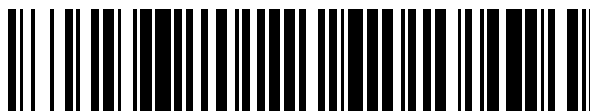


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 329**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/82 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2007 E 07840229 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2046369**

54 Título: **Huésped recombinante para la producción de L-asparaginasa II**

30 Prioridad:

30.06.2006 US 817817 P

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

07.12.2015

73 Titular/es:

SIGMA-TAU PHARMA LIMITED (100.0%)
21 Holborn Viaduct
London EC1A 2DY, GB

72 Inventor/es:

FILPULA, DAVID R. y
WANG, MAOLIANG

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 553 329 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

Huésped recombinante para la producción de L-asparaginasa II

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con vectores, células huésped y métodos novedosos para producir una enzima L-asparaginasa específica II de *E. coli* recombinante de pureza uniforme.

Descripción de la técnica relacionada

10 La L-asparaginasa es una enzima que hidroliza el aminoácido L-asparagina a L-aspartato y amoníaco, esto es, es una enzima desaminante. La *E. coli* contiene dos isoenzimas de asparaginasa: L-asparaginasa I y L-asparaginasa II. La L-asparaginasa I está localizada en el citosol y tiene una baja afinidad por la asparagina. La L-asparaginasa II está localizada en el periplasma y tiene una alta afinidad por la L-asparagina.

15 La L-asparaginasa II es útil en el tratamiento de tumores o cánceres que dependen de la L-asparagina para la síntesis de proteína eliminando la asparagina extracelular. Es particularmente útil en el tratamiento de leucemias, tales como leucemia linfoblástica aguda. La L-asparaginasa se usa típicamente en combinación con otras terapias antitumorales o anticáncer, aunque puede ser empleada sola en ciertas situaciones clínicas. La L-asparaginasa fue purificada originalmente a partir de varios organismos, incluyendo *Escherichia coli* ("*E. coli*") y *Erwinia carotovora*. Entre los mamíferos, la L-asparaginasa II se encuentra en cantidades superiores a trazas solamente en cobayas (superfamilia Caviioidea) y en ciertos monos del Nuevo Mundo.

20 La L-asparaginasa II de *E. coli* es un tetrámero de subunidades idénticas que exhiben excelente K_{salida} y $K_{entrada}$. La L-asparaginasa II de *E. coli* (también conocida en la técnica como L-asparagina amidohidrolasa, tipo EC-2, EC 3.5.1.1) está disponible comercialmente como Elspar® (Merck & Co., Inc.) y también está disponible de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

25 La L-asparaginasa II, por sí misma, sufre de las desventajas usuales de las terapias proteínicas, tales como la alta rata de eliminación de una proteína extraña al paciente, y el potencial para inducir una respuesta inmune en un paciente tratado con esta enzima. Con el fin de abordar estos inconvenientes, se ha desarrollado un derivado conjugado con polietilén glicol de L-asparaginasa II y es comercializado como pegaspargasa u Oncaspar® por Enzon Pharmaceuticals, Inc. La pegaspargasa es producida utilizando L-asparaginasa II extraída de *E. coli*, suministrado por Merck. La pegaspargasa (también conocida como monometoxi polietilén glicol succinimidil L-asparaginasa) tiene las ventajas de ser sustancialmente no antigénica, y de exhibir una rata reducida de eliminación de la circulación.

30 Sin embargo, a pesar de estos éxitos, sería aún más eficiente y económico si la proteína L-asparaginasa II de *E. coli* pudiera ser producida en una célula huésped recombinante empleando un vector de expresión extracromosómico adecuado, por ejemplo, tal como un plásmido. Tales vectores de expresión pueden ser manipulados para la producción más eficiente de la proteína que está disponible con la producción de una cepa de *E. coli* nativa. A pesar de las ventajas potenciales de tal producción recombinante, se considera que por lo tanto no ha habido una
35 secuencia de polipéptidos publicada exacta para la enzima L-asparaginasa II comercial, y ni una secuencia de ácidos nucleicos publicada para polinucleótidos que codifiquen esa enzima. Por ejemplo, una secuencia de péptidos de L-asparaginasa II fue reportada previamente por Maita et al., 1980, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361(2), 105-117, and Maita et al., 1974, J. Biochem. 76, 1351-1354 [Tokyo]. Sin embargo, como se discute aquí más adelante, este trabajo temprano sufre de numerosos errores de secuenciación.

40 Otro obstáculo potencial para la expresión en plásmido de la subunidad de la enzima L-asparaginasa II es la presencia del gen que codifica una subunidad de L-asparaginasa II que es nativa al cromosoma de cepas de *E. coli* potenciales que podrían ser empleadas como células huésped. Así, hay una preocupación acerca de que la L-asparaginasa II recolectada de la célula huésped de *E. coli* que porta un vector de expresión extracromosómico podría incluir subunidades que representan más de una isoforma de L-asparaginasa. Dada la necesidad de tener un
45 producto enzimático bien caracterizado, tanto para propósitos clínicos como regulatorios, esta posibilidad ha representado por lo tanto un reto técnico serio para mejorar la eficiencia de la producción de la proteína L-asparaginasa II de *E. coli*.

Resumen de la invención

50 La presente invención satisface la necesidad antes mencionada para L-asparaginasa II de *E. coli* que es producida de manera eficiente y económicamente en forma recombinante, a la vez que provee un producto enzimático que tiene la misma estructura peptídica que la proteína L-asparaginasa II de *E. coli*, comercializada como Oncaspar®, que también está libre de cantidades detectables de isoformas alternativa de L-asparaginasa II.

Así, la invención provee una célula huésped de *E. coli* que comprende un cromosoma de *E. coli* y al menos una copia de un vector extracromosómico recombinante, en donde el vector extracromosómico codifica una subunidad de la proteína L-asparaginasa II, en donde el cromosoma de la célula huésped de *E. coli* codifica la misma subunidad de la proteína L-asparaginasa, y en donde el cromosoma huésped de *E. coli* no codifica ninguna otra isoforma de L-asparaginasa II. El vector extracromosómico es preferiblemente un plásmido adecuado para la replicación y expresión en *E. coli*.

Preferiblemente, la proteína L-asparaginasa expresada comprende cuatro subunidades que tienen una secuencia de polipéptidos de acuerdo con SEQ ID NO:1, que corresponde con la secuencia de las subunidades de la enzima L-asparaginasa II usada en la manufactura de Oncaspar®, y el vector plásmido comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una subunidad de la proteína L-asparaginasa, que está conectado operativamente a un promotor adecuado. El promotor es cualquier promotor adecuado, pero se selecciona opcionalmente del grupo consistente de promotores T7, araB, trp, tac, lac, λP_L , λP_R , aroH y phoA. El vector plásmido incluye opcionalmente elementos de vector adicionales, que pueden ser necesarios para la expresión y/o purificación de producto eficientes, que están conectados operativamente con el marco de lectura abierto de L-asparaginasa y/o el promotor. Estos elementos de vector incluyen, por ejemplo, una secuencia operadora compatible, un sitio de enlazamiento al ribosoma, un terminador de la transcripción, una secuencia de señalización, un marcador de resistencia a fármaco y el origen de la replicación. Una copia conectada al plásmido del gen represor relevante, por ejemplo, lacI, también puede estar presente.

Preferiblemente, la molécula de ADN del plásmido que codifica la subunidad de la proteína L-asparaginasa II comprende SEQ ID NO: 2, y la molécula de ADN cromosómica que codifica la proteína L-asparaginasa II comprende SEQ ID NO: 3.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un mapa del vector de plásmido pEN537.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con lo anterior, con el fin de proveer las mejoras deseadas en la producción de la L-asparaginasa II correspondiente a Oncaspar® y a la L-asparaginasa Kyowa Hapikko, es necesario obtener un vector que codifique la enzima, y también proveer una célula huésped que expresará solamente una isoforma sencilla de L-asparaginasa II. Así, la enzima L-asparaginasa II de Merck & Co., Inc., así como enzima L-asparaginasa II obtenida de Kyowa Hako Kogyo Co., Ltd. fueron secuenciadas, y las secuencias resultantes fueron comparadas con la de la enzima L-asparaginasa II obtenida de *E. coli* K-12, según lo reportan Jennings et al., 1990 J Bacteriol 172: 1491-1498. La enzima L-asparaginasa II K12 es codificada por el gen ansB (GeneBank No. M34277).

Como se anotó anteriormente, el experto en el arte apreciará que la enzima L-asparaginasa II comprende cuatro subunidades idénticas. Así, la referencia a un gen o a una molécula de ADN que codifica la enzima, y la secuencia proteínica de la enzima, se refiere al gen que codifica una de estas subunidades idénticas.

La secuenciación de péptido fue llevada a cabo por métodos estándar en el arte, tal como se resume en el Ejemplo 1, aquí más adelante. Las secuencias de proteína de las subunidades tanto de la Merck & Co., Inc., como de la Kyowa Hako Kogyo Co., Ltd., se encontraron sorprendentemente idénticas (véase SEQ ID NO: 1). Con estos datos, puede ser evidente ahora que los informes anteriores acerca de la secuencia de la L-asparaginasa de Merck por Maita et al., 1980 Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361(2), 105-117, y Maita et al., 1974, J. Biochem. 76, 1351-1354 [Tokyo] contenían realmente numerosos errores.

Las secuencias obtenidas también fueron comparadas con la estructura de la subunidad de la enzima L-asparaginasa II K12. Se encontró que la subunidad de la enzima L-asparaginasa II K12 difiere de la subunidad de la enzima L-asparaginasa II de Merck & Co., Inc. en cuatro posiciones de residuos específicos. Con respecto a la enzima L-asparaginasa II de Merck, la subunidad enzimática K12 tiene Val₂₇ en lugar de Ala₂₇, Asn₆₄ en lugar de Asp₆₄, Ser₂₅₂ en lugar de Thr₂₅₂ y Thr₂₆₃ en lugar de Asn₂₆₃.

Como se anotó más arriba, se prefiere que el cromosoma de la célula huésped *E. coli* no exprese una isoforma diferente de L-asparaginasa II que la expresada por el vector extracromosómico, esto es, por un plásmido. Este resultado deseable puede ser alcanzado por una de varias estrategias alternativas. Por ejemplo, cualquier gen de L-asparaginasa II presente en el cromosoma huésped de *E. coli* podría ser total o parcialmente eliminado o anulado. Alternativamente, la expresión de cualquier gen de L-asparaginasa II alternativo presente en el cromosoma huésped podría ser suprimido por propiedades regulatorias intrínsecas del promotor natural con uno que falle en permitir la expresión bajo las mismas condiciones de cultivo que favorecen la expresión de la isoforma de la L-asparaginasa II codificada por el vector extracromosómico. Sin embargo, es preferible hacer que los genes cromosómico y extracromosómico de L-asparaginasa II expresen la misma isoforma de la enzima L-asparaginasa II.

- Con este propósito, las subunidades de la enzima L-asparaginasa II producida por varias cepas disponibles de *E. coli* fueron secuenciadas y comparadas con los productos enzimáticos comerciales. Se descubrió inesperadamente que la cepa BLR (DE3) de *E. coli* [obtenida de Novagen Corporation; Cat. No. 69208-3] produce una enzima L-asparaginasa II codificada cromosómicamente idéntica en estructura a las enzimas comercialmente disponibles, mientras que se encontró que las cepas de *E. coli* GX1210 y *E. coli* GX6712 que fueron probadas también producían diferentes isoformas de la enzima L-asparaginasa II.
- Con la identificación de un huésped *E. coli* preferido, puede construirse un vector de expresión extracromosómico, esto es, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica. Los vectores extracromosómicos adecuados para uso en *E. coli* incluyen, por ejemplo, plásmidos derivados de pUC o pBR322. Estos incluyen plásmidos tales como pET y pBAD, así como una variedad de plásmidos que tienen elementos de expresión de T7, araBAD, phoA, trc, O_L, O_R, P_L, P_R.
- En el vector, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la subunidad de enzima L-asparaginasa II está conectada operativamente con una secuencia promotora adecuada. Promotores adecuados incluyen, por ejemplo, los promotores T7, araBAD, phoA, trc, O_L, O_R, P_L y P_R. Preferiblemente, el promotor es un promotor viral T7.
- Elementos inductores adecuados incluyen, por ejemplo, arabinosa, lactosa, o inducción por calor, limitación por fosfatos, limitación por triptófano, para nombrar sólo unos pocos. Preferiblemente, el elemento inductor es un Lac operón, el cual es inducible por isopropil tiogalactósido ("IPTG").
- Una secuencia de señalización señal adecuada (péptido de señalización) puede ser derivada de pelB, fd pIII, u ompA. Preferiblemente, el péptido de señalización es derivado de ansB.
- Marcadores de selección de antibióticos adecuados son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, los que confieren resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, rifampicina, o tetraciclina, entre otros.
- El origen adecuado para las secuencias de replicación incluyen las encontradas en los siguientes plásmidos: *pUC19*, *pACYC177*, *pUB110*, *pE194*, *pAMB1*, *pIJ702*, *pBR322*, *pBR327*, y *pSC101*.
- Secuencias de terminación adecuadas incluyen, por ejemplo, el terminador principal del fago fd, TF, y rrnB.
- Los plásmidos generalmente son preferidos para uso en *E. coli*. Vectores de plásmidos convencionales son moléculas de ADN circulares de doble cadena manipuladas preferiblemente con sitios de reconocimiento enzimático adecuados para insertar secuencias de ADN exógenas, un gen seleccionable antibiótico, un origen de replicación para propagación autónoma en la célula huésped, y un gen para la discriminación o selección de clones que contienen ADN de inserto recombinante. Vectores de plásmido disponibles incluyen, por ejemplo, plásmidos pET3, pET9, pET11, y la serie pET extendida (catalogado por Novagen Corporation) pBAD, trc, phoA, trp, y O_{L/R}/P_{L/R}.
- Como se ejemplifica aquí más adelante, un plásmido del sistema de expresión pET, tal como pET 27b+ es el preferido. Con el fin de proveer una expresión eficiente y controlada de la enzima, el vector de expresión incluye también un promotor, un operador, un sitio de enlazamiento a ribosoma, una secuencia de señalización, un terminador de transcripción, un origen de replicación, una copia regulada del gen represor (por ejemplo, lacI)
- La cepa de *E. coli* huésped tendrá elementos reguladores compatibles en su cromosoma. Por ejemplo, el gen para la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5 está presente en células BLR (DE3). Esta cepa es un lisógeno del bacteriófago DE3. La adición de IPTG al cultivo de BLR (DE3) induce la T7 ARN polimerasa, la cual a su vez transcribe el gen objetivo del plásmido pET. Las BLR (DE3) también es recA⁻ que puede proveer estabilidad adicional de los genes en plásmidos extracromosómicos.
- Con el fin de obtener una molécula de ácido nucleico que codifique la enzima de Merck y de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., puede modificarse una L-asparaginasa II disponible mediante métodos adecuados. La secuencia de aminoácidos madura 326 de la subunidad L-asparaginasa II de *E. coli* K-12 ansB está codificada en un segmento de 978 pares de base según lo informa Jennings MP y Beacham IR (1990 J Bacteriol 172: 1491-1498; GeneBank No. M34277). El gen ansB, el cual incluye un péptido de señalización de 22 aminoácidos que precede a la proteína madura, fue clonado a partir de otra cepa de *E. coli* K-12 (GX1210; obtenida de Genex Corporation) por métodos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencionales. El gen ansB que codifica la subunidad de L-asparaginasa II de *E. coli* K-12 ansB fue adaptado por mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, con el método Amersham Sculptor) para expresar la L-asparaginasa II con las sustituciones de residuos discutidas más arriba, para hacer las siguientes sustituciones de bases. T a C en la base 530; A a G en la base 640; T a A en la base 1205 y C a A en la base 1239. La numeración está basada en la dada por el GeneBank No. M34277. Los cambios de codón resultantes [GTG a GCG; AAT a GAT; TCT a ACT y ACC a AAC en las correspondientes posiciones] convirtieron el gen ansB en un gen modificado (de aquí en adelante ansB*; SEQ ID NO: 2) que expresa la subunidad de la enzima L-asparaginasa II idéntica a la obtenida de Merck & Co., Inc. y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

