

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 853**

51 Int. Cl.:

C12N 15/60 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12P 19/26 (2006.01)
A61K 38/51 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2001 E 01916493 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 1266013**

54 Título: **Heparinasa III y sus usos**

30 Prioridad:

08.03.2000 US 187846 P

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

30.01.2015

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
77 MASSACHUSETTS AVENUE
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**DONGFANG, LIU;
POJASEK, KEVIN;
SHRIVER, ZACHARY;
HOLLEY, KRISTINE;
EL-SHABRAWI, YOSUF;
VENKATARAMAN, GANESH y
SASISEKHARAN, RAM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 527 853 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

Heparinasa III y sus usos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere a formas modificadas de heparinasa III. En particular, la invención se refiere a formas modificadas de heparinasa III con actividad enzimática reducida, que son útiles para una diversidad de propósitos, incluyendo la secuenciación de glicosaminoglicanos similares a heparina (HLGAGs - siglas en inglés), la separación de HLGAGs a partir de una disolución, la inhibición de la angiogénesis, la inhibición de la coagulación, etc. La invención, en otros aspectos, se refiere a formas modificadas de heparinasa III para tratar el cáncer e inhibir el crecimiento de células tumorales y/o metástasis o productos HLGAG producidos por escisión enzimática con formas modificadas de heparinasa III.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Glicosaminoglicanos similares a heparina (HLGAGs) son componentes importantes de la matriz extracelular, que se piensa que regulan una amplia diversidad de actividades celulares, incluyendo la invasión, migración, proliferación y adhesión. Khodapkar, et al. 1998; Woods, et al., 1998). Los HLGAGs logran algunas de estas funciones mediante uniéndose a y regulando las actividades biológicas de diversas moléculas, incluyendo factores de crecimiento, morfógenos, enzimas, proteínas extracelulares. Los HLGAGs son polisacáridos lineales que se caracterizan por una unidad repetitiva disacárido de un ácido urónico [ácido α -L-idurónico (I) o ácido β -D-glucurónico (G)] enlazado a 1,4 α -B-hexosamina (H). (1) Estos polímeros de 20-100 unidades disacárido pueden modificarse adicionalmente a través de N- y O-sulfatación, epimerización en la posición C5 del resto de ácido urónico, añadiendo una micro-heterogeneidad adicional a estas moléculas de información densas. (1.5).

A pesar de que la estructura y la química de HLGAGs están bastante bien comprendidas, información sobre cómo secuencias de HLGAG específicas modulan diferentes procesos biológicos ha demostrado ser más difícil de obtener. Los autores de la invención han desarrollado recientemente una metodología de secuenciación rápida para polisacáridos utilizando herramientas químicas y enzimáticas para modificar o degradar un polímero de HLGAG desconocido de una manera específica para la secuencia. (Venkataraman, G., et al., *Science*, 286,537-542 (1999), y Solicitudes de Patente de EE.UU. N° de serie. 09/557.997 y 09/558.137, ambas presentadas el 24 de abril de 2000). Una herramienta enzimática importante en este proceso de secuenciación son las heparinasas, incluyendo heparinasas I, II y III. Las tres heparinasas son enzimas de degradación de HLGAG que se pueden producir por parte de *Flavobacterium heparinum*. Cada una de las heparinasas tiene su propia secuencia de HLGAG única en la que se escinde, haciendo de estas enzimas valiosas herramientas para obtener una información específica de la secuencia. La heparinasa I escinde principalmente HLGAGs en el enlace $\text{HN}_{\text{S},6\text{x}-1}\text{S}^2$ que se encuentra principalmente en las regiones similares a heparina (Ernst, S., et al., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30, 387-444 (1995)). Desai, U., et al., *Biochemistry* 32, 8140-8145 (1993)), y Jandik, K., et al., *Glycobiology*, 4, 289-296 (1994)). La heparinasa III escinde en los enlaces $\text{HN}_{\text{AC}}\text{-I}$ y $\text{HN}_{\text{Y},6\text{x}-\text{G}}^2$ que son los principales disacáridos encontrados en el sulfato de heparán (Ernst, et al., (1995), *supra*, y Linhardt, R., et al., *Biochemistry*, 29, 2611-2617 (1990)). La heparinasa II es capaz de reconocer y escindir ambos conjuntos de enlaces de sustrato (Ernst, et al., (1995), *supra*). Recientemente, los autores de la invención han identificado varios residuos que son críticos para la actividad de heparinasa I y heparinasa II. Se encontró que la cisteína 135 y la histidina 203, así como las lisinas 198, 199 y 132 de heparinasa I eran críticas para la actividad enzimática de la molécula. Se determinó que la cisteína 348 y las histidinas 238, 451 y 579 eran cruciales para la actividad heparinasa II. (Solicitud de Patente de EE.UU. en tramitación, N° 09/384.959; Sasisekharan, R., et al., *Biochemistry*, 34, 14441-14448 (1995); Godavarti, R., et al., *Biochemistry*, 35, 6846-6852 (1996); Godavarti, R., y Sasisekharan, R., *J. Biol. Chem.* 273, 248-255 (1998); Shriver, Z., et al, *J. Biol. Chem.*, 273, 22904-22912 (1998); y Shriver, Z., *J. Biol. Chem.*, 273, 10160-10167 (1998)).

45 La heparinasa III es única, ya que es el único miembro de la familia de la heparinasa que reconoce y escinde preferencialmente sulfato de heparán. La heparinasa III tampoco contiene cisteínas en su secuencia de aminoácidos.

La metástasis de tumores implica la propagación de células tumorales principalmente a través de la vasculatura a sitios remotos en el cuerpo. Se piensa que a medida que la matriz extracelular se degrada, las interacciones célula tumoral-matriz extracelular se desensamblan, liberando la célula tumoral para atravesar el lecho capilar. Se han logrado avances extraordinarios para dilucidar los roles de colágeno y proteínas relacionadas, enzimas (colagenasas y otras) que degradan las proteínas de la matriz extracelular para regular la angiogénesis tumoral y/o invasión de células tumorales.

Recientemente también se ha planteado la hipótesis de que enzimas que degradan HLGAG, heparinasas, ayudan en la degradación de la matriz extracelular para regular el crecimiento del tumor, la angiogénesis y la metástasis. Se ha sugerido que la expresión de heparinasas en asociación con el desarrollo de tumores representa una

conmutación de un tumor metastásico a un tumor no metastásico y desempeña un papel en la iniciación del proceso de metástasis. La hipótesis fue reafirmada por la reciente clonación de un gen humano heparinasa y por la demostración de una malignidad incrementada de las células cancerosas mediante la sobre-expresión del producto del gen de la heparinasa.

5 SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha descubierto, de acuerdo con un aspecto de la invención, que la expresión de heparinasas no representa necesariamente una conmutación de un tumor primario a un estado de enfermedad metastásica. De acuerdo con el paradigma actual, se encontró actividad de heparinasa I para acelerar el crecimiento del tumor y se correlaciona con el aumento de la metástasis. Sorprendentemente, se encontró, sin embargo, que heparinasa III inhibe el crecimiento del tumor primario y reduce significativamente la metástasis. En un aspecto, la invención proporciona una heparinasa III modificada, sustancialmente pura, que comprende: un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del péptido maduro de SEQ ID NO: 2, en donde al menos un residuo histidina, seleccionado del grupo que consiste en His36, His105, His110, His139, His152, His225, His234, His241, His424, His469 y His539, ha sido sustituido con un residuo seleccionado del grupo que consiste en alanina, serina, tirosina, treonina y lisina. La heparinasa III modificada de la invención se puede utilizar para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la angiogénesis y/o la neovascularización, para uso en un método terapéutico para disminuir los síntomas de glaucoma neovascular, retinopatía diabética o fibropasia retrolental, en donde la heparinasa III modificada se administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable para la aplicación tópica a los ojos, para uso en un método terapéutico *in vivo* para disminuir los síntomas de psoriasis, para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la proliferación celular, para uso en un método terapéutico *in vivo* para prevenir la proliferación de un tumor, que comprende exponer células tumorales a una cantidad eficaz de la heparinasa III modificada para prevenir la proliferación de las células tumorales y el crecimiento del tumor, o para uso en un método terapéutico *in vivo* para prevenir la metástasis de células tumorales, que comprende exponer una célula tumoral a una cantidad eficaz de la heparinasa III modificada para prevenir la invasión de la célula tumoral a través de una barrera. En un aspecto, la invención es un método para prevenir el crecimiento de un tumor *in vitro* mediante la exposición de una célula tumoral a una cantidad eficaz de heparinasa III modificada para prevenir la proliferación de las células tumorales con el fin de prevenir el crecimiento del tumor. En otros aspectos, la invención es un método para prevenir la metástasis de células tumorales mediante la exposición *in vitro* de una célula tumoral a una cantidad eficaz de heparinasa III modificada para prevenir la invasión de la célula tumoral a través de una barrera.

Adicionalmente, se ha descubierto de acuerdo con la invención que fragmentos de HLGAG terapéuticos pueden utilizarse para tratar el cáncer. Estos fragmentos son útiles para prevenir el crecimiento de un tumor, así como para prevenir la metástasis. Estos fragmentos pueden ser generados mediante tratamiento con heparinasa III modificada de células cancerosas. Los fragmentos generados mediante tratamiento con heparinasa III modificada de una célula cancerosa se pueden utilizar para prevenir o tratar el cáncer de las mismas o diferentes células cancerosas que las que se utilizan para generar los fragmentos. Adicionalmente, pueden utilizarse para tratar o prevenir el cáncer en el mismo o en un sujeto diferente que el que se utilizó para generar los fragmentos.

La célula tumoral se puede exponer a la heparinasa III modificada mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, cuando la célula tumoral es una célula tumoral *in vitro*, heparinasa III modificada se pueden añadir al cultivo *in vitro*. Cuando la célula tumoral es *in vivo*, la heparinasa III se puede administrar por cualquier método para suministrar la heparinasa III al tumor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la heparinasa III puede ser administrada sistémicamente tal como mediante administración oral, inyección, etc., o localmente tal como mediante inyección directa en el tumor o sitio del tumor o por aplicación directa durante la manipulación quirúrgica, etc.

La heparinasa III modificada puede administrarse sola o en unión con otras terapias tal como un fármaco anti-cáncer. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor de próstata o un melanoma.

En otros aspectos, la invención es un método *in vitro* para la preparación de un fragmento de HLGAG terapéutico, que comprende poner en contacto un tumor aislado o una parte del mismo con una heparinasa III modificada de la presente invención para producir un fragmento de HLGAG, e identificar el fragmento de HLGAG para el tratamiento del tumor. En algunas realizaciones, el método también puede incluir la etapa de determinar la secuencia de los fragmentos de HLGAG.

El fragmento de HLGAG terapéutico preparado podría utilizarse en un método para tratar un sujeto que tiene un tumor. El método implica administrar al sujeto fragmentos de HLGAG terapéuticos para tratar el tumor. Opcionalmente, el método puede implicar identificar un fragmento de HLGAG terapéutico mediante la identificación de un HLGAG que se produce cuando el tumor se pone en contacto con heparinasa III modificada. En algunas realizaciones, el fragmento de HLGAG terapéutico es un fragmento de HLGAG sintético, generado en base a la secuencia del fragmento de HLGAG identificado cuando el tumor se pone en contacto con heparinasa III. En otras realizaciones, el fragmento de HLGAG administrado al sujeto es un fragmento de HLGAG aislado, producido cuando el tumor se pone en contacto con la heparinasa III.

Un fragmento de HLGAG terapéutico preparado también podría utilizarse en un método para tratar o prevenir un sujeto que tiene un cáncer o que está en riesgo de desarrollar un cáncer mediante la administración al sujeto de un fragmento de HLGAG terapéutico. El fragmento de HLGAG terapéutico podría ser una composición de fragmentos de HLGAG en donde al menos 50%, 75% o 90% de los fragmentos de HLGAG son disacáridos di-o tri-sulfatados. El fragmento de HLGAG terapéutico podría estar libre de disacáridos monosulfatados o no sulfatados.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición. La composición incluye heparinasa III modificada y un soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición puede incluir heparinasa III modificada en una cantidad eficaz para prevenir la metástasis de una célula tumoral, y una molécula diana para fijar como objetivo la heparinasa III al tumor. En algunas realizaciones, la heparinasa III es un heparinasa III modificada y en otras realizaciones es un heparinasa III nativa. La molécula diana puede ser, por ejemplo, un compuesto que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula tumoral.

En algunas realizaciones, la composición puede incluir heparinasa III modificada en una cantidad eficaz para prevenir la metástasis de una célula tumoral, y un compuesto anti-cáncer en un soporte farmacéuticamente aceptable.

La invención, en otros aspectos, se basa en la identificación de residuos importantes dentro de la molécula de heparinasa III. Se ha descubierto de acuerdo con la invención que la modificación de determinados residuos de histidina dentro de la molécula de heparinasa III provoca cambios en la velocidad enzimática de la enzima, así como el perfil del producto producido por la enzima. En particular, se descubrió que histidina 295 e histidina 510 son importantes para la degradación enzimática de sulfato de heparán por parte de heparinasa III. Cuando estas dos histidinas se cambiaron a otros aminoácidos, se perdió toda la actividad de la enzima. La modificación de los otros residuos de histidina dio lugar a cambios en las constantes cinéticas de la enzima, pero la enzima seguía conservando actividad. Así, en otro aspecto, la invención es un heparinasa III modificada sustancialmente pura que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del péptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o que tiene sustituciones conservativas de la misma dentro de residuos no esenciales para la función enzimática, en donde al menos un residuo histidina, seleccionado del grupo que consiste en His 36, His 105, His 110, His 139, His 152, His 225, His 234, His 241, His 424, His 469 y His 539 ha sido sustituido con un residuo seleccionado del grupo que consiste en alanina, serina, tirosina, treonina y lisina. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene una sustitución en His 110 o His 241. En otros aspectos, la invención es un heparinasa III sustancialmente pura que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del péptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o que tiene sustituciones conservativas de la misma dentro de residuos no esenciales para la función enzimática, en donde al menos un residuo histidina seleccionado del grupo que consiste en His295 y His510 ha sido sustituido con cualquier otro aminoácido.

En otro aspecto, la invención es una heparinasa III sustancialmente pura que es una heparinasa III modificada que tiene un perfil de producto modificado, en donde el perfil de producto modificado de la heparinasa III modificada es al menos un 10% diferente de un perfil de producto nativo de una heparinasa III nativa.

En otro aspecto, la invención es una heparinasa III sustancialmente pura que es una heparinasa III modificada que pueden escindir un sustrato de HLGAG que tiene un valor k_{cat} de heparinasa III modificada, en donde el valor k_{cat} de heparinasa III modificada es al menos un 10% diferente de un valor k_{cat} de una heparinasa III nativa. La invención también abarca preparados farmacéuticos de cualquiera de las moléculas de heparinasa III sustancialmente puras con un soporte farmacéuticamente aceptable. La invención también abarca la heparinasa III modificada de la invención, inmovilizada sobre una membrana de soporte sólida.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de escindir específicamente un HLGAG *in vitro*. El método de escindir específicamente un HLGAG *in vitro* incluye la etapa de poner en contacto un HLGAG con la heparinasa III modificada de la invención, opcionalmente para producir LMWH. El método puede utilizarse en un método para prevenir la proliferación de células tumorales o metástasis, tal como se describe arriba. En otras realizaciones, el método es un método para secuenciar HLGAGs. En aún otras realizaciones, el método es un método para separar HLGAGs activos a partir de un fluido que contiene HLGAG. El método también se puede utilizar en un método para inhibir la angiogénesis, un método para inhibir la neovascularización, p. ej. tal como la asociada con la enfermedad de los ojos, un método para el tratamiento de psoriasis, o un método para inhibir la coagulación.

La invención también incluye un método para preparar LMWH poniendo en contacto una muestra de HLGAG con una molécula de heparinasa III modificada *in vitro* para producir LMWH. Una composición de este tipo puede utilizarse en un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con la coagulación, tumor, psoriasis, o neovascularización, mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de esta composición para tratar o prevenir un trastorno asociado con la coagulación, tumor, psoriasis o neovascularización.

Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinaciones de elementos pueden incluirse en cada uno de los aspectos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La Figura 1 es un gráfico que representa el efecto de la inactivación mediante DEPC de heparinasa III sobre la constante de velocidad.

La Figura 2 es un gráfico que representa la dependencia del pH de la constante de velocidad de segundo orden de inactivación tras la incubación de heparinasa III con concentraciones variables de DEPC.

10 La Figura 3 es un gráfico que representa la cuantificación de residuos de histidina modificada con DEPC en heparinasa III durante un periodo de tiempo.

La Figura 4 es un gráfico que representa la protección de sustrato de la inactivación de heparinasa III por parte de DEPC III.

La Figura 5 es un perfil de HPLC de fase inversa de una digestión lys-C de heparinasa III que no fue expuesta a DEPC (panel superior) y un perfil de péptido de la heparinasa III marcado con DEPC (panel inferior).

15 La Figura 6 es una serie de gráficos que representan el análisis de SAX de digestiones exhaustivas con heparinasa III de sulfato de heparán. El sulfato de heparán se digirió con heparinasa III de *F. heparinum* (panel A), heparinasa III recombinante (panel B), enzima mutante H295A (panel C), enzima mutante H510A (panel D) o la enzima mutante H105A (panel E).

20 La Figura 7 representa un análisis de dicroísmo circular de heparinasa III recombinante y la enzima mutante H295A, y la enzima mutante H510A.

La Figura 8 es un gráfico que representa el volumen del tumor en ratones, así como ratones tratados con heparinasa I.

25 La Figura 9 es un histograma que representa el número de nódulos pulmonares que se desarrollaron 13 días después de inyección en la vena de la cola de células B16 BL6. Las células fueron tratadas con PBS, heparinasa I o heparinasa III.

La Figura 10, panel A, representa el volumen del tumor de ratones que fueron tratados con fragmentos de GAG generados a partir de tratamiento de células B16BL6 con heparinasa I, heparinasa III, o PBS o fragmentos generados a partir del tratamiento con heparinasa I de células LLC. El volumen del tumor se midió en el tiempo entre los 7 y 15 días después de la inyección de las células tumorales.

30 La Figura 10, panel B, es un histograma que cuantifica el número de nódulos pulmonares de los ratones descritos en el panel A.

La Figura 11 es un histograma que representa el efecto sobre la migración celular B16 y la invasión de transfección con 2OST antisentido en pcDNA3.1.

35 La Figura 12 muestra histogramas que representan la capacidad de las células transfectadas de la Figura 12 para convertirse en tumores primarios según se evalúa por el volumen medio del tumor (12a) y el peso del tumor (12b).

La Figura 13 representa los resultados de análisis de la composición de fragmentos de sacáridos HLGAG liberados de células B16BL6.

La Figura 14 es un histograma que representa la señalización de FGF2 modulada por fragmentos de HLGAG.

40 La Figura 15 es una tabla (15a) y un esquema que representa la modulación de la actividad de FGF2 in vivo por fragmentos de B16BL6 (15b).

Breve Descripción de las Secuencias

Secuencia ID N° 1 es la secuencia de ácidos nucleicos de heparinasa III de *F. bacterium*.

Secuencia ID N° 2 es la secuencia de aminoácidos de heparinasa III de *F. bacterium*.

Secuencia ID N° 3 es un fragmento de péptido.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención, en algunos aspectos se refiere a heparinasa III modificada y a usos de la misma. El invento surgió de varios hallazgos científicos que amplían el campo de la biología de heparinasa. En particular, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de nuevas formas modificadas de heparinasa que tienen una actividad enzimática variable y producen perfiles de productos diferentes. La invención también se basa en el hallazgo de que la heparinasa III nativa, formas modificadas de la heparinasa III y formas modificadas de la heparinasa II que tienen una actividad similar a heparinasa III son útiles para el tratamiento y la prevención del crecimiento de células tumorales y la metástasis.

La presente invención proporciona una serie de nuevas moléculas modificadas de heparinasa III. En particular, basándose en una caracterización estructural y funcional detallada de la heparinasa III, se proporcionan nuevas heparinasas con estabilidad, actividad y especificidad alteradas. Las heparinasas modificadas de la invención tienen muchas utilidades *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Por ejemplo, tienen un gran valor en la generación de HLGAGs de bajo peso molecular, sulfato de heparán o fragmentos de sulfato de heparán para uso clínico. Adicionalmente, se pueden utilizar para neutralizar la función HLGAGs que contiene sulfato de heparán o se pueden utilizar para identificar la secuencia de HLGAGs. Otros usos se describen en esta memoria.

La heparinasa III es única, debido a que es el único miembro de la familia de la heparinasa que reconoce y escinde sulfato de heparán como su único sustrato. La heparinasa III es también única entre sus miembros de la familia degradantes de heparina, debido a que no contiene cisteínas en su secuencia de aminoácidos primaria (Su, H., Blain, F., Musil, R.A., Zimmermann, J.J., Gu, K. y Bennett, D.C. (1996) *Appl. Environ. Micro.* 62, 2723-34 y Godavarti, R., Davis, M., Venkataraman, G., Cooney, C.L., Langer, R. y Sasisekharan, R. (1996) *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 225, 751-58). La heparinasa III, sin embargo, contiene trece histidinas, de las cuales una o varias podrían estar involucradas en la actividad de la enzima. A través de una combinación de modificación química, representación en mapa de péptidos y los estudios de mutagénesis dirigida al sitio, se ha identificado, de acuerdo con la invención, el papel de histidinas en la actividad catalítica de heparinasa III.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de heparinasa III se proporcionan en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. La secuencia de la heparinasa III ha sido reseñada en Su, H., Blain, F., Musil, R.A., Zimmermann, J.J., Gu, K., y Bennett, D.C. (1996) *Appl. Environ. Micro.* 62, 2723-34 y Godavarti, R., Davis, M., Venkataraman, G., Cooney, C.L., Langer, R. y Sasisekharan, R. (1996) *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 225, 751-58, patentes de EE.UU. N°s 5.919.693 y 5.681.733, y se listan en el número de Acceso I71365. Estas secuencias han proporcionado una primera visión de la estructura primaria de la heparinasa III nativa de *F. heparinum*.

La presente descripción proporciona información adicional acerca de la estructura secundaria y terciaria de la heparinasa III, así como información relativa a los roles funcionales de las diversas regiones de la enzima. Esta información se basa en la representación en mapa bioquímica detallada de los sitios importantes dentro de la enzima y en la caracterización de estos sitios a través de estudios cinéticos, caracterización de mutantes creados por mutagénesis dirigida al sitio, etc. El resultado es una imagen detallada de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la heparinasa III y los roles funcionales de diversas regiones de la enzima, así como las funciones de mutantes específicos de la misma.

La invención se basa en varios descubrimientos científicos. Se descubrió, de acuerdo con la invención, que diversos residuos aminoácidos dentro de heparinasa III son esenciales para la función catalítica de estas enzimas y pueden ser modificados para alterar la actividad enzimática de estos compuestos. También se descubrió que otros residuos aminoácidos son absolutamente críticos para la función de la heparinasa III y si están sustituidos o modificados de la actividad de estos compuestos se pierde por completo. En particular, se ha demostrado de acuerdo con la invención, a través de una combinación de modificación química, representación en mapa de péptidos y experimentos de mutagénesis dirigida al sitio que dos histidinas, histidina 295 e histidina 510, son críticas para la degradación enzimática de HLGAGs por heparinasa III.

Como se muestra en la sección de Ejemplos, DEPC se utilizó en la primera etapa del análisis de heparinasa III. DEPC es extremadamente útil para dilucidar el papel de histidinas en la función enzimática. Se ha de tener cuidado, sin embargo, para asegurar que DEPC no modifica otros aminoácidos nucleófilos tales como tirosina, lisina o cisteína (Godavarti, R., Cooney, C.L., Langer, R. y Sasisekharan, R. (1996) *Biochemistry* 35, 6846-52 y Shriver, Z., Hu, Y. y Sasisekharan, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10160-67). En el caso de la heparinasa III, no existen residuos cisteína en la secuencia primaria de aminoácidos, eliminando este aminoácido como un posible factor de confusión en los estudios de modificación química. Además, no se observó disminución en la absorbancia a 278 nm después de incubar heparinasa III con DEPC, lo que indica que los residuos tirosina no se modificaron. Se observó un incremento en la cinética de inactivación sin un cambio en el orden de la reacción de pH 6,0-7,5 tras el tratamiento con DEPC. Además, la modificación de DEPC era un 90% reversible tras la incubación con hidroxilamina 300 mM. Por encima de pH 8,0, la cinética de inactivación ya no eran de primer orden para la DEPC y la modificación no podía invertirse mediante hidroxilamina, lo que indica que los residuos distintos de histidinas (es decir, lisinas) estaban siendo modificados en esos pHs. Sin embargo, a pH neutro, los datos indican que DEPC modifica específicamente los residuos histidina de heparinasa III.

En consonancia con la observación de que DEPC está modificando un residuo histidina, se produjo un aumento en la absorbancia a 240 nm como una función del tiempo. Esto es indicativo de la formación de un derivado de N-carboxihistidilo, el producto de una reacción entre DEPC y un residuo de histidina. En el transcurso de diez minutos, se modificaron 1,8 residuos histidina y la actividad enzimática se redujo en un 90%. También, la preincubación con sulfato de heparán resultó en la cinética de inactivación más baja de heparinasa III mediante DEPC. Estos datos indicaron que DEPC modificaba específicamente un residuo histidina crítico, próximo a la unión del sustrato/sitio activo de heparinasa III, inactivando la enzima.

Una aparente discrepancia surgió de estos resultados, debido a que la reacción de DEPC con heparinasa III sigue una pseudo-cinética de primer orden, pero dos histidinas parecían ser modificadas de forma independiente, lo que sugiere que dos histidinas accesibles en la superficie reaccionan con DEPC a velocidades idénticas. Podría ser el caso de que uno o los dos residuos modificados son los responsables de la inactivación de la enzima. Se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida al sitio para determinar si dos histidinas eran esenciales para la actividad catalítica de heparinasa III. Los resultados de los experimentos de mutagénesis dirigida al sitio confirmaron y ampliaron en base a los datos de modificación química que las histidinas accesibles en superficie son críticas para la actividad de heparinasa III. Estos resultados identifican histidina 295 e histidina 510 como las histidinas primarias involucradas en la degradación de HLGAGs por parte de heparinasa III. Cuando estos residuos son reemplazados por alaninas, la enzima pierde toda actividad hacia su sustrato. Ninguno de los otros residuos histidina, cuando mutan a alanina, muestran una pérdida completa de la actividad. Los resultados de los estudios de representación en mapa de péptidos confirman la importancia de la accesibilidad a superficie de la histidina 295.

