGGACATCGCTGTGTTTCGAG
 GGGCCTGGGGGAGCTAACTCCGCCTACATGCTGAGGGACTCCGGCCTGGACATCGCTGTGTTTCGAG

 Y S D R V G G R L F T Y O L P N T P D V N L
 TACTCGGACCGAGTGGGGCGGCCGGCTGTTACCTACCAGCTGCCCAACACACCCGACGTTAACTCTG
 TACTCAGACCGAGTGGGGCGGCCGGCTGTTACCTACCAGCTGCCCAACACACCCGACGTTAACTCTG
 TACTCAGACCGAGTGGGGCGGCCGGCTGTTACCTACCAGCTGCCCAACACACCCGACGTTAACTCTG

 E I G G M R F I E G A M H R L W R V I S E L
 GAGATTGGCGGCATGAGGTTTCATCGAGGGCGCCATGCACAGGCTCTGGAGGGTCATTTTCAGAACTC
 GAGATTGGCGGCATGAGGTTTCATCGAGGGCGCCATGCACAGGCTCTGGAGGGTCATTTTCAGAACTC
 GAGATTGGCGGCATGAGGTTTCATCGAGGGCGCCATGCACAGGCTCTGGAGGGTCATTTTCAGAACTC

 G L T P K V F K E G F G K E G R Q R F Y L R
 GGCCTAACCCCAAGGTGTTCAAGGAAGGTTTCGGCAAGGAGGGCAGACAGAGATTTTACCTGCGG
 GGCCTAACCCCAAGGTGTTCAAGGAAGGTTTCGGCAAGGAGGGCAGACAGAGATTTTACCTGCGG
 GGCCTAACCCCAAGGTGTTCAAGGAAGGTTTCGGCAAGGAGGGCAGACAGAGATTTTACCTGCGG

 G Q S L T K K Q V K S G D V P Y D L S P E E
 GGACAGAGCCTGACCAAGAAAACAGGTCAAGAGTGGGGACGTACCCTATGACCTCAGCCCCGAGGAG
 GGACAGAGCCTGACCAAGAAAACAGGTCAAGAGTGGGGACGTACCCTATGACCTCAGCCCCGAGGAG
 GGACAGAGCCTGACCAAGAAAACAGGTCAAGAGTGGGGACGTACCCTATGACCTCAGCCCCGAGGAG

 K E N Q G N L V E Y Y L E K L T G L Q L N G
 AAAGAAAACCAGGGAAATCTGGTTCGAATACTACCTGGAGAAACTGACAGGTCTACAACCTCAACGGC
 AAAGAAAACCAGGGAAATCTGGTTCGAATACTACCTGGAGAAACTGACAGGTCTACAACCTCAACGGC
 AAAGAAAACCAGGGAAATCTGGTTCGAATACTACCTGGAGAAACTGACAGGTCTACAACCTCAACGGC

 E G P L K R E V A L K L T V P D G R F L Y D L
 SAACCGCTCAAACGTGAGGTTGCGCTTAAACTAACCCTGCCGGACGGCAGATTCTCTATGACCTC
 SAACCGCTCAAACGTGAGGTTGCGCTTAAACTAACCCTGCCGGACGGCAGATTCTCTATGACCTC
 SAACCGCTCAAACGTGAGGTTGCGCTTAAACTAACCCTGCCGGACGGCAGATTCTCTATGACCTC

 S F D E A M D L V A S P E G K E F T R D T H
 ICGTTTGACGAAGCCATGGATCTGGTTGCCTCCCTGAGGGCAAAGAGTTCACCCGAGACACGCAC
 ICGTTTGACGAAGCCATGGATCTGGTTGCCTCCCTGAGGGCAAAGAGTTCACCCGAGACACGCAC
 ICGTTTGACGAAGCCATGGATCTGGTTGCCTCCCTGAGGGCAAAGAGTTCACCCGAGACACGCAC