5 El gen *ansB** puede ser insertado en cualquier vector extracromosómico adecuado para una expresión eficiente de la proteína en *E. coli*, como se discutió más arriba. En particular, el gen *ansB** fue insertado en el plásmido pET-27b+ (Novagen Corporation) e introducido en la cepa de *E. coli* BLR (DE3) por electroporación, tal como se describe en detalle con los ejemplos provistos aquí más adelante, con el fin de proveer un *E. coli* que porta el plásmido *ansB** y expresa la subunidad L-asparaginasa II como una isoforma uniforme que coincide con la L-asparaginasa II de Merck.

10 Preferiblemente, el clon identificado por los ejemplos como cepa EN538 (depositado como ATCC Número PTA 7490) es empleado y cultivado empleando el método conocido en el arte adecuado para *E. coli*. Sistemas de cultivo adecuados incluyen métodos de cultivo por lotes, por lotes alimentados y continuos. Los medios de cultivo son seleccionados de los medios conocidos en el arte optimizados para *E. coli*. Una vez que el cultivo alcanza una densidad suficiente, que varía desde aproximadamente 20 OD₆₆₀ hasta aproximadamente 200 OD₆₆₀, se agrega un inductor apropiado, tal como IPTG al medio de cultivo. Después de un período de tiempo suficiente, que varía desde aproximadamente 0.5 horas hasta aproximadamente 20 horas, la L-asparaginasa II producida es purificada por métodos estándar a partir del medio de cultivo y/o a partir de masas celulares recolectadas del cultivo.

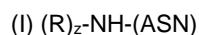
15 La masa celular es recolectada por centrifugación y/o filtración, y sometida a lisis mediante un método conocido en el arte. La lisis de los cuerpos celulares puede ser lograda por métodos que incluyen lisis enzimática de la pared celular seguida por lisis osmótica, congelación descongelación, sonicación, ruptura mecánica (por ejemplo, microfluidización), uso de agentes de lisis y similares, seguidos por filtración y/o centrifugación para separar la masa celular rota del contenido de proteína soluble. Pueden emplearse varios ciclos de lisis, lavado y separación para optimizar la recuperación.

20 La enzima puede ser recuperada entonces y purificada a partir del sobrenadante y/o medio de cultivo por métodos de purificación bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita, FPLC® (cromatografía líquida rápida de proteínas), cromatografía líquida de alto rendimiento, y similares.

25 Pueden ajustarse varios parámetros del proceso de fermentación para optimizar la expresión de asparaginasa o controlar el grado de fuga de la proteína desde el periplasma hacia el medio de cultivo. Estas variables incluyen los constituyentes del medio (por ejemplo, fuentes de carbono y nitrógeno y aminoácidos agregados u otros nutrientes), temperatura, pH, concentración del inductor y duración de la expresión. La línea genética total de *E. coli* (genotipo) también puede afectar la expresión y la fuga de producto. Puede ser deseable recolectar la asparaginasa producida de las células (periplasma) solamente, o del medio solamente, o del contenido total del fermentador dependiendo del rendimiento de la expresión de proteína y la fuga desde las células huésped.

Conjugados poliméricos de L-asparaginasa

35 Una utilidad preferida de la enzima L-asparaginasa II preparada de acuerdo con la invención está en la forma de una enzima conjugada con polímero. Los conjugados L-asparaginasa-polímero de la presente invención corresponden en general a la fórmula (I):



en donde

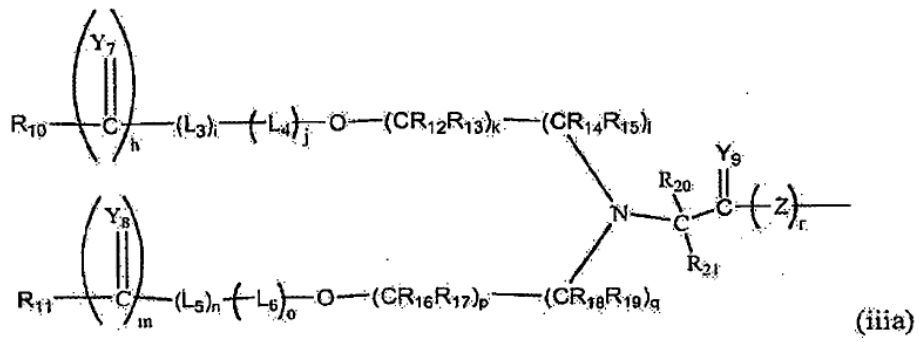
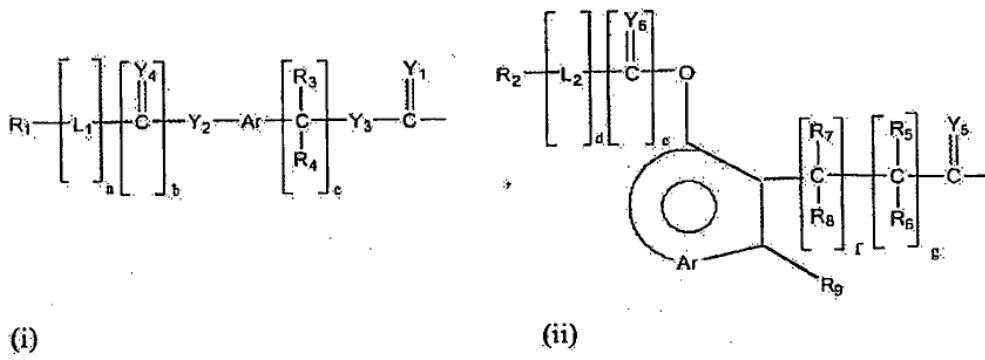
(ASN) representa la L-asparaginasa o un derivado o fragmento de la misma;

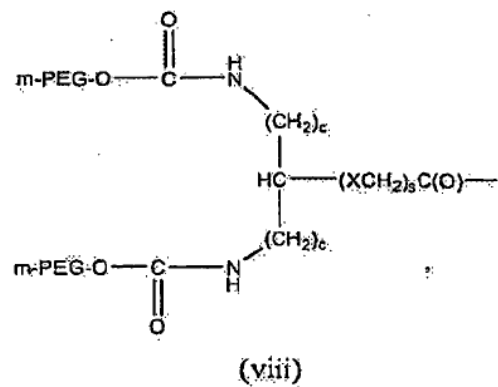
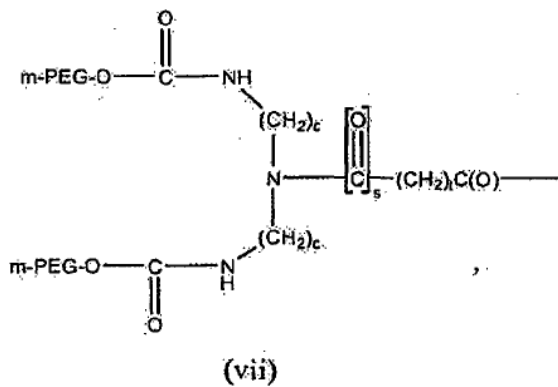
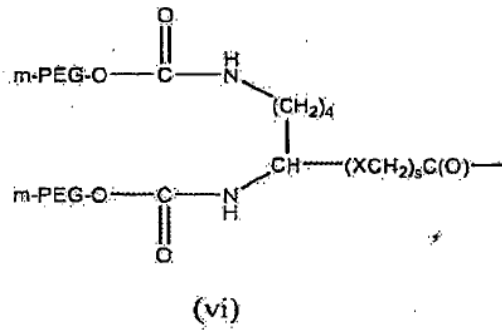
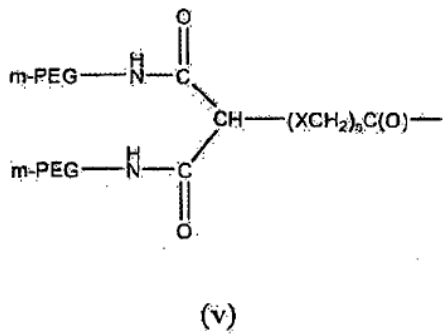
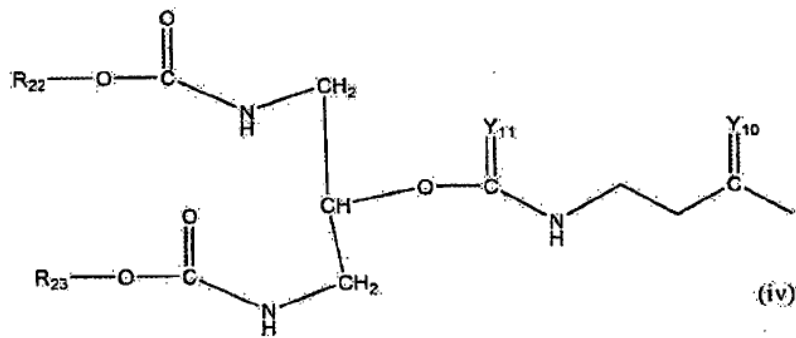
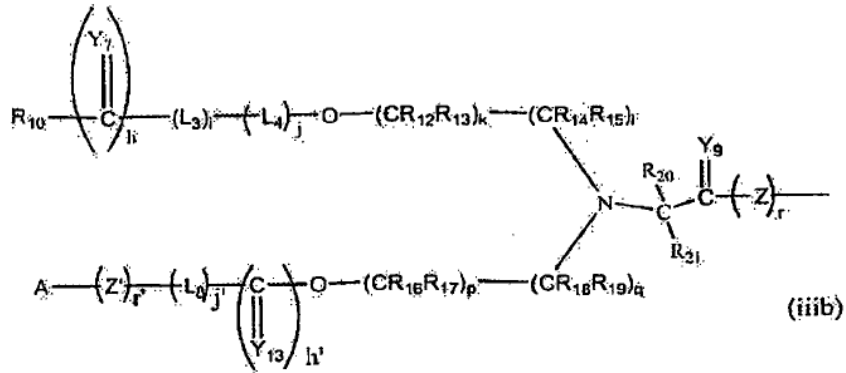
40 NH- es un grupo amino de un aminoácido encontrado en la ASN, derivado o fragmento de la misma para unión al polímero;

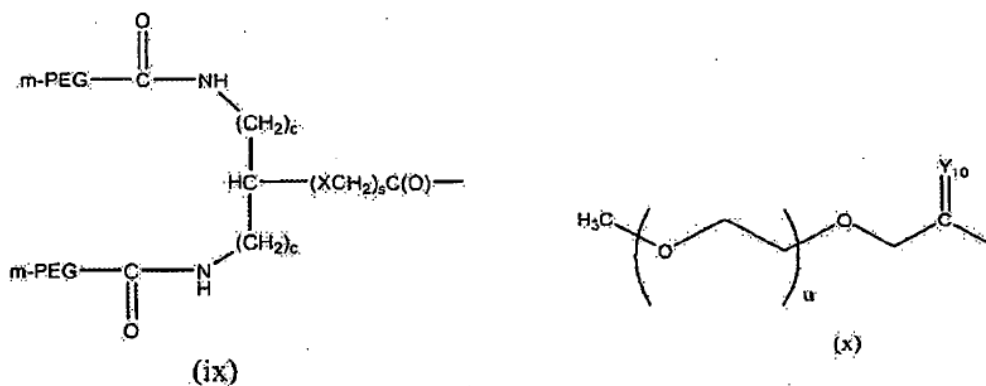
z es un número entero positivo, preferiblemente desde aproximadamente 1 a hasta aproximadamente 80; y

R es un residuo polimérico sustancialmente no antigénico que está unido a la ASN en una forma liberable o no liberable.