La pérdida de actividad con las enzimas H295A y H510A puede explicarse de varias maneras. Puede ser que estas histidinas sean necesarias para el plegamiento correcto de heparinasa III. Sin embargo, el espectro de CD de H295A, H510A y heparinasa III recombinante era casi idéntico, lo que indica fuertemente que este no es el caso. Es más probable que histidina 295 e histidina 510 desempeñen un papel directo en la unión de HLGAGs a la enzima o que histidina 295 e histidina 510 sean residuos del sitio activo críticos directamente implicados en la degradación catalítica de HLGAGs. Moléculas de heparinasa III modificada que tienen un cambio en el aminoácido en His295 o 510 pueden ser útiles para una diversidad de propósitos, p. ej., como un inhibidor competitivo de la heparinasa III funcional.

Los estudios descritos en la sección de Ejemplos también identificaron varios mutantes de heparinasa III que tenían niveles alterados de actividad, pero que seguían siendo activos. Estos mutantes incluyen moléculas de heparinasa III que tienen los siguientes residuos mutados o sustituidos: His36, His105, His110, His139, His152, His225, His234, His241, His424, His469 y His539. Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevas heparinasas modificadas, racionalmente diseñadas sobre la base de la secuencia de la heparinasa III de *F. heparinum* y las caracterizaciones estructurales y funcionales descritas en esta memoria.

En la presente descripción, se hace referencia a los residuos aminoácidos y a las posiciones de residuos de la heparinasa III nativa descritos en la SEQ ID NO 2. En particular, a los residuos y a las posiciones de residuos se les alude como "correspondiente a" un residuo particular o posición de residuo de heparinasa III. Como resultará obvio para un experto ordinario en la técnica, estas posiciones son relativas y, por lo tanto, inserciones o deleciones de uno o más residuos tendrían el efecto de alterar la numeración de los residuos aguas abajo. En particular, inserciones o deleciones N-terminales alterarían la numeración de todos los residuos subsiguientes. Por lo tanto, tal como se utiliza en esta memoria, a un residuo en una heparinasa modificada recombinante se aludirá como "correspondiente a" un residuo de la heparinasa III completa si, utilizando programas estándares de comparación de secuencias, estuvieran alineados. Muchos de los programas de alineación de secuencias de este tipo están ahora disponibles para un experto ordinario en la técnica y su uso en comparaciones de secuencias se ha convertido en estándar. Tal como se utiliza en esta memoria, esta convención de referirse a las posiciones de los residuos de las heparinasas modificadas recombinantes por sus correspondientes residuos heparinasa III deberá extenderse no sólo a realizaciones que incluyen inserciones o deleciones N-terminales, sino también a inserciones o deleciones internas (p. ej., inserciones o deleciones en las regiones de "bucle").

Además, en la descripción en esta memoria, a determinadas sustituciones de un residuo aminoácido por otro en una heparinasa recombinante modificada se las alude como "sustituciones conservadoras. Tal como se utiliza en esta memoria, una "sustitución de aminoácidos conservadora" o "sustitución conservativa" se refiere a una sustitución de aminoácidos en la que el residuo aminoácido sustituido es de carga similar a la del residuo reemplazado y es de un tamaño similar o más pequeño que el residuo reemplazado. Sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) los pequeños aminoácidos no polares, A, M, I, L y V; (b) los pequeños aminoácidos polares, G, S, T y C; (c) los aminoácidos amido, Q y N; (d) los aminoácidos aromáticos, F, Y y W; (e) los aminoácidos de carácter básico, K, R y H; y (f) los aminoácidos de carácter ácido, E y D. Sustituciones que son carga neutra y que reemplazan a un residuo por un residuo más pequeño también puede ser consideradas "sustituciones conservativas" incluso si los residuos se encuentran en diferentes grupos (p. ej., el reemplazo de fenilalanina por la isoleucina más pequeña). La expresión "sustitución de aminoácidos conservativa" también se refiere al uso de análogos o variantes de aminoácidos.

Métodos para hacer sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle en los Ejemplos que figuran más adelante. Las expresiones "sustitución conservadora", "sustituciones no conservadoras", "aminoácidos no polares", "aminoácidos polares" y "aminoácidos de carácter ácido" se utilizan todos consistentemente con la terminología de la técnica anterior. Cada uno de estos términos es bien conocido en la técnica y se ha descrito ampliamente en numerosas publicaciones, incluyendo libros de texto de bioquímica convencionales, tales como "Biochemistry" por Geoffrey Zubay, Addison-Wesley Publishing Co., edición de 1986, que describe sustituciones conservativas y no conservativas, y las propiedades de aminoácidos que conducen a su definición como polar, no polar o de carácter ácido.

Incluso cuando es difícil predecir de antemano el efecto exacto de una sustitución, un experto en la técnica apreciará que el efecto se puede evaluar mediante ensayos de rastreo rutinarios, preferentemente los ensayos biológicos descritos en esta memoria. Modificaciones de propiedades de péptidos, incluyendo la estabilidad térmica, la hidrofobicidad, la susceptibilidad a la degradación proteolítica o la tendencia a agregarse con soportes o en multimeros se ensayan mediante métodos bien conocidos por el experto ordinario en la materia. Para una descripción detallada adicional de la química y la estructura de proteínas, véase Schulz, G.E. et al., Principles of Protein Structure, editorial Springer, Nueva York, 1979, y Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1984.

Adicionalmente, algunas de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas. En determinadas realizaciones en las que la sustitución está alejada de los sitios activos o de unión, las sustituciones no conservativas son toleradas fácilmente siempre que conservan la estructura terciaria característica de heparinasa nativa, preservando así los sitios activos y de unión. Sustituciones no conservadoras tales como entre en vez de dentro de los grupos anteriores (u otros dos grupos de aminoácidos no mostrados arriba), que diferirán más significativamente en su efecto manteniendo (a) la estructura principal del péptido en la zona de la sustitución (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el grueso de la cadena lateral.

En un aspecto, la invención es una heparinasa sustancialmente pura, que es una heparinasa III modificada tiene un valor k_{cat} de heparinasa III modificada, en donde el valor k_{cat} de heparinasa III modificada es al menos un 10% diferente de un valor k_{cat} de heparinasa III nativa. En una realización preferida, el valor k_{cat} de heparinasa III modificada es al menos un 20% diferente de un valor k_{cat} de heparinasa III nativa. En otra realización preferida, el valor k_{cat} de heparinasa III modificada es al menos un 50% diferente de un valor k_{cat} de heparinasa III nativa. Un "valor k_{cat} de heparinasa III modificada", tal como se utiliza en esta memoria es una medida de la actividad catalítica de la enzima heparinasa III modificada con respecto a un sustrato de glicosaminoglicano similar a sulfato de heparán.

El valor k_{cat} puede determinarse utilizando cualquier ensayo de actividad enzimática que sea útil para la evaluación de la actividad de una enzima heparinasa, tal como los ensayos recogidos en los Ejemplos que figuran más adelante. Varios de estos ensayos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ensayo para la medición de k_{cat} se describe en (Ernst, S.E., Venkataraman, G., Winkler, S., Godavarti, R., Langer, R., Cooney, C. y Sasisekharan, R. (1996) Biochem. J. 315, 589-597. El "valor k_{cat} de heparinasa III nativa", es la medida de la actividad enzimática de la heparinasa nativa III.

La heparinasa modificada puede tener una actividad enzimática reducida con respecto a HLGAGs. Una "actividad enzimática reducida" se evalúa comparando el valor k_{cat} de la heparinasa modificada con el de heparinasa nativa. Preferiblemente, el valor k_{cat} de la heparinasa III modificado será menor que o igual a 75% del valor k_{cat} de heparinasa III nativa. Una heparinasa modificada que tiene actividad enzimática reducida con respecto a HLGAGs es una que tiene modificaciones en los residuos esenciales para la actividad catalítica. Por ejemplo, la mutación de His¹¹⁰ o His²⁴¹ hace que la heparinasa III tenga una actividad enzimática reducida. Una heparinasa III modificada que tiene una actividad enzimática incrementada es una que tiene residuos alterados que producen una enzima con una mayor actividad enzimática. Por ejemplo, la mutación de His¹³⁹ produce moléculas de heparinasa III modificada que tienen una actividad enzimática incrementada. Adicionalmente, cuando His²²⁵ está mutada en heparinasa III, se produce una heparinasa III modificada que exhibe casi la misma actividad enzimática que la heparinasa III nativa. Estas enzimas también son útiles.

Tal como se usa en esta memoria, con respecto a las heparinasas, la expresión "sustancialmente pura" significa que las heparinasas están esencialmente exentas de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en un grado práctico y apropiado para su uso previsto. En particular, las heparinasas están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de sus células huéspedes con el fin de ser útiles, por ejemplo, en la producción de preparados farmacéuticos o en la secuenciación. Debido a que las heparinasas de la invención se pueden mezclar con un soporte farmacéuticamente aceptable en un preparado farmacéutico, la heparinasa puede comprender sólo un pequeño porcentaje en peso del preparado. No obstante, la heparinasa es sustancialmente pura, debido a que se ha separado sustancialmente de las sustancias con las que puede estar asociada en los sistemas vivos.

Basado en la descripción proporcionada en esta memoria, los expertos ordinarios en la técnica serán capaces de identificar otras moléculas de heparinasa modificada III que tienen alterada la actividad enzimática con respecto a la molécula de heparinasa III nativa.

5 En otro aspecto, la invención es una heparinasa sustancialmente pura que es una heparinasa III modificada que tiene un perfil de producto modificado, en donde el perfil de producto modificado de la heparinasa III modificada es al menos un 10% diferente de un perfil de producto nativo de una heparinasa III nativa. Preferiblemente, es al menos un 20% o incluso al menos un 50%. Un "perfil de producto modificado", tal como se utiliza en esta memoria, es un conjunto de productos de degradación producidos por una heparinasa modificada que difieren de los productos de degradación que se producen por una heparinasa nativa bajo condiciones enzimáticas idénticas. La diferencia en el perfil del producto puede ser debida a la presencia de diferentes productos enzimáticos o simplemente en el número de productos enzimáticos formados por la heparinasa modificada en comparación con la heparinasa nativa, o una combinación de los dos. Por ejemplo, la formación de diferentes productos enzimáticos mediante una heparinasa modificada en oposición a la heparinasa nativa, constituiría un perfil de producto modificado. Adicionalmente, la producción de los mismos tipos de productos enzimáticos, pero en una cantidad menor o mayor por parte de la heparinasa modificada en oposición a la heparinasa nativa, constituiría también un perfil de producto modificado.

El perfil de producto producido por una heparinasa modificada o una heparinasa nativa puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica para examinar el tipo o cantidad de producto de degradación producido por heparinasa. Un método preferido para la determinación del tipo y cantidad de producto se describe en Rhomberg, A.J. et al., *PNAS*, v. 95, págs. 4176-4181 (abril de 1998), que se incorpora aquí en su totalidad como referencia. El método descrito en la referencia de Rhomberg utiliza una combinación de espectrometría de masas y técnicas electroforéticas capilares para identificar los productos enzimáticos producidos por heparinasa. El estudio de Rhomberg utiliza heparinasa para degradar HLGAGs para producir oligosacáridos de HLGAG. Puede utilizarse la espectrometría de masas MALDI (desorción/ionización por láser asistida por una matriz) para la identificación y medición semicuantitativa de sustratos, enzimas y productos finales en la reacción enzimática. La técnica de electroforesis capilar separa los productos para resolver incluso pequeñas diferencias entre los productos y se aplica en combinación con espectrometría de masas para cuantificar los productos producidos. La electroforesis capilar puede incluso resolver la diferencia entre un disacárido y su derivado de semicarbazona. Métodos detallados para la secuenciación de polisacáridos y otros polímeros se describen en las solicitudes de patente de EE.UU. en co-tramitación N°s de serie. 09/557.997 y 09/558.137, ambas presentadas el 24 de abril de 2000 y que tienen inventores en común. La totalidad del contenido de las dos solicitudes se incorpora con ello como referencia.

Brevemente, el método se realiza por digestión enzimática, seguido de espectrometría de masas y electroforesis capilar. Los ensayos enzimáticos se pueden realizar de una diversidad de maneras, siempre y cuando los ensayos se realicen de forma idéntica en la heparinasa modificada y la heparinasa nativa, de modo que los resultados pueden ser comparados. En el ejemplo descrito en la referencia de Rhomberg, las reacciones enzimáticas se llevan a cabo mediante la adición de 1 mL de disolución de enzima a 5 mL de disolución de sustrato. La digestión se lleva a cabo entonces a temperatura ambiente (22°C), y la reacción se detiene en diversos instantes separando 0,5 mL de la mezcla de reacción y añadiéndolos a 4,5 mL de una solución matriz MALDI tal como el ácido cafeico (aproximadamente 12 mg/mL) y 70% de acetonitrilo/agua. La mezcla de reacción se somete después a espectrometría de masas MALDI. La superficie MALDI se prepara por el método de Xiang y Beavis (Xiang y Beavis (1994) *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 8, 199-204). Un acceso dos veces inferior de péptido de carácter básico (Arg/Gly)₁₅ se mezcla previamente con la matriz antes de ser añadido a la disolución de oligosacáridos. Una parte alícuota de 1 mL de la mezcla de muestra/matriz que contiene 1-3 picomoles de oligosacárido se deposita en la superficie. Después de producirse la cristalización (típicamente dentro de los 60 segundos), el exceso de líquido se enjuaga con agua. Los espectros de espectrometría de masas MALDI se adquirieron entonces en el modo lineal utilizando un instrumento reflectrón del tiempo de vuelo Voyager Elite de PerSeptive Biosystems (Framingham, MA), equipado con un láser de nitrógeno 337 nanómetros. Se utiliza una extracción retardada para aumentar la resolución (22 kV, rejilla en el 93%, cable guía en 0,15%, retraso de pulso 150 ns, puerta baja masa en 1.000, media de 128 tiros). Los espectros de masas se calibran externamente utilizando las señales para (Arg/Gly)₁₅ proteinado y su complejo con el oligosacárido.

50 La electroforesis capilar se realiza a continuación en una unidad CE de Hewlett-Packard^{3D} utilizando capilares sin revestir de sílice fundida (diámetro interno de 75 micrómetros, diámetro externo de 363 micrómetros, l_{det} 72,1 cm e l_{tot} 85 cm). Los analitos se vigilan mediante el uso de detección UV a 230 nm y una célula de trayectoria de la luz extendida (Hewlett-Packard). El electrolito es una disolución de 10 mL de sulfato de dextrano y Tris/ácido fosfórico 50 milimolar (pH 2,5). El sulfato de dextrano se utiliza para suprimir las interacciones no específicas de los oligosacáridos de heparina con una pared de sílice. Las separaciones se llevan a cabo a 30 kV con el ánodo en el lado detector (polaridad invertida). Una mezcla de un ácido 1/5-naftalenodisulfónico y ácido 2-naftalenesulfónico (10 micromolar en cada caso) se utiliza como patrón interno.

También se pueden utilizar otros métodos para evaluar el perfil del producto. Por ejemplo, otros métodos incluyen métodos que se basan en parámetros tales como la viscosidad (Jandik, K.A., Gu, K. y Linhardt, R.J., (1994),

Glycobiology, 4: 284-296) o la absorbancia UV total (Ernst, S. et al., (1996), *Biochem. J.*, 315: 589-597) o espectrometría de masas o electroforesis capilar sola.

5 Las heparinasas modificadas de la invención se pueden utilizar para cualquiera de los mismos fines que la heparinasa III nativa. Por ejemplo, las moléculas de heparinasa III modificada se pueden utilizar para escindir específicamente un HLGAG poniendo en contacto el sustrato de HLGAG con una de las heparinasas modificadas de la invención. La invención es útil en una diversidad de métodos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* en los cuales sea útil escindir HLGAGs.

10 La heparinasa III modificada se puede utilizar, por ejemplo, en un método para inhibir la angiogénesis. En este método se administra una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis de la heparinasa III a un sujeto en necesidad de tratamiento de la misma. La angiogénesis, tal como se utiliza en esta memoria, es la formación inapropiada de nuevos vasos sanguíneos. "Angiogénesis" se produce a menudo en tumores cuando las células endoteliales secretan un grupo de factores de crecimiento que son mitógenos para el endotelio, provocando el alargamiento y la proliferación de células endoteliales que da lugar a una generación de nuevos vasos sanguíneos. Varios de los mitógenos angiogénicos son péptidos de unión a heparina o sulfato de heparán que están relacionados con factores de crecimiento de células endoteliales. Las heparinasas modificados también son útiles para tratar o prevenir el crecimiento de células cancerosas o metástasis. Este aspecto de la invención se comenta con mayor detalle más adelante.

20 Los heparinasas modificadas también son útiles para inhibir la neovascularización asociada con la enfermedad tal como enfermedad de los ojos. La neovascularización, o angiogénesis, es el crecimiento y desarrollo de nuevas arterias. Es crítica para el desarrollo normal del sistema vascular, incluyendo lesión-reparación. Hay, sin embargo, estados caracterizados por una neovascularización anormal, incluyendo retinopatía diabética, glaucoma neovascular, artritis reumatoide, y determinados cánceres. Por ejemplo, la retinopatía diabética es una causa principal de la ceguera. Existen dos tipos de retinopatía diabética, simple y proliferativa. La retinopatía proliferativa se caracteriza por la neovascularización y la cicatrización. Aproximadamente la mitad de los pacientes con retinopatía proliferativa progresa a una ceguera en el espacio de aproximadamente cinco años.

30 Otro ejemplo de neovascularización anormal es el asociado con tumores sólidos. Se ha establecido ahora que el crecimiento no restringido de tumores depende de la angiogénesis y que la inducción de la angiogénesis por liberación de factores angiogénicos puede ser un paso importante en la carcinogénesis. Por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) es liberado por varias células cancerosas y juega un papel crucial en la angiogénesis del cáncer. Tal como se utiliza en esta memoria, un estado angiogénico significa una enfermedad o estado médico indeseable que tiene una patología que incluye la neovascularización. Tales enfermedades o estados incluyen retinopatía diabética, glaucoma neovascular y artritis reumatoide (estados angiogénicos no cancerosos). Estados angiogénicos cancerosos son tumores y cánceres sólidos o tumores asociados de otro modo con la neovascularización tales como hemangioendoteliomas, hemangiomas y el sarcoma de Kaposi.

35 Una proliferación de células endoteliales y musculares lisas vasculares es la característica principal de la neovascularización. Así, la heparinasa III modificada de la invención es útil para prevenir la proliferación y, por lo tanto, para inhibir o detener por completo la progresión del estado angiogénico la cual depende, en su totalidad o en parte, de una neovascularización de este tipo.

40 La neovascularización y la angiogénesis también son importantes en un cierto número de otros procesos patológicos, incluyendo artritis, psoriasis, retinopatía diabética, inflamación crónica, escleroderma, hemangioma, fibroplasia retrolental y proliferación capilar anormal en articulaciones hemofílicas, menstruación prolongada y sangrado, y otros trastornos del sistema reproductivo femenino (J. Folkman, *Nature Medicine*, Vol 1, págs. 27-31, (1995); J.W. Miller, et al., *J. Pathol.*, Vol. 145, págs. 574-584 (1994); A.P. Adamid, et al., *Amer. J. Ophthal.*, Vol. 118, págs. 445-450 (1994); K. Takahashi, et al., *J. Clin. Invest.*, Vol. 93, págs. 2357-2364 (1994); D. J. Peacock, et al., *J. Exp. Med.*, Vol. 175, págs. 1135-1138 (1992); B.J. Nickoloff, et al., *Amer. J. Pathol.*, Vol. 44, págs. 820-828 (1994); J. Folkman, *Steroid Hormones and Uterine Bleeding*, N.J. Alexander y C. d'Arcangues, comps., Asociación Americana para el Avance de la Prensa Científica, Washington, D.C., U.S.A., págs. 144-158 (1992)). Así, en otra realización, la heparinasa modificada de la invención se utiliza para tratar enfermedades tales como la psoriasis. La psoriasis es una enfermedad dermatológica común provocada por una inflamación crónica.

50 Las heparinasas modificadas H295A H510A también son útiles de acuerdo con la invención como inhibidores de la actividad de heparinasa III. Estos heparinasas modificados tienen un mínimo de una modificación de par de bases de la heparinasa nativa, pero no tienen actividad enzimática. Por lo tanto, heparinasas modificados que tienen una modificación H295A o H510A se pueden utilizar como inhibidores competitivos de formas modificadas nativas o funcionales de la heparinasa III. Estos compuestos son útiles en cualquier momento que sea deseable bloquear la actividad de la heparinasa III, p. ej. cuando es deseable una proliferación y migración celular o para bloquear la actividad de heparinasa III en una disolución.

- Las heparinasas modificadas de la invención también son útiles como herramientas para la secuenciación de HLGAGs. Métodos detallados para secuenciar polisacáridos y otros polímeros se describen en las solicitudes de patente de EE.UU. en co-tramitación N°s de serie. 09/557.997 y 09/558.137, ambas presentadas el 24 de abril de 2000 y que tienen inventores en común. Estos métodos utilizan herramientas tales como heparinasas en el proceso de secuenciación. La heparinasa III modificada de la invención es útil como una herramienta de este tipo.
- Las heparinasas modificadas de la invención también se pueden utilizar para separar HLGAGs activos de un HLGAG que contiene fluido *in vitro*. Un fluido que contiene HLGAG se pone en contacto con la heparinasa III modificada de la invención para degradar el HLGAG. El método es particularmente útil para la separación *ex vivo* de HLGAGs de la sangre. En una realización de la invención, la heparinasa modificada se inmoviliza sobre un soporte sólido tal como es convencional en la técnica. El soporte sólido que contiene la heparinasa modificada inmovilizada se puede utilizar en dispositivos médicos extracorpóreos (p. ej. hemodializador, bomba-oxigenador) para la heparinización sistémica para evitar que la sangre se coagule en el dispositivo. La membrana de soporte que contiene heparinasa III inmovilizada se coloca en el extremo del dispositivo para neutralizar el HLGAG antes de que la sangre sea devuelta al cuerpo.
- En otro aspecto, la invención es un heparinasa inmovilizada, sustancialmente pura de la invención. La heparinasa se puede inmovilizar en cualquier tipo de soporte, pero si el soporte se ha de utilizar *in vivo* o *ex vivo* se desea que el soporte sea estéril y biocompatible. Un soporte biocompatible es uno que no provoca una reacción inmunológica ni otro tipo de reacción perjudicial cuando se utiliza en un sujeto. La heparinasa se puede inmovilizar por cualquier método conocido en la técnica. Se conocen muchos métodos para la inmovilización de proteínas a soportes.
- La heparinasa III está, en algunas realizaciones, inmovilizada sobre un soporte sólido. Un "soporte sólido", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier material sólido al que una proteína puede ser inmovilizada. Soportes sólidos, por ejemplo, incluyen pero no se limitan a membranas, p. ej. celulosas naturales y modificadas tales como nitrocelulosa o nilón, Sepharose, agarosa, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, amilasas, poliacrilamidas, poli(difluoruro de vinilideno), otras agarosas, y magnetita, incluidas perlas magnéticas. El soporte puede ser totalmente insoluble o parcialmente soluble y puede tener cualquier configuración estructural posible. Por lo tanto, el soporte puede ser esférico, como en una perla, o cilíndrico, como en la superficie interna de un tubo de ensayo o pocillo de microplaca, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una hoja, tira de ensayo, la superficie de fondo de un pocillo de microplaca, etc.
- Las moléculas de heparinasa III modificada también son útiles para generar LMWHs que tienen muchas utilidades terapéuticas. Las moléculas de heparinasa III modificada y LMWH se pueden utilizar para el tratamiento de cualquier tipo de estado en el que la terapia de LMWH ha sido identificada como una terapia útil, p. ej., prevención de la coagulación, prevención de la psoriasis.
- Por lo tanto, las moléculas de heparinasa modificada son útiles para tratar o prevenir trastornos asociados con la coagulación. Una "enfermedad asociada con la coagulación", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un estado caracterizado por la inflamación local que resulta de una interrupción en el suministro de sangre a un tejido debido a una obstrucción del vaso sanguíneo responsable del suministro de sangre al tejido tal como se observa para el infarto de miocardio o cerebral. Un ataque isquémico cerebral o isquemia cerebral es una forma de estado isquémico en el que se bloquea el suministro de sangre al cerebro. Esta interrupción en el suministro de sangre al cerebro puede resultar de una diversidad de causas, incluyendo un bloqueo intrínseco u oclusión del propio vaso sanguíneo, una fuente de oclusión de origen remoto, presión de perfusión reducida o viscosidad de la sangre incrementada que resulta en insuficiencia de flujo sanguíneo cerebral, o un vaso sanguíneo roto en el espacio subaracnoideo o tejido intracerebral.
- Los métodos de la invención son útiles también para el tratamiento de la isquemia cerebral. La isquemia cerebral puede resultar en déficits transitorios o permanentes y la gravedad de la lesión neurológica en un paciente que ha experimentado isquemia cerebral depende de la intensidad y duración del evento isquémico. Un ataque isquémico transitorio es uno en el que el flujo de sangre al cerebro se interrumpe sólo brevemente y causa déficits neurológicos temporales, que a menudo se despejan en menos de 24 horas. Síntomas de AIT incluyen entumecimiento o debilidad de la cara o las extremidades, pérdida de la capacidad de hablar con claridad y/o entender el lenguaje de los demás, una pérdida de la visión o visión borrosa, y una sensación de mareo. Ataques isquémicos cerebrales permanentes, también llamados accidentes cerebrovasculares, son provocados por una interrupción más prolongada en el flujo de sangre al cerebro que resulta de un tromboembolismo. Un derrame cerebral provoca una pérdida de neuronas, lo cual normalmente resulta en un déficit neurológico que puede mejorar, pero que no se resuelve por completo. El ictus tromboembólico es debido a la oclusión de un vaso sanguíneo extracraneal o intracraneal por un trombo o émbolo. Debido a que a menudo es difícil discernir si un accidente cerebrovascular es provocado por una trombosis o una embolia, el término "tromboembolia" se utiliza para cubrir los accidentes cerebrovasculares provocados por cualquiera de estos mecanismos.