Figura 11 (continuación I)

V F T G E V T L DG A S A V S L F D D H L G E
 GTCTTCACAGGGAGAGGTCACCCTGGACGCGTCGGCTGTCTCCCTCTTCGACGACCACCTGGGAGAG
 GTCTTCACCGGAGAGGTCACCCTGGGCGCGTCGGCTGTCTCCCTCTTCGACGACCACCTGGGAGAG
 GTGTTACCGGAGAAGTCACCCTGGACGCGTCGGCTGTCTCCCTCTTCGACGACCACCTGGGAGAG

D Y Y G S E I Y T L K E G L S S V P Q G L L
 GACTACTATGGCAGTGAGATCTACACCCTAAAGGAAGGACTGTCTTCCGTCCCACAAGGGCTCCTA
 GACTACTACGGCAGTGAGATCTACACCCTCAAGGAAGGACTGTCTTCCGTCCCTCAAGGGCTCCTA
 GACTACTATGGCAGTGAGATCTACACCCTAAAGGAAGGACTGTCTTCCGTCCCACAAGGGCTCCTA

Q AT F L D A A D S N E F Y P N S H L K A L R
 CAGGCTTTTTCTGGACGCCGAGACTCCAACGAGTTCTATCCCAACAGCCACCTGAAGGCCCTGAGA
 CAGGCTTTTTCTGGACGCCGAGACTCCAACGAGTTCTATCCCAACAGCCACCTGAAGGCCCTGAGA
 CAGACTTTTTCTGGACGCCGAGACTCCAACGAGTTCTATCCCAACAGCCACCTGAAGGCCCTGAGA

R K T N G Q Y V L Y F E P T T S K D G Q T T
 CGTAAGACCAACGGTCAGTATGTTCTTTACTTTGAGCCCACCACCTCCAAGGATGGACAAACCACA
 CGTAAGACCAACGGTCAGTATGTTCTTTACTTTGAGCCCACCACCTCCAAGGATGGACAAACCACA
 CGTAAGACCAACGGTCAGTATGTTCTTTACTTTGAGCCCACCACCTCCAAGGATGGACAAACCACA

I N Y L E P L Q V V C A Q R V I L A M P V Y
 ATCAACTATCTGGAACCCCTGCAGGTTGTGTGTGCACAAAGAGTCATCCTGGCCATGCCGGTATAC
 ATCAACTATCTGGAACCCCTGCAGGTTGTGTGTGCACAGAGAGTCATTCTGGCCATGCCGGTCTAC
 ATCAACTATCTGGAACCCCTGCAGGTTGTGTGTGCACAGAGAGTCATCCTGGCCATGCCGGTCTAC

A L N Q L D W N Q L R N D R A T O A Y A A V
 GCTCTGAACCAACTAGACTGGAATCAGCTCAGAAATGACCGAGCCACCCAAGCGTACGCTGCCGTT
 GCTCTCAACCAGTGGATTTGGAATCAGCTCAGAAATGACCGAGCCACCCAAGCGTACGCTGCCGTG
 GCTCTCAACCAACTGGACTGGAATCAGCTCAGAAATGACCGAGCCACCCAAGCGTACGCTGCCGTG

R P I P A S K V F M TS F D O P W W L E N E R
 CGCCCGATTCTGCAAGTAAGGTGTTTCATGTCCTTTGATCAGCCCTGGTGGTTGGAGAACGAGAGG
 CGCCCGATTCTGCAAGTAAGGTGTTTCATGACCTTTGATCAGCCCTGGTGGTTGGAGAACGAGAGG
 CGCCCGATTCTGCAAGTAAGTGTTTCATGACCTTTGATCAGCCCTGGTGGTTGGAGAACGAGAGG