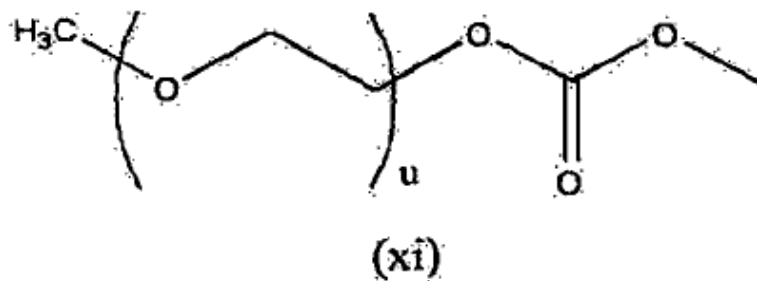
45 La porción de residuo polimérico no antigénico del conjugado (R) puede seleccionarse de entre una lista no limitante de sistemas basados en polímeros tales como:







y

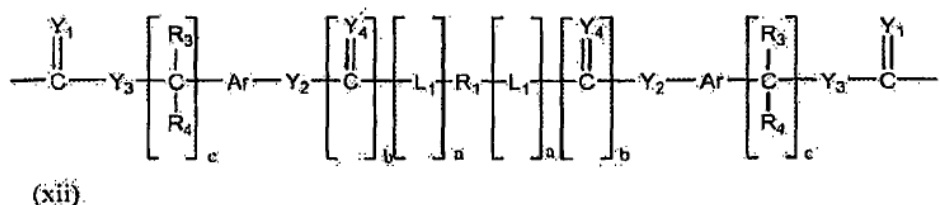


en donde:

- 5 R_{1-2} , R_{10-11} , y R_{22-23} pueden ser el mismo o diferentes y son residuos poliméricos no antigénicos seleccionados independientemente; R_{3-9} , R_{12-21} y R_{24} (véase más adelante) son los mismos o diferentes y son seleccionados cada uno independientemente de entre hidrógeno, C_{1-6} alquilos, C_{3-12} alquilos ramificados, C_{3-8} cicloalquilos, C_{1-6} alquilos sustituido, C_{3-8} cicloalquilos sustituidos, arilos, arilos sustituidos, aralquilos, C_{1-6} heteroalquilos, C_{1-6} heteroalquilos sustituidos, C_{1-6} alcoxi, fenoxi y C_{1-6} heteroalcoxis;
- 10 Ar es una unidad estructural aromática la cual forma un hidrocarburo aromático multisustituido o un grupo heteroaromático multisustituido;
- Y_{1-11} y Y_{13} pueden ser el mismo o diferentes y son seleccionados independientemente de O, S y NR_{24} ;
- A se selecciona de entre hidrógeno, grupos alquilo, unidades estructurales de direccionamiento, grupos salientes, grupos funcionales, agentes de diagnóstico, y unidades estructurales biológicamente activas;
- 15 X es O, NQ, S, SO o SO_2 ; donde Q es H, C_{1-8} alquilo, C_{1-8} alquilo ramificado, C_{1-8} alquilo sustituido, arilo o aralquilo;
- Z se selecciona de entre unidades estructurales transportadas activamente en una célula objetivo, unidades estructurales hidrófobas, unidades estructurales de enlazamiento bifuncionales y combinaciones de los mismos;
- L_{1-6} y L_8 pueden ser el mismo o diferentes y son grupos enlazantes bifuncionales seleccionados independientemente;
- 20 a, c, d, f, g, i, j, j', k, l, n, o, p, q y t pueden ser el mismo o diferentes y son independientemente 0 o un entero positivo, preferiblemente, en la mayoría de los aspectos;
- b, e, r, r', s, h, h' y m puede ser el mismo o diferentes y son independientemente 0 o 1;
- mPEG es $H_3CO(-CH_2CH_2O)_u-$ y
- 25 u es un entero positivo, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 2,300, y más preferiblemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000.

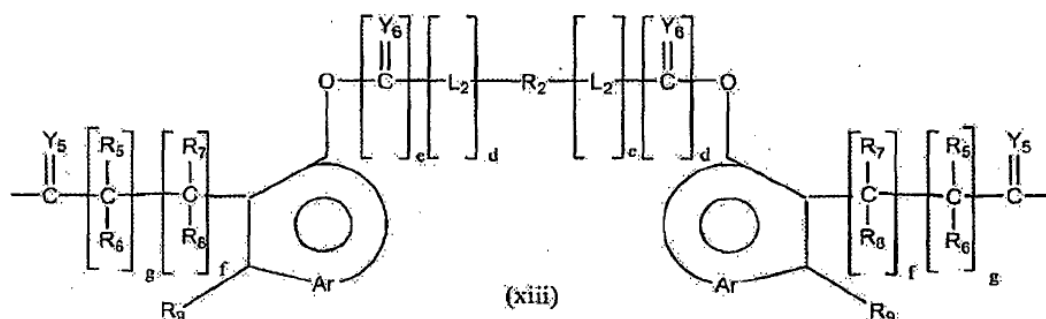
Dentro de lo anterior, se prefiere que Y_{1-11} y Y_{13} sean O; R_{3-8} , R_{12-21} y R_{24} son cada uno independientemente hidrógeno o C_{1-6} alquilo, siendo metilo y etilo los alquilo más preferidos y R_9 es preferiblemente CH_3 .

En un aspecto adicional de la invención, la porción de polímero del conjugado puede ser uno que proporciona múltiples puntos de unión para la L-asparaginasa. Una lista no limitante de tales sistemas incluyen:



5

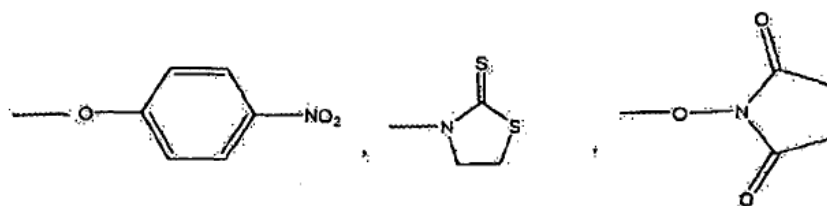
y



en donde todas las variables son la misma que en lo establecido más arriba.

10

Los polímeros activados que pueden ser empleados para hacer los conjugados de L-asparaginasa, corresponderán naturalmente de manera directa con las porciones poliméricas descritas más arriba. La principal diferencia es la presencia de un grupo saliente o activador, el cual facilita la unión liberable del sistema polimérico a un grupo amina encontrado en la L-asparaginasa. Así, los compuestos (i) - (xiii) incluyen un grupo saliente o activador tal como: p-nitrofenoxi, tiazolidinil tiona, N-hidroxisuccinimidilo



15

u otros grupos salientes o activador adecuados tal como, N-hidroxibenzotriazolilo, halógeno, N-hidroxiftalimidilo, imidazolilo, O-acil ureas, pentafluorofenol o 2,4,6-triclorofenol u otros grupos salientes adecuados evidentes para las personas experimentadas en el arte, encontrados en el lugar en donde la L-asparaginasa se une después de la reacción de conjugación.

20

Algunos PEGs activados preferidos incluyen los divulgados en las Patentes de los Estados Unidos de propiedad común Nos. 5,122,614, 5,324,844, 5,612,460 y 5,808,096. Como será evidente para los experimentados en el arte tales reacciones de conjugación se llevan a cabo típicamente en un regulador adecuado utilizando un exceso molar varias veces de PEG activado. Algunos conjugados preferidos hechos con PEG lineales como los SC-PEG antes mencionados pueden contener, en promedio, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 80 cadenas de PEG por enzima. Consecuentemente, para estos, pueden emplearse excesos molares de varios cientos de veces, por ejemplo, 200-1000x. El exceso molar utilizado para polímeros ramificados y polímeros unidos a la enzima será inferior y puede ser determinado utilizando las técnicas descritas en las patentes y en solicitudes de patente que describen las mismas y que se mencionan aquí más adelante.

25

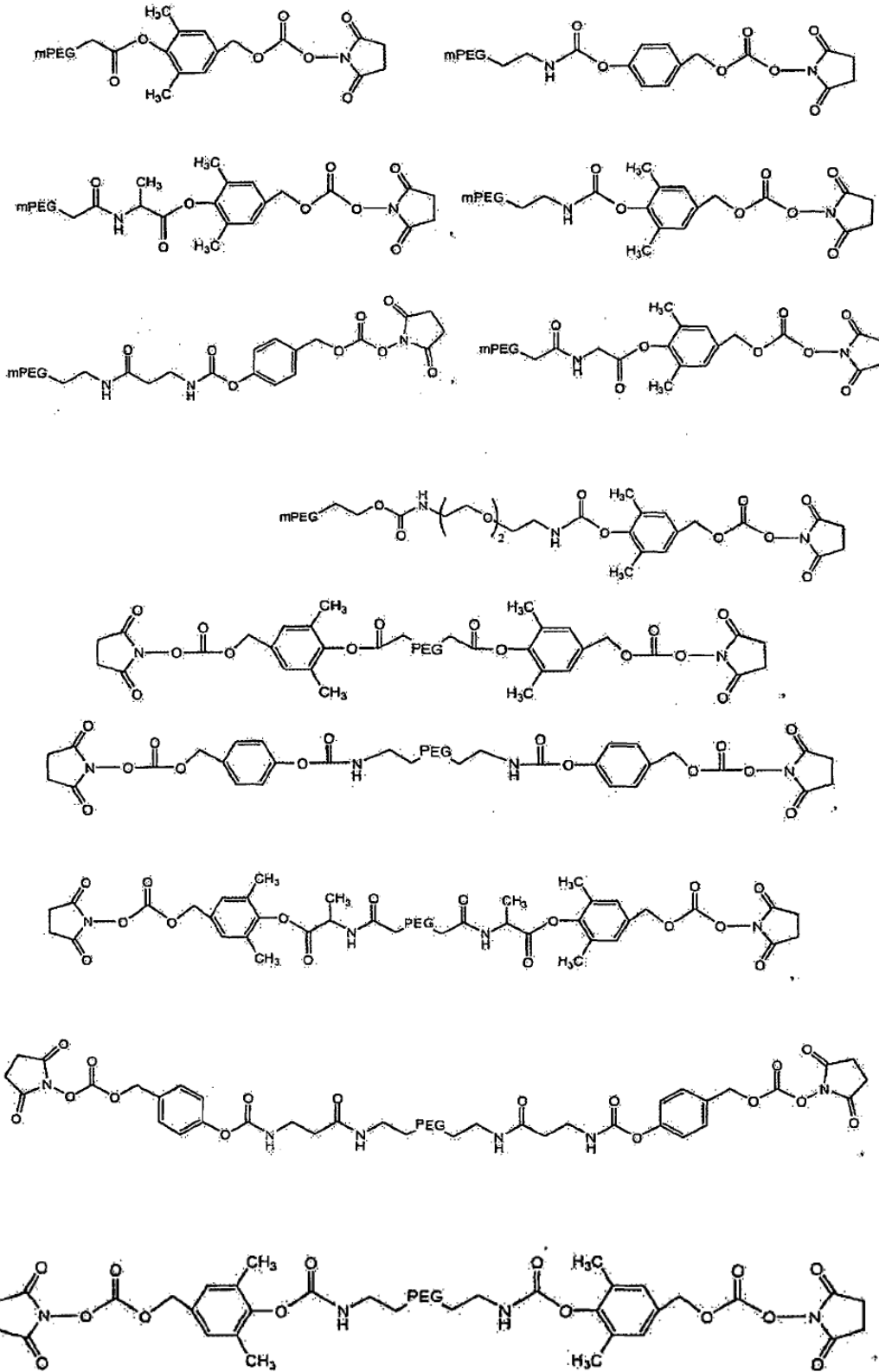
Para propósitos de la presente invención, los grupos salientes deben entenderse como aquellos grupos que son capaces de reaccionar con un grupo amina (nucleófilo) encontrado sobre una L-asparaginasa, por ejemplo, sobre una Lys.

- 5 Para propósitos de la presente invención, los anteriores también se denominan como enlazantes poliméricos activados. Los residuos poliméricos son preferiblemente basados en óxidos de polialquileno y más preferiblemente basados en polietilen glicol (PEG), en donde el PEG es bien sea lineal o ramificado.

- 10 Con referencia ahora a los polímeros activados descritos más arriba, puede verse que el Ar es una unidad estructural que forma un hidrocarburo aromático multisustituido o un grupo heteroaromático multisustituido. Un aspecto clave es que la unidad estructural Ar es aromática en naturaleza. Generalmente, para ser aromáticos, los electrones $n(\pi)$ debes ser compartidos dentro de una "nube" tanto por encima como por debajo del plano de una molécula cíclica. Adicionalmente, el número de electrones n debe satisfacer la regla de Huckle ($4n+2$). Las personas experimentadas en el arte entenderán que una miríada de unidades estructurales satisfará los requerimientos aromáticos de la unidad estructural y así son adecuadas para uso aquí con halógenos y/o cadenas laterales tal como aquellos términos son entendidos comúnmente en el arte.

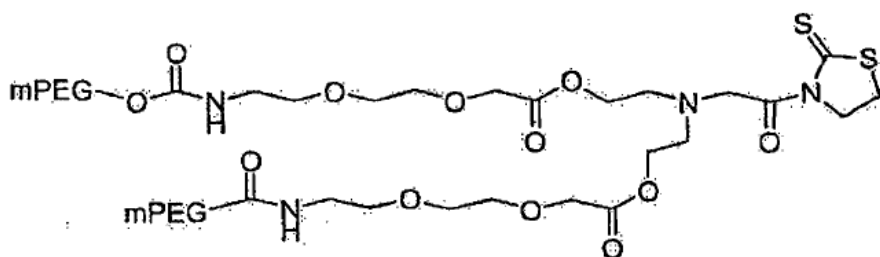
- 15 En algunos aspectos preferidos de la invención, los enlazantes polímeros activados son preparados de acuerdo con las patentes de los Estados Unidos de propiedad común Nos. 6,180,095, 6,720,306, 5,965,119, 6624,142 y 6,303,569

Dentro de este contexto, se prefieren los siguientes enlazantes poliméricos activados:

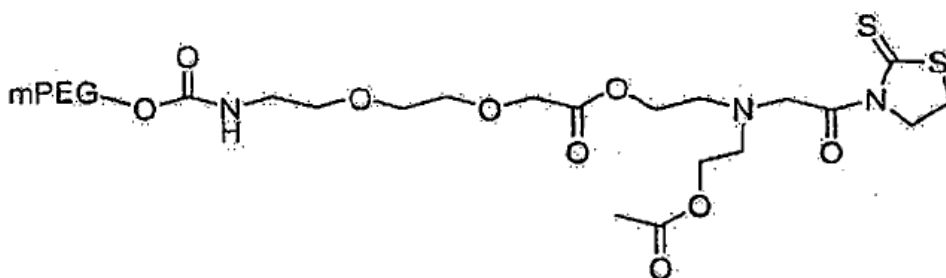


y

5 En un aspecto alternativo de la invención, los conjugados L-asparaginasa polímero se hacen usando ciertos residuos de polímeros ramificados o de bicina tales como los descritos en las solicitudes de patentes de los Estados Unidos de propiedad común Nos. 7,122,189 y 7087,229 y las solicitudes de patentes de los Estados Unidos Nos. 10/557,522, 11/502,108, y 11/011,818. Algunos de los polímeros activados preferidos incluyen:



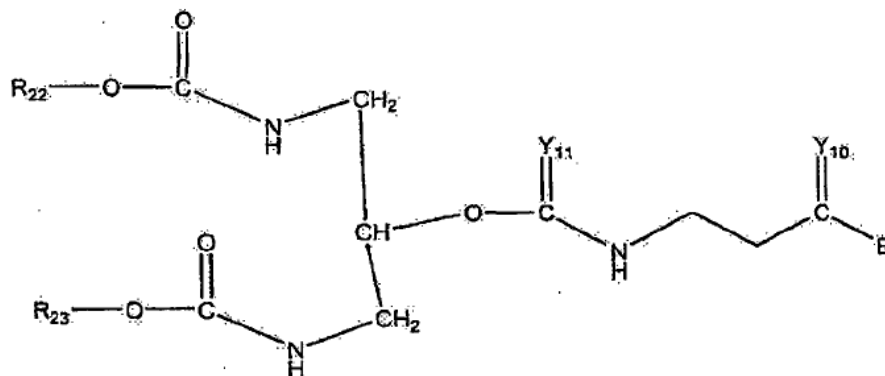
y



5 También debe entenderse que el grupo saliente mostrado más arriba es solamente uno de los grupos adecuados y los otros mencionados aquí también pueden ser utilizados sin experimentación indebida.