Heparinasa III modificada o los LMWHs generados con la misma se podrían utilizar para el tratamiento de un accidente tromboembólico agudo. Un accidente cerebrovascular es un síndrome médico que implica una lesión neurológica resultante de un evento isquémico, que es una interrupción en el suministro de sangre al cerebro.

5 Una cantidad eficaz de una heparinasa III modificada o los LMWHs generados con la misma, sola o en combinación con otra terapéutica para el tratamiento del accidente cerebrovascular es la cantidad suficiente para reducir en la lesión del cerebro *in vivo* resultante de la apoplejía. Una reducción de la lesión del cerebro es cualquier prevención de lesiones en el cerebro que de otro modo se habrían producido en un sujeto que experimenta un accidente cerebrovascular tromboembólico en ausencia del tratamiento de la invención. Se pueden utilizar varios parámetros fisiológicos para evaluar la reducción de la lesión del cerebro, incluyendo el tamaño del infarto más pequeño, el flujo sanguíneo cerebral regional mejorado y la presión intracraneal disminuida, por ejemplo, en comparación con los parámetros de pretratamiento del paciente, pacientes con accidente cerebrovascular sin tratar o pacientes con accidente cerebrovascular tratados con agentes trombolíticos solos.

15 La heparinasa III modificada o los LMWHs generados con la misma se pueden usar solos o en combinación con un agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad asociada con la coagulación. Ejemplos de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas con la coagulación incluyen agentes anticoagulantes, agentes antiplaquetarios y agentes trombolíticos.

Agentes de anticoagulación impiden la coagulación de los componentes de la sangre y, por lo tanto, previenen la formación de coágulos. Anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, heparina, warfarina, coumadina, dicumarol, fenprocoumon, acenocumarol, biscoumacetato de etilo y derivados de indandiona.

20 Los agentes antiplaquetarios inhiben la agregación plaquetaria, y a menudo se utilizan para prevenir el accidente cerebrovascular tromboembólico en pacientes que han sufrido un ataque isquémico transitorio o accidente cerebrovascular. Los agentes antiplaquetarios incluyen, pero no se limitan a aspirina, derivados de tienopiridina tales como ticlopodina y clopidogrel, dipiridamol y sulfpirazona, así como miméticos de RGD y también agentes antitrombina tales como, pero no limitado a, hirudina.

25 Los agentes trombolíticos lisan coágulos que provocan el ictus tromboembólico. Agentes trombolíticos se han utilizado en el tratamiento de la tromboembolia venosa aguda y embolias pulmonares y son bien conocidos en la técnica (p. ej., véase Hennekens et al., *Am Coll Cardiol*; v. 25 (Supl 7), págs. 18S-22S (1995); Holmes, et al, *J Am Coll Cardiol*; v. 25 (Supl 7), págs. 10S-17S (1995)). Agentes trombolíticos incluyen, pero no se limitan a plasminógeno, α_2 -antiplasmina, estreptoquinasa, antiestrepasa, activador del plasminógeno tisular (tPA) y uroquinasa. "tPA", tal como se utiliza en esta memoria, incluye tPA nativa y tPA recombinante, así como formas modificadas de tPA que conservan la actividad enzimática o fibrinolítica de la tPA nativa. La actividad enzimática de tPA se puede medir evaluando la capacidad de la molécula de convertir plasminógeno en plasmina. La actividad fibrinolítica de tPA puede ser determinada por cualquier actividad de lisis de coágulos *in vitro* conocida en la técnica tales como el ensayo de lisis de coágulos purificado descrito por Carlson, et. al., *Anal. Biochem.* 168, 428-435 (1988) y su forma modificada descrita por Bennett, W.F. et al., 1991, *Supra*, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia.

40 La invención también se refiere al descubrimiento de que heparinasa III, formas modificadas de la misma, formas modificadas de heparinasa II y productos de degradación de heparinasas (fragmentos de HLGAG) en realidad son útiles para tratar y prevenir la proliferación de células cancerosas y metástasis. Así, heparinasa III modificada podría utilizarse para tratar sujetos que tienen o con riesgo de tener cáncer.

45 Las heparinasas degradan los HLGAGs, que son polisacáridos lineales que se caracterizan por una unidad repetitiva de disacárido de un ácido urónico [ácido α L-urónico (I) o ácido β -D-glucurónico (G)] enlazado 1,4 a α -D-hexosamina (H). Los HLGAGs son el biopolímero más de carácter ácido, heterogéneo y de información densa encontrados en la naturaleza debido a la modificación química muy variable de la unidad repetitiva de disacárido - principalmente en forma de sulfatación en las posiciones N, 3O y 6O de H, y la 2O de los ácidos urónicos. Críticamente, los HLGAGs (junto con el colágeno) son componentes clave de la interfaz superficie de la célula-matriz extracelular (ECM). Mientras que proteínas similares al colágeno proporcionan el almacén extracelular necesario para que las células se fijen y formen tejidos, los polisacáridos complejos rellenan el espacio creado por el almacén y actúan como una esponja molecular mediante la unión y la regulación específicas de las actividades biológicas de numerosas moléculas de señalización tales como factores de crecimiento, citoquinas, etc. Se ha reconocido recientemente que las células sintetizan distintas secuencias de HLGAG y se decoran con estas secuencias, utilizando el contenido de información extraordinario presente en las secuencias de unirse específicamente a muchas moléculas de señalización y, con ello, regulan diversos procesos biológicos.

55 La metástasis de tumores implica la propagación de células tumorales principalmente a través de la vasculatura tras el desmontaje de interacciones células tumorales-ECM a través de la degradación de la ECM, y de la extravasación de células tumorales a través del lecho capilar. Una evidencia reciente ha sugerido que el colágeno (y proteínas relacionadas), enzimas (colagenasas y otras) que degradan el componente proteico de la ECM pueden desempeñar

papeles en la regulación de la angiogénesis del tumor o la invasión de células tumorales de la ECM. Sin embargo, la heterogeneidad química de polisacáridos complejos y la falta de herramientas eficaces, ha limitado seriamente las investigaciones sobre los papeles de HLGAGs en el crecimiento del tumor y la metástasis. Curiosamente, sin embargo, en paralelo con el colágeno y las proteasas, se ha planteado la hipótesis de que enzimas que degradan HLGAG (heparinasas) ayudan en la descomposición de la ECM para fomentar el crecimiento del tumor, la angiogénesis y la metástasis. Otra evidencia como la reciente clonación de genes tumorales heparinasa ha conducido al paradigma de que la expresión de enzimas que degradan HLGAG representa una forma de 'conmutación' desde un tumor primario a un estado de enfermedad metastásico.

En sorprendente contraste con los hallazgos de la técnica anterior, se ha descubierto ahora de acuerdo con la invención que no sólo la técnica anterior es incorrecta al afirmar que enzimas degradantes de HLGAG pueden contribuir en el crecimiento del tumor y en la metástasis, sino que, de hecho, algunas enzimas degradantes de HLGAG y fragmentos de HLGAG (incluyendo composiciones de LMWH generadas por heparinasa III) son, en realidad, muy eficaces en la inhibición del crecimiento de células cancerosas y la metástasis. En particular, se ha descubierto que las heparinasas que tienen una actividad funcional similar a la heparinasa III nativa previenen el crecimiento del tumor y la metástasis *in vivo*. También se ha descubierto que los productos enzimáticos de heparinasa III (fragmentos de HLGAG y LMWH) son útiles para prevenir el crecimiento del tumor y la metástasis.

La sección de Ejemplos proporciona *in vitro* e *in vivo* datos que demuestran la eficacia de las heparinasas en la prevención de crecimiento del tumor y la metástasis. Utilizando dos modelos de animales diferentes de cáncer, B16BL6 y LLC, se obtuvieron, sorprendentemente, datos similares, lo que indica un papel importante para los HLGAGs en el crecimiento del tumor y la metástasis. Los datos también demostraron los efectos diferenciales de heparinasas I y III, y los fragmentos de HLGAG generados por estas heparinasas sobre los procesos fisiológicos. La heparinasa I era incapaz de prevenir la proliferación de células de cáncer o la metástasis, lo cual indica que los efectos son específicos para la heparinasa III y variantes funcionales de la misma. Estos resultados son consistentes con las especificidades únicas de heparinasas y, por lo tanto, los productos de oligosacáridos distintos que generan. Adicionalmente, los datos demostraron que fragmentos de HLGAG para un tipo de célula eran capaces de influir sobre los efectos en otro tipo de célula, lo que indica fuertemente la implicación de secuencias específicas de HLGAG para modular efectos sobre el crecimiento del tumor y la metástasis.

Por lo tanto, la molécula de heparinasa III modificada y/o fragmentos de HLGAG terapéuticos (incluidos LMWH) se podrían utilizar para tratar o prevenir la formación de tumores y/o la metástasis mediante la administración a un sujeto.

Las heparinasas útiles en este aspecto de la invención incluyen heparinasa III modificada y heparinasas modificadas que tienen la actividad funcional de la heparinasa III. "Heparinasa III nativa" tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la molécula de heparinasa III que se produce de forma natural en una forma aislada. La secuencia de la molécula que se produce de forma natural a partir de *F. heparinum* se proporciona como SEQ ID NO.: 1 (secuencia de ácido nucleico) y 2 (secuencia de aminoácidos), y ha sido descrita ampliamente en la técnica, incluidas patentes emitidas. Una molécula aislada es una molécula que es sustancialmente pura y está libre de otras sustancias con las que se encuentra normalmente en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en un grado práctico y apropiado para su uso previsto. En particular, las especies moleculares son lo suficientemente puras y están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de células huésped con el fin de ser útiles, por ejemplo, en la producción de preparaciones farmacéuticas o en la secuenciación si la especie molecular es un ácido nucleico, péptido o polisacárido. Debido a que una especie de molécula aislada de la invención se puede mezclar con un soporte farmacéuticamente aceptable en un preparado farmacéutico, las especies moleculares pueden comprender sólo un pequeño porcentaje en peso del preparado. La especie molecular es, no obstante, sustancialmente pura, debido a que ha sido separada sustancialmente de las sustancias con las que puede estar asociada en los sistemas vivos.

Una "heparinasa III modificada", tal como se utiliza en esta memoria, es cualquier molécula de heparinasa III que tiene al menos una mutación, delección o sustitución, en comparación con heparinasa III nativa, pero que conserva la capacidad de escindir enzimáticamente sulfato de heparán. Éstas incluyen las heparinasas modificadas particulares descritas en esta memoria, así como cualquier otra heparinasa modificada que tenga la función apropiada. Éstas se pueden identificar por los expertos ordinarios en la técnica utilizando los métodos arriba descritos o en la sección de Ejemplos. Por ejemplo, la heparinasa III modificada puede tener una simple sustitución conservativa dentro de una región de la molécula que no es crítica para la actividad enzimática o el plegado y, por lo tanto, que no tiene efecto alguno sobre la capacidad de la heparinasa para escindir el sustrato. Adicionalmente, sustituciones tales como las sustituciones de histidina descritas en esta memoria que influyen sobre la actividad enzimática o el perfil de producto de la heparinasa, pero que aún conservan alguna actividad enzimática también son útiles para este aspecto de la invención, debido a que todavía son capaces de escindir sulfato de heparán. Las dos mutaciones de histidina (His 295 y His 510) que perdieron toda la actividad no son, sin embargo, útiles en este aspecto de la invención. (Estos dos mutantes tienen otras utilidades tales como inhibidores competitivos).

La expresión "heparinasas modificadas que tienen actividad funcional de la heparinasa III", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a heparinasas distintas de la heparinasa III que han sido modificadas de tal manera que son

enzimáticamente activas hacia sulfato de heparán, pero que sólo tienen una mínima actividad o ninguna hacia la heparina. Por ejemplo, la mutación de Cys³⁴⁸ de heparinasa II, un residuo que está implicado en la unión a heparina, provoca que la heparinasa II tenga una actividad enzimática reducida con respecto a la heparina. Esta modificación produce una heparinasa II modificada que se convierte exclusivamente en una enzima degradante de sulfato de heparán. Adicionalmente, cuando histidina 440 está mutada en heparinasa III, se produce una heparinasa III modificada que tiene una actividad enzimática reducida con respecto a heparina, pero que exhibe casi la misma actividad enzimática que la heparinasa III nativa cuando sulfato de heparán se utiliza como el sustrato. La mutación de histidinas 451, 238 y 579 de heparinasa II produce moléculas de heparinasa II modificada que tienen una actividad enzimática reducida con respecto a sulfato de heparán. Por lo tanto, moléculas de heparinasa II modificada en las que Cys³⁴⁸ o His⁴⁴⁰ está mutado, son "heparinasas modificadas que tiene actividad funcional de heparinasa III" de acuerdo con la invención, mientras que heparinasas en las que histidinas 451, 238 ó 579 han sido mutadas no están dentro de esta clase de moléculas.

HLGAGs terapéuticos podrían utilizarse para el tratamiento y la prevención de la proliferación de células tumorales y la metástasis. Un fragmento de HLGAG terapéutico, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula o moléculas que son trozos o fragmentos de un HLGAG que han sido identificados mediante el uso de heparinasa III modificada. Fragmentos de HLGAG también incluyen heparinas de bajo peso molecular (LMWHs - siglas en inglés). El análisis de la composición de algunos HLGAGs terapéuticos se describe más adelante en la sección de Ejemplos.

La invención también abarca ensayos de cribado para identificar frgamentos de HLGAG terapéuticos para el tratamiento de un tumor y para la prevención de la metástasis. Los ensayos se llevan a cabo mediante el tratamiento de un tumor o células tumorales aisladas con heparinasa III, nativa o modificada, y el aislamiento de los fragmentos de HLGAG resultantes. Sorprendentemente, estos fragmentos de HLGAG tienen actividad terapéutica en la prevención de la proliferación de células tumorales y la metástasis. Como se describe con mayor detalle en la sección de Ejemplos, estos fragmentos de HLGAG son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de las células tumorales a partir de las cuales fueron generados, así como otros tumores. Por lo tanto, la invención abarca un método *in vitro* para preparar fragmentos HLGAG terapéuticos, en el que se aísla un tumor o una porción de un tumor. Estos fragmentos terapéuticos se pueden volver a administrar al sujeto para proteger a éste de la proliferación adicional de células tumorales o metástasis o del inicio de la metástasis si el tumor no es aún metastásico. Alternativamente, los fragmentos se pueden utilizar en un sujeto diferente que tiene el mismo tipo de tumor o un tipo diferente de tumor.

La expresión "fragmento de HLGAG terapéutico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un HLGAG que tiene actividad terapéutica debido a que evita la proliferación y/o metástasis de una célula tumoral. Tales compuestos se pueden generar utilizando heparinasa III para producir fragmentos terapéuticos, o se pueden sintetizar de novo. Fragmentos putativos de HLGAG se pueden someter a ensayo en cuanto a la actividad terapéutica utilizando cualquiera de los ensayos descritos en esta memoria o conocidos en la técnica. Así, el fragmento de HLGAG terapéutico puede ser un fragmento de HLGAG sintético generado en base a la secuencia del fragmento de HLGAG identificado cuando el tumor se pone en contacto con heparinasa III modificada, o puede tener variaciones menores que no interfieren con la actividad del compuesto. Alternativamente, el fragmento de HLGAG terapéutico puede ser un fragmento de HLGAG aislado que se produce cuando el tumor se pone en contacto con heparinasa III.

El fragmento de HLGAG terapéutico es útil para tratar y/o prevenir la proliferación de células tumorales o la metástasis en un sujeto. Los términos "prevenir" y "prevención", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a la inhibición completa o parcial de la proliferación o metástasis de una célula cancerosa o tumoral, así como a la inhibición de cualquier aumento en la proliferación o metástasis de una célula cancerosa o tumoral.

Un "sujeto que tiene un cáncer" es un sujeto que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Cánceres o tumores incluyen, pero no se limitan a cáncer del tracto biliar; cáncer de cerebro; cáncer de mama; cáncer cervical; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (p. ej., de células pequeñas y de células no pequeñas); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas.

Un "sujeto en riesgo de tener un cáncer", tal como se utiliza en esta memoria, es un sujeto que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia ha demostrado tener una relación correlativa a una mayor probabilidad de desarrollar un cáncer y sujetos expuestos a agentes causantes de cáncer tales como tabaco, amianto u otras toxinas químicas, o un sujeto que previamente ha sido tratado para el cáncer y que está en remisión aparente. Cuando un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer es tratado con una heparinasa III, el sujeto puede ser capaz de exterminar a las células cancerosas a medida que se desarrollan.

Cantidades eficaces de heparinasa III modificada, o HLGAGs terapéuticos de la invención se podría utilizar y administrar a sujetos en necesidad de tal tratamiento. Cantidades eficaces son aquellas cantidades que resultarán en una reducción deseada en la proliferación celular o metástasis sin provocar otros efectos secundarios médicamente inaceptables. Tales cantidades se pueden determinar con no más que una experimentación rutinaria.

5 Se cree que serán eficaces las dosis que oscilan desde 1 nanogramo/kilogramo a 100 miligramos/kilogramo, dependiendo del modo de administración. La cantidad absoluta dependerá de una diversidad de factores (incluyendo si la administración es en unión con otros métodos de tratamiento, el número de dosis y parámetros individuales del paciente incluida la edad, condición física, tamaño y peso) y se puede determinar con una experimentación rutinaria. Se prefiere generalmente utilizar una dosis máxima, es decir, la más alta dosis segura de acuerdo con el juicio del
10 médico. El modo de administración puede ser cualquier modo médicamente aceptable, incluida la vía oral, subcutánea, intravenosa, etc.

La cantidad eficaz de heparinasa III es la cantidad eficaz para prevenir la invasión de una célula tumoral a través de una barrera. La invasión y la metástasis del cáncer es un proceso complejo que implica cambios en las propiedades de adhesión celular que permiten que una célula transformada invada y migre a través de la matriz extracelular (ECM) y adquiera propiedades de crecimiento independientes del anclaje. Liotta, L.A., et al, Cell 64: 327-336 (1991).
15 Algunos de estos cambios se producen en las adhesiones focales, que son los puntos de contacto célula/ECM que contienen moléculas de señalización asociadas a la membrana, del citoesqueleto e intracelulares. La enfermedad metastásica se produce cuando los focos de células tumorales diseminados siembran un tejido que ayuda a su crecimiento y propagación, y esta diseminación secundaria de células tumorales es la responsable de la morbilidad y la mortalidad asociadas con la mayoría de los cánceres. Por lo tanto, el término "metástasis", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la invasión y migración de células tumorales lejos del sitio del tumor primario.
20

La barrera para las células tumorales puede ser una barrera artificial *in vitro* o una barrera natural *in vivo*. Barreras *in vitro* incluyen, pero no se limitan a membranas revestidas de matriz extracelular tal como Matrigel. Por lo tanto, las composiciones de heparinasa se pueden someter a ensayo en cuanto a su capacidad de inhibir la invasión de
25 células tumorales en un sistema de ensayo de invasión de Matrigel según se describe en detalle por Parish, C.R., et al., "A Basement-Membrane Permeability Assay which Correlates with the Metastatic Potential of Tumour Cells " Int. J. Cancer (1992) 52:378-383. Matrigel es una membrana basal reconstituida que contiene colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicanos de sulfato de heparán tal como perlecan, que se unen a y localizan bFGF, vitronectina así como factor de crecimiento β transformante (TGF- β), activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), activador del plasminógeno tisular (tPA), y la serpina conocida como inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1). Otros ensayos *in vitro* e *in vivo* para la metástasis se han descrito en la técnica anterior, véase, p. ej., Patente de EE.UU. N° 5.935.850, expedida el 10 de agosto de 1999, que se incorpora como referencia. Una barrera *in vivo* se refiere a una barrera celular presente en el cuerpo de un sujeto.
30

En general, cuando se administran con fines terapéuticos, las formulaciones de la invención se aplican en disoluciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparados pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, soportes compatibles, adyuvantes y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos.
35

Las composiciones de la invención se pueden administrar *per se* (puras) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se utilizan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero sales no farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la invención. Sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables de este tipo incluyen, pero no se limitan a las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. También, sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.
40
45

Agentes tampón adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2% P/V); ácido cítrico y una sal (1-3% P/V); ácido bórico y una sal (0,5-2,5% P/V); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2% P/V). Conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003 - 0,03% P/V); clorobutanol (0,3-0,9% P/V); parabenos (0,01-0,25% P/V) y timerosal (0,004 - 0,02% P/V).
50

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas, para uso médico, que comprenden heparinasa III modificada de la invención, junto con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables y, en algunas realizaciones, otros ingredientes terapéuticos. La expresión "soporte farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en esta memoria, y se describen más completamente más adelante, significa una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuados para la administración a un ser humano u otro animal. En la presente invención, el término "soporte" designa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse con las heparinasas modificados de la presente
55

invención, y entre sí, de una manera tal que no hay interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

5 Está disponible una diversidad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de la heparinasa modificada particular seleccionada, del estado particular a tratar y de la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. La heparinasa III modificada de esta invención, en términos generales, puede administrarse por cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de una respuesta inmunitaria sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables. Un modo preferido de administración es una vía parenteral. El término "parenteral" incluye inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intra esternal o técnicas de infusión. Otros modos de administración incluyen la vía oral, mucosal, rectal, vaginal, sublingual, intranasal, intratraqueal, por inhalación, ocular, transdérmica, etc.

15 Para la administración por vía oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando el o los compuestos activos con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales soportes permiten que los compuestos de la invención se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones densas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un sujeto a tratar. Preparados farmacéuticos para uso oral se pueden obtener en forma de un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparados de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, fécula de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en disolución salina o tampones para neutralizar las condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin ningún tipo de soporte.

25 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito se pueden utilizar disoluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Colorantes o pigmentos pueden añadirse a los comprimidos o recubrimientos de las grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

30 Preparados farmacéuticos que pueden utilizarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. También se pueden utilizar microesferas formuladas para administración por vía oral. Tales microesferas han sido bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para administración por vía oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

40 Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

45 Para la administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Puede formularse cápsulas y cartuchos, p. ej., de gelatina para uso en un inhalador o insuflador para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

50 Los compuestos, cuando es deseable administrar sistémicamente, se pueden formular para administración parenteral por inyección, p. ej., por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej. en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

55 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos,

o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

- 5 Alternativamente, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril apirógena, antes de su uso.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases para supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 10 Un sujeto es cualquier ser humano o vertebrado no humano, p. ej., perro, gato, caballo, vaca, cerdo.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como un preparado de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden formular con materiales adecuados poliméricos o hidrófobos (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo como una sal poco soluble.

- 15 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender soportes o excipientes sólidos o en fase gel adecuados. Ejemplos de tales soportes o excipientes incluyen, pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

- 20 Formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, disoluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, revestidas sobre partículas microscópicas de oro, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, gránulos para la implantación en la piel, o secadas sobre un objeto afilado a ser rayado en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparados con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se utilizan habitualmente excipientes y aditivos y/o agentes auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de expansión, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes, como se describe arriba. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una diversidad de sistemas de administración de fármacos. Para una breve revisión de los métodos de administración de fármacos, véase Langer, *Science* 249: 1527-1533,1990; que se incorpora aquí como referencia.
- 25

- 30 Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar la heparinasa modificada activa con un soporte que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el polímero con un soporte líquido, un soporte sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto. El polímero se puede almacenar liofilizado.

- 35 Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación en el tiempo, liberación retardada o liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de las heparinasas de la invención, aumentando la comodidad para el sujeto y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de liberación y son conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Éstos incluyen sistemas basados en polímeros tales como ácido poliláctico y poliglicólico, polianhídridos y policaprolactona; sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera, comprimidos que utilizan aglutinantes y excipientes convencionales, implantes parcialmente fusionados y similares. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el polisacárido está contenido en una forma dentro de una matriz, que se encuentran en las patentes de EE.UU. N°s 4.452.775 (Kent); 4.667.014 (Nestor et al.); y 4.748.034 y 5.239.660 (Leonard) y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo permea a una velocidad controlada a través de un polímero, que se encuentra en las patentes de EE.UU. N°s 3.832.253 (Higuchi et al.) y 3.854.480 (Zaffaroni). Además, puede utilizarse un sistema de administración de hardware basado en una bomba, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.
- 40
- 45

- 50 Cuando se administran a un paciente sometido a tratamiento para el cáncer, los compuestos de heparinasa III modificada pueden ser administrados en cócteles que contienen otros agentes anti-cáncer. Los compuestos también pueden ser administrados en cócteles que contienen agentes que tratan los efectos secundarios de la terapia de radiación, tales como anti-eméticos, protectores de radiación, etc.

- 55 Fármacos anti-cáncer que pueden ser co-administrados con los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a: aciclovir; aclarubicina; acodazol hidrocloreto; acronina; adriamicina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; ametantrona acetato; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramycin; asparaginasa; asperlina;

azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; bisantreno hidrocloreuro; bisnafida dimesilato; bizelesina; bleomicina sulfato; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero; carboplatino; carmustina; carubicina hidrocloreuro; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; crinamol mesilato; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; daunorubicina hidrocloreuro; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; dezaguanina mesilato; diaziquna; docetaxel; doxorubicina; doxorubicina hidrocloreuro; droloxifeno; droloxifeno citrato; dromostanolona propionato; duazomicina; edatrexato; eflornitina hidrocloreuro; elsamitracina; enloplativo; enpromato; epipropidina; epirubicina hidrocloreuro; erbulozol; esorubicina ; estramustina; estramustina fosfato de sodio; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprina; fadrozol hidrocloreuro; fazarabina; fenretinida; loxuridina; fludarabina fosfato; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina; gemcitabina; gemcitabina hidrocloreuro; hidroxiurea; idarubicina; ifosfamida; ilmofofina; interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón Alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-l a; interferón gamma-l b; iproplativo; irinotecán hidrocloreuro; lanreotida acetato; letrozol; leuprolida acetato; liarazol; lometrexol sódico; lomustina; losoxantrona hidrocloreuro; asoprocol; maitansina; mecloretamina hidrocloreuro; megestrol acetato; melengestrol acetato; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; itogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; mitoxantrona hidrocloreuro; cido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; peplomicina sulfato; perfosfamida; ipobromán; pipo sulfán; piroxantrona hidrocloreuro; plicamicina; plomestano; porfímero; porfíromicina; prednimustina; procarbazona sódica; puromicina; puromicina hidrocloreuro; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsonomicina; espirogermanio hidrocloreuro; espiromustina; espiroplativo; estreptonigrina; estreptozocina; ulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; teloxantrona hidrocloreuro; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiampirina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; topotecan hidrocloreuro; toremifeno citrato; trestolona; triciribina fosfato; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; tubulozol hidrocloreuro; uracilo mostaza; uredepa; vapreotida; verteporfina; inblastina sulfato; vincristina sulfato; vindesina; vindesina sulfato; vinepidinaulfato; vinglicinato sulfato; vinleurosina sulfato; vinorelbina tartrato; vinrosidinaulfato; vinzolidina sulfato; vorozol; zeniplativo; zinostatina; zorubicina hidrocloreuro. Los compuestos de heparinasa III modificada también pueden estar enlazados a una molécula diana. Una molécula diana es cualquier molécula o compuesto que es específico para una célula o tejido particular y que puede ser utilizado para dirigir la heparinasa III a la célula o tejido. Preferiblemente, la molécula diana es una molécula que interactúa específicamente con una célula cancerosa o un tumor. Por ejemplo, la molécula diana puede ser una proteína u otro tipo de molécula que reconoce y específicamente interactúa con un antígeno tumoral.