K S W V T K S D A L F S O M Y D W Q K S E A
 AAATCCTGGGTACCAAGTCGGACGCGCTTTTCAGCCAAATGTACGACTGGCAGAAGTCTGAGGCG
 AAATCCTGGGTACCAAGTCGGACGCGCTTTTCAGTCAAATGTACGACTGGCAGAAGTCTGAGGCG
 AAATCCTGGGTACCAAGTCGGACGCGCTTTTCAGCCAAATGTACGACTGGCAGAAGTCTGAGGCG

S G D Y I L I A S Y A D G L K A Q Y L R E L
 TCCGGAGACTACATCCTGATCGCCAGCTACGCCGACGGCCTCAAAGCCAGTACCTGCGGGAGCTG
 TCCGGAGACTACATCCTGATCGCCAGCTACGCCGACGGCCTCAAAGCCAGTACCTGCGGGAGCTG
 TCCGGAGACTACATCCTGATCGCCAGCTACGCCGACGGCCTCAAAGCCAGTACCTGCGGGAGCTG

K N O G E D I P G S D P G Y N O V T E P L K
 AAGAATCAGGGAGAGGACATCCCAAGGCTCTGACCCAGGCTACAACCAGGTTACCGAACCCCTCAAG
 AAGAATCAGGGAGAGGACATCCCAAGGCTCTGACCCAGGCTACAACCAGGTCAACCGAACCCCTCAAG
 AAGAATCAGGGAGAGGACATCCCAAGGCTCTGACCCAGGCTACAACCAGGTCAACCGAACCCCTCAAG

Figura 11 (continuación - II)

D T I L D H L T E A Y G V E R D S I PR E P V
 GACACCATTCTTGACCACCTCACTGAGGCTTATGGCGTGGAGCGAGACTCGATCCCGGAACCCGTG
 GACACCATTCTTGACCACCTCACTGAGGCTTATGGCGTGGAGCGAGACTCGATCCCGGAACCCGTG
 GACACCATTCTTGACCACCTCACTGAGGCTTATGGCGTGGAGCGAGACTCGATCCCGGAACCCGTG

T A A S Q F W T D Y P F G C G W I T W R A G
 ACCGCCGCTTCCAGTTCTGGACAGACTACCCGTTTGGCTGTGGATGGATCACCTGGAGGGCCGGC
 ACCGCCGCTTCCAGTTCTGGACAGACTACCCGTTTGGCTGTGGATGGATCACCTGGAGGGCCGGC
 ACCGCCGCTTCCAGTTCTGGACAGACTACCCGTTTGGCTGTGGATGGATCACCTGGAGGGCCGGC

F H F D D V I S T M R R P S L K D E V Y V V
 TTCCATTTTCGATGACGTCATCAGCACCATGCGTCGCCCGTCACTGAAAGATGAGGTCTACGTGGTG
 TTCCATTTTCGATGACGTCATCAGCACCATGCGTCGCCCGTCACTGAAAGATGAGGTCTACGTGGTG
 TTCCATTTTCGATGACGTCATCAGCACCATGCGTCGCCCGTCACTGAAAGATGAGGTCTACGTGGTG

G A D Y S W G L I S S W I E G A L E T S E N
 GGAGCCGACTACTCCTGGGGACTTATCTCCTCCTGGATAGAGGGCGCTCTGGAGACCTCGGAAAAC
 GGAGCCGACTACTCCTGGGGACTTATCTCCTCCTGGATAGAGGGCGCTCTGGAGACCTCGGAAAAC
 GGAGCCGACTACTCCTGGGGACTTATCTCCTCCTGGATAGAGGGCGCTCTGGAGACCTCGGAAAAC

V I N D Y F L - SEQ ID NO: 2, 4 y 6
 GTCATCAACGACTACTTCCTCTAA SEQ ID NO: 1
 GTCATCAACGACTACTTCCTCTAA SEQ ID NO: 3
 GTCATCAACGACTACTTCCTCTAA SEQ ID NO: 5