En aspectos alternativos, los enlazantes poliméricos activados son preparados utilizando los residuos poliméricos ramificados tales como los descritos en las patentes de los Estados Unidos de propiedad común Nos. 5,643,575; 5,919,455 y 6,113,906 y 6,566,506.

Tales polímeros activados corresponden a sistemas de polímeros (v) - (ix) siendo representativo el siguiente:



10

en donde B es L-asparaginasa II y todas las otras variables son como se definió anteriormente.

Polímeros sustancialmente no antigénicos

15 Como se estableció anteriormente, R_{1-2} , R_{10-11} , y R_{22-23} y son preferiblemente cada uno residuos de polímero solubles en agua que son preferiblemente sustancialmente no antigénicos tales como óxidos de polialquileno (PAO) y más preferiblemente polietilen glicoles tal como mPEG. Para propósitos de ilustración y no de limitación, la porción de residuo de polietilen glicol (PEG) de R_{1-2} , R_{10-11} , y R_{22-23} y se puede seleccionar de entre:

J-O-(CH₂CH₂O)_u-

J-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂C(O)-O-

J-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂CH₂ NR₂₅-, y

20 J-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂CH₂ SH-,

en donde:

u es el grado de polimerización, esto es, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 2,300;

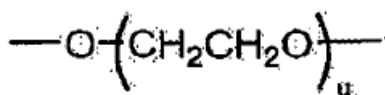
5 R₂₅ es seleccionado de entre hidrógeno, C₁₋₆ alquilos, C₂₋₆ alquenos, C₂₋₆ alquinos, C₃₋₁₂ alquilos ramificados, C₃₋₈ cicloalquilos, C₁₋₆ alquilos sustituidos, C₂₋₆ alquenos sustituidos, C₂₋₆ alquinos sustituidos, C₃₋₈ cicloalquilos sustituidos, arilos, arilos sustituidos, aralquilos, C₁₋₆ heteroalquilos, C₁₋₆ heteroalquilos sustituidos, C₁₋₆ alcoxi, fenoxi y C₁₋₆ heteroalcoxi, y

J es un grupo de cubrimiento, esto es, un grupo que se encuentra en el terminal del polímero y, en algunos aspectos, se puede seleccionar de cualquiera de NH₂, OH, SH, CO₂H, C₁₋₆ alquilos, preferiblemente metilo, u otros grupos que activan el terminal PEG, puesto que tales grupos son entendidos por los expertos en el arte.

10 En una realización particularmente preferida, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, y R₂₂₋₂₃ se seleccionan de entre

CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-, CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂C(O)-O-, y CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂CH₂ NH- y CH₃-O-(CH₂CH₂O)_u-CH₂CH₂ SH-, donde u es un entero positivo, seleccionado preferiblemente de tal manera que el peso molecular promedio en peso es de aproximadamente 200 a aproximadamente 80,000 Da. Más preferiblemente, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, y R₂₂₋₂₃ independientemente tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 2,000 Da a aproximadamente 42,000 Da, con un peso molecular promedio de aproximadamente 5,000 Da a aproximadamente 40,000 Da siendo el más preferido. Otros pesos moleculares también se contemplan para acomodar las necesidades del experto.

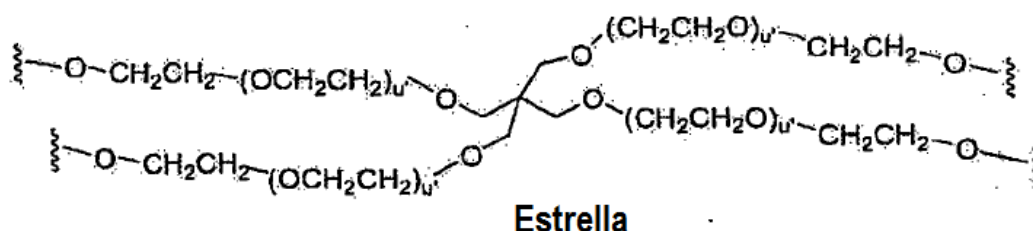
PEG está representado en general por la estructura:



20 y R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, y R₂₂₋₂₃ comprenden preferiblemente los residuos de esta fórmula. El grado de polimerización para el polímero representa el número de unidades de repetición en la cadena polimérica y es dependiente del peso molecular del polímero.

25 También son útiles los polipropilen glicoles, ramificados derivados de PEG tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos de propiedad común No. 5,643,575 (la patente '575), "PEG en estrella y PEG de brazos múltiples" tales como los descritos en el catálogo de Shearwater Corporation 2001 "polietileno" "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Application". La divulgación de cada uno de los anteriores se incorpora aquí como referencia. La ramificación proporcionada por la patente '575 permite ramificaciones secundarias o terciarias como una manera de incrementar la carga de polímero en una molécula biológicamente activa a partir de un punto sencillo de unión. Se entenderá que el polímero soluble en agua puede ser funcionalizado para la unión a los grupos de enlazamiento bifuncionales si se requiere sin experimentación indebida.

30 Por ejemplo, los conjugados de la presente invención se pueden preparar por métodos que incluyen convertir los productos "estrella"-PEG multibrazo PEG-OH tales como los descritos en el catálogo NOF Corp. Drug Delivery System, Ver. 8, abril de 2006, cuya divulgación se incorpora aquí como referencia, en un polímero adecuadamente activado, utilizando las técnicas de activación descritas en las patentes '614' o '096 antes mencionadas. Específicamente, el PEG puede ser de la fórmula:



35

o

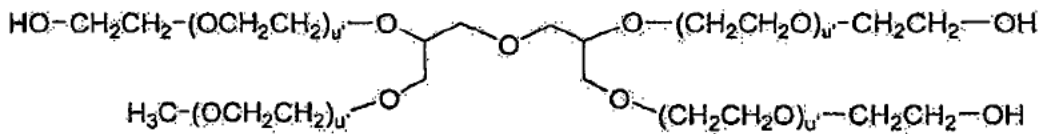
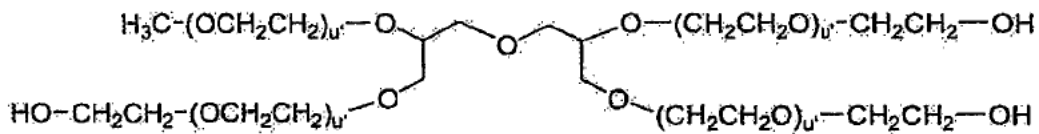
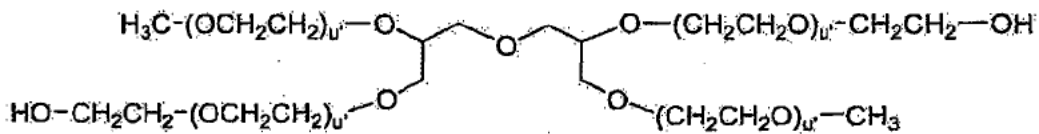
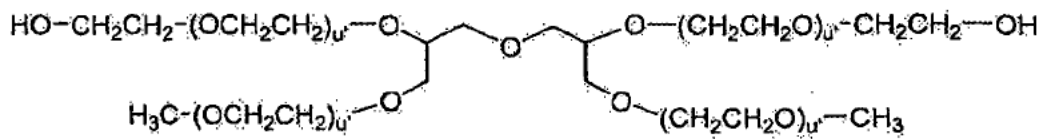
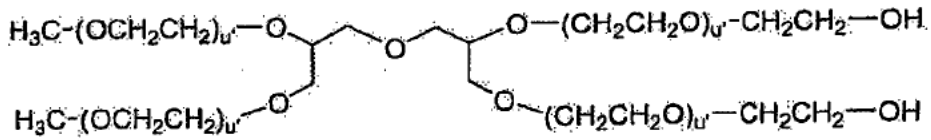
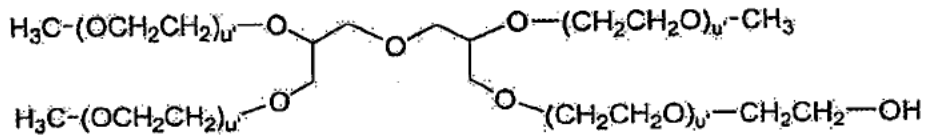


en donde:

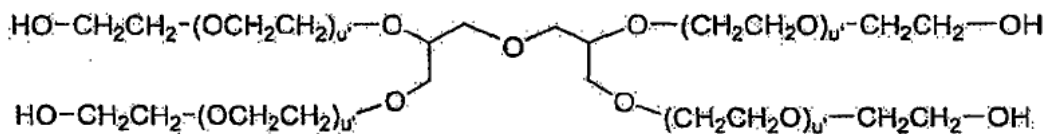
u' es un entero de aproximadamente 4 a aproximadamente 455, preferiblemente para proveer polímeros que tienen un peso molecular total de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 40,000; y hasta 3 porciones terminales del residuo es/son cubiertas con un metilo u otro alquilo inferior.

5

En algunas realizaciones preferidas, todos los 4 de los brazos de PEG se convierten en grupos salientes adecuados, esto es, carbonato de N-hidroxisuccinimidilo (SC), etc., para facilitar la unión a la proteína recombinante. Tales compuestos anteriores a la conversión incluyen:



y



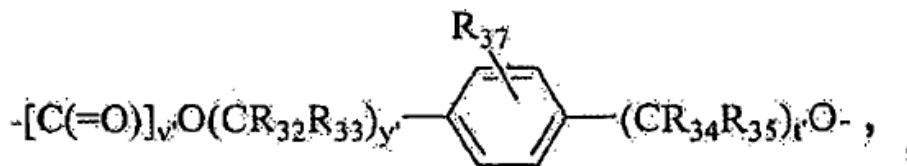
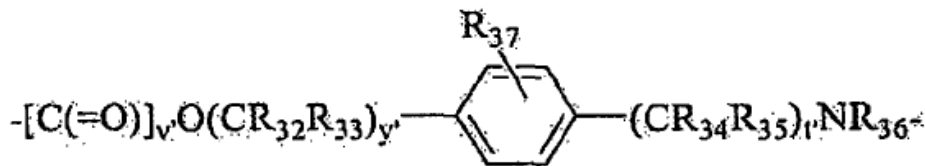
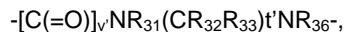
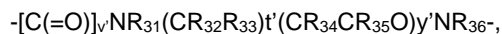
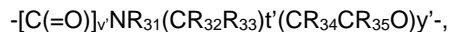
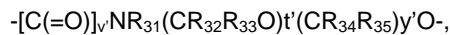
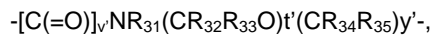
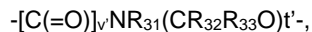
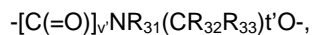
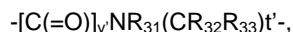
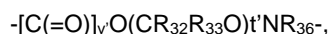
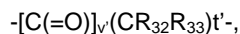
5 Las sustancias poliméricas incluidas aquí son preferentemente solubles en agua a temperatura ambiente. Una lista no limitante de tales polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileno tales como polietilén glicol (PEG) o polipropilén glicoles, polioles polioxietilénados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos, con la condición que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloque.

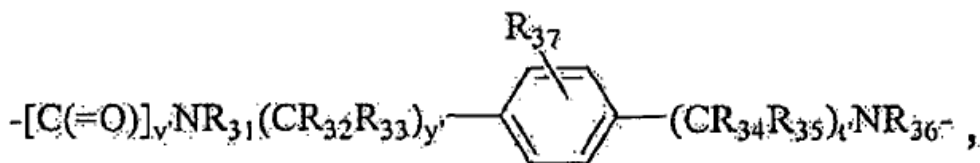
En una realización adicional, y como una alternativa a los polímeros basados en PAO, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, y R₂₂₋₂₃ son cada uno seleccionados opcionalmente de entre uno o más materiales efectivamente no antigénico tales como dextrano, alcoholes de polivinilo, polímeros basados en carbohidratos, hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), óxidos de polialquileo, y/o copolímeros de los mismos. Véase también la patente de los Estados Unidos de propiedad común No. 6,153,655.

Se entenderá por los expertos en el arte que el mismo tipo de activación se emplea como se describe aquí para los PAO tales como PEG. Aquellos de experiencia normal en el arte se darán cuenta, además, que la lista anterior es meramente ilustrativa y que también se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas aquí y que también se contemplan otros derivados de óxido de polialquileo tales como los propilen glicoles, etc..