Antígenos tumorales incluyen Melan-A/M A RT-1, dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina deaminasa (ADA b), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)-C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno prostático específico (PSA) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena zeta de CD3, familia MAGE de antígenos tumorales (p. ej., MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (p. ej., GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, β -catenina y γ -catenina, p120ctn, gp100^{Pmel117}, PRAME, NY-ESO-1, glucógeno fosforilasa de cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1, CT-7, cdc27, proteína de poliposis coli adenomatosa (APC), fodrina, P1A, conexina 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano, la familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA) 1 y c-erbB-2. Ejemplos de antígenos tumorales que se unen tanto a moléculas de MHC clase I como a moléculas de MHC clase II, véanse las siguientes referencias: Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995; Traversari et al., J. Exp. Med. 176:1453-1457, 1992; Chaux et al., J. Immunol. 163:2928-2936, 1999; Fujie et al., Int. J. Cancer 80:169-172, 1999; Tanzarella et al., Cancer Res. 59:2668-2674, 1999; van der Bruggen et al., Eur. J. Immunol. 24:2134-2140, 1994; Chaux et al., J. Exp. Med. 189:767-778, 1999; Kawashima et al, Hum. Immunol. 59:1-14, 1998; Tahara et al., Clin. Cancer Res. 5:2236-2241, 1999; Gaugler et al., J. Exp. Med. 179:921-930, 1994; van der Bruggen et al., Eur. J. Immunol. 24:3038-3043, 1994; Tanaka et al., Cancer Res. 57:4465-4468, 1997; Oiso et al., Int. J. Cancer 81:387-394, 1999; Herman et al., Immunogenetics 43:377-383, 1996; Manici et al., J. Exp. Med. 189:871-876, 1999; Duffour et al., Eur. J. Immunol. 29:3329-3337, 1999; Zorn et al., Eur. J. Immunol. 29:602-607, 1999; Huang et al., J. Immunol. 162:6849-6854, 1999; Boel et al., Impunity 2:167-175, 1995; Van den Eynde et al., J. Exp. Med. 182:689-698, 1995; De Backer et al., Cancer Res. 59:3157-3165, 1999; Jager et al., J. Exp. Med. 187:265-270, 1998; Wang et al., J. Immunol. 161:3596-3606, 1998; Aarnoudse et al., Int. J. Cancer 82:442-448, 1999; Guilloux et al., J. Exp. Med. 183:1173-1183, 1996; Lupetti et al., J. Exp. Med. 188:1005-1016, 1998; Wölfel et al., Eur. J. Immunol. 24:759-764, 1994; Skipper et al., J. Exp. Med. 183:527-534, 1996; Kang et al., J. Immunol. 155:1343-1348, 1995; Morel et al., Int. J. Cancer 83:755-759, 1999; Brichard et al., Eur. J. Immunol. 26:224-230, 1996; Kittlesen et al., J. Immunol. 160:2099-2106, 1998; Kawakami et al., J. Immunol. 161:6985-6992, 1998; Topalian et al., J. Exp. Med. 183:1965-1971, 1996; Kobayashi et al., Cancer Research 58:296-301, 1998; Kawakami et al., J. Immunol. 154:3961-3968, 1995; Tsai et al., J. Immunol. 158:1796-1802, 1997; Cox et al., Science 264:716-719, 1994; Kawakami et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 91:6458-6462, 1994; Skipper et al., J. Immunol. 157:5027-5033, 1996; Robbins et al., J. Immunol. 159:303-308, 1997; Castelli et al., J. Immunol. 162:1739-1748, 1999; Kawakami et al., J. Exp. Med. 180:347-352, 1994; Castelli et al., J. Exp. Med. 181:363-368, 1995; Schneider et al., Int. J. Cancer 75:451-458, 1998; Wang et al., J. Exp. Med. 183:1131-1140, 1996; Wang et al., J. Exp. Med. 184:2207-2216, 1996; Parkhurst et al., Cancer Research 58:4895-4901, 1998; Tsang et al., J. Natl Cancer Inst 87:982-990, 1995; Correale et al., J Natl Cancer Inst 89:293-300, 1997; Coulie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7976-7980, 1995; Wölfel et al., Science 269:1281-1284, 1995; Robbins et al., J. Exp. Med. 183:1185-1192, 1996; Brändle et al., J. Exp. Med. 183:2501-2508, 1996; ten Bosch et al., Blood 88:3522-3527, 1996; Mandruzzato et al., J. Exp. Med. 186:785-793, 1997; Guéguen et al., J. Immunol. 160:6188-6194, 1998; Gjertsen et al., Int. J. Cancer 72:784-790, 1997; Gaudin et al., J. Immunol. 162:1730-1738, 1999; Chiari et al., Cancer Res. 59:5785-5792, 1999; Hogan et al., Cancer Res. 58:5144-5150, 1998; Pieper et al., J. Exp. Med. 189:757-765, 1999; Wang et al., Science 284:1351-1354, 1999; Fisk et al., J. Exp. Med. 181:2109-2117, 1995; Brossart et al., Cancer Res. 58:732-736, 1998; Röpke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14704-14707, 1996; Ikeda et al., Immunity 6:199-208, 1997; Ronsin et al., J. Immunol. 163:483-490, 1999; Vonderheide et al., Immunity 10:673-679, 1999. Estos antígenos, así como otros, se describen en la solicitud PCT PCT/US98/18601.

Un experto ordinario en la técnica, a la vista de la presente descripción, está habilitado para producir preparados sustancialmente puros de cualquiera de las heparinasas nativas o modificadas por tecnología estándar, incluyendo la tecnología recombinante, síntesis directa, mutagénesis, etc. Por ejemplo, utilizando la tecnología recombinante se puede sustituir codones apropiados en SEQ ID NO: 1 para producir las sustituciones de aminoácidos deseadas mediante técnicas de mutagénesis dirigida al sitio estándares. Obviamente, también se puede utilizar cualquier secuencia que difiera de SEQ ID NO: 1 sólo debido a la degeneración del código genético como el punto de partida para la mutagénesis dirigida al sitio. La secuencia de ácido nucleico mutada puede entonces ser ligado en un vector de expresión adecuado y expresada en un huésped tal como *F. heparinum* o *E. coli*. La heparinasa modificada resultante puede entonces ser purificada por técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo las descritos a continuación y en Sasiseldiaran, et al. (1993). Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sustancialmente pura" significa que las proteínas están esencialmente libres de otras sustancias en una medida práctica y apropiada para su uso previsto. En particular, las proteínas son lo suficientemente puras y están lo suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de sus células huésped con el fin de ser útiles, por ejemplo, en la secuenciación de proteínas, o en la producción de preparados farmacéuticos.

En otro conjunto de realizaciones se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la heparinasa modificada, sustancialmente pura, de la invención. Tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a los ácidos nucleicos, el término "aislado" significa: (i) amplificado *in vitro* mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido de forma recombinante por clonación; (iii) purificado tal como por escisión y separación en gel; o (iv) sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que es fácilmente manipulable por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos contenida en un vector en el que se conocen sitios de restricción 5' y 3' o para los que se han descrito secuencias de cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera aislado, pero una secuencia de ácido nucleico que existe en su estado nativo en su huésped natural no lo es. Un ácido nucleico aislado puede estar sustancialmente purificado, pero no tiene que estarlo. Por ejemplo, un ácido nucleico que está aislado dentro de un vector de clonación o expresión no es puro, debido a que puede comprender sólo un pequeño porcentaje del material en la célula en la que reside. Un ácido nucleico de este tipo está aislado, sin embargo, tal como se utiliza el término en esta memoria, porque es fácilmente manipulable por técnicas estándares conocidas por los expertos en la técnica.

Tal como se utiliza en esta memoria, se dice que una secuencia codificadora y secuencias reguladoras están "operativamente unidas" cuando están unidas covalentemente de tal manera como para colocar la expresión o transcripción de la secuencia codificadora bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias codificadoras sean traducidas en una proteína funcional, las secuencias codificadoras están operativamente unidas a secuencias reguladoras. Dos secuencias de ADN se dice que están unidas operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' resulta en la transcripción de la secuencia codificadora y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN (1) no resulta en la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región de promotor de dirigir la transcripción de las secuencias codificadoras, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente para ser traducido en una proteína. Por lo tanto, una región de promotor estaría operativamente unida a una secuencia codificadora si la región de promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de manera que la transcripción resultante podría traducirse en la proteína o polipéptido deseado.

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos de células, pero incluirá, en general, según sea necesario, secuencias 5' que no transcriben y secuencias 5' que no traducen, implicadas en la iniciación de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de remate, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, tales secuencias reguladoras 5' que no transcriben incluirán una región de promotor que incluye una secuencia de promotor para el control transcripcional del gen unido operativamente. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles.

Secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras aguas arriba, según se desee.

Tal como se utiliza en esta memoria, un "vector" puede ser cualquiera de un cierto número de ácidos nucleicos en el que una secuencia deseada se puede insertar mediante restricción y ligamiento para el transporte entre diferentes entornos genéticos o para expresión en una célula huésped. Los vectores están compuestos típicamente de ADN, aunque también están disponibles vectores de ARN. Los vectores incluyen, pero no se limitan a plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula huésped, y que se caracteriza, además, por uno o más sitios de restricción de endonucleasas en los que el vector puede ser cortado de una manera determinable y en los que una secuencia de ADN deseada puede ser ligada de tal manera que el nuevo vector recombinante conserva su habilidad para replicarse en la célula huésped. En el caso de plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede producirse muchas veces, ya que el plásmido aumenta en número de copias dentro de la bacteria huésped, o simplemente una sola vez por huésped ya que el huésped se reproduce por mitosis. En el caso de fagos, la replicación puede producirse de forma activa durante una fase lítica o de forma pasiva durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es uno en el que una secuencia de ADN deseada puede insertarse mediante restricción y ligamiento de tal manera que está operativamente unida a secuencias reguladoras y puede ser expresada como un transcrito de ARN. Los vectores pueden contener, además, una o más secuencias de marcador, adecuadas para su uso en la identificación de células que han sido o no han sido transformadas o transfectadas con el vector. Marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen la resistencia o sensibilidad a antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas, cuyas actividades son detectables mediante ensayos estándares conocidos en la técnica (p. ej., β -galactosidasa o fosfatasa alcalina), y genes que afectan visiblemente al fenotipo de células, huéspedes, colonias o placas transformadas o transfectadas. Vectores preferidos son aquellos capaces de replicación y de expresión autónomas de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los que están unidos operativamente.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "condiciones rigurosas" se refiere a parámetros conocidos por los expertos en la técnica. Un ejemplo de condiciones rigurosas es la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5xSSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,02%, NaH₂PO₄ 25 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15M/citrato de sodio 0,15M, pH 7; SDS es dodecilsulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiamina tetraacético. Hay otras condiciones, reactivos, etc. que se pueden utilizar, que dan como resultado el mismo grado de rigurosidad. Un experto en la materia estará familiarizado con estas condiciones, y por lo tanto no se dan aquí. El experto en la materia también está familiarizado con la metodología para el rastreo de células para la expresión de moléculas de este tipo, que a continuación se aíslan de forma rutinaria, seguido de aislamiento del ácido nucleico pertinente. Por lo tanto, se pueden obtener de forma rutinaria homólogos y alelos de las heparinasas sustancialmente puras modificadas de la invención, así como ácidos nucleicos que codifican las mismas, y la invención no pretende estar limitada a las secuencias específicas descritas.

Para sistemas procariotas se pueden utilizar vectores plasmídicos que contienen sitios de replicación y secuencias control derivadas de una especie compatible con el huésped. Ejemplos de vectores plasmídicos adecuados incluyen pBR322, pUC18, pUC19, y similares; vectores de fagos o bacteriófagos adecuados incluyen λ gt10, λ gt11 y similares; y vectores de virus adecuados incluyen pMAM-neo, pKRC y similares. Preferiblemente, el vector seleccionado de la presente invención tiene la capacidad de replicarse autónomamente en la célula huésped seleccionada. Huéspedes procariotas útiles incluyen bacterias tales como *E. coli*, *Flavobacterium heparinum*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, y similares.

Para expresar las heparinasas sustancialmente puras modificadas de la invención en una célula procariota, es necesario unir operativamente la secuencia de ácido nucleico de una heparinasa sustancialmente pura modificada de la invención a un promotor procariótico funcional. Un promotor de este tipo puede ser constitutivo o, más preferiblemente, regulable (es decir, inducible o derrepresible). Ejemplos de promotores constitutivos incluyen el promotor *int* del bacteriófago λ , el promotor *bla* de la secuencia del gen β -lactamasa de pBR322, y el promotor CAT de la secuencia del gen de la cloranfenicol-acetil-transferasa de pPR325, y similares. Ejemplos de promotores procariotas inducibles incluyen los principales promotores de derecha e izquierda del bacteriófago λ (P_L y P_R), los promotores *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI* y *gal* de *E. coli*, la α -amilasa (Ulmanen et al., *J. Bacteriol.* 162: 176-182 (1985)) y los promotores ζ -28-específicos de *B. subtilis* (Gilman et al, *Gene sequence* 32:11-20 (1984)), los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus* (Gryczan, en : *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, Inc., NY (1982)), y promotores de *Streptomyces* (Ward et al., *Mol. Gen. Genet.* 203: 468-478 (1986)).

Promotores procariotas son revisados por Glick (*J. Ind. Microbiol.* 1:277-282 (1987)); Cenatiempo (*Biochimie* 68: 505-516 (1986)); y Gottesman (*Ann.Rev. Genet.* 18: 415-442 (1984)).

La expresión adecuada en una célula procariota también requiere la presencia de un sitio de unión a ribosoma aguas arriba de la secuencia codificadora. Sitios de unión a ribosomas se describen, por ejemplo, por Gold et al. (*Ann. Rev. Microbiol.* 35: 365-404 (1981)).

Dado que las células procariotas no producirán las heparinasas modificadas de la invención con una glicosilación eucariota normal, la expresión de las heparinasas modificadas de la invención por parte de huéspedes eucariotas es posible cuando se desea una glicosilación. Huéspedes eucariotas preferidos incluyen, por ejemplo, levaduras, hongos, células de insectos y células de mamíferos, ya sea *in vivo* o en cultivo de tejidos. Las células de mamífero que pueden ser útiles como huéspedes incluyen células HeLa, células de origen fibroblástico tales como VERO o CHO-K1, o células de origen linfocitario tales como el hibridoma SP2/0-AG14 o el mieloma P3x63Sg8, y sus derivados. Células huésped de mamífero preferidas incluyen SP2/0 y J558L, así como líneas celulares de neuroblastoma tales como IMR 332 que pueden proporcionar mejores capacidades para un procesamiento post-traducciona correcto. Las células embrionarias y las células maduras de un órgano trasplantable también son útiles de acuerdo con algunos aspectos de la invención.

Además, las células vegetales también están disponibles como huéspedes, y están disponibles secuencias de control compatibles con las células vegetales tales como el promotor de nopalina sintasa y secuencias señal de poliadenilación.

Otro huésped preferido es una célula de insecto, por ejemplo en larvas de *Drosophila*. Utilizando células de insectos como huéspedes, se puede utilizar el promotor de la alcohol deshidrogenasa de *Drosophila* (Rubin, *Science* 240: 1453-1459 (1988)). Alternativamente, los vectores de baculovirus pueden ser diseñados para expresar grandes cantidades de las heparinasas modificadas de la invención en células de insectos (Jasny, *Science* 238: 1653 (1987); Miller et al, en: *Genetic Engineering* (1986), Setlow, J.K., et. al., comps., Plenum, Vol. 8, págs. 277-297).

También se puede utilizar cualquiera de una serie de sistemas de expresión de la secuencia de genes de levadura que incorporan elementos de promotor y de terminación de los genes que codifican enzimas glicolíticas y que se producen en grandes cantidades cuando las levaduras se cultivan en medios ricos en glucosa. Secuencias de genes glicolíticos conocidas también pueden proporcionar señales de control transcripcional muy eficientes. La levadura proporciona ventajas sustanciales, debido a que también pueden llevar a cabo modificaciones de péptidos post-traducción. Existe un cierto número de estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias de promotor fuerte y plásmidos de alto número de copias que pueden utilizarse para la producción de las proteínas deseadas en la levadura. La levadura reconoce secuencias conductoras en productos clonados de secuencias de genes de mamíferos y secretan péptidos que portan secuencias conductoras (es decir, pre-péptidos).

Se puede emplear una amplia diversidad de secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción, dependiendo de la naturaleza del huésped. Las señales reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden derivarse de fuentes virales tales como adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de simio, o similares, en donde las señales reguladoras están asociadas con una secuencia génica particular que tiene un alto nivel de expresión. Alternativamente, se pueden emplear los promotores de productos de expresión de mamíferos tales como actina, colágeno, miosina y similares. Se pueden seleccionar señales reguladoras de la iniciación de la transcripción que permitan la represión o activación, de modo que se puede modular la expresión de las secuencias génicas. De interés son señales reguladoras que son sensibles a la temperatura, de modo que variando la temperatura, la expresión puede ser reprimida o iniciada, o que están sujetas a regulación química (tal como metabolito).

Tal como se comentó arriba, la expresión de las heparinasas modificadas de la invención en huéspedes eucariotas requiere el uso de regiones reguladoras eucariotas. Tales regiones, en general, incluirán una región de promotor suficiente para dirigir la iniciación de la síntesis de ARN. Promotores eucariotas preferidos incluyen, por ejemplo, el promotor de la secuencia del gen de la metalotioneína I de ratón (Hamer et al, *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 273-288 (1982)); el promotor TK del virus Herpes (McKnight, *Cell* 31: 355-365 (1982)); el promotor temprano de SV40 (Benoist et al, *Nature (Londres)* 290:304-310 (1981)); el promotor de la secuencia del gen *gal4* de levadura (Johnston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79: 6971-6975 (1982); Silver et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81: 5951-5955 (1984)).

Como es ampliamente conocido, la traducción de ARNm eucariota se inicia en el codón que codifica la primera metionina. Por esta razón, es preferible asegurar que el enlace entre un promotor eucariota y una secuencia de ADN que codifica las heparinasas modificadas de la invención no contiene codón de intervención alguno que sea capaz de codificar una metionina (es decir, AUG). La presencia de tales codones resulta en la formación de una proteína de fusión (si el codón AUG está en el mismo marco de lectura que las heparinasas modificadas de la secuencia codificadora de la invención) o una mutación de desplazamiento de marco (si el codón AUG no está en el mismo marco de lectura que las heparinasas modificadas de la secuencia codificadora de la invención).

En una realización, se emplea un vector que es capaz de integrar las secuencias de genes deseadas en el cromosoma de la célula huésped. Células que han integrado de forma estable el ADN introducido en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo también uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped que contienen el vector de expresión. El marcador puede, por ejemplo, proporcionar prototrofia a un huésped auxotrófico, o puede conferir resistencia biocida, p. ej., a antibióticos, metales pesados o similares. La secuencia del gen marcador seleccionable puede estar directamente enlazado a las secuencias de genes de ADN a expresar, o puede estar introducido en la misma célula por co-transfección. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de las heparinasas modificadas del ARNm de la invención. Estos

elementos pueden incluir señales de corte y empalme, así como promotores de la transcripción, potenciadores, y señales de terminación. vectores de expresión de ADNc que incorporan tales elementos incluyen los descritos por Okayama, *Molec. Cell. Biol.* 3: 280 (1983).

- 5 En una realización preferida, la secuencia introducida se incorporará en un plásmido o vector viral capaz de replicación autónoma en el huésped receptor. Para este propósito puede emplearse cualquiera de una amplia diversidad de vectores. Factores de importancia en la selección de un plásmido o vector viral particular incluyen: la facilidad con que las células receptoras que contienen el vector pueden ser reconocidas y seleccionadas de aquellas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desean en un huésped particular; y si es deseable poder "lanzar" el vector entre células huésped de diferentes especies. Vectores procarionóticos preferidos incluyen plásmidos tales como los capaces de replicación en *E. coli* (tales como, por ejemplo, pBR322, ColEI, PSC101, pACYC 184, y π VX. Tales plásmidos se describen, por ejemplo, por Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)). Plásmidos de *Bacillus* incluyen pC194, pC221, pT127 y similares. Tales plásmidos se describen por Gryczan (En: *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, NY (1982), págs. 307-329).
- 10 Plásmidos de *Streptomyces* adecuados incluyen pIJ101 (Kendall et al, *J. Bacteriol.*169:4177-4183 (1987)), y bacteriófagos de *Streptomyces* tales como Φ C31 (Chater et al, En: *Sexto Simposio Internacional sobre Biología de Actinomicetales*, Akademiai Kaido, Budapest, Hungría (1986), págs. 45-54). Plásmidos de *Pseudomonas* son revisados por John et al. (*Rev. Infect. Dis.* 8:693-704 (1986)), e Izaki (*Jpn. J. Bacteriol.* 33: 729-742 (1978)).
- 15 Plásmidos eucariotas preferidos incluyen, por ejemplo, BPV, EBV, SV40, círculo de 2 micras, y similares, o sus derivados. Tales plásmidos son bien conocidos en la técnica (Botstein et al., *Miami Wntr. Symp.* 19:265-274 (1982); Broach, en: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, págs. 445-470 (1981); Broach, *Cell* 28:203-204 (1982); Bollon et al., *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10:39-48 (1980); Maniatis, En: *Cell Biology: A Comprehensive Treatise*, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, págs. 563-608 (1980)). Otros vectores eucarióticos preferidos son vectores
- 20 virales. Por ejemplo, y no a modo de limitación, se pueden emplear el virus de la viruela, virus del herpes, adenovirus y diversos retrovirus. Los vectores virales pueden incluir virus de ADN o de ARN para provocar la expresión del ADN de inserción o el ARN de inserción. Adicionalmente, el ADN o ARN que codifica las heparinasas modificadas de los polipéptidos de la invención puede ser inyectado directamente en las células o puede ser impulsados a través de las membranas celulares después de haber sido adherido a micropartículas.
- 25 Una vez que el vector o la secuencia de ADN que contiene la o las construcciones se ha preparado para la expresión, la o las construcciones de ADN se pueden introducir en una célula huésped apropiada mediante cualquiera de una diversidad de medios adecuados, es decir, transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección directa, y similares. Después de la introducción del vector, las células receptoras se cultivan en un medio selectivo, el cual selecciona el crecimiento de las células que contienen el vector. La expresión de la o las secuencias del gen clonado resulta en la producción de las heparinasas modificadas de la invención. Esto puede tener lugar en las células transformadas como tales, o después de la inducción de estas células para diferenciarse (por ejemplo, mediante la administración de bromodesoxiuracilo a células de neuroblastoma o similares).
- 30
- 35

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, que de ninguna manera deben interpretarse como limitantes adicionales. Todo el contenido de todas las referencias (incluyendo referencias bibliográficas, patentes emitidas, solicitudes de patentes publicadas y solicitudes de patente en tramitación) citados en esta solicitud se incorporan con ello expresamente como referencia.

40

EJEMPLOS

Materiales y métodos:

- 45 **Productos químicos y materiales.** Hidrocloruro de hidroxilamina y urea eran de EM Science (Gibbstown, NJ). El reactivo de modificación química dietilpircarbonato (DEPC) se adquirió de Sigma y se utilizó como se recibió (Milwaukee, WI). Sulfato de heparán se adquirió de Celsus Laboratories (Cincinnati, OH). Lys-C de *Lysobacter enzymogenes* (EC 3.4.21.50) era de Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN). Heparinasa III de *Flavobacterium heparinum* (EC 4.2.2.8) se purificó como se ha descrito previamente (Godavarti, R., Cooney, C.L., Langer, R., y Sasisekharan, R. (1996) *Biochemistry* 35, 6846-52 y Lohse, D. y Linhardt, R.J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 781-87) y era un regalo de IBEX Technologies (Montreal, Canadá).
- 50

Ensayo de actividad de Heparinasa III

- La actividad de heparinasa III se midió utilizando un ensayo UV a 232 nm similar a los reseñados para la heparinasa I y heparinasa II (Godavarti, R., Cooney, C.L., Langer, R., y Sasisekharan, R. (1996) *Biochemistry* 35, 6846-52; Shriver, Z., Hu, Y., y Sasisekharan, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273,10160-67; y Lohse, D. y Linhardt, R.J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 781-87). En síntesis, el aumento en la absorbancia a 232 nm como una función del tiempo se monitorizó bajo condiciones de saturación de sustrato. Todos los ensayos se realizaron con sulfato de heparán a
- 55

una concentración de 2 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,6. La temperatura para mediciones de la actividad enzimática se mantuvo constante a 35°C.

Modificación química de heparinasa III con DEPC

5 (A) *Inactivación de heparinasa III con DEPC.* A valores de pH que oscilan entre 6,0 y 8,0, heparinasa III (50 µg/mL) se incubó con DEPC en tampón fosfato de sodio 50 mM a 25°C. La disolución patrón de DEPC (6,9 M) se diluyó con etanol. Las reacciones control contenían una cantidad equivalente de etanol en lugar de DEPC y se encontró que no afectaban a la actividad enzimática durante el intervalo de tiempo experimental. A cada pH, se realizaron tres reacciones utilizando diferentes concentraciones de DEPC que oscilan entre 50 µM y 2,5 mM. A intervalos de tiempo fijos, partes alícuotas de 25 µL se retiraron de la mezcla de reacción para el ensayo de actividad UV a 232 nm.

