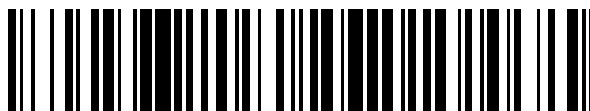


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 139**

51 Int. Cl.:

C12N 9/50 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09824219 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2350273**

54 Título: **Composiciones de arginasas humanas modificadas por ingeniería y métodos para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

31.10.2008 US 110218 P

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

15.06.2016

73 Titular