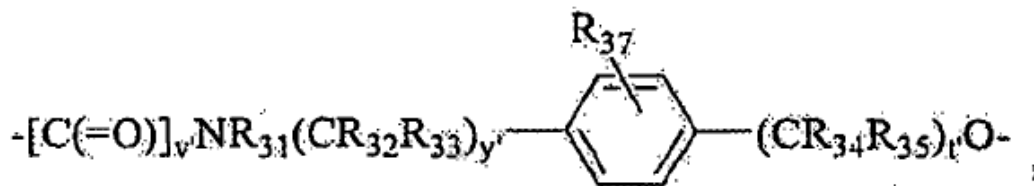
Grupos bifuncionales de enlazamiento

En muchos aspectos de la invención, L₁₋₆ y L₈ son grupos de enlazamiento que facilitan la unión de las cadenas de polímero, por ejemplo, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, y/o R₂₂₋₂₃. El enlace provisto puede ser directo o a través de grupos de acoplamiento adicionales conocido por los expertos en el arte. En este aspecto de la invención, L₁₋₆ y L₈ pueden ser el mismo o diferentes y se pueden seleccionar de una amplia variedad de grupos bien conocidos por los expertos en el arte tales como grupos bifuncionales y heterobifuncionales alifáticos y aromáticos-alifáticos, aminoácidos, etc. Así, L₁₋₆ y L₈ pueden ser el mismo o diferentes e incluyen grupos tales como:





y



- 5 en donde: R₃₁-R₃₇ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, amino, amino sustituido, azido, carboxi, ciano, halo, hidroxilo, nitro, silil éter, sulfonilo, mercapto, C₁₋₆ alquilmercapto, arilmercapto, arilmercapto sustituido, C₁₋₆ alquiltio sustituido, C₁₋₆ alquilos, C₂₋₆ alquenilo, C₂₋₆ alquinilo, C₃₋₁₉ alquilo ramificado, C₃₋₈ cicloalquilo, C₁₋₆ alquilo sustituido, C₂₋₆ alquenilo sustituido, C₂₋₆ alquinilo sustituido, C₃₋₈ cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, C₁₋₆ heteroalquilo, C₁₋₆ heteroalquilo sustituido, C₁₋₆ alcoxi, ariloxi, C₁₋₆ heteroalcoxi, heteroariloxi, C₂₋₆ alcanilo, arilcarbonilo, C₂₋₆ alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, C₂₋₆ alcaniloxi, arilcarboniloxi, C₂₋₆ alcanilo sustituido, arilcarbonilo sustituido, C₂₋₆ alcaniloxi sustituido, ariloxycarbonilo sustituido, C₂₋₆ alcaniloxi sustituido, sustituido y arilcarboniloxi,

- 10 en donde los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste de acilo, amino, amido, amidina, aralquilo, arilo, azido, alquilmercapto, arilmercapto, carbonilo, carboxilato, ciano, éster, éter, formilo, halógeno, heteroarilo, heterocicloalquilo, hidroxilo, imino, nitro, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxi, fosforilo, fosfonato, fosfinato, sililo, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamilo, sulfonamida, y sulfonilo;

(t') y (y') se seleccionan independientemente de cero o enteros positivos, preferiblemente de 1 a 6; y

(v') es 0 o 1.

Preferiblemente, L₁₋₆ y L₈ se seleccionan de entre

- 15 -C(O)CH₂OCH₂C(O)-;
- 20 -C(O)CH₂NHCH₂C(O)-;
- C(O)CH₂SCH₂C(O)-;
- C(O)CH₂CH₂CH₂C(O)-, y
- C(O)CH₂CH₂C(O)-,

- 25 Alternativamente, residuos adecuados de aminoácidos se pueden seleccionar de cualquiera de los L-aminoácidos conocidos de origen natural, por ejemplo, alanina, valina, leucina, etc. y/o una combinación de los mismos, por nombrar sólo unos pocos. L₁₋₆ y L₈ también pueden incluir un péptido que varía en tamaño, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 residuos de aminoácidos.

También se contemplan derivados y análogos de los aminoácidos de origen natural, así como diversos aminoácidos (D o L) conocidos en el arte de origen no natural, hidrófobos o no hidrófobos.

- 30 A Unidades estructurales

1. Grupos salientes o de activación

En aquellos aspectos donde A es un grupo activador, unidades estructurales adecuadas incluyen, sin limitación, grupos tales como N-hidroxibenzotriazolilo, halógeno, N-hidroxifalimidilo, p-nitrofenoxilo, imidazolilo, N-

hidroxisuccinimidilo; tiazolidinil tiona, O-acilo ureas, pentafluorofenoxilo, 2,4,6-triclorofenoxilo u otros grupos salientes adecuados que serán evidentes para los expertos en el arte.

5 Para los propósitos de la presente invención, se entenderá por grupos salientes aquellos grupos que son capaces de reaccionar con un nucleófilo encontrado en el objetivo deseado, esto es, una unidad estructural biológicamente activa, un agente de diagnóstico, una unidad estructural de direccionamiento, un espaciador bifuncional, un intermediario, etc. Así los objetivos contienen un grupo para el desplazamiento, tales como los grupos NH₂ encontrados en proteínas, péptidos, enzimas, moléculas terapéuticas sintetizadas naturalmente o químicamente tales como doxorubicina, espaciadores, tales como diaminas monoprotegidas. Es de entenderse que aquellas unidades estructurales seleccionadas para A también pueden reaccionar con otras unidades estructurales, además de los nucleófilos biológicamente activos.

2. Grupos funcionales

15 A también puede ser un grupo funcional. Ejemplos no limitantes de tales grupos funcionales incluyen maleimidilo, vinilo, residuos de sulfona, hidroxilo, amino, carboxi, mercapto, hidrazida, carbazato y similares que pueden ser unidos a la porción de bicina a través de un espaciador que contiene amina. Una vez unido a la porción de bicina, el grupo funcional (por ejemplo, maleimida), se puede utilizar para unir el polímero de bicina a un objetivo tal como el residuo de cisteína de un polipéptido, aminoácido o péptido espaciador, etc.

3. Grupos alquilo

20 En aquellos aspectos de la fórmula (I) donde A es un grupo alquilo, una lista no limitante de grupos adecuados consiste de C₁₋₆ alquilos, C₂₋₆ alquenos, C₂₋₆ alquinos, C₃₋₁₉ alquilos ramificados, C₃₋₈ cicloalquilos, C₁₋₆ alquilos sustituidos, C₂₋₆ alquenos sustituidos, C₂₋₆ alquinos sustituidos, C₃₋₈ cicloalquilos sustituidos, aralquilos, C₁₋₆ heteroalquilos, y C₁₋₆ heteroalquilos sustituidos.

Unidades estructurales Z y su función

25 En un aspecto de la invención Z es L₇-C(= Y₁₂) en donde L₇ es un enlazador bifuncional seleccionado de entre el grupo que define L₁₋₆, y Y₁₂ es seleccionado de entre los mismos grupos como los que definen Y₁. En este aspecto de la invención, el grupo Z sirve como el enlace entre la L-asparaginasa y el resto del sistema de suministro de polímero. En otros aspectos de la invención, Z es una unidad estructural que es transportada activamente en una célula objetivo, una unidad estructural hidrófoba, y combinaciones de los mismos. El Z' cuando está presente puede servir como un enlazador bifuncional, una unidad estructural que es transportada activamente en una célula objetivo, una unidad estructural hidrófoba, y combinaciones de los mismos.

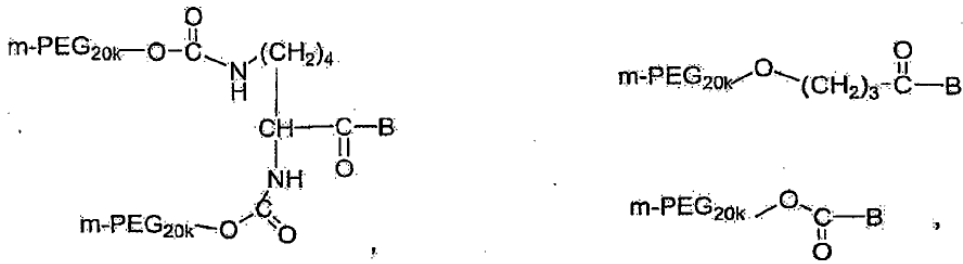
30 En este aspecto de la invención, los sistemas de polímeros liberables se preparan de tal manera que la hidrólisis in vivo escinde el polímero de la L-asparaginasa y libera la enzima en el fluido extracelular, mientras que permanece enlazado a la unidad estructural Z. Por ejemplo, una combinación potencial ZB es leucina-L-asparaginasa

Preparación de conjugados de la L-asparaginasa

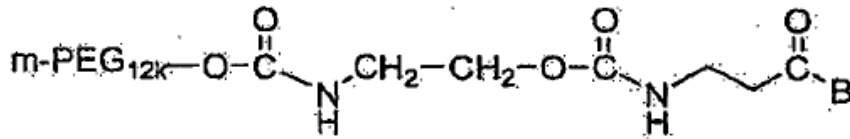
35 Para propósitos de ilustración, las reacciones adecuadas de conjugación incluyen la reacción de L-asparaginasa con un sistema de polímero adecuadamente activado descrito aquí. La reacción se lleva a cabo preferiblemente utilizando condiciones bien conocidas por los expertos en el arte para la modificación de proteínas, incluyendo el uso de un sistema regulado de PBS, etc., con el pH en el rango de aproximadamente 6.6-8.5. Se contempla que en la mayoría de los casos, un exceso del polímero activado se hace reaccionar con la L-asparaginasa.

40 Las reacciones de este orden frecuentemente darán como resultado la formación de conjugados que contienen uno o más polímeros unidos a la L-asparaginasa. Como se apreciará, frecuentemente será deseable aislar las diversas fracciones y proveer un producto más homogéneo. En la mayoría de aspectos de la invención, la mezcla de reacción es recolectada, cargada en una columna de resina adecuada, y las fracciones deseadas son secuencialmente eluidas con niveles crecientes de regulador. Las fracciones se analizaron mediante herramientas analíticas adecuadas para determinar la pureza de la proteína conjugada antes de ser procesadas adicionalmente.

45 Independientemente de la ruta de síntesis y del polímero activado seleccionado, los conjugados se ajustarán a la Fórmula (I) como se define aquí. Algunos de los compuestos preferidos que resultan de las técnicas sintéticas descritas en este documento incluyen:

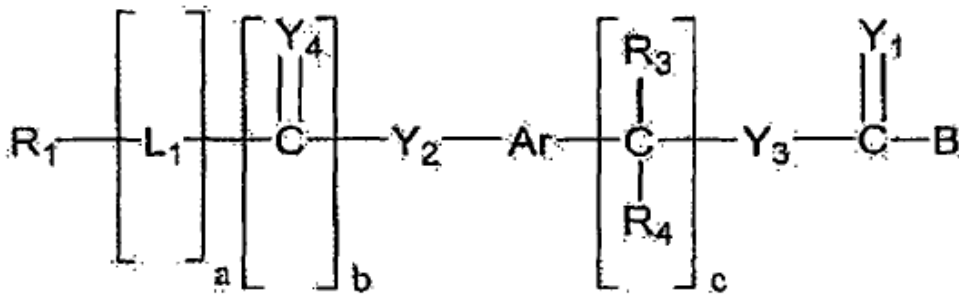


y

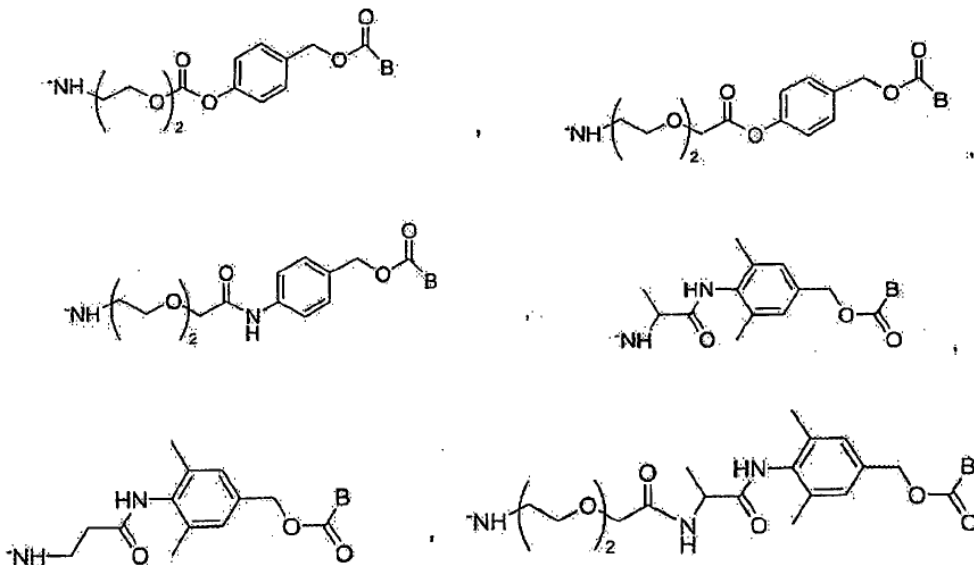


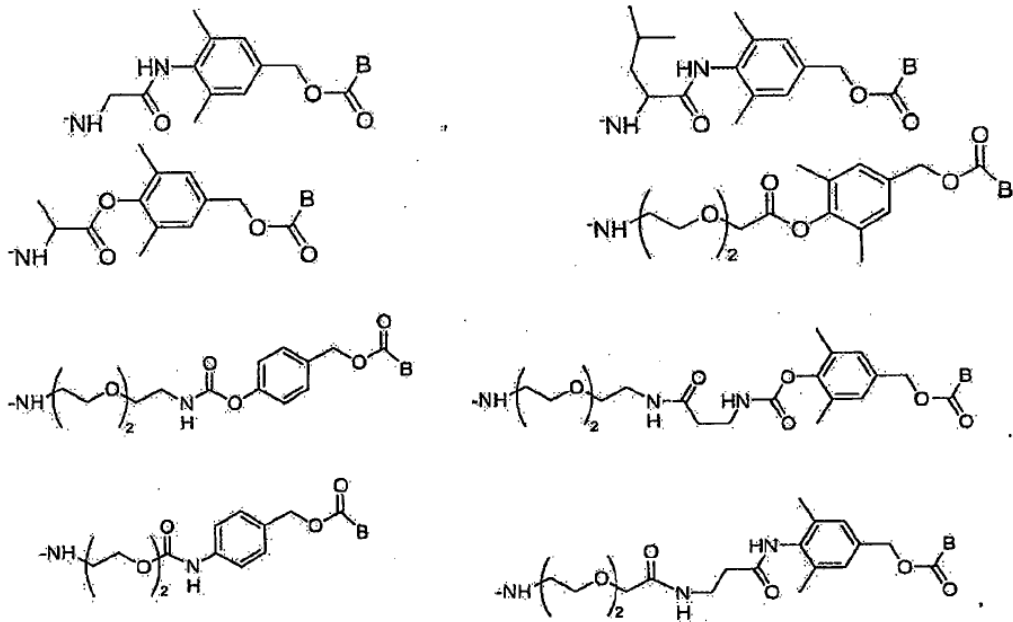
en donde B es L-asparaginasa.