10 La cinética de inactivación de heparinasa III con DEPC se determinó representando gráficamente el logaritmo natural del porcentaje de actividad frente a un plazo de tiempo ajustado (para dar cuenta de la descomposición de DEPC). En síntesis, este término de tiempo ajustado (t') se calculó según la siguiente ecuación:

$$t' = \frac{1 - e^{-k't}}{k'}$$

15 En esta ecuación, k' es la constante de velocidad de primer orden para la hidrólisis de DEPC y t es el tiempo medido después de la adición de DEPC a la disolución de heparinasa III. A cada uno de los pH, el orden de la reacción en DEPC se determinó mediante el trazado de las constantes de velocidad observadas de inactivación a cada uno de los pH frente a $\log [DEPC]$. La pendiente de esta gráfica es n , el orden de la reacción con respecto a DEPC (Lundblad, R. (1995) *Techniques in Protein Modification*, CRC Press, Boca Raton).

20 (B) *Reactivación de la Enzima Modificada con DEPC con Hidroxilamina.* De manera similar a lo que se completó con heparinasa I y II (Godavarti, R., Cooney, C.L., Langer, R. y Sasisekharan, R. (1996) *Biochemistry* 35, 6846-52 y Shriver, Z., Hu, Y. y Sasisekharan, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10160-67), heparinasa III (50 µg/mL) se incubó con DEPC 0,97 mM, pH 6,5, hasta que su actividad enzimática se redujo al 50% de su valor inicial. La hidroxilamina se añadió después inmediatamente a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 0,5 M. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 6 horas. Se retiraron partes alícuotas cada hora para el ensayo de actividad. La mezcla de control no contenía DEPC, pero la misma concentración de hidroxilamina para dar cuenta de la pérdida de actividad no específica. La relación de la actividad de la mezcla de reacción durante la actividad del control se calculó para determinar la recuperación de la actividad enzimática.

(C) Protección del Sustrato de Heparinasa III contra la Inactivación de DEPC

30 La heparinasa III (50 µg/mL) se pre-incubó con 2 mg/mL de sulfato de heparán en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,6 durante 30 minutos antes de la adición de DEPC 1,5 mM. También se completó una reacción de control sin incubación previa de sustrato. El curso en el tiempo de la inactivación para ambas se determinó utilizando el ensayo de actividad de heparinasa III.

35 (D) *Cuantificación del Número de Histidinas Modificadas mediante DEPC.* El grado de modificación de una enzima por parte de DEPC se puede determinar monitorizando la formación del aducto de N-carboxihistidilo a 240 nm. En el tiempo cero, DEPC 1,5 mM se añadió a la cubeta que contenía heparinasa III en tampón fosfato de sodio, pH 7,0. El cambio en la absorbancia a 240 nm se monitorizó cada minuto durante 10 min. El número de residuos modificados se determinó utilizando un coeficiente de extinción molar de $3.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Lundblad, R. (1995) *Techniques in Protein Modification*, CRC Press, Boca Raton).

Estudios de Representación en Mapa de Péptidos

40 Para determinar qué residuos histidina se modificaron con DEPC, se completaron los estudios de representación en mapa utilizando la proteasa Lys-C. Heparinasa III (1 nmol) se incubó con DEPC 4 mM durante quince minutos, se desnaturizó con yrea 6,5 M a 55°C y se diluyó con agua. Subsiguientemente, la heparinasa III desnaturizada, modificada se digirió con Lys-C.

45 Péptidos derivados de la digestión con heparinasa III se separaron por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RPHPLC) y se monitorizaron a 210, 277 y 240 nm. Se recogieron picos de péptidos que no están presentes en la digestión control y se secuenciaron utilizando un secuenciador de Applied Biosystems modelo 477 con un analizador de aminoácidos PTH modelo 120 en línea (Biopolymers Laboratory, MIT).

Mutagénesis dirigida al sitio

50 Cada uno de los trece residuos histidina de heparinasa III fue mutado a alanina utilizando PCR de extensión de solapamiento durante 15 ciclos (Higuchi, R. (1990) en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., y White, T.J., Ed.) págs. 177-83, Academic Press, San Diego). Las reacciones PCR

se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se escindió la banda correspondiente al peso molecular apropiado. El ADN se extrajo del gel utilizando un kit de purificación de gel (QIAGEN, Valencia, CA) y el inserto se subclonó en pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La validez de todas las mutaciones puntuales y la integridad del resto del gen fueron verificadas por secuenciación. Las trece secuencias mutantes de la heparinasa III se prepararon en pCR2.1 utilizando un kit Miniprep (Qiagen, Valencia, CA) y se clonaron utilizando Nde I/BamH I (New England Biolabs, Beverly, MA) en pET-15b (Novagen, Madison, WI) para la expresión. El plásmido pET-15b contiene una etiqueta His NH₂-terminal para la purificación en columna de Ni²⁺. Heparinasa III recombinante también se expresó y se comparó con la heparinasa III nativa aislada directamente de *Flavobacterium heparinum*.

Expresión, Aislamiento y Purificación de r-heparinasa III y Mutantes en *E coli*

10 Cultivos de una noche de caldo Luria-Bertani (LB) (5 ml) que contienen 0,02 mg/ml de ampicilina (amp) se utilizaron para inocular cultivos de 500 ml de BL/amp a una DO₆₀₀ inicial de 0,1. Los cultivos se indujeron con isopropil-BD-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM en la fase semilogarítmica (DO₆₀₀ 0,7-0,9) y se incubaron durante otra hora a 37°C. Para recolectar las células, los cultivos se centrifugaron a 5.000 rpm y el sobrenadante se desechó.

15 El sedimento celular se resuspendió en Tris 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol-HCl 5 mM, pH 7,9 (1/50 del volumen de cultivo inicial). Las células resuspendidas se colocaron en hielo y se trataron mediante ultrasonidos tal como se ha descrito previamente (Ernst, S., Venkataraman, G., Winkler, S., Godavarti, R., Langer, R., Cooney, C.L., y Sasisekharan, R. (1996) *Biochem. J.* 315, 589-97). La proteína soluble del lisado celular se aisló mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se cargó en una columna de níquel utilizando un sistema de cromatografía por perfusión Biocad (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). La columna se lavó y la proteína se eluyó posteriormente en Tris 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol-HCl 500 mM, pH 7,9. El análisis de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida utilizando 12% de geles prefabricados, el aparato Mini-Protean II y el kit Silver Stain Pus (Bio-Rad, Hercules, CA) se realizó para determinar la concentración y pureza de las proteínas individuales.

Análisis por HPLC de Productos Sacáridos de la Actividad de Heparinasa III

25 Digestiones exhaustivas de 3 mg/ml de sulfato de heparán en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,6 se realizaron durante la noche a 37°C para cada uno de los mutantes (20 µg de proteína). Las reacciones se cargaron en una columna Spherisorb S5 SAX (Waters) y se eluyeron utilizando un gradiente lineal de NaCl 0,2-1,0 M, pH 3,5. Los productos se monitorizaron a 232 nm y se recogieron cada uno de los picos principales. Para determinar su composición, las fracciones recogidas se analizaron mediante electroforesis capilar y se identificaron por comigración con patrones conocidos.

Dicroísmo Circular (CD)

35 Se concentraron heparinasa III expresada de forma recombinante y los mutantes de heparinasa III, H295A y H510A, y se intercambiaron con tampón en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 utilizando un filtro Centricon 30 (Millipore, Watertown, Massachusetts). Espectros CD se recogieron en un espectropolarímetro Aviv 62DS equipado con un controlador de temperatura termostático y se importaron a un microordenador IBM. Las mediciones se realizaron en una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria de 1 mm. Los espectros se registraron a 25°C, en una media de 10 exploraciones entre 205 y 260 nm, con un ancho de banda de 1,0 nm y una velocidad de barrido de 3 nm/min. Intensidades de banda de CD se expresan como elipticidades molares, θ_M , en grados cm².dmol⁻¹.

Transfección de células B16:

40 Células de melanoma B16BL6 fueron transfectadas con 2OST antisentido en pcDNA3.1. Clones transfectantes estables se seleccionaron con G418 y se propagaron. El éxito de la transfección se confirmó con el rastreo por PCR de células transfectadas.

Ensayo de invasión in vitro:

45 10⁵ de B16BL6 y transfectantes de B16BL6 se cargaron en los insertos recubiertos con 15 µg de Matrigel. MEM-α con 40 ng/ml de bFGF se utilizó como quimioatrayente. Después de 20 horas de incubación a 37°C, los insertos se fijaron y tiñeron. Las células que no habían migrado se retiraron y las células que habían migrado se contaron bajo microscopio óptico.

Crecimiento del tumor primario in vivo:

50 4 x 10⁵ B16BL6, transfectadas y no transfectadas, respectivamente, fueron inoculadas por vía subcutánea en el flanco de ratones desnudos. La medición del tamaño del tumor comenzó el día 10 después de la inyección de células tumorales. y los ratones fueron eutanizados el día 16 después de la inyección.

Metástasis in vivo de pulmón:

2 x 10⁵ B16BL6 en 0,2 ml de PBS, transfectadas y no transfectadas, respectivamente, fueron inyectadas a través de vena de la cola de ratones C57BL6. 13 días más tarde, los ratones fueron eutanizados, y los pulmones recogieron y analizaron.

Análisis de la composición de HLGAGs que resultan del tratamiento con heparinasa de células B16:

5 Células B16 fueron tratadas con heparinasa I, III o PBS. El sobrenadante se recogió, se hirvió y se filtró a través de un filtro 0,45 µm. Esta muestra fue sometida luego a fraccionamiento utilizando una columna de centrifugación Centricon con un corte de peso molecular nominal de 5 kDa. El material retenido se intercambiaba en agua y se concentró 50 veces mediante liofilización.

10 El análisis de la composición de oligosacáridos se completó por digestión exhaustiva de la fracción de alto peso molecular con heparinasas I-III. A 9 µL de oligosacárido acuoso se añadió 1 mU de heparinasas I-III en acetato de sodio 25 mM, tampón cloruro de calcio 2 mM a pH 7,0. La reacción se dejó proseguir a 37°C durante la noche, después de lo cual se completó el análisis de CE.

15 Se completó el análisis de la composición en una unidad CE de Hewlett Packard 3D mediante el uso de tubos capilares de sílice fundida sin recubrir (d.i. 75 µm). Los analitos se midieron utilizando un capilar de longitud de la trayectoria extendida. El electrolito era tris/fosfato 50 mM pH 2,5. Las separaciones se llevaron a cabo a 30 kV con polaridad inversa. Las asignaciones y la cuantificación de disacáridos se hicieron por comparación con patrones conocidos.

Resultados:

Ejemplo 1: DEPC inactiva heparinasa III

20 Como un primer paso hacia la identificación de histidinas, que son críticas para la actividad enzimática de la heparinasa III, se determinó el efecto del reactivo de modificación DEPC sobre la actividad enzimática de heparinasa III. DEPC es un reactivo común utilizado para la determinación de histidinas catalíticamente críticas en enzimas. Tal como se indica en las primeras publicaciones (Godavarti, R., Cooney, C.L., Langer, R. y Sasisekharan, R. (1996) *Biochemistry* 35, 6846-52 y Shriver, Z., Hu, Y. y Sasisekharan, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273,10160-67), DEPC es útil
25 para la determinación de histidinas catalíticamente críticas, sin embargo debe tenerse cuidado para asegurar que no se modifican otros residuos nucleófilos, a saber tirosinas, lisinas y cisteínas.

La heparinasa III se incubó con DEPC 0,31 (□), 0,54 (●), 0,97 (O), 1,5 (▲), 1,9 (Δ) mM a pH 6,5 y a 25°C (se muestra en la inserción de la Figura 1). El logaritmo natural del porcentaje de actividad restante se representó gráficamente frente a un plazo de tiempo ajustado (t') para tener en cuenta la descomposición de DEPC. La
30 pendiente de cada una de las líneas en las diversas concentraciones de DEPC representa las constantes de velocidad de pseudo-primer orden de inactivación. El trazado de estas constantes de velocidad de pseudo-primer orden frente a las respectivas concentraciones de DEPC produce una constante de velocidad de segundo orden de inactivación de 0,20 ± 0,04 mM⁻¹ min⁻¹.

35 Para heparinasa III, similar a heparinasa I y II, se encontró que DEPC inhibía de una manera dependiente de la dosis. Una constante de velocidad de segundo orden medida de 0,20 ± 0,04 min⁻¹mM⁻¹ se obtiene variando la concentración del inhibidor. En consonancia con esta reacción que es de primer orden, tanto en heparinasa III como en DEPC, una gráfica de k_{inact} frente a log [DEPC] proporcionó una línea con una pendiente de 1 (**Figura 1**).

40 El hecho de que DEPC inactive heparinasa III en un pseudo-primer orden, de manera dependiente de la dosis, sugiere que DEPC está modificando directamente un residuo implicado en la degradación catalítica de sulfato de heparán. La constante de velocidad de segundo orden de inactivación (0,20 ± 0,04 min⁻¹mM⁻¹) también sugiere que DEPC es un potente inhibidor de la función de heparinasa III.

45 Para asegurar que la interacción de DEPC con heparinasa III sea a través de la modificación de histidina, se investigó si otros aminoácidos nucleófilos de heparinasa III interactúan con DEPC. Primero, a diferencia con heparinasa I o II, no hay posibilidad de una modificación de cisteína, ya que heparinasa III no contiene cisteínas en su secuencia de aminoácidos primaria. Además, no hubo pérdida de la absorbancia a 278 nm tras la incubación de DEPC con heparinasa III como sería de esperar si se modificaran tirosinas. Finalmente, la adición de hidroxilamina para heparinasa III modificada con DEPC invertía la mayor parte de la inactivación, indicando que los residuos fuertemente nucleofílicos tales como lisina, no se modificaron por DEPC (**Tabla 1**).

Tabla 1: Reversibilidad de Hidroxilamina de Inactivación con DEPC

Tiempo (min)	Actividad (%)
0	51
30	60
60	66

90	72
180	76
240	78
360	80

En un intento de definir adicionalmente la interacción de DEPC con las histidinas de heparinasa III, se examinó el efecto del pH sobre la cinética de inactivación. El examen de la velocidad de inactivación como una función de pH se ha utilizado para derivar un pKa para un residuo modificado, ya que, en el caso de histidina, la forma no protonada se modifica mucho más fácilmente que es la forma protonada. La dependencia del pH de la constante de velocidad de segundo orden de inactivación se muestra en la Figura 2. (Heparinasa III se incubó con DEPC 50 μM a 2,5 mM a pHs de 6,0-8,0 a 25°C y se calculó la constante de velocidad de segundo orden de inactivación para cada pH). Con heparinasa III, aumentando el pH de la reacción de 6,0-7,5 resulta un aumento en la cinética de inactivación sin cambiar el orden de la reacción (**Figura 2**). Sin embargo, a pH 8,0 y superior, la reacción ya no es de primer orden en DEPC, indicando que otros residuos (posiblemente lisinas) están interactuando con DEPC a este pH. En consonancia con esta interpretación, hidroxilamina ya no es capaz de revertir la inacción a pH 8,0. Por lo tanto, los estudios de representación en mapa y experimentos de protección del sustrato, comentados a continuación, se llevaron a cabo a pH 7,0 que maximizaba la reactividad al tiempo que garantizaba que sólo las histidinas fueran el objetivo de la modificación de DEPC.

Se cuantificaron residuos de histidina modificados con DEPC en heparinasa III (mostrados en la Figura 3). En el tiempo cero, DEPC 1,5 mM se añadió a una cubeta que contenía heparinasa III (540 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tampón fosfato de sodio, pH 7,0. El cambio en la absorbancia a 240 nm se monitorizó a intervalos de tiempo de 10 min. El número de histidinas modificados se calculó utilizando $\epsilon = 3200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Al principio y al final del experimento, se retiraron partes alícuotas de heparinasa III y se ensayaron en cuanto a la actividad. Menos de 5% de la actividad inicial se mantuvo después de 10 minutos de incubación con DEPC.

En consonancia con la idea de que DEPC está interactuando con un residuo histidina en heparinasa III, hay un aumento en la absorbancia a 240 nm como una función del tiempo, lo que resulta a partir de derivados N-carboxihistidilo. La Figura 3 muestra la cuantificación del número de histidinas modificadas. En el transcurso de 10 minutos, 1,8 histidinas fueron modificadas por molécula de enzima, resultando en una pérdida de actividad mayor que 90%. Por lo tanto, parece que una o posiblemente dos histidinas, modificadas mediante DEPC, resultan en pérdida de la actividad enzimática de heparinasa III.

La protección del sustrato de la inactivación de heparinasa III por DEPC también se evaluó (Figura 4). La heparinasa III (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se incubó con 2 mg/mL de sulfato de heparán durante 30 min. DEPC 1,5 mM se añadió a la reacción y el transcurso en el tiempo de inactivación se completó usando el ensayo de actividad de heparinasa III (O). También se realizó una reacción de control sin preincubación con sulfato de heparán (\square).

La preincubación de heparinasa III con el sustrato sulfato de heparán antes de la adición de DEPC resultó en una cinética de inactivación más baja (**Figura 4**) lo que sugiere que la o las histidinas modificadas por DEPC están próximas a la unión del sustrato y/o al sitio activo de heparinasa III, similar a lo observado para heparinasa I y II (Godavarti, R., Cooney, C.L.; Langer, R. y Sasisekharan, R. (1996) *Biochemistry* 35, 6846-52 Y Shriver, Z., Hu, Y. y Sasisekharan, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10160-67).

Ejemplo 2: Representación en Mapa de Péptidos de la Histidina Modificada por DEPC.

Para identificar la o las histidinas modificadas por DEPC que resultaban en la pérdida de actividad enzimática, heparinasa III modificada por DEPC se digirió con Lys-C. Los péptidos que tenían tiempos de retención alterados y un aumento en la absorbancia a 240 nm en comparación con una digestión control se recogieron y se secuenciaron (**Figura 5**). Se aislaron y secuenciaron tres péptidos con tiempos de retención alterados y un aumento en la absorbancia a 240 nm. Dos de los péptidos contenían histidina 295 y uno no contenía residuos histidina modificada.

El marcaje de las histidinas reactivas con DEPC se completó haciendo reaccionar primero heparinasa III con DEPC y, a continuación, desnaturando la proteína en urea. Después de una digestión durante la noche con Lys-C, los péptidos resultantes se separaron utilizando un gradiente de acetonitrilo de 1,6%-78,4% a lo largo de 120 minutos, que incluía una fase isocrática de 5 min (acetonitrilo al 1,6%, ácido trifluoroacético al 0,1%) al comienzo de la operación. Péptidos Lys-C se controlaron a 210, 240 y 277 nm. Nuevos picos peptídicos, no presentes en la digestión control y con una absorbancia acusada a 277 nm, se recogieron y se secuenciaron. Estos péptidos están marcados con un asterisco en el cromatograma. Los péptidos que migraban a 62 y 71 min. contenían la secuencia QVYADGMQFELSPIYHVAADIFLK (SEQ ID NO: 3) que incluye histidina 295. El otro péptido marcado consistentemente no contenía una histidina. La Figura 5A muestra el perfil C4 RPHLPLC de la digestión Lys-C de heparinasa III que no fue expuesto a DEPC, y las Figuras 5B muestra el perfil de péptido de heparinasa III marcada con DEPC.

Ejemplo 3: Mutagénesis dirigida al sitio de heparinasa III.

En paralelo a los estudios de representación en mapa y para confirmar los resultados de los experimentos de modificación química, cada uno de los trece residuos histidina presentes en heparinasa III fue mutado a alanina. Las proteínas recombinante mutantes de heparinasa III se expresaron, se purificaron y se evaluaron para la actividad enzimática hacia sulfato de heparán (**Tabla 2**).

Tabla 2: Constantes Cinéticas para r-heparinasa III y Mutantes de Histidina.

Enzima	KM (uM) ^a	k _{cat} (s ⁻¹)
r-heparinasa III de tipo salvaje	80	78
H36A	98	86
H105A	ND ^b	ND ^b
H110A	9	37
H139A	191	68
H152A	58	83
H225A	80	22
H234A	75	23
H241A	16	5
H295A	ND	ND
H424A	59	24
H469A	71	100
H510A	ND	ND
H539A	92	132

^aCalculada asumiendo un peso molecular para sulfato de heparán de 15 kDa.

^bLos niveles de expresión de proteínas eran demasiado bajos para el ensayo cinético de heparinasa III.

Como control, se expresó la construcción de r-heparinasa III sin su secuencia señal putativa. La concentración y la pureza de todas los preparados de enzimas recombinantes se determinaron utilizando SDS-PAGE. La heparinasa III expresada de forma recombinante también fue comparada con la heparinasa III aislada de *F. heparinum* para asegurar que eran del mismo peso molecular. El análisis SAX de digestiones de heparinasa III exhaustivas de sulfato de heparán se muestra en la **Figura 6**. La heparinasa III (20 µg/mL) se incubó con 4 mg/mL de sulfato de heparán durante la noche a 37°C. La reacción se cargó en una columna SAX y los productos de sacárido se eluyeron utilizando un gradiente de NaCl 0,2-1,0 M, pH 3,5 a lo largo de 30 min y se monitorizó a 232 nm. (A) Sulfato de heparán digerido con heparinasa III de *F. heparinum*. (B) Sulfato de heparán digerido con heparinasa III recombinante. (C) Sulfato de heparán digerido con la enzima mutante H295A. (D) Sulfato de heparán digerido con la enzima mutante H510A. (E) Sulfato de heparán digerido con la enzima mutante H105A.

Las dos enzimas mostraban una actividad cinética similar hacia sulfato de heparán y proporcionaron los mismos perfiles de degradación según se determina por SAX-HPLC (**Figura 6**). Los productos de las digestiones exhaustivas se analizaron a continuación mediante electroforesis capilar. El primer pico principal (5 min) observado en los cromatogramas de HPLC SAX-tiene un tiempo de migración que es idéntico a $\Delta U-H_{NAC}$. El segundo pico (7,5 min) tiene un tiempo de migración que es idéntico a $\Delta U-H_{NS}$ (datos no mostrados). Por lo tanto, la degradación de sulfato de heparán por parte de heparinasa III recombinante produce un perfil de productos idéntico al de tipo salvaje de heparinasa III, indicando que, al menos funcionalmente, estas enzimas son las mismas.

La sustitución de histidina 295 e histidina 510 con residuos alanina eliminó completamente la actividad de heparinasa III hacia sulfato de heparán (**Tabla 2**). Las enzimas mutantes H295A y H510A no mostraron diferencias en términos de nivel de expresión o de peso molecular. Sin embargo, tanto los datos cinéticos como el perfil de digestión exhaustiva para H295A y H510A sugieren que las enzimas son completamente inactivas (**Figura 6**). Nueve de los mutantes de histidina (H36A, H152A, H225A, H234A, H241A, H469A, H424A, H510A y H539A) no mostraron cambios significativos en el rendimiento de la proteína recombinante, la actividad enzimática, o parámetros cinéticos cuando se compara con r-heparinasa III. Curiosamente, tres (H105A, H110A y H139A) de los trece mutantes histidina proporcionó mucha menos proteína recombinante que cualquiera heparinasa recombinante III o los otros mutantes. A pesar de los niveles de proteína más bajos, las proteínas mutantes H110A y H139A eran susceptibles de análisis cinético, mientras que la proteína mutante H105A no lo era. Sin embargo, análisis SAX-HPLC de digestiones de sulfato de heparán durante una noche confirmó que a pesar de los niveles más bajos de expresión recombinante, las tres de estas enzimas sub-expresadas conservan su actividad catalítica (**Figura 6**).

La heparinasa III expresada de forma recombinante, el mutante H295A y el mutante H510A se compararon mediante dicroísmo circular (CD). El análisis de dicroísmo circular de la heparinasa recombinante III y la enzima mutante H295A se muestra en la Figura 7. La heparinasa III recombinante (●), la enzima mutante H295A (O) y la enzima mutante H510A (□) se concentraron y se intercambió el tampón en tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. Las lecturas se tomaron utilizando una celda de cuarzo con una longitud de recorrido de 1 mm a 25°C. Los espectros se registraron entre 205 y 260 nm con una media de 10 exploraciones; el ancho de banda era de 1,0 nm; y la velocidad de barrido era de 3 nm/min. Las intensidades de las bandas de CD se expresan como elipticidades molares, θ_M , en grados $\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$.

Se mantuvo la posibilidad de que la histidina 295 y/o histidina 510 eran de alguna manera responsables del plegado o de la estructura terciaria de la enzima y no estaban directamente implicadas en la catálisis. Sin embargo, el espectro de CD para H295A y H510A era casi idéntico al de heparinasa III recombinante (Figura 7). Si bien la identidad cerca de los perfiles de CD no excluye la posibilidad de que haya perturbaciones en el entorno local que rodea a histidina 295 e histidina 510 que no están representado en el perfil CD, sí sugiere que no hay cambios conformacionales inducidos brutos al mutar histidina 295 e histidina 510 en alanina.

Ejemplo 4: Comparación de las heparinasas I y III con respecto al crecimiento del tumor y la metástasis

Heparinasas I y III, que tienen especificidades de sustrato muy distintas para escindir HLGAGs, se emplearon como herramientas para investigar el papel de HLGAGs en el crecimiento del tumor y la metástasis. Mientras que escinde heparinasa I en las regiones altamente sulfatadas de HLGAGs, la heparinasa III escinde sólo en las regiones sub-sulfatadas de la cadena de polisacáridos, haciendo así estas enzimas poderosas herramientas para investigar *in vivo* e *in vitro* los papeles de HLGAGs, en el desarrollo, morfogénesis, angiogénesis, etc. Para examinar los papeles de los HLGAGs en el crecimiento del tumor y la metástasis, se utilizó melanoma B16BL6 como un sistema modelo y se trataron ratones portadores de tumor con cualquiera de las heparinasas I o III para investigar tanto el crecimiento del tumor primario como la metástasis del tumor. En consonancia con el paradigma actual, heparinasa I aceleraba el crecimiento del tumor (Figura 8). A una dosis de 0,5 mg/kg/día de la heparinasa I, el crecimiento del tumor se incrementó en aproximadamente 39%. Sin embargo, y lo más sorprendentemente, la heparinasa III inhibió el crecimiento del tumor primario (Figura 8). La inhibición del crecimiento de melanoma por parte de heparinasa III demostró ser dependiente de la dosis. La inhibición del crecimiento del tumor primario por parte de heparinasa III se observó por primera vez en 2 mg/kg al día. El crecimiento del tumor fue inhibido en un 73% a 12 mg/kg al día, la dosis máxima sometida a ensayo en el estudio (Figura 8). Los ratones control tratados con heparinasa III inactivada por calor exhibían curvas de crecimiento comparables con la de los ratones tratados con PBS (Figura 8), sugiriendo que la actividad catalítica de heparinasa III era responsable de la capacidad de heparinasa III de inhibir el crecimiento del tumor primario. El examen histológico de muestras de tumores reveló una apoptosis incrementada en tumores tratados con heparinasa III, mientras que tumores tratados con heparinasa I revelaron una apoptosis reducida.