- 5 Conjugados todavía adicionales hechos de acuerdo con la presente invención incluyen:



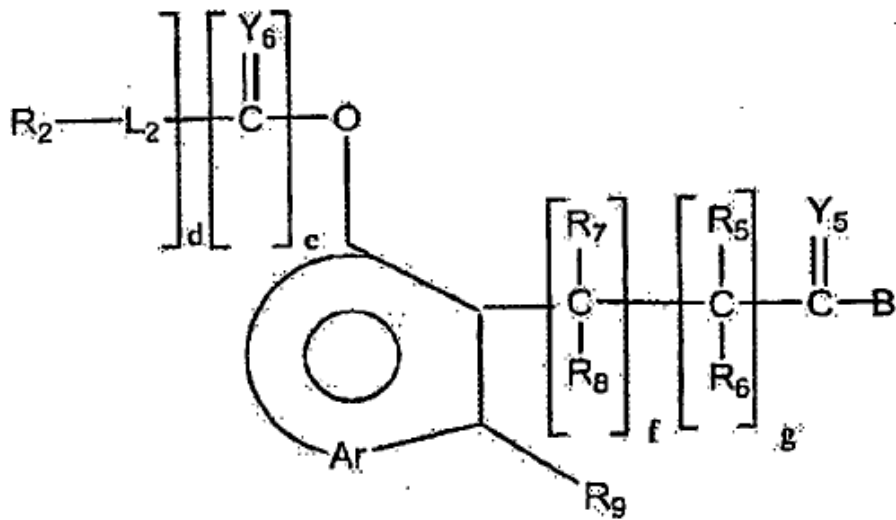
en donde todas las variables son la misma que en lo establecido más arriba. Por ejemplo, algunos de las realizaciones incluidas en los conjugados se seleccionan de entre el grupo que consiste de:





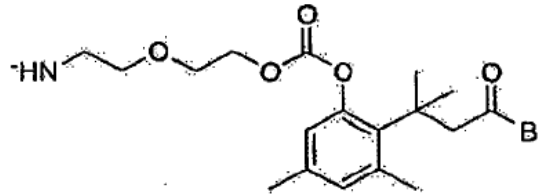
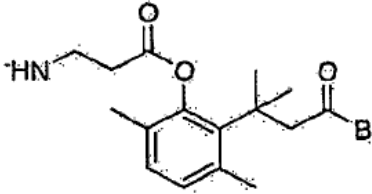
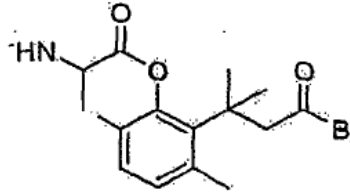
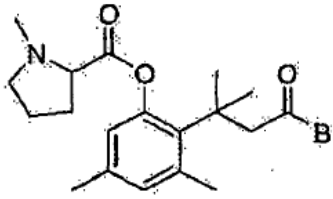
en donde B es L-asparaginasa.

Conjugados adicionales incluyen:

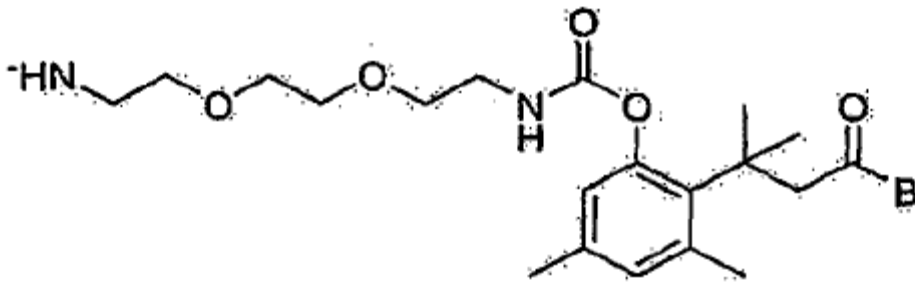


5 en donde B es L-asparaginasa. Una lista no limitante empleada en los conjugados se encuentran entre



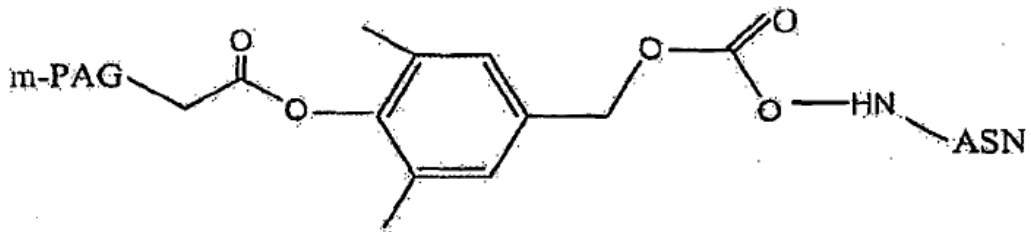


y



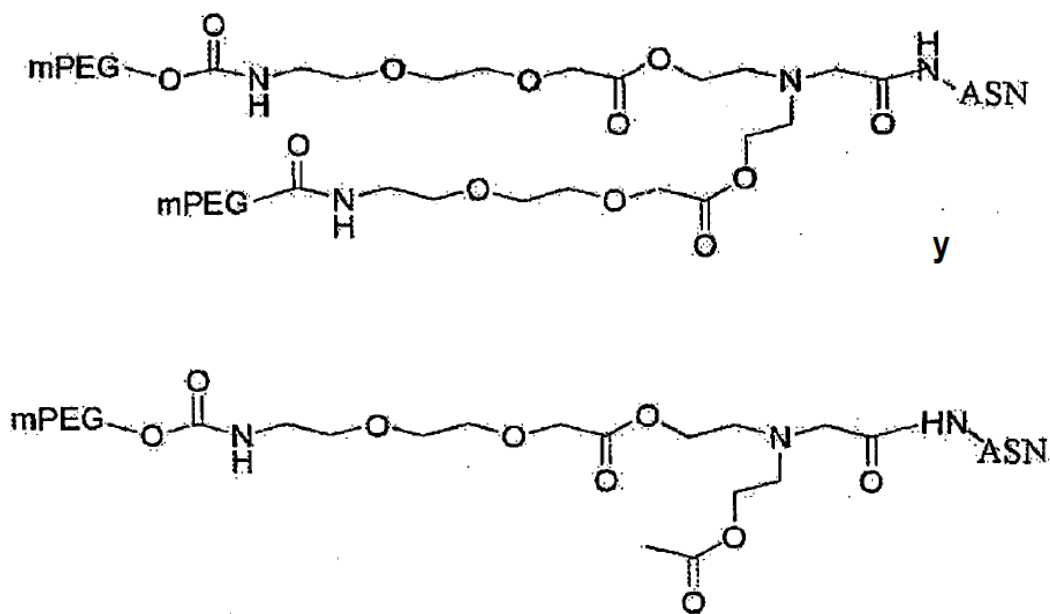
en donde B es L-asparaginasa.

5 Un conjugado particularmente preferido es:



en donde el peso molecular del mPEG es de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 40,000.

Cuando se utilizan los sistemas de polímeros basados en Bicina, dos conjugados preferidos son:



en donde los pesos moleculares de los mPEG son los mismos que anteriormente,

- 5 Hay que anotar que la PEGilación de la L-asparaginasa será optimizada empíricamente para las uniones PEG totales por proteína, tamaño del polímero de PEG, y diseño del enlazante PEG. Las características clave de la L-asparaginasa pegilada para evaluación de la PEGilación, optimización incluyen tanto ensayos in vitro (por ejemplo, actividad y estabilidad enzimática) como ensayos in vivo (por ejemplo, la farmacocinética y farmacodinamia).

Métodos de tratamiento

- 10 La L-asparaginasa producida por el ADN, vectores y células huésped descrita aquí es útil para todos los métodos e indicaciones ya conocidas en el arte para Elspar® (Merck & Co., Inc.) y Oncaspar® (Enzon Pharmaceuticals, Inc.). Así, la enzima L-asparaginasa II de la invención, si está conjugada con óxido de polialquileno, o es una proteína no conjugada es administrada a un paciente que así lo requiere en una cantidad que es efectiva para tratar una enfermedad o trastorno u otra condición que responde a tal tratamiento. La persona experimentada en el arte tendrá evidencia a la cantidades, rutas de administración y programaciones de dosificación adecuadas extrapoladas a partir de las propiedades conocidas de Elspar® y Oncaspar®.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes citados aquí más adelante ilustran ciertos aspectos de la invención.

Ejemplo 1

Secuenciación de la L-asparagina amidohidrolasa, proteína L-asparaginasa II tipo EC-2, EC 3.5.1.1: *E. coli*

- 20 con el fin de obtener las secuencias de aminoácidos de las enzimas L-asparaginasa II disponibles comercialmente de Merck & Co. y Kyowa Hakko Kogyo Co., respectivamente, estas proteínas fueron sometidos a análisis de secuencia de proteínas y comparados con la secuencia del gen de *E. coli* K-12 ansB (GenBank Accession Number M34277).

- 25 La L-asparaginasa II fue secuenciada como sigue. Una alícuota de 2 mL de L-asparaginasa II (80 mg/ml; Merck) fue diluida en agua grado reactivo para producir una solución diluida con una concentración de proteína de 5.0 mg/mL. La solución diluida fue filtrada a través de un filtro de 0.22 μm hacia viales con el fin de reducir la carga biológica antes de llevar a cabo el análisis de secuencias de proteína. De manera similar, se disolvieron 100 mg de L-asparaginasa II (Kyowa Hakko Kogyo) en 20 ml de agua grado reactivo para producir una solución diluida de 5.6 mg/ml y se filtró en condiciones de esterilidad. El análisis cuantitativo de aminoácidos, las determinaciones de secuencias N-terminales, el mapeo de péptidos, y la espectrometría de masas se utilizaron para determinar las secuencias completas de las dos proteínas. Se prepararon fragmentos por digestión triptica, digestión quimotriptica, digestión con Lys-C y bromuro de cianógeno (CnBr) y se separaron por cromatografía líquida de alta presión ("HPLC"), y espectrometría de masas y la secuenciación de aminoácidos se llevó a cabo sobre los péptidos aislados.
- 35 Los análisis completados demostraron una identidad de secuencia aparente entre las dos enzimas de L-asparaginasa II comerciales. Sin embargo, cuatro posiciones de aminoácidos diferían de la secuencia genética

derivada de asparaginasa de *E. coli* K-12. Estas cuatro posiciones diferentes se muestran en la Tabla 1, a continuación.

TABLA 1

Posición del residuo	27	64	252	263
Merck y KH	Ala	Asp	Thr	Asn
K12 AnsB	Val	Asn	Ser	Thr

5 Ejemplo 2

Construcción de la cepa EN538 de *E. coli* que expresa L-asparaginasa II recombinante

El gen que codifica la L-asparaginasa II de *E. coli* K-12 ansB fue adaptado para expresar la L-asparaginasa II con las sustituciones de residuos ilustradas en la Tabla 1 del Ejemplo 1, como sigue. La secuencia de L-asparaginasa II de aminoácidos madura 326 de *E. coli* K-12 ansB es codificada en un segmento de pares de 978 bases tal como lo informaron Jennings MP y Beacham IR (1990 J Bacteriol 172: 1401-1498; GeneBank No. M34277). El gen ansB, que incluye un péptido de señalización de 22 aminoácidos que precede la proteína madura, fue clonado desde otra cepa de *E. coli* K-12 (GX1210; obtenida de Genex Corporation) por métodos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencionales. Específicamente, los oligonucleótidos 5'-TACTGAATTCATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCA-3' (SEQ ID NO: 4) y 5'-ACAGTAAGCTTAGTACTGATTGAAGATCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 5) fueron empleados como cebadores utilizando un termociclador Perkin Elmer Gene Amp 9600, Taq polimerasa, y reactivos estándar con estos parámetros de ciclización: 30 segundos 94°C, 30 segundos 40°C, 1 minuto 72°C, para 25 ciclos.

La banda ~ 1 kb amplificada fue purificada sobre electroforesis en gel de agarosa TBE, digerida con Eco RI y Hind III, y clonada en el vector de bacteriófago M13mp8. La secuencia de ADN del gen ansB [Genebank No. M34277] fue confirmada por métodos de secuenciación manuales de dideoxi ADN. El gen ansB clonado fue utilizado a continuación en mutagénesis dirigida al sitio para cambiar cuatro codones del gen ansB [GTG a GCG en la base 530; AAT a GAT en la base 640; TCT a ACT en la base 1205 y ACC a AAC en la base 1239] para codificar los aminoácidos alternos (Val27Ala; Asn64Asp; Ser252Thr y Thr263Asn) utilizando el kit de mutagénesis Amersham RPN 1253 versión 2 como lo describen Whitlow y Filpula [Single Chain Fvs, In Tumour Immunology. A Practical Approach, Ed. G. Gallagher, R.C. Rees, and C.W. Reynolds, 1993, Oxford University Press, pp 279-291].

Específicamente, los oligonucleótidos mutagénicos empleados fueron 5'-CAACTTTACCCGCTGTGTAGTTAG-3' (SEQ ID NO: 6) para el cambio en Val27Ala; 5'-CAGCCAGACATCATCGTTTCATGTC-3' (SEQ ID NO: 7) para el cambio en Asn64Asp; 5'-GTCGAACACAGTTTTTATACAGGTTGC-3' (SEQ ID NO: 8) para el cambio en Ser252Thr; 5'-CTGCAGTACCGTTTTTCGCGCGG-3' (SEQ ID NO: 9) para el cambio en Thr263Asn. Todos los cuatro cambios fueron hechos en un lote sencillo y la secuenciación de ADN confirmó la secuencia del gen ansB modificado [designado aquí como gen ansB* (SEQ ID NO: 2)].

La clonación del gen ansB* en el plásmido pET-27b+ (Novagen Corporation) se logra introduciendo los sitios de restricción de flanqueo, NdeI y BamHI, en los terminales 5' y 3' del gen, respectivamente, por amplificación por PCR. Después de la digestión del ADN sintético con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, el gen de 1 kilobase fue ligado a través de T4. ADN ligasa al vector de plásmido pET-27b(+), el cual también había sido digerido con estas dos enzimas. El plásmido recombinante fue introducido en la cepa de *E. coli* BLR (DE3) por electroporación utilizando un BTX Electro Cell Manipulator 600 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La construcción del vector pET coloca el gen ansB* por detrás de un promotor T7 el cual es inducible, como consecuencia de la adición de IPTG. La IPTG induce la expresión del gen cromosómico de T7 ARN polimerasa bajo el control de un promotor lacUV5 y la T7 ARN polimerasa que transcribe el gen ansB* produciendo la expresión a alto nivel del producto de proteína ansB*.

La mezcla de transformación fue sembrada sobre placas de agar LB que contenían kanamicina (15 µg/ml) para permitir la selección de colonias que contenían el plásmido pET-27b(+)/ansB*. Este es designado como plásmido pEN537, como se ilustra en la Figura. 1. Se purificaron adicionalmente colonias aisladas sembrando y analizando la expresión del gen inducible IPTG por métodos estándar tal como los descritos en Novagen pET System Manual Ninth Edition. Las secuencias genéticas fueron verificadas utilizando un Applied Biosystems Prism310 Genetic Analyze.