Se examinaron ratones, 15 días después de la implantación del tumor con melanoma B16BL6. 4×10^5 células de melanoma B16BL6 en fase de crecimiento log en 0,1 ml de PBS se inyectaron en el costado de ratones C57BL/6 el día 1. La inyección diaria de 0,1 ml de PBS, hep III inactivada por calor o heparinasa III activa (2 mg/ml, expresada de forma recombinante, purificada, intercambiado el tampón con PBS y concentrada) comenzó el día 4 y continuó durante todo el experimento. El día 7, bombas osmóticas (capacidad de 100 μl que suministran a razón de 0,5 μl por hora) que contienen PBS o 3 mg/ml de hep III se implantaron por vía subcutánea en un lugar alejado del sitio del tumor. Los ratones fueron sacrificados el día 15. Tras una inspección visual, el control de los ratones tratados con PBS o Hep III inactiva tenían masas de tumores significativamente mayores que los ratones tratados con Hep III activa.

La Figura 8 representa el volumen del tumor de los tumores aislados de los ratones arriba descritos. El volumen del tumor se midió diariamente después de 7 días con un calibrador y se calculó con la fórmula [volumen = $0,52 \times (\text{anchura})^2 \times (\text{longitud})$]. Los datos se representaron como curvas de crecimiento de los ratones portadores de melanoma tratados con PBS, hep III inactiva y hep III activa.

Para garantizar que estas observaciones no se limitaron al modelo de tumor elegido, hep III se utiliza para tratar ratones portadores de tumores de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC). Se representaron curvas de crecimiento de crecimiento del tumor primario para el tumor LLC en ratones C57BL/6 tratados con PBS o heparinasa III. 4×10^5 células LLC en fase log se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de los ratones el día 1. La inyección diaria de 0,1 ml de PBS o 2 mg/ml heparinasa III expresada de forma recombinante comenzó el día 4 y continuó durante todo el experimento. El día 8, bombas osmóticas (100 μl de capacidad que suministran a razón de 0,5 μl por hora) que contiene PBS o 3 mg/ml de hep III se implantaron por vía subcutánea en un lugar alejado del sitio del tumor. Los ratones fueron sacrificados el día 20. Las metástasis de pulmón de células LLC inyectados a través de la vena de la cola se cuantificaron como el número de nódulos pulmonares. Células LLC en crecimiento log se tripsinizaron durante 30 segundos y se resuspendieron en PBS a una concentración final de 1×10^6 por ml. Para el grupo experimental, las células se incubaron con 200 nm de hep III durante 30 minutos a 37°C antes de inyectar 0,2 ml de la suspensión de células a través de vena de la cola. Los ratones fueron sacrificados 12 días después de las

inyecciones en la vena de la cola, se recogieron los pulmones, se enjuagaron en agua del grifo y se fijaron durante la noche en solución de Bouin. El número de nódulos en la superficie del pulmón se contó con ayuda de un microscopio de disección.

De manera similar a B16BL6, el tratamiento con heparinasa III de ratones portadores de tumor LLC a 12 mg/kg al día mostró una inhibición en el crecimiento del tumor. Además, la separación de la capa de HLGAG presente en las células LLC tras el tratamiento con heparinasa III (y la presencia de fragmentos de HLGAG) inhibió las células LLC para colonizar los pulmones de manera similar al experimento con B16BL6. Los autores de la invención investigaron la posibilidad de que fragmentos de HLGAG derivados de células LLC apoyaran o inhibieran el crecimiento del tumor B16BL6 y la metástasis. Fragmentos de HLGAG de las células LLC generados tanto de heparinasa I como III se aislaron y se recogieron en PBS. De acuerdo con los resultados de B16BL6, fragmentos de HLGAG de LLC generados por heparinasa I fomentaron el crecimiento de células tumorales B16BL6, mientras que fragmentos de HLGAG de LLC generados por heparinasa III mostraron un efecto mínimo sobre el crecimiento de células B16BL6. De manera similar, cuando células B16BL6 se incubaron con los fragmentos de HLGAG de LLC derivados de heparinasa antes de la inyección en ratones, fragmentos de HLGAG de LLC derivados de heparinasa III inhibían la metástasis de B16BL6 a los pulmones. Por lo tanto, estudios *in vivo*, junto con los experimentos *in vitro* de cultivo de células apuntan a la acción enzimática de hep III reduciendo la tumorigenicidad de una diversidad de tipos de células tumorales.

Existen dos posibles mecanismos mediante los cuales la heparinasa puede estar actuando sobre células tumorales. Por ejemplo, el tratamiento con heparinasa III de las células puede resultar en la pérdida de células de su capa de HLGAG de superficie única y esto, directa o indirectamente, puede afectar a su capacidad para crecer o metastatizar. Por otro lado, el tratamiento con heparinasa III de las células también puede resultar en la generación de fragmentos de HLGAG distintos, y estos fragmentos podrían entonces modular, directa o indirectamente, la función de las células tumorales. Se pensó que la heparinasa III puede funcionar a través de uno cualquiera de estos mecanismos o a través de alguna combinación de estos mecanismos. Para investigar más a fondo los mecanismos de acción, los autores de la invención trataron células B16BL6 con heparinasas I o III, para separar la capa de HLGAG en la superficie de las células tumorales. Curiosamente, la separación de la capa de HLGAG, ya sea por heparinasa I o III, no tuvo efecto alguno sobre la capacidad de estas células para crecer en ratones en comparación con las células no tratadas. Como se muestra más adelante, también se encontró que fragmentos de HLGAG eran capaces de modular la función de las células tumorales, lo que sugiere que este es el mecanismo a través del cual la heparinasa III ejerce sus funciones anti-tumorales y anti-metástasis.

A continuación los autores de la invención investigaron la capacidad de células de melanoma B16BL6 tratadas con heparinasa de metastatizarse en los pulmones. En la Figura 9 se muestra la metástasis del pulmón de melanoma B16BL6 13 días después de la inyección en la vena de la cola de células B16BL6. Células B16BL6 en fase de crecimiento log se tripsinizaron brevemente y se resuspendieron en PBS a una concentración final de 1×10^6 por ml. Antes de la inyección, las células se trataron con PBS, hep I (200 nm) o hep III (200 nm) durante 30 min. a 37°C. 0,2 ml de suspensiones de células (2×10^5 células) se inyectaron lentamente a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 13 días más tarde y se recogieron los pulmones y se enjuagaron con agua del grifo. Se contó el número de nódulos en la superficie del pulmón con ayuda de un microscopio de disección. * Indica $p < 0,05$ (ensayo de Mann-Whitney).

Células B16BL6 fueron tratadas con heparinasas I o III y luego fueron inyectadas a través de la vena de la cola de ratones singénicos. Curiosamente, células B16BL6 tratadas con heparinasa III eran significativamente menos capaces de metastatizar los pulmones, mientras que células tratadas con heparinasa I fueron marginalmente afectadas, en todo caso, en su capacidad de metastatizar los pulmones en comparación con células tratadas con PBS control (Figura 9). Por lo tanto, la separación de la capa específica de HLGAG presente en las células tumorales B16BL6 afectaba de manera significativa la capacidad de las células tumorales de metastatizar, pero no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento de células tumorales B16BL6. Cabe señalar que el tratamiento con heparinasa de las células generaría fragmentos de HLGAG que todavía podrían unirse a proteínas específicas en la superficie de B16BL6 para inhibir la metástasis del tumor.

Con el fin de investigar un papel plausible en el crecimiento del tumor y la metástasis para fragmentos de HLGAG generados tras el tratamiento con heparinasa de la capa de HLGAG B16BL6, fragmentos de HLGAG de las células B16BL6 generados tanto de heparinasa I como III se aislaron, se recogieron en PBS y se ensayaron (Figura 10). Melanoma B16BL6 fueron tratados con fragmentos GAG generados a partir de tratamiento de células B16BL6 con hep I y III. En síntesis, el 80-90% de células confluentes se lavaron con PBS una vez. 1,5 ml de PBS que contenía 200 nm de heparinasa I o III se añadieron a los matraces y se incubaron a 37°C en un agitador durante 2 h. El sobrenadante se combinó en un tubo, se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm, se hirvió durante 15 minutos y se filtró. La disolución se incubó finalmente con condroitinasa ABC durante 2 horas a 37°C, la reacción se detuvo por ebullición durante 1 min. 4×10^5 células B16BL6 fueron inyectadas por vía subcutánea según se describe en la Figura 8 el día 1. Las bombas osmóticas (capacidad de 200 ul que suministran 0,5 ul por hora) se implantaron por vía subcutánea el día 2. La inyección diaria de 0,1 ml de disolución de fragmento de GAG y PBS se inició el día 5 y

continuó durante todo el experimento. Los ratones fueron eutanizados el día 15. El volumen del tumor se muestra en la Figura 10A. Se examinó la metástasis del pulmón de melanoma B16BL6. 2×10^5 de B16BL6 se resuspendieron en PBS, disoluciones de fragmento generado de heparinasa I y disoluciones de fragmento generado de heparinasa III fueron inyectadas a través de vena de la cola de ratones ($n = 7$ u 8). Los pulmones se recogieron 13 días después de la inyección, se trataron y se contaron tal como se describió anteriormente. * Indica $p < 0.05$ (ensayo de Mann-Whitney). Se calculó el número de nódulos pulmonares.

Curiosamente, fragmentos de HLGAG generados de heparinasa I fomentaban significativamente el crecimiento del tumor primario, mientras que fragmentos de HLGAG generado de heparinasa III no mostraron hacerlo (Figura 10). En consonancia con el crecimiento del tumor mejorado, el examen histológico de muestras de tumores reveló una apoptosis reducida para el tratamiento con fragmento de HLGAG generado de heparinasa I. Por otra parte y más intrigante, cuando células B16BL6 se suspendieron en PBS que contenía fragmentos de HLGAG generados de heparinasa III antes de la inyección a través de vena de la cola de ratones, estos fragmentos inhibieron la metástasis de pulmón de células B16BL6, mientras que fragmentos generados de heparinasa I mostraron un efecto marginal, en todo caso. Por lo tanto, los fragmentos de HLGAG generados a partir de células B16BL6 mediante tratamiento con heparinasa también parecen jugar un papel en el crecimiento del tumor y la metástasis.

En apoyo adicional de esta conclusión la digestión *ex vivo* de la capa de HLGAG presente en células tumorales con heparinasa, seguido de centrifugación y resuspensión en PBS para separar la enzima y los fragmentos de HLGAG liberados de la superficie celular, antes de la inyección *in vivo* resulta en que las células son funcionalmente idénticas a los controles. Así, los fragmentos de HLGAG liberados de células tumorales parecen desempeñar el papel clave en la modulación del crecimiento del tumor y la metástasis.

La inmunohistoquímica se realizó como se describe (Parangi et al, 1996; O'Reilly et al, 1994) con modificaciones menores. En síntesis, tejidos tumorales se fijaron en formaldehído al 4% (vol/vol) durante la noche para la tinción con el factor de von Willebrand (vWF) y marcaje con desoxinucleótido transferasa terminal (TdT) o en solución Glyo-Fixx durante la noche para la tinción de antígeno nuclear Ki-67. Los tejidos fueron embebidos en parafina de acuerdo con procesos histológicos estándares. Para la tinción de vWF, secciones (5 μm de espesor) fueron incubadas con HCl 0,2N durante 10 min. se sometieron en autoclave en un frasco Coplin inmerso con la solución de recuperación Target (Dako) durante 15 min y se permeabilizaron con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K a 37°C durante 15 min. Las secciones fueron incubadas con anticuerpo vWF anti-humano de conejo acoplado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako). La tinción positiva se detectó por reacción del sustrato con diaminobenzidina. Las secciones se contra-tiñieron con hematoxilina de Gill y se montaron en un aparato Permount (Fisher). La tinción con antígeno Ki-67 (anticuerpo de antígeno Ki-67 anti-humano de conejo junto con HRP, Dako) y marcaje con TdT (DeadEnd Colorimetric Apoptosis Detection System, Promega) se realizaron esencialmente de acuerdo con el protocolo del fabricante. La densidad capilar se determinó contando el número de capilares vWF-positivos por campo de alta potencia (HPF, $\times 200$). Los índices proliferativos y apoptóticos de células tumorales dentro de las zonas de tumor viable se estimaron a partir del porcentaje de células anotado bajo un microscopio óptico con un aumento de 400 veces. Un mínimo de 2000 células fueron contadas en cada animal. # Indica el error estándar.

La similitud general de los datos para los modelos animales con B16BL6 y con LLC sugiere un papel importante para los HLGAGs en el crecimiento del tumor y la metástasis. Los efectos diferenciales de heparinasas I y III, y los fragmentos de HLGAG generados por heparinasas son consistentes con las especificidades únicas de heparinasas y, por lo tanto, los productos de oligosacáridos distintos que generan. Además de ello, los fragmentos de HLGAG para un tipo de célula son capaces de influir sobre los efectos en otro tipo de célula, lo que sugiere fuertemente la implicación de secuencias específicas de HLGAG en efectos de modulación sobre el crecimiento del tumor y la metástasis.

Células de melanoma B16BL6 fueron transfectadas con 2OST antisentido en pcDNA3.1 y fueron sometidas a ensayo en un ensayo de invasión *in vitro*. Las células que migraron se retiraron y se contaron. El número de células que migraron por campo de alta potencia ($\times 400$) para las células transfectadas con 2OST antisentido era el doble que el de las células B16BL6 no transfectadas. Los resultados se muestran en el histograma de la Figura 11.

La capacidad de las células transfectadas de desarrollarse en tumores primarios se evaluó mediante la inoculación subcutánea de 4×10^5 B16BL6, transfectadas y no transfectadas, respectivamente, en el flanco de ratones inmunológicamente deficientes. El volumen medio del tumor y el peso del tumor del grupo transfectadas era más de dos veces mayor que el del grupo control no transfectado tal como se muestra en la Figura 12 A y B, respectivamente.

La capacidad de las células transfectadas de metastatizar se determinó mediante inyección de 2×10^5 B16BL6 en 0,2 ml de PBS, de células transfectadas y no transfectadas a través de la vena de la cola de ratones C57BL6. El número de nódulos metastásicos sobre la superficie del pulmón para el grupo transfectadas era más de tres veces mayor que el del control no transfectado. Por lo tanto, B16BL6 transfectadas antisentido 2OST parecen ser más invasivas con un mayor potencial metastásico y tasa de crecimiento.

Ejemplo 5: Fragmentos de HLGAG con distinta composición son potentes inhibidores del crecimiento del tumor y la metástasis

Métodos: Células B16BL6 fueron tratadas con a, hep I; b, hep III; o c, un control de PBS y se recogieron los fragmentos de HLGAG liberados. Fragmentos de sacáridos se recogieron en PBS y se sometieron a purificación y fraccionamiento. En primer lugar, las muestras se unieron a una membrana Ultrafree-DEAE, que había sido equilibrada con fosfato de sodio pH 6,0, NaCl 0,15 M. Se lavaron con el mismo tampón y se eluyó con tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 6,0 que contenía NaCl 1,0 M. Los fragmentos se concentraron después y se intercambiaron el tampón en agua ultrapura mediante aplicación a una columna Microcon (MWCO = 3000 Da). La muestra se digirió durante la noche con un cóctel de hep I-III (1 mU en cada caso) en acetato de sodio 25 mM, acetato de calcio 1 mM, pH 7,0. El análisis se completó mediante electroforesis capilar utilizando una celda de flujo de alta sensibilidad en polaridad inversa con un tampón de desarrollo de tris 50 mM/fosfato pH 2,5. La identificación del disacárido se hizo por co-migración con patrones conocidos, la identidad de los picos se enumera en **a**, **b** y **d**. Tabla que muestra el porcentaje relativo de los disacáridos HLGAG en fragmentos generados por hep I y hep III. El porcentaje se obtuvo sobre la base de las áreas de pico normalizadas de los diferentes disacáridos en **a** y **b**. Obsérvese que la composición relativa de fragmentos generados por hep I y hep III son muy diferentes. La asignación alfanumérica de cada uno de los disacáridos también aparece como se indica previamente (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. Sequencing complex polysaccharides. *Science* **286**, 537-42 (1999).). El análisis de sacáridos de las células B16BL6 que se transfectaron con el 2OST(-) indicaba que había una ausencia de sacáridos que contienen 2-O-sulfato, específicamente el disacárido trisulfatado $\Delta U_{2S}-H_{NS,6S}$. La representación en mapa de oligosacáridos por espectrometría de masas de fragmentos de sacáridos HLGAG derivados de hep I (**e**) o hep III (**f**). Fragmentos de sacáridos HLGAG derivados de hep I o hep III se sometieron a escisión enzimática parcial heparinasa II 100 nM (8 μ g/ml) en etilendiamina 10 mM, ovoalbúmina 10 μ M, sulfato de dextrano 1 μ M pH 7,0 durante una hora. Las digestiones resultantes se complejaron con el péptido (RG)₁₉R básico y se sometieron a espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por una matriz. La huella digital del fragmento de HLGAG es diferente para los fragmentos generados por hep I frente a hep III consistentes con cada uno que es estructuralmente distinto.

Resultados: Los estudios de composición de los fragmentos de sacárido de HLGAG generados tras el tratamiento con heparinasa confirmaron que los fragmentos de HLGAG liberados a partir de células B16BL6 por hep I o hep III son de composición diferente y estructuralmente distintos (**Fig 13a-f**). La electroforesis capilar, en combinación con digestión enzimática exhaustiva se utilizó para obtener información sobre la composición de los fragmentos de sacáridos (**Fig. 13**). Los fragmentos de sacáridos derivados del tratamiento con hep III tenían más disacáridos tri- y disulfatados mientras los HLGAGs tratados con hep I tenían más disacáridos monosulfatados y no sulfatados (**Fig. 13a, b**). Esto es consistente con las especificidades de sustrato conocidas de las heparinasas. Además, la investigación de espectrometría de masas de HLGAGs proporcionó una "huella digital" de oligosacáridos generados a partir de cada uno de los tratamientos y demostró que los fragmentos de sacáridos generados a partir de los diferentes tratamientos son estructuralmente distintos (**Fig. 13 e, f**).

El análisis de la composición de la construcción antisentido 2-OST demuestra la deficiencia que estos mutantes tienen en HLGAGs sulfatados específicamente 2-O sulfatación. Una comparación entre la composición de los HLGAGs de la superficie celular de este mutante y aquellos para fragmentos generados de hep I y hep III a partir de células B16BL6 no transfectadas indica que los HLGAGs del mutante son químicamente más próximos en comparación con fragmentos generados de hep I que de fragmentos generados de hep III.

Ejemplo 6: Mecanismo de acción: HLGAGs inciden sobre la actividad biológica de moléculas de señalización específicas Después de haber observado los efectos marcados y opuestas que tienen fragmentos de HLGAG distintos tienen tanto en el tumor como en los compartimientos vasculares, los autores de la invención han tratado de dilucidar el mecanismo molecular subyacente de HLGAGs en el progreso del tumor. Dado que muchas proteínas de unión de HLGAG son factores de crecimiento y citoquinas, los autores de la invención exploraron sistemáticamente, por lo tanto, factores de crecimiento de unión a HLGAG que juegan papeles clave en la patobiología del tumor para identificar un objetivo inmediato de los fragmentos de HLGAG generados a partir de la superficie de las células tumorales. La señalización de FGF2 ha demostrado ser un requisito previo para la progresión del melanoma fomentando el crecimiento del tumor en una forma autocrina, y la interrupción del bucle autocrino de FGF2 al interferir con la actividad del receptor de FGF2 o de FGF (FGFR) resulta en la inhibición de la progresión del melanoma (Rodeck, U. et al. Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *J Invest Dermatol* **97**, 20-6 (1991). Becker, D., Meier, C. B. y Herlyn, M. Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor. *Embo J* **8**, 3685-91 (1989). Becker, D., Lee, P. L., Rodeck, U. y Herlyn, M. Inhibition of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene* **7**, 2303-13 (1992). Torcia, M. et al. Interferon-alpha-induced inhibition of B16 melanoma cell proliferation: interference with the bFGF autocrine growth circuit. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 838-44 (1999).). Por otro lado, la regulación positiva de la expresión de FGF2 en los melanocitos normales resulta en su transformación maligna (Nesbit, M. et al. Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene* **18**, 6469-

76 (1999).). Además, FGF2 es un factor angiogénico potente y esencial que regula la neovascularización de melanoma (Wang, Y. y Becker, D. Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* 3, 887-93 (1997). Birck, A., Kirkin, A. F., Zeuthen, J. y Hou-Jensen, K. Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in primary and metastatic melanoma from the same patients. *Melanoma Res* 9, 375-81 (1999).) Lo más importante, se sabe que estructuras de HLGAG específicas se unen y modulan la actividad FGF2, y existe una evidencia creciente de que secuencias de HLGAG, dependiendo de su estructura, pueden fomentar o inhibir la actividad de FGF2 (Guimond, S.E. y Turnbull, J.E. Fibroblast growth factor receptor signaling is dictated by specific heparan sulphate saccharides *Curr Biol* 9,1343-6 (1999).). Dadas las múltiples líneas de evidencia que implican a FGF2 como una conmutación clave en la progresión del melanoma, junto con la estricta dependencia de FGF en HLGAGs para su actividad, los autores de la invención han tratado de determinar si el objetivo inmediato de fragmentos de HLGAG derivados del tumor es de hecho FGF2.

Para probar si los fragmentos derivados de hep I y hep III se unen a FGF2 y afectan a su actividad, los autores de la invención establecieron primero que el tratamiento con hep III inhibe la proliferación inducida por FGF de células B16BL6 *in vitro*, y, además, y confirmaron directamente esto mediante el examen de las vías de señalización aguas abajo mediadas por FGF, a saber la vía de la MAP quinasa (es decir., Erk-1, 2), la vía de transducción de señal principal de FGF2 conduce a la proliferación y la diferenciación celular (Seger, R. y Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9, 726-35 (1995).).

Métodos: Células B16BL6 en placas de cultivo de 10 cm se privaron de suero durante 48 horas antes de la estimulación con 50 ng/ml de FGF2. Las células se estimularon durante 20 minutos antes de preparar lisados de células enteras con 1 ml de tampón RIPA modificado que contiene diversos inhibidores de la enzima (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NP-40 al 1%, desoxicolato de Na al 0,25%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, 1 µg/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina, Na₃VO₄ activada 1 mM, NaF 1 mM). La concentración de proteína en el lisado se determinó usando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (BioRad) y se ajustó en consecuencia para el análisis de electroforesis. Para los grupos tratados con heparinasa, las células se trataron con hep I o hep III (200 nM) durante 30 min a 37°C antes de la adición de FGF2. El borrón de inmunotransferencia se sondeó con anticuerpo anti-Erk-1, 2 o anti-fosfo-Erk-1, 2 (New England Biolabs; MA) y se detectó mediante IgG anti-conejo conjugada con HRP utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, IL).

b. Proliferación mediada por FGF de células BaF3 con FGR transfectada en presencia de fragmentos de HLGAG generados con hep I o III. Células BaF3 que expresan FGFR se cultivaron en la siguiente manera. El número inicial de células se contó mediante contador Coulter, y se resuspendieron a una densidad de 1×10^5 células/ml en 12 muestras de 6 ml. Cada una de las muestras de células se centrifugó durante 3 min a temperatura ambiente a 1085 x g, y se resuspendió en preparados de HLGAG en PBS, produciendo dos conjuntos de células en el mismo medio. Uno de cada serie se suplementó con 50 ng/ml de FGF2 (□), mientras que el otro no se suplementó (□). Se añadió 1 ml de cada serie a cada uno de 3 pocillos en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. Las células se incubaron durante 72 h a 37°C/5% de CO₂. El número de células enteras se contó en el punto final experimental mediante un contador Coulter. Este proceso se repitió tres veces. Los datos recogidos se normalizaron utilizando un índice de proliferación (PI), como se describió previamente (Padera, R., Venkataraman, G., Berry, D., Godavarti, R. y Sasisekharan, R. FGF-2/fibroblast growth factor receptor/heparin-like glycosaminoglycan interactions: a compensation model for FGF-2 signaling. *Faseb J* 13, 1677-87 (1999).). El índice se define como el aumento en el número de células para el caso experimental, dividido por el aumento en el número de células para el control positivo. El control positivo era el de células en DMEM con BCS al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 500 ng/ml de heparina y 50 ng/ml de FGF2. El control negativo era el de células en DMEM con BCS al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 500 ng/ml de heparina

c. Efecto del tratamiento del tumor con hep I y hep III en la activación de FGFR1 en comparación con PBS. El nivel de FGFR1 fosforilado en muestras de tumores se evaluó mediante inmunoprecipitación estándar seguida por transferencia Western con un anticuerpo específico de fosfotirosina. Tumores de B16BL6 primarios se desarrollaron y se trataron como se ha descrito anteriormente y el día 15 el tumor se recogió en tampón RIPA modificado frío que contiene inhibidores de la enzima y se homogeneizó. Los homogeneizados se hicieron pasar 3 veces a través de una aguja de calibre 25 y se centrifugaron. El sobrenadante se ajustó para la concentración de proteínas utilizando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad). FGFR1 se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-FGFR1 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA). Las muestras se sedimentaron después, se lavaron y se eluyeron de las perlas mediante la adición de tampón de muestra y se hirvieron durante 3 minutos (Kapila, Y. L., Wang, S. y Johnson, P. W. Mutations in the heparin binding domain of fibronectin in cooperation with the V region induce decreases in pp125(FAK) levels plus proteoglycan-mediated apoptosis via caspases. *J Biol Chem* 274, 30906-13 (1999).). Después de la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por métodos estándares. El borrón de inmunotransferencia se sondeó con un anticuerpo específico de fosfotirosina conjugado con HRP (RC20; Transduction Laboratories, Lexington, KY) y se desarrolló con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico. El peso molecular de FGFR1 es de 120 KDa.

d, Efecto del tratamiento con heparinasa en la activación de FAK en el tumor B16BL6. La proteína FAK se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal anti-FAK de ratón (Transduction Laboratories, Lexington, KY) de acuerdo con los procesos arriba descritos. La FAK fosforilada se detectó utilizando anticuerpo específico para fosfotirosina RC20.

e, Nivel de Erk-1, 2 total y fosforilado en tumor B16BL6 tratado con heparinasa Homogeneizados de tumor se prepararon y procesaron como se describe en c. El sobrenadante se utilizó para el ensayo de la concentración total de proteínas e inmunotransferencia. El borrón de inmunotransferencia se detectó como se describe en a.

f, Efecto del tratamiento con heparinasa en la activación de Akt. El tumor primario fue tratado y procesado como se describe arriba. Anticuerpo Akt y anticuerpo fosfo-Akt de New England Biolabs se utilizaron para sondear el borrón de inmunotransferencia.

Resultados: Tras la estimulación de FGF2, se observó una activación disminuida de Erk-1, 2 en células tratadas con hep III, mientras que se observó una activación incrementada de Erk-1, 2 en células tratadas con hep I. Los datos *in vitro* se confirmaron adicionalmente utilizando células F32, una línea de células pre-linfocitos que ha sido transfectada con FGFR, y que a menudo se ha utilizado como un sistema modelo para estudiar la señalización mediada por FGF en cultivo celular sin trabas por las complicaciones asociadas con los eventos de señalización iniciados por otros factores de crecimiento y/o receptores (Ornitz, D. M. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **271**, 15292-7 (1996)). De manera similar a lo observado en células B16BL6, fragmentos hep I fomentaban, mientras que fragmentos hep III inhibían la proliferación celular mediada por FGF2 en estas células (Fig.14). En conjunto, los hallazgos *in vitro* apuntan al hecho de que los fragmentos de HLGAG derivados de la superficie celular pueden afectar sustancial y específicamente a la señalización de FGF2. En consonancia con las observaciones *in vitro*, los autores de la invención encontraron que fragmentos de B16BL6 derivados de hep I y hep III afectan significativamente las vías de señalización de FGF *in vivo*. Dentro del tumor en los animales, los autores de la invención analizaron tanto la fosforilación de FGFR en animales tratados con hep I y hep III, así como la señalización de Erk-1 y 2. El tratamiento del tumor primario con hep III (o sus fragmentos generados) inhibió la fosforilación de FGFR1, mientras que el tratamiento con hep I tuvo el efecto opuesto sobre la fosforilación de FGFR1. Consistentemente, el tratamiento del tumor primario con hep III resultó en un menor nivel de ERK-1,2 activado. Eventos intracelulares de señalización adicionales tales como la actividad quinasa de adhesión focal (FAK), que está implicada en procesos de adhesión celular y migración (Rodríguez-Fernandez, J. L. Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK? *Bioessays* **21**, 1069-75 (1999). Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. y Sieg, D. J. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 435-78 (1999).), se moduló de manera similar mediante tratamiento con hep I y III del tumor. De acuerdo con estos hallazgos, el tratamiento con hep III inhibía la activación de FAK. Cabe destacar que no hubo ningún cambio en la activación de Akt, ya sea con tratamiento con hep I o hep III, indicando que los cambios en la fosforilación eran específicos y eran el resultado de la baja regulación de sólo determinadas vías de señalización. En conjunto, estos resultados sugieren que los fragmentos de HLGAG median en la señalización de FGF2 con fragmentos derivados de hep-I que fomentan la actividad de FGF2 y fragmentos generados por hep III inhibitorias de la misma. Este efecto se observó en los pasos clave de la señalización mediada por FGF, desde el receptor de la superficie celular (FGFR) a través de eventos de señalización aguas abajo.

Ejemplo 7: Modulación de la actividad de FGF2 *in vivo* mediante fragmentos de B16BL6

Métodos: a-c Evaluación de la señalización de FGF2 *in vivo* con el ensayo de bolsillo corneal de rata. Fotografías con lámpara de hendidura representativas de córneas de ratas el día 6 después de la implantación con nódulos de Hydron que contienen FGF2, fragmentos hep I con FGF2 y fragmentos hep III con FGF2. La cantidad de FGF2 cargado en cada nódulo era ~120 ng, y la cantidad de fragmentos de HLGAG era de aproximadamente 1 ng. Los nódulos se prepararon y se implantaron esencialmente como se describe (Kenyon, B.M. et al. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 1625-32 (1996)). El día 6 después de la implantación en la córnea de ratas Sprague-Dawley (n = 5), la neovascularización de la córnea fue fotografiada con una lámpara de hendidura y la extensión de la neovascularización se expresó como longitud lineal y horas de reloj según se describe (Kenyon, B.M. et al. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 1625-32 (1996)). Los resultados se resumen en la tabla. Nódulos de control que no contenían FGF2 fracasaron en inducir la neovascularización. Se observó que la inhibición de la neovascularización por parte de fragmentos derivados de hep III es dependiente de la dosis, con una inhibición inicial observada a aproximadamente 0,02 ng/nódulo. Además, se encontró que la inhibición de la neovascularización por parte de fragmentos derivados de hep III era independiente del sitio de implantación, con una inhibición similar observada cuando fragmentos derivados de hep III se implantaron como un segundo nódulo entre el nódulo de sólo FGF2 y el limbo. # Indica media y ET.

b, Modelo de la formación de moduladores de HLGAG crípticos de señalización de FGF2.

La interacción de HLGAGs (como parte de los proteoglicanos) con los dominios de unión a heparina de FGF2 y FGFR permite la formación de un complejo ternario en la superficie celular que forma la base de la señalización de FGF2. La digestión de la capa celda de HLGAG con hep I libera fragmentos con un display espacial apropiado de grupos 2 O-, 6 O- y N-sulfatados que permitiría un "ajuste" óptimo tanto a FGF2 como a FGFR, conduciendo a la señalización a través de la activación de la tirosina quinasa. Por el contrario, los fragmentos de HLGAG generados por hep III muestran otro patrón de grupos sulfatados son todavía capaces de unirse a FGF2 pero fracasan en formar un complejo de señalización constructivo en la superficie de la célula, inhibiendo así la actividad de FGF2.

Resultados: Para demostrar una interacción directa entre los fragmentos de HLGAG de B16BL6 y su FGF2 diana inmediato *in vivo*, los autores de la invención evaluaron la capacidad de fragmentos de HLGAG de B16BL6 de modular las respuestas inducidas por FGF2 que conducen a la migración, proliferación y diferenciación celular *in vivo* utilizando un ensayo de neovascularización corneal (Fig. 15A tabla). En este modelo, los fragmentos generados por hep I mezclados con FGF2 se unían al factor de crecimiento y fomentaban la respuesta de la neovascularización *in vivo* de FGF2 (Fig. 15A tabla), mientras que fragmentos generados por hep III, mezclados con FGF2 se unían al factor de crecimiento pero drásticamente inhibían su actividad (Fig. 15A tabla). Este resultado es consistente con los cambios en la neovascularización observada en el estudio inmunohistoquímico del tumor. Tomados en conjunto, los resultados anteriores indican que un objetivo directo *in vivo* de los fragmentos de HLGAG liberados mediante el tratamiento con heparinasa es FGF2. Por lo tanto, se puede concluir que los fragmentos generados por hep I actúan para puentear FGF2 a su receptor cognato activando la señalización intracelular, mientras que fragmentos derivados de hep III son antagonistas, previniendo la formación de un complejo de señalización en la superficie de la célula. Por lo tanto, al activar o inhibir directamente la señalización de FGF2, estos fragmentos bioactivos son potentes moduladores de crecimiento de tumores y la metástasis. Los resultados presentados aquí no se oponen a un efecto directo o indirecto de fragmentos de HLGAG en otros factores de crecimiento de unión a HLGAG que juegan un papel en fisiopatología de tumores. Sin embargo, sobre la base de las muchas líneas de evidencia presentadas en esta memoria, parece que FGF2 es de hecho un objetivo inmediato para los fragmentos de HLGAG derivados enzimáticamente.

Los resultados presentados en esta memoria demuestran que al incidir sobre la actividad biológica de moléculas de señalización específicas, los HLGAGs juegan un papel directo en el crecimiento del tumor y la metástasis. Lo más importante, HLGAGs en la superficie celular de células tumorales contienen tanto secuencias de HLGAG 'activadoras' e 'inhibidoras' que se encuentran en equilibrio (Fig. 15B). La degradación específica de un conjunto de secuencias (p. ej. por parte de hep I) resulta en la liberación de fragmentos que fomentan la actividad biológica de moléculas de señalización de unión a HLGAG y, por lo tanto, actúan como una conmutación para el crecimiento de tumores y la metástasis. Por el contrario, la degradación por parte de una enzima con una especificidad para sustrato ortogonal (p. ej., hep III) inclina la balanza en la dirección opuesta, liberando fragmentos que antagonizan las moléculas de señalización de unión a HLGAG, que conduce a la inhibición del crecimiento de tumores y la metástasis. Por lo tanto, los autores de la invención han demostrado aquí por primera vez que HLGAGs químicamente complejos en la superficie celular son promotores o inhibidores "crípticos" del crecimiento de tumores y la metástasis que se convierten en biológicamente activos después de su liberación de la superficie celular por parte de enzimas degradantes de HLGAG específicas.

Así como las colagenasas sujetan el compartimento proteico de la ECM, sirviendo ya sea para aumentar el crecimiento del tumor (p. ej., ruptura de la membrana basal) o para inhibir tumores (p. ej., la formación de endostatina a partir de colágeno XVIII), el compartimento de polisacárido exhibe un fenómeno similar. Es importante destacar que, al igual que el fragmento de colágeno proteolíticamente escindido, endostatina, distintos oligosacáridos HLGAG, tras la liberación mediante escisión enzimática de la superficie de las células tumorales, pueden servir como potentes inhibidores de la progresión del tumor. Por lo tanto, el presente estudio no sólo permite un nuevo paradigma de cómo los polisacáridos modulan el crecimiento del tumor y la metástasis, sino que identifica una nueva diana terapéutica, proporcionando un marco para el desarrollo de nuevas moléculas anti-cáncer basadas en HLGAG.

Los datos presentados en esta memoria demuestran hallazgos importantes en relación con los posibles mecanismos e implicaciones fisiológicas de cómo los HLGAGs regulan el crecimiento del tumor y la metástasis. Fragmentos de HLGAG pueden ejercer sus efectos a través de muchas vías, incluyendo crecimiento autocrino y factores angiogénicos, o a través de interacciones con moléculas de ECM. Adicionalmente, las fuentes de las enzimas degradantes de HLGAG endógenas y su especificidad para el sustrato también se vuelven importantes. La producción de enzimas degradantes de HLGAG, presumiblemente por las células tumorales, con especificidad para el sustrato similar a heparinasa I será ventajosa para las células tumorales. La secreción de enzimas degradantes de HLGAG por una célula tumoral conduciría a la producción de secuencias de HLGAG específicas (de su propia capa o del lecho del tumor de ECM) que podría ejercer efectos a través de factores de crecimiento autocrinos y angiogénicos, o por medio de otras vías de señalización para apoyar el crecimiento del tumor y la metástasis. Por otro lado la producción de una enzima degradante de HLGAG con especificidad para el sustrato similar a heparinasa III sería extremadamente beneficiosa para el huésped. Por ejemplo, las células endoteliales en la proximidad de un tumor o macrófagos pueden secretar una enzima con especificidad para el sustrato de heparinasa III conduciendo a

5 la producción de secuencias específicas de HLGAG que inhiben el crecimiento del tumor y la metástasis. De acuerdo con un modelo de este tipo el cebado del animal con heparinasa III no inhibe significativamente el crecimiento del tumor, lo que sugiere una propiedad supresora de tumores de heparinasa III. Un equilibrio en la regulación de la biodisponibilidad de secuencias de HLGAG únicas a través de enzimas que degradan HLGAG o a través de otros mecanismos puede jugar una conmutación clave para apoyar o inhibir el crecimiento del tumor y la metástasis.

10 Tal como se describió anteriormente, el tratamiento con hep III provocó una inhibición significativa en el crecimiento del tumor primario tanto en ratones inmunológicamente deficientes como ratones C57BL/6 con inyecciones subcutáneas de hep III. Estos resultados indican que la respuesta al tratamiento con hep III no depende de la vía de administración ni es mediada por el sistema inmunitario.

15 Habiendo descrito las realizaciones preferidas actualmente, y de acuerdo con la presente invención, se cree que otras modificaciones, variaciones y cambios se sugerirán a los expertos en la técnica a la vista de las enseñanzas establecidas en esta memoria. Por lo tanto, debe entenderse que se cree que todas estas variaciones, modificaciones y cambios caen dentro del alcance de la presente invención según se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una heparinasa III modificada, sustancialmente pura, que comprende:
 - un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del péptido maduro de SEQ ID NO: 2, en donde al menos un residuo histidina seleccionado del grupo consistente en His36, His105, His110, His139, His152, His225, His234, His241, His424, His469 e His539 ha sido sustituido con un residuo seleccionado del grupo que consiste en alanina, serina, tirosina, treonina y lisina.
2. Una heparinasa III modificada según la reivindicación 1, en donde el polipéptido tiene al menos una sustitución dentro de un residuo histidina seleccionado del grupo consistente en His110, His139, His225 e His241.
3. Una heparinasa III modificada según la reivindicación 2, en donde el polipéptido tiene una sustitución en His110, His139, His225 o His241.
4. Una heparinasa III modificada según la reivindicación 3, en donde la His110, His139, His225 o His241 está sustituida con alanina.
5. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, inmovilizada sobre un soporte sólido.
6. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la angiogénesis y/o la neovascularización.
7. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la angiogénesis y/o la neovascularización según la reivindicación 6, en donde la heparinasa III modificada se administra a un tumor.
8. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la angiogénesis y/o la neovascularización según la reivindicación 6, en donde la heparinasa III modificada se administra sistémicamente mediante inyección directa a un sitio de un tumor, o mediante aplicación directa durante la manipulación quirúrgica.
9. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la angiogénesis y/o la neovascularización según la reivindicación 6, en donde la administración es por suministro oral o inyección.
10. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la angiogénesis y/o la neovascularización según la reivindicación 6, en donde la heparinasa III modificada se administra en una cantidad eficaz para disminuir el número de vasos sanguíneos que crecen en un tumor.
11. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la angiogénesis y/o la neovascularización según la reivindicación 6, en donde la heparinasa III modificada es para tratar el cáncer, artritis reumatoide, glaucoma neovascular, artritis, retinopatía diabética, inflamación crónica, escleroderma, hemangioma, fibroplasia retrolental y proliferación capilar anormal en articulaciones hemofílicas, o trastornos del sistema reproductor femenino.
12. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para disminuir los síntomas de glaucoma neovascular, retinopatía diabética o fibroplasia retrolental, en donde la heparinasa III modificada se administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable para la aplicación tópica al ojo.
13. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para disminuir los síntomas de la psoriasis.
14. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para inhibir la proliferación celular.
15. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método terapéutico *in vivo* para prevenir la proliferación de un tumor, que comprende exponer células tumorales a una cantidad eficaz de la heparinasa III modificada para prevenir la proliferación de las células tumorales y el crecimiento del tumor.
16. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en prevenir la proliferación de un tumor según la reivindicación 15, en donde la heparinasa III modificada se inyecta en el tumor *in*

vivo, se administra sistémicamente a un sujeto que tiene un tumor, o se administra oralmente a un sujeto que tiene un tumor.

17. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en prevenir la proliferación de un tumor según la reivindicación 15, en donde la heparinasa III modificada se administra

- 5
- (a) en unión con un fármaco anti-cáncer; o
 - (b) sin fármacos anti-cáncer adicionales.

18. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en prevenir la proliferación de un tumor según la reivindicación 15, en donde la heparinasa III modificada se administra a un sujeto que tiene un tumor no metastásico con el fin de prevenir que el tumor se vuelva metastásico.

10 19. Una heparinasa modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en prevenir la proliferación de un tumor según la reivindicación 15, en donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en un tumor de próstata y melanoma.

15 20. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método *in vivo* para prevenir la metástasis de células tumorales, que comprende exponer una célula tumoral a una cantidad eficaz de la heparinasa III modificada para prevenir la invasión de la célula tumoral a través de la barrera.

21. Una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en prevenir la metástasis de células tumorales según la reivindicación 20, en donde la heparinasa III modificada se administra *in vivo* en unión con un fármaco anti-cáncer.

20 22. Un método para prevenir la proliferación de un tumor *in vitro*, que comprende exponer células tumorales a una cantidad eficaz de una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para prevenir la proliferación de las células tumorales con el fin de prevenir el crecimiento del tumor.

23. Un método para prevenir la metástasis de células tumorales *in vitro*, que comprende exponer una célula tumoral a una cantidad eficaz de una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para prevenir la invasión de la célula tumoral a través de una barrera.

25 24. El método de la reivindicación 23, en el que la barrera es una barrera *in vitro* de una membrana revestida con una matriz extracelular.

25. Una composición farmacéutica que comprende una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

30 26. Una composición farmacéutica según la reivindicación 25, en donde dicha composición es un preparado farmacéutico que comprende una formulación estéril de una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

27. Un método de escindir específicamente un glicosaminoglicano similar a heparina *in vitro*, que comprende poner en contacto un glicosaminoglicano similar a heparina con una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, opcionalmente para producir LMWH.

35 28. Un método según la reivindicación 27, en el que el método es un método de separar fragmentos de HLGAG activos a partir de un fluido que contiene fragmentos de HLGAG.

29. Un método según la reivindicación 27, en el que la heparinasa III modificada está inmovilizada sobre un soporte sólido.

40 30. Un método según la reivindicación 29, en el que el método es un método para secuenciar fragmentos de HLGAG.

31. Un método *in vitro* para preparar un fragmento de HLGAG terapéutico, que comprende poner en contacto un tumor aislado o una parte del mismo con una heparinasa III modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para producir un fragmento de HLGAG e identificar el fragmento de HLGAG.

45 32. Un método según la reivindicación 31, que comprende, además, determinar la secuencia del fragmento de HLGAG.

33. Un método según la reivindicación 31, en el que el fragmento de HLGAG es terapéuticamente eficaz para:

- (a) prevenir la proliferación de células tumorales o metástasis; o

(b) inhibir la neovascularización.

34. El método de la reivindicación 33, en el que la célula tumoral es de un tipo diferente de tumor que el tumor aislado o parte del mismo.

5 35. Un método según la reivindicación 31, en el que el tumor o parte del mismo es de cáncer del tracto biliar, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer de tiroides o cáncer renal.

10 36. Un método según la reivindicación 35, en el que el tumor o parte del mismo es de cáncer de próstata o melanoma.