Ejemplo 3

Expresión de L-asparaginasa II recombinante y caracterización parcial de la enzima.

La cepa EN538 fue cultivada en medio LB a 37° C con kanamicina (15 µg/ml). A OD₆₀₀ de aproximadamente 0.8, se agregó IPTG (1 mM) al cultivo y se permitió la inducción de la expresión del gen para avanzar, durante 2, 3, o 4 horas. El análisis por SDS-PAGE del cultivo confirmó un alto nivel de expresión del polipéptido ansB* de 34.6 kDa. La inmunoprecipitación Western utilizando anticuerpo policlonal de conejo anti-asparaginasa II de *E. coli* confirmó que la banda de proteína principal inducida sobre SDS-PAGE era L-asparaginasa II.

Puesto que la L-asparaginasa II normalmente es secretada normalmente al espacio periplasmático que sigue a la eliminación del péptido de señalización, se llevaron a cabo experimentos adicionales para examinar la localización de la asparaginasa en las células o el medio. El cultivo fue centrifugado y las células convertidas en pellas fueron resuspendidas en una solución de lisozima para romper las paredes celulares antes de examinar las proteínas asociadas a la célula solubles e insolubles, más las proteínas liberadas en el medio de crecimiento durante el cultivo, mediante SDS-PAGE.

Estos análisis demostraron que, una inducción bien sea de 3 o de 4 horas a 37°C provee una expresión casi máxima de ansB* de aproximadamente 30% de las proteínas celulares totales. Al menos el 70% de la asparaginasa puede ser solubilizada a partir de la pella celular por tratamiento con lisozima. La cantidad de asparaginasa liberada hacia el medio de crecimiento durante el cultivo es aproximadamente 25% de la asparaginasa total expresada.

La asparaginasa solubilizada liberada del periplasma por tratamiento con lisozima fue examinada adicionalmente en cuanto su actividad enzimática utilizando un ensayo de RP-HPLC que mide el ácido aspártico, el producto de la reacción de la asparaginasa a partir del sustrato, asparagina. La actividad enzimática en extractos crudos de muestras inducidas por IPTG fue de aproximadamente 60 IU/mg, mientras que sólo aproximadamente 2 IU/mg en muestras preparadas de cultivos no inducidos. Puesto que la proteína solamente es un 20% pura en esta etapa, esto se compara bien con la actividad específica reportada de la asparaginasa II pura (~250-300 IU/mg). El análisis de secuencia N-terminal de esta preparación de asparaginasa también fue logrado utilizando un secuenciador de proteínas Applied BioSystems PROCISE. La secuencia en N-terminal LPNITLATGGTIAGGGDSA (SEQ ID NO: 10) coincide exactamente con la secuencia de proteína N-terminal predicha de asparaginasa madura, correctamente procesada. El análisis por LC-MS (columna en fase reversa Júpiter C-18) también fue llevado a cabo sobre esta muestra. La especie proteínica principal demostró una masa de 34,592, que coincide exactamente con la masa predicha como asparaginasa ansB* madura. No se observaron evidencias de una especie proteínica que portara sustituciones de norleucina.

Ejemplo 4

Secuencias de codificación de proteína de L-asparaginasa II (genes ansB y ansB*) del plásmido pEN537 y cromosoma BLR de *E. coli*

El ADN cromosómico fue preparado a partir de BLR (DE3) de *E. coli* [obtenido en Novagen Corporation; Cat. No. 69208-3]. Un cultivo de 2 ml de BLR creciendo en medio LB con kanamicina (15 µg/ml) a 37°C fue centrifugado durante 2 minutos en una microcentrífuga y la pella celular fue resuspendida en 0.5 ml de regulador STET. Se agregó fenol/cloroformo (0.5 ml) y la mezcla fue sometida a vórtex y centrifugada durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recolectado y mezclado con 50 µl de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol. Después de incubar sobre hielo durante 10 minutos, el ADN fue convertido en pella por centrifugación y resuspendido en 100 µl de agua. Se llevó a cabo PCR sobre la muestra para aislar el gen ansB cromosómico. La mezcla de reacción por PCR contenía 5 µl de regulador 10X High Fidelity PCR, 5 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 1 µl de MgSO₄ 50 mM, 0.5 µl (50 pmol) de oligonucleótido.

5'-GATCCATATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCAC-3' (SEQ ID NO: 11),

0.5 µl (50 pmol) de oligonucleótido

5'-GTACGGATCCTCATTAGTACTGATTGAAGATC-3' (SEQ ID NO: 12),

1 µl de ADN de BLR, 36 µl de agua destilada y 1 µl de polimerasa Platinum Taq High Fidelity. El producto de PCR fue clonado utilizando el sistema de clonación comercial TOPO obtenido de Invitrogen Corporation y llevado a cabo como lo describe el fabricante.

La reacción de clonación utilizando el producto de PCR y el vector TOPO TA fue llevada a cabo en 6 µl a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto de ligación de la reacción fue transformado en células de *E. coli* TOP 10 competentes y sembrado sobre placas de agar con LB con selección por kanamicina. El análisis de la secuencia del ADN del gen cromosómico ansB BLR clonado y del gen pEN537 ansB* fue llevada a cabo sobre los plásmidos utilizando un Applied Biosystems Prism 310 Genetic Analyzer. Ambas cadenas fueron secuenciadas. Las secuencias de codificación del gen BLR ansB y del gen pEN537 ansB* difieren en 29 asignaciones de bases no coincidentes en las secuencias de codificación de la proteína madura. Sin embargo, ninguna de estas sustituciones de bases dio como resultado una alteración en la secuencia de aminoácidos debido a degeneración del codón. La proteína de ansB codificada a partir de BLR y la proteína de ansB* codificada a partir de pEN537 se confirmaron

como idénticas en secuencia de aminoácidos. Todas las 326 posiciones demostraron ser idénticas en estas dos proteínas asparaginasa.

Ejemplo 5

Purificación a partir de células y medio de cultivo

- 5 Los siguientes procesos fueron adaptados de Harms et al., 1991 Protein Expression and Purification 2: 144-150.

Cultivos de cepa de *E. coli* EN538, como se describieron más arriba, son cultivados en caldo Luria en la presencia de kanamicina (15 µg/ml) a 37°C, en una incubadora con agitación. A una OD₆₆₀ de 0.8, se agrega IPTG hasta una concentración final de 1 mM y el crecimiento continuó durante 4 horas adicionales. Las células son recolectadas por centrifugación. Para propósitos analíticos, se utilizan cultivos de 2 ml.

- 10 Para hacer los extractos celulares, las pellas son resuspendidas en 1 ml de regulador de ruptura (KPO 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, ditioneitol 0.5 mM) y las células fueron rotas por microfluidización. Los residuos celulares son eliminados por centrifugación y el fluido sobrenadante es probado en cuanto la actividad de L-asparaginasa II y también utilizado para establecer la producción de enzima por electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). El fraccionamiento por choque osmótico se lleva a cabo como lo describen Boyd et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8525-8529, incorporado aquí como referencia. En resumen, la pella es suspendida en 2 ml de regulador de esferoblastos (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, sacarosa 0.5 M, EDTA 0.5 mM), se incubó sobre hielo durante 5 minutos y se centrifugó. La pella es calentada hasta temperatura ambiente, resuspendida en 0.3 ml de agua enfriada con hielo, incubada sobre hielo durante 5 minutos, y de nuevo centrifugada. La fracción periplasmática sobrenadante es utilizada sin tratamiento adicional para la determinación de la actividad y la electroforesis.

- 20 Purificación de la enzima

Para preparaciones de L-asparaginasa II a gran escala las células se cultivan en cultivos por lotes (10 litros) y se someten a choque osmótico como se indicó más arriba. Por litro de cultivo se emplean volúmenes de 50-100 ml de regulador de esferoblastos y 30-40 ml de agua. El protocolo siguiente comienza con el extracto periplasmático obtenido a partir de un cultivo de 2 litros. Todas las etapas se llevaron a cabo a 5-10°C.

- 25 Fraccionamiento con sulfato de amonio

A 100 ml de un fluido de sobrenadante se agregaron 29.5 g de sulfato de amonio sólido para dar 50% de saturación. Después de 2 horas el precipitado es eliminado por centrifugación, y se descarta la pella. El sobrenadante fue llevado a 90% de saturación con sulfato de amonio (27.2 g a 100 ml). Después de que la pella se deja en reposo durante la noche es recolectada por centrifugación, disuelta en unos pocos mililitros de regulador de piperazina-HCl 25 mM, pH 5.5, y dializada contra el mismo regulador. Este mismo proceso se aplica también al medio de cultivo celular remanente para recuperar la L-asparaginasa II secretada.

- 30

Cromatografía

Una columna de 1 x 30 cm de intercambiador Poliregulador PBE 94 fue equilibrada con 200 ml del regulador de piperazina-HCl anterior (regulador de partida). Después de que la solución de muestra (10 ml) es aplicada, la columna es eluida con 200 ml de regulador de elución (Poliregulador 74, diluido 10 veces con H₂O y ajustado a pH 4.0 con HCl) a una tasa de flujo de 30 ml/h. Se recolectan fracciones de 2 ml y se prueban en cuanto a la actividad de L-asparaginasa II después de una dilución apropiada de muestras de 20 µl. Las fracciones que contenían la asparaginasa fueron reunidas y dializadas contra solución saturada de sulfato de amonio. La pella de la enzima es lavada con sulfato de amonio al 90% y almacenada como una suspensión en este medio.

- 40 Ejemplo 6

Purificación de células y medio de cultivo

Cultivos de la cepa EN538 de *E. coli*, tal como se describió más arriba, son cultivados en medio de cultivo [por ejemplo, como se describe en Filpula, D., McGuire, J. y Whitlow, M. (1996) Production of single-chain Fv monomers and multimers, In Antibody Engineering: A Practical Approach (J. McCafferty, H. Hoogenboom, and D.J. Chiswell, eds.; Oxford University Press, Oxford, UK) pp. 253-268] en la presencia de kanamicina (15 µg/ml) a 25°C hasta 37°C, en un fermentador. A una OD₆₆₀ de 20 a 200, se agrega IPTG hasta una concentración final de 0.1-1 mM y el crecimiento continuó durante 1-12 horas adicionales. Las células fueron recolectadas por centrifugación y pasadas a través de un homogeneizador celular Manton-Gaulin. El lisado celular es centrifugado a 24,300 g durante 30 minutos a 6°C y el sobrenadante es recolectado y sometido a ultrafiltración/diafiltración, y la conductividad es ajustada a 3 mS. El pH del lisado es ajustado a 4.1 con ácido acético al 25% y diafiltrado con regulador de acetato de sodio 5 mM, NaCl 25 mM, pH 4.1.

- 45
- 50

La asparaginasa es capturada por cromatografía de columna de intercambio catiónico en S-Sepharose. La asparaginasa unida es eluida con fosfato de potasio 12.5 mM, NaCl 25 mM, pH 6.4 (regulador NK64).

5 Las fracciones pico de asparaginasa recolectadas de la cromatografía en S-Sepharose fueron reunidas y se agregó Tween 80 al 0.1% y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agrega un volumen de regulador NK64 y la muestra es cargada sobre una columna Q-Sepharose. La columna Q es lavada con regulador Q-25 (NaCl 25 mM, fosfato de potasio 10 mM pH 6.4) y la asparaginasa es eluida entonces con regulador Q-135 (NaCl 135 mM en fosfato de potasio 10 mM pH 6.4).

10 A las fracciones enzimáticas reunidas se agrega sulfato de magnesio en polvo hasta una concentración final de 0.25 M y se cargan sobre una columna de interacción fenil hidrófoba preequilibrada con MgSO₄ 0.25 M en fosfato de potasio 10 mM, pH 7.8. La asparaginasa es recolectada en el flujo a través de la fracción y diafiltrada en una unidad Filtron utilizando una membrana de polisulfona de corte de peso molecular de 30 kDa con el regulador, NaCl 75 mM, fosfato de potasio 1 mM, pH 7.2.

15 La fracción de asparaginasa es diluida con un volumen igual de agua y cargada sobre una columna de hidroxiapatita. Las impurezas son eliminadas con elución con regulador H15 (NaCl 50 mM, fosfato de potasio 15 mM, pH 7.8). La asparaginasa purificada es eluida con regulador H150 (NaCl 50 mM, fosfato de potasio 150 mM, pH 7.8).

Ejemplo 7

Purificación desde células y medio de cultivo

20 Cultivos de *E. coli* cepa EN538, crecidos, inducidos, y homogeneizados como se describió en el Ejemplo 6, son diafiltrados contra acetato de sodio 20 mM, NaCl 40 mM, pH 4.6 con 8 volúmenes de producto con una fibra hueca Microgon de 50 kDa a una rata de flujo de 2.9 L/minuto, 16 psi hasta que la A₂₈₀ es menor de 0.1 y la conductividad es 5 mS. El producto es filtrado utilizando una membrana de 0.22 µm.

25 Se lleva a cabo cromatografía de intercambio catiónico con una columna Poros-HS. La columna es equilibrada con acetato de sodio 20 mM, pH 4.6, NaCl 40 mM. El medio clarificado diafiltrado es cargado sobre un volumen de columna de 0.5 (CV)/minuto y la columna es lavada con 5 CV de acetato de sodio 20 mM, pH 4.6, NaCl 40 mM. La asparaginasa es eluida con acetato de sodio 20 mM, pH 4.6, NaCl 135 mM.

Al producto anterior se agrega fosfato de sodio dibásico 0.2 M, pH 9.2 para ajustar el pH a 6.3. La muestra es luego diafiltrada contra fosfato de sodio 10 mM, pH 6.3 con un filtro de fibra hueca Microgon kDa 50 a una rata de flujo de 0.74 L/minuto, 16.5 psi.

30 Se lleva a cabo cromatografía de intercambio aniónico sobre Fractogel TMAE. La columna es equilibrada con acetato de sodio 10 mM, pH 6.4. El eluido de la columna catiónica diafiltrado es cargado a 0.5 CV/minuto y la columna es lavada con 5 CV de acetato de sodio 10 mM, pH 6.4. La columna es lavada adicionalmente con 5 CV de acetato de sodio 10 mM, pH 6.4, NaCl 25 mM. La asparaginasa es eluida con acetato de sodio 10 mM, pH 6.4, NaCl 100 mM.

35 El producto es diafiltrado contra fosfato de sodio 10 mM, pH 7.5 con una membrana de 50 kDa hasta una concentración de 40 mg/ml y filtrada a través de una membrana de 0.22 µm.