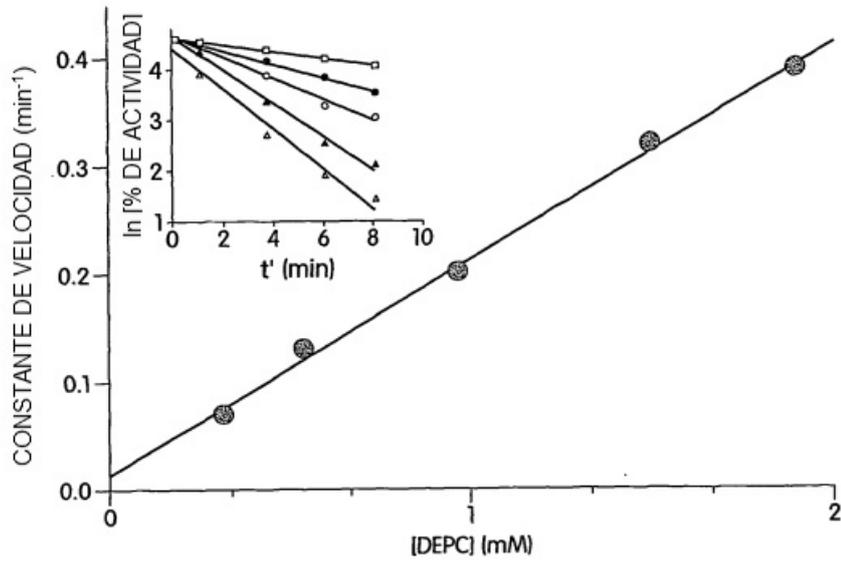


Fig. 1

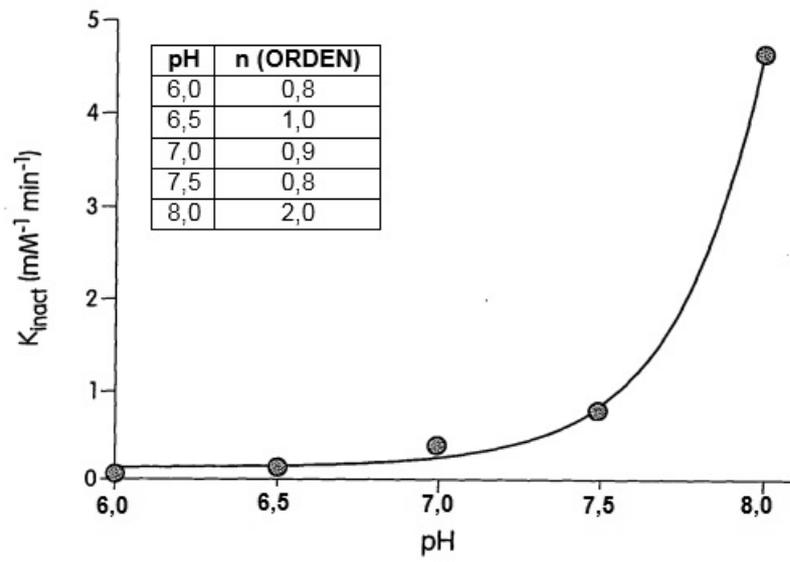


Fig. 2

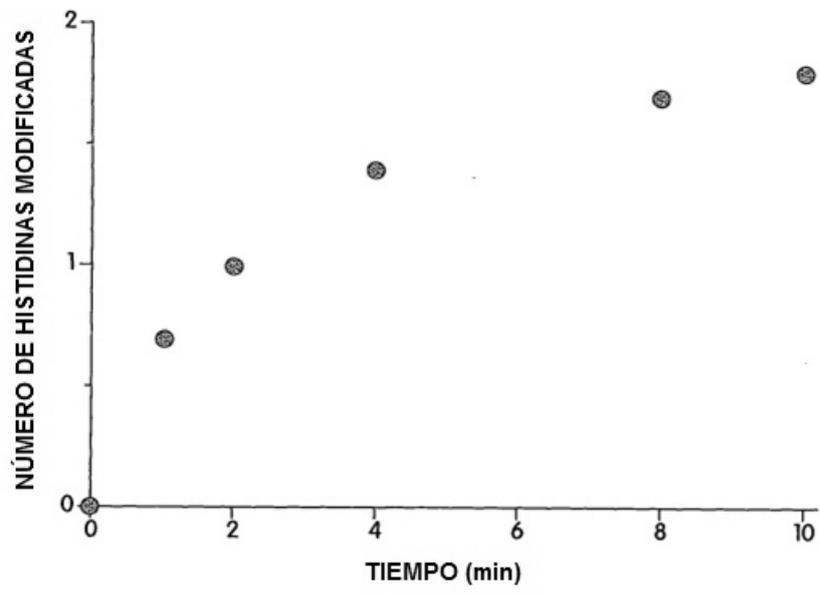


Fig. 3

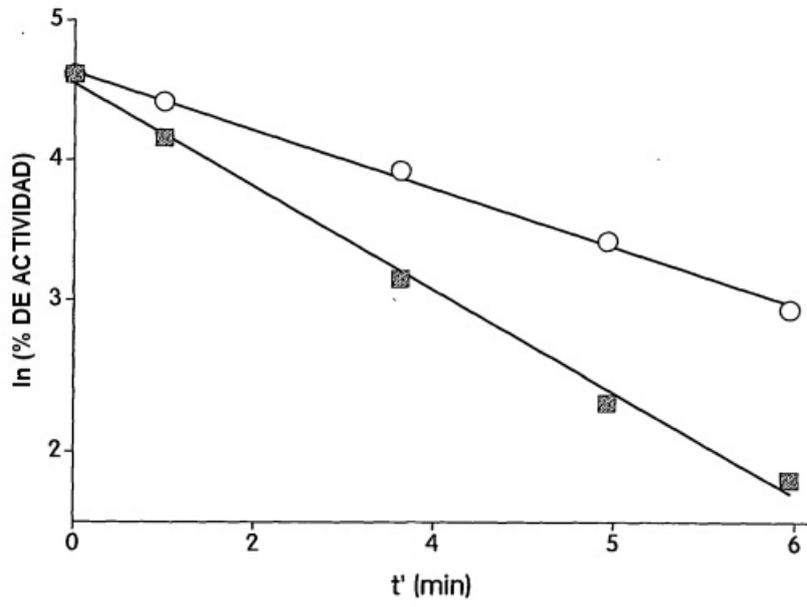


Fig. 4

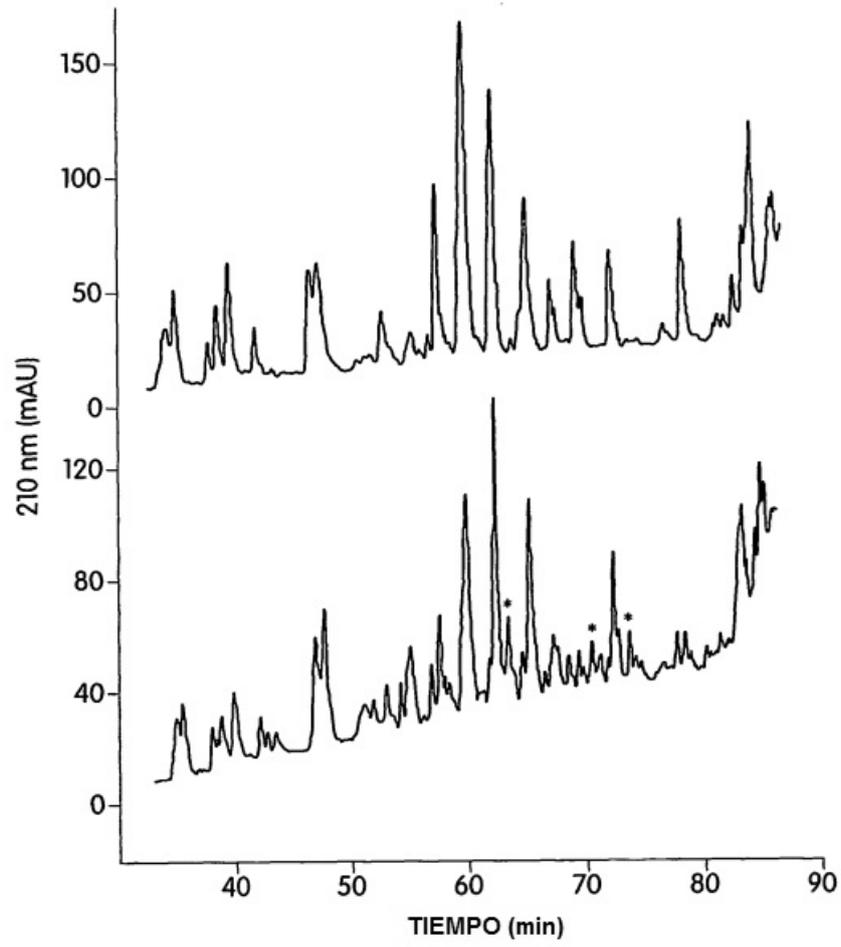


Fig. 5

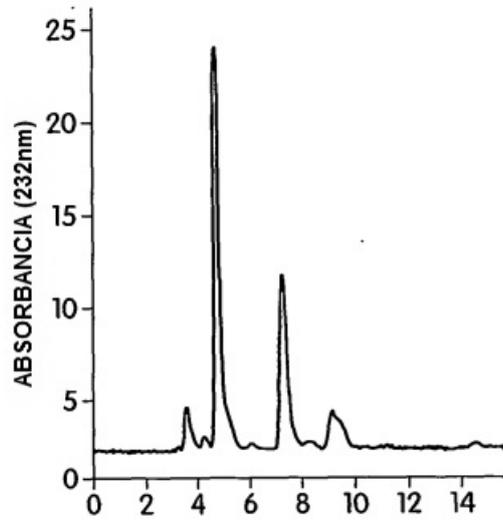


Fig. 6A

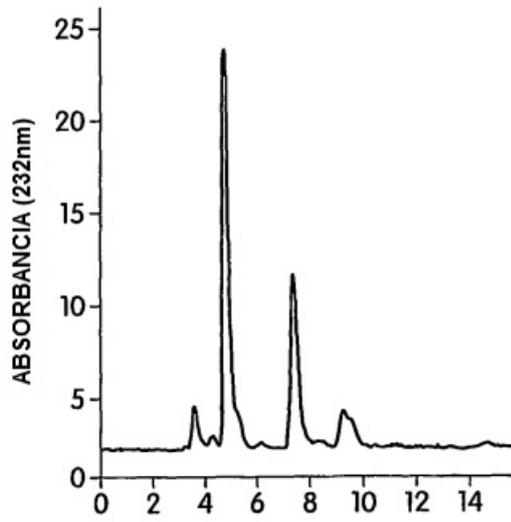


Fig. 6B

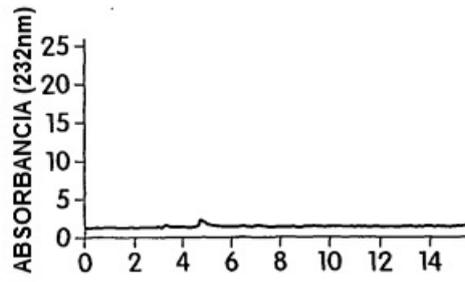


Fig. 6C

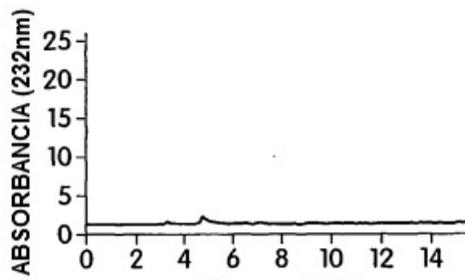


Fig. 6D

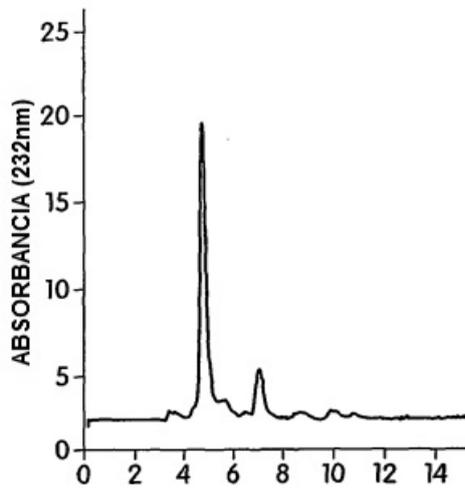


Fig. 6E

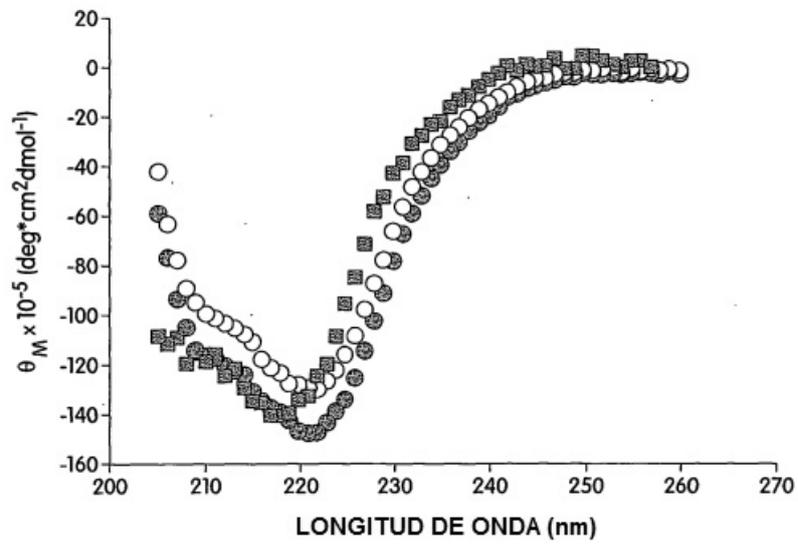


Fig. 7

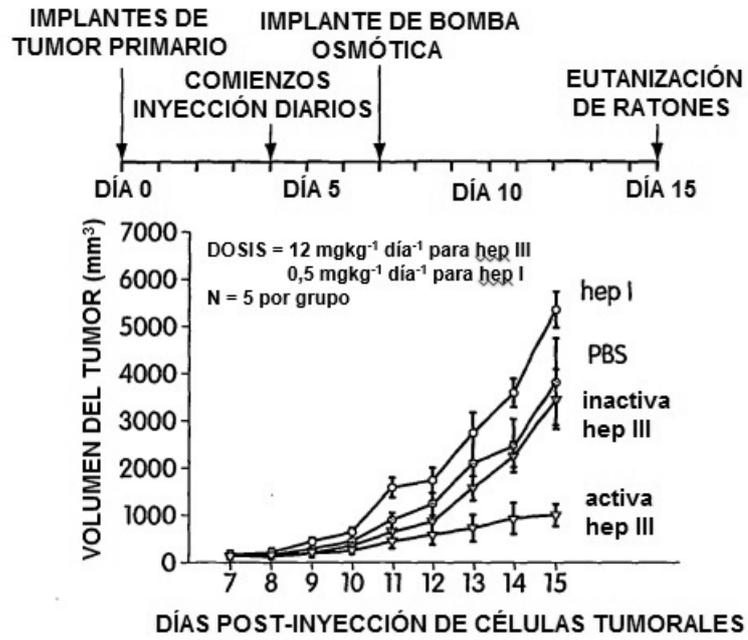


Fig. 8

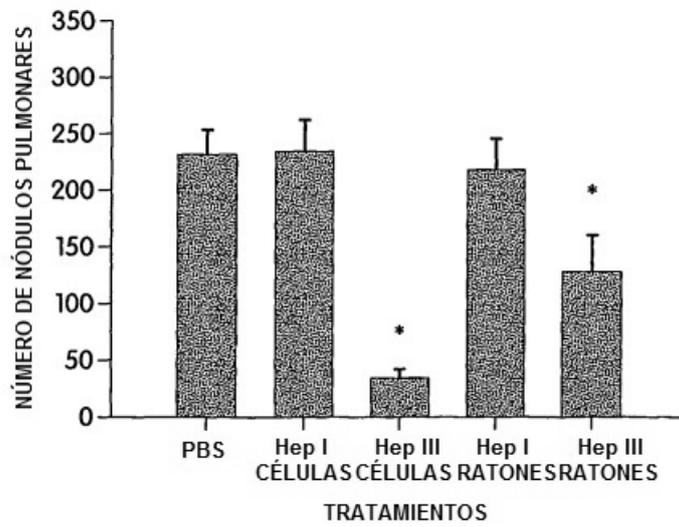


Fig. 9

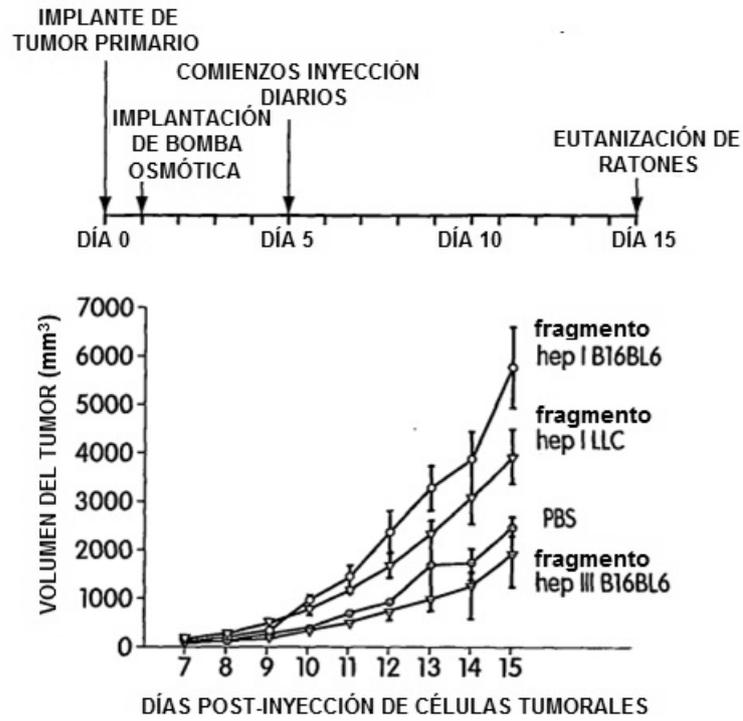
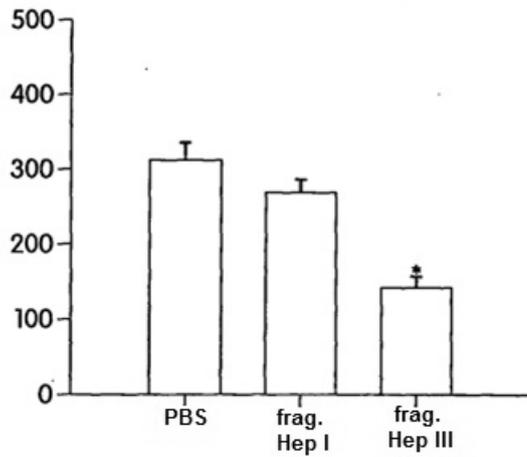


Fig. 10A



TRATAMIENTOS DEL PULMÓN. * INDICA $p < 0,05$ (ENSAYO DE MANN-WHITNEY)

Fig. 10B

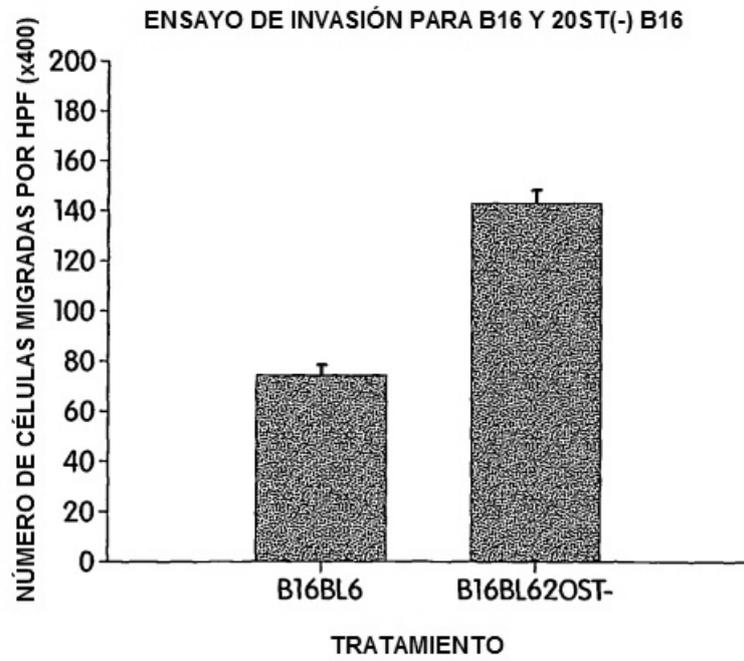


Fig. 11

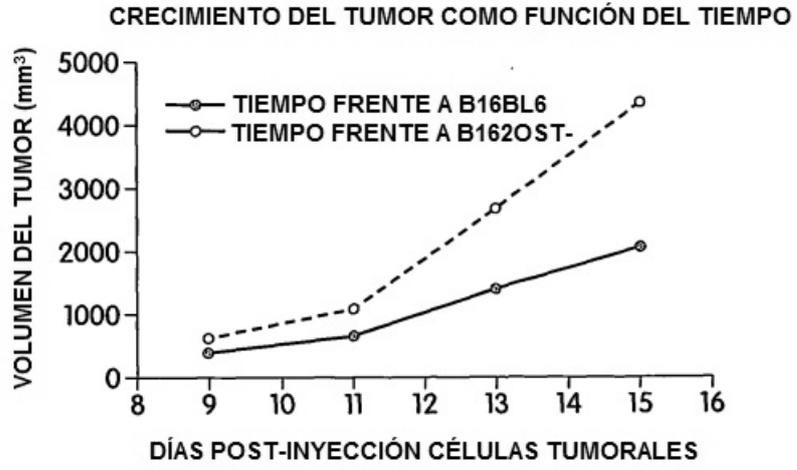


Fig. 12A

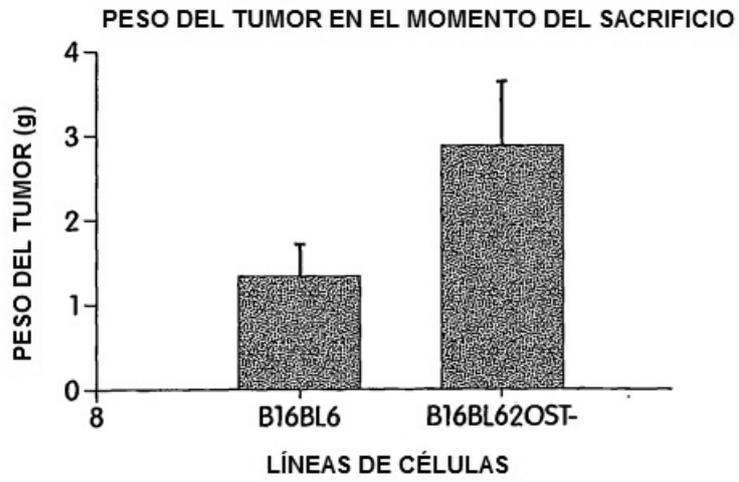


Fig.12B

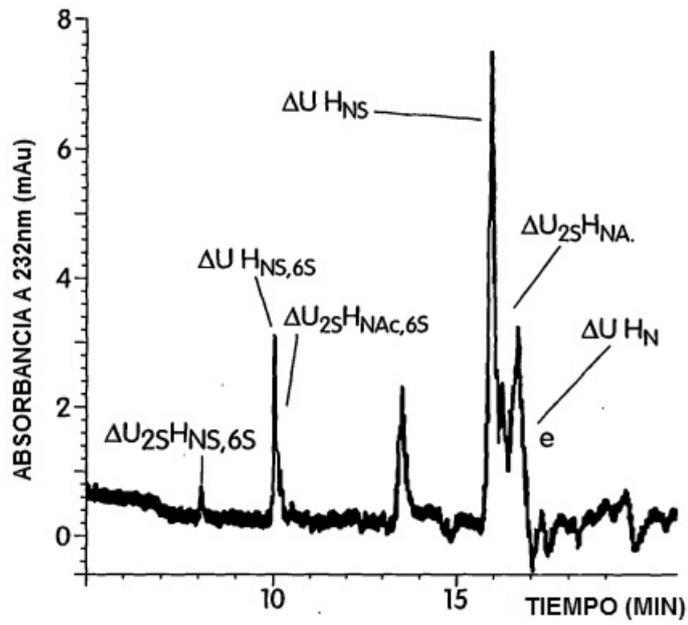


Fig. 13A

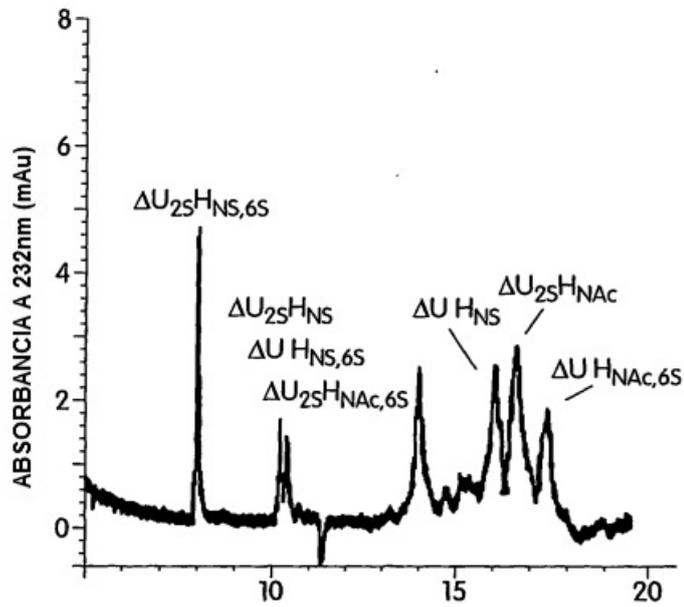


Fig. 13B

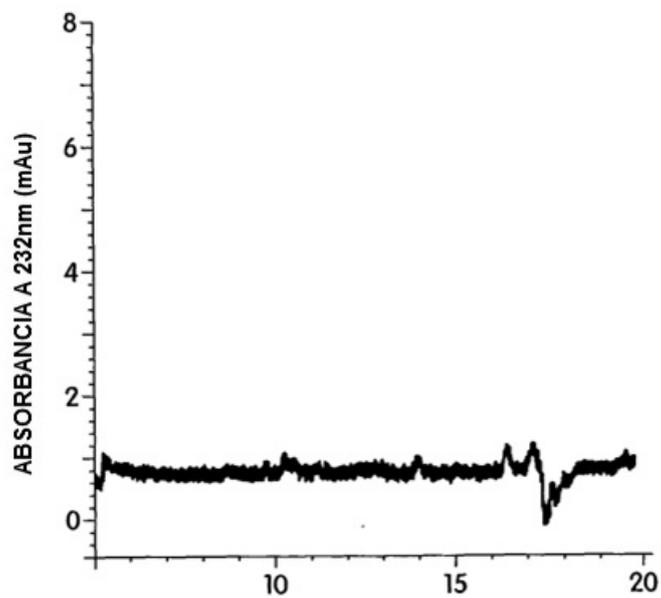


Fig. 13C

Código de Sacch.	HEP I	HEP III
D $\Delta U_{25-H_{NS,6S}}$	1	10
9 $\Delta U_{25-H_{NS}}$	0	6
5 $\Delta U-H_{NS,6S}$	11	8
C $\Delta U_{25-H_{NAC,6S}}$	3	5
1 $\Delta U-H_{NS}$	23	12
8 $\Delta U_{25-H_{NAC}}$	8	18
4 $\Delta U-H_{NAC,6S}$	13	8
0 $\Delta U-H$	41	33

Fig. 13D

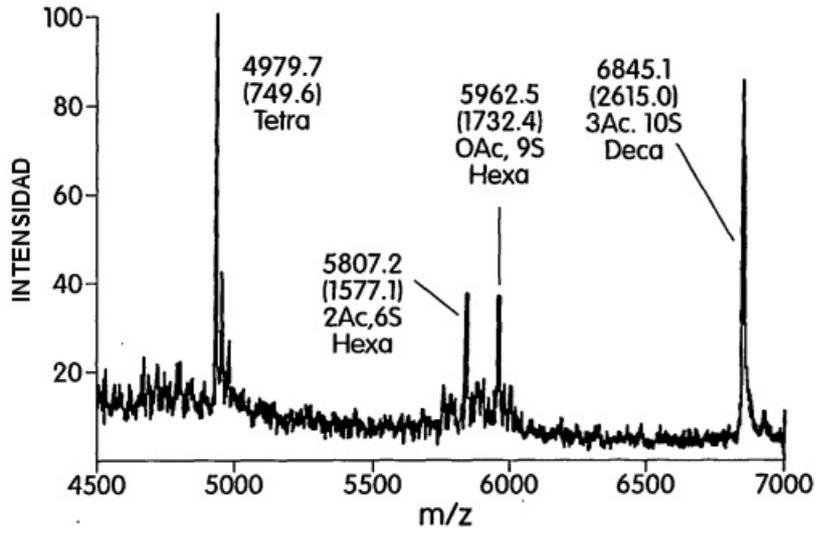


Fig. 13E

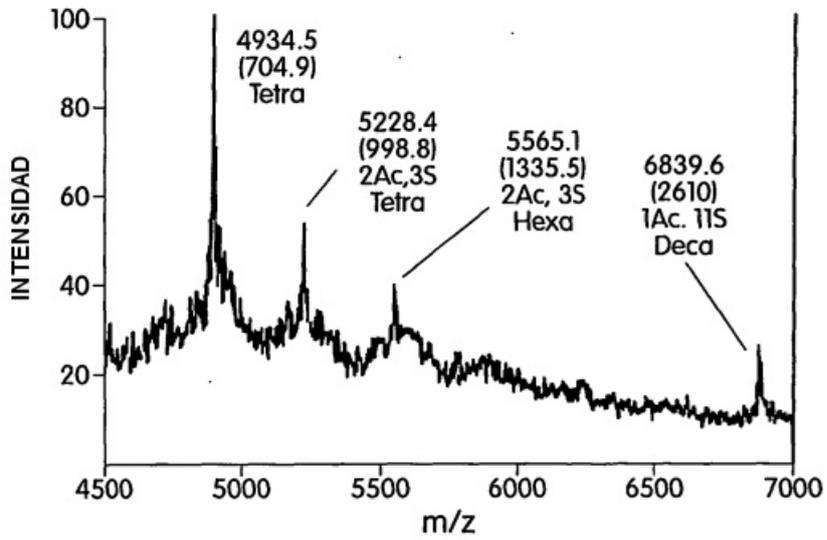


Fig. 13F

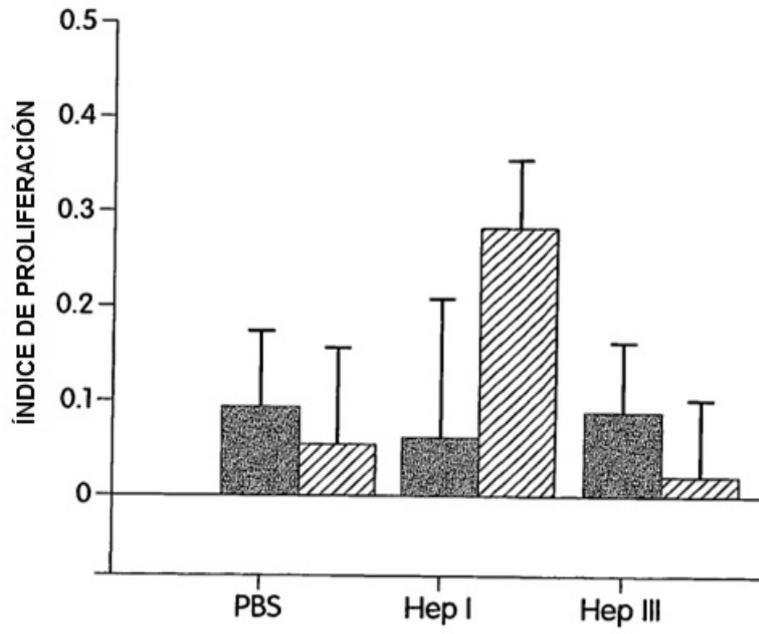


Fig. 14

RESPUESTA	FGF2	Hep I FRAG.	HEP III FRAG.
HORAS RELOJ	2,4 ± 0,24 [#]	3,4 ± 0,19	0,2 ± 0,12
LONGITUD RECIPIENTE (mm)	1,9 ± 0,05	2,0 ± 0,07	0,4 ± 0,22

Fig.15A

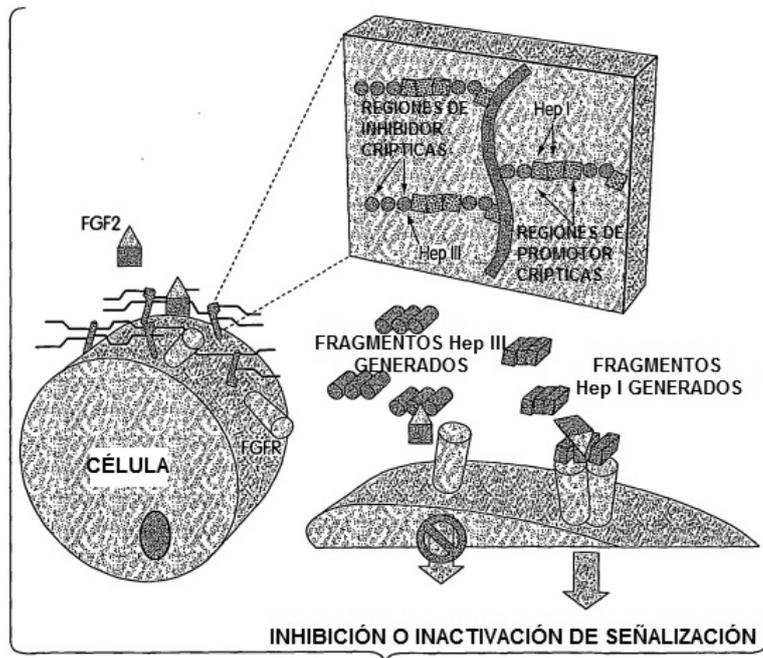


Fig.15B