Listado de secuencias

<110> Filpula, David R.

40 Maoliang, Wang R.

<120> HUÉSPED RECOMBINANTE PARA LA PRODUCCIÓN DE L-ASPARAGINASA II

<130> 213.1239-U-PCT

<140> PCTUS0770706

<141> 2007-06-08

45 <150> Aún no conocido

<151> En la misma fecha

<150> 60/817,817

<151> 2006-06-30

<160> 12

<170> PatentIn version 3.4

5 <210> 1

<211> 326

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Leu Pro Asn Ile Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

10

Lys Gly Glu Gln Val Val Asn Ile Gly Ser Gln Asp Met Asn Asp Asp
 50 55 60

Val Trp Leu Thr Leu Ala Lys Lys Ile Asn Thr Asp Cys Asp Lys Thr
 65 70 75 80

Asp Gly Phe Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Met Glu Glu Thr Ala
 85 90 95

Tyr Phe Leu Asp Leu Thr Val Lys Cys Asp Lys Pro Val Val Met Val
 100 105 110

Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ser Met Ser Ala Asp Gly Pro Phe Asn
 115 120 125

Leu Tyr Asn Ala Val Val Thr Ala Ala Asp Lys Ala Ser Ala Asn Arg
 130 135 140

Gly Val Leu Val Val Met Asn Asp Thr Val Leu Asp Gly Arg Asp Val
 145 150 155 160

Thr Lys Thr Asn Thr Thr Asp Val Ala Thr Phe Lys Ser Val Asn Tyr
 165 170 175

Gly Pro Leu Gly Tyr Ile His Asn Gly Lys Ile Asp Tyr Gln Arg Thr
 180 185 190

Pro Ala Arg Lys His Thr Ser Asp Thr Pro Phe Asp Val Ser Lys Leu
 195 200 205

Asn Glu Leu Pro Lys Val Gly Ile Val Tyr Asn Tyr Ala Asn Ala Ser
 210 215 220

Asp Leu Pro Ala Lys Ala Leu Val Asp Ala Gly Tyr Asp Gly Ile Val
 225 230 235 240

Ser Ala Gly Val Gly Asn Gly Asn Leu Tyr Lys Thr Val Phe Asp Thr
 245 250 255

Leu Ala Thr Ala Ala Lys Asn Gly Thr Ala Val Val Arg Ser Ser Arg
 260 265 270

Val Pro Thr Gly Ala Thr Thr Gln Asp Ala Glu Val Asp Asp Ala Lys
 275 280 285

Tyr Gly Phe Val Ala Ser Gly Thr Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg Val
 290 295 300

ES 2 553 329 T3

Leu Leu Gln Leu Ala Leu Thr Gln Thr Lys Asp Pro Gln Gln Ile Gln
305 310 315 320

Gln Ile Phe Asn Gln Tyr
325

<210> 2

<211> 1530

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 2

ES 2 553 329 T3

aaatggg	cgcg	gaaagcgg	ctgaaaag	cgcgtaacc	attacagaat	gtgctggg	60
gcctggga	ag	cctggggg	ctgcaatc	caatccaa	ac	cgagtggaa	120
aagattt	cca	gcagttt	ggc	aaagatg	ttt	gtagccg	180
gcaaagc	ccct	ggtcggg	aat	ttaaaata	at	cctctat	240
tatgccc	gtt	aattctt	cg	tttgttac	ct	gcctcta	300
ttcacg	ttgt	aaattgt	tta	acgtcaa	att	tcccata	360
cgttcac	gta	actggag	gaa	tgaaatg	gag	tttttca	420
gttatgg	gtt	ttagtgg	tgc	agcattg	gca	ttacca	480
gggacc	attg	ccggtgg	tgg	tgactcc	gca	accaa	540
ggcgta	gaaa	atctgg	tta	tgcggtg	ccg	caactaa	600
gagcag	gtag	tgaata	tcg	ctcccag	gac	atgaac	660
aaaaaa	aatta	acaccg	actg	cgataag	acc	gacggc	720
acgatg	ggaag	aaactg	ctta	cttcc	tcgac	ctgacg	780
atggtc	ggcg	caatgc	gtcc	acgtct	atgag	cgcgag	840
aacgcg	gtag	tgaccg	cagc	tgataaa	gccc	tccgcca	900
aatgac	accg	tgcttg	atgg	ccgtgac	gtc	acaaaa	960
ttcaag	tctg	ttaact	acgg	tccctc	gggt	tacatt	1020
cgtacc	cccg	cacgta	agca	taccag	cgcac	acgccat	1080
ctgccg	aaag	tcggc	attgt	ttataa	ctac	gctaac	1140
ctggta	gatg	cgggct	atga	tggcat	cg	ttt	1200
aaaact	gtgt	tcgac	cagct	ggcgac	cgc	gcaaaa	1260
tcccgc	gtac	cgacgg	gcgc	taccact	cag	gatgcc	1320
ttcgtc	gcct	ctggc	acgct	gaacc	cgc	aaagc	1380
acgcaa	acca	aagat	ccgc	gcagat	ccag	cagatc	1440
cccgta	tatc	tgccgg	ggct	ttttc	acttc	agactc	1500
ccta	atgata	atcacc	gga	taaatt	at	tttaatt	1530

<210> 3

<211> 1044

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 3

ES 2 553 329 T3

atggagtttt tcaaaaagac ggcacttgcc gcaactggta tgggttttag tgggtgcagca 60
 ttggcattac ccaatatcac catttttagca accggcgagg ccattgccgg tgggtggtgac 120
 tccgcaacca aatctaacta cacagcgggt aaagttggcg tagaaaatct ggttaatgcg 180
 gtgccgcaac tgaaggacat tgcgaacggt aaaggcgagc aggtagtgaa tattggctcc 240
 caggacatga acgatgatgt ctggctgaca ctggcgaaaa aaattaacac cgactgcgat 300
 aaaactgacg gcttcgtcat taccoacggt accgacacga tgggaagaaac cgcttacttc 360
 ctcgacctga cggtgaaatg cgacaaaccg gtgggtgatgg tcggtgcaat gcgtccgtcc 420
 acgtctatga gcgcagacgg tccattcaac ctgtataacg cggtagtgac tgcagctgat 480
 aaagcctccg ctaatcgtgg cgtactggta gtgatgaacg acaccgtgct tgatggcgt 540
 gatgtcacca aaaccaacac caccgatgta gcgacctca agtctgttaa ctacggtcct 600
 ctgggttaca ttcacaacgg taagattgac taccaacgta ccccggcacg taagcacacc 660
 agcgacacgc cgttcgatgt ctctaagctg aatgaactgc cgaaagtcgg cattgtttat 720
 aactacgcta acgcatccga tcttccggct aaagcactgg tagatgcggg ctatgatggc 780
 atcgttagcg ctggcgtggg taacggcaac ctgtataaaa ccgtatttga cacccttga 840
 accgctgcga aaaacggcac tgcagtagtg cgttcttccc gcgtaccgac gggcgctacc 900
 actcaggatg ccgaagtgga tgatgcgaaa tacggcttcg tcgcctctgg cacgttgaac 960
 ccgcaaaaag cgcgcgttct gctgcaactg gctctgacgc aactaaaga tccgcagcag 1020
 atccagcaga tcttcaatca gtac 1044

<210> 4

<211> 34

<212> ADN

5 <213> cebador de oligonucleótido

<400> 4

tactgaattc atggagtttt tcaaaaagac ggca 34

<210> 5

<211> 33

10 <212> ADN

<213> cebador de oligonucleótido

<400> 5

acagtaagct tagtactgat tgaagatctg ctg 33

<210> 6

15 <211> 24

<212> ADN

<213> cebador de oligonucleótido
 <400> 6
caactttacc cgctgtgtag ttag 24

<210> 7
 5 <211> 24
 <212> ADN
 <213> cebador de oligonucleótido
 <400> 7
cagccagaca tcatcgttca tgtc 24

10 <210> 8
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> cebador de oligonucleótido
 <400> 8
gtcgaacaca gttttataca ggttgc 26

15 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> cebador de oligonucleótido

20 <400> 9
ctgcagtacc gtttttcgcg gcgg 24

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT

25 <213> Escherichia coli
 <400> 10
Leu Pro Asn Ile Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Gly
 1 5 10 15
Gly Asp Ser Ala
 20
 <210> 11

<211> 32

<212> ADN

<213> cebador de oligonucleótido

<400> 11

gatccatag gagtttttca aaaagacggc ac

32

5

<210> 12

<211> 32

<212> ADN

<213> cebador de oligonucleótido

10

<400> 12

gtacggatcc tcattagtac tgattgaaga tc

32

Reivindicaciones

- 5 1. Una célula huésped de *Escherichia coli* recombinante para producir una enzima L-asparaginasa II de *Escherichia coli*, que comprende un cromosoma de *Escherichia coli* y al menos una copia de un vector extracromosómico recombinante, en donde el vector extracromosómico recombinante codifica una subunidad de la enzima L-asparaginasa II, en donde el cromosoma de la célula huésped también codifica la misma subunidad de la enzima L-asparaginasa II, en donde el cromosoma huésped no codifica ninguna otra isoforma de L-asparaginasa II, en donde la subunidad de L-asparaginasa II codificada comprende SEQ ID NO: 1; y el vector extracromosómico recombinante comprende una molécula de ADN que comprende SEQ ID NO: 2.
- 10 2. La célula huésped de *Escherichia coli* recombinante de la reivindicación 1, en donde el vector extracromosómico es un plásmido.
3. La célula huésped de *Escherichia coli* recombinante de la reivindicación 1 en donde el vector extracromosómico recombinante comprende una molécula de ADN que codifica la subunidad de la enzima L-asparaginasa II que está conectado operativamente a un promotor adecuado.
- 15 4. La célula huésped de *Escherichia coli* recombinante de la reivindicación 3 en donde el promotor es seleccionado del grupo consistente de los promotores T7, araB, $\lambda P_R/\lambda P_L$, phoA, trc, y trp.
- 20 5. La célula huésped de *Escherichia coli* recombinante de la reivindicación 3 en donde el vector extracromosómico recombinante comprende adicionalmente un operador, un sitio de enlazamiento al ribosoma, una secuencia de señalización, un terminador de la transcripción, un marcador de selección de antibiótico, un origen de replicación, y una copia regulada del represor.
6. La célula huésped de *Escherichia coli* recombinante de la reivindicación 3 en donde el cromosoma comprende una molécula de ADN de acuerdo con SEQ ID NO: 3.
7. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una subunidad de enzima L-asparaginasa II de SEQ ID NO: 1 en donde la molécula de ácido nucleico aislada consiste de un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.
- 25 8. Un vector extracromosómico recombinante, en donde el vector extracromosómico recombinante comprende SEQ. ID NO: 2 y codifica una subunidad de la enzima L-asparaginasa II.
9. El vector extracromosómico de la reivindicación 8 en donde el vector es un plásmido.
10. El vector extracromosómico de la reivindicación 9 en donde el vector es el plásmido pEN537.
- 30 11. La célula huésped de *Escherichia coli* que comprende el plásmido de la reivindicación 2 en donde el plásmido es pEN537, designado como EN538 y depositado como ATCC Number PTA 7490.
12. Un método para producir una enzima L-asparaginasa II recombinante sustancialmente libre de otros isómeros de L-asparaginasa II, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 11 y aislar la enzima L-asparaginasa II producida.
- 35 13. Una molécula de ADN aislada que codifica una subunidad de la enzima L-asparaginasa II que comprende SEQ ID NO: 2.
14. El vector extracromosómico recombinante de la reivindicación 8, en donde SEQ ID NO: 2 está conectado operativamente a un promotor adecuado.
15. El vector extracromosómico recombinante de la reivindicación 14 en donde el promotor es seleccionado del grupo consistente de los promotores T7, araB, $\lambda P_R/\lambda P_L$, phoA, trc y trp.

40

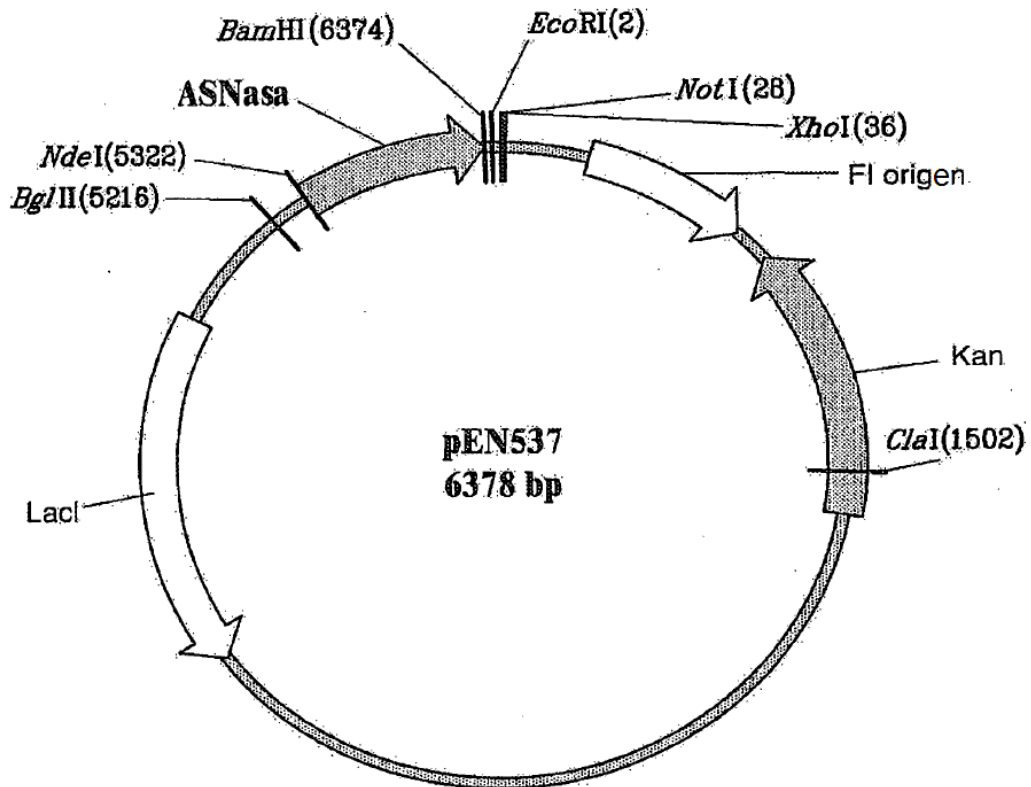


FIG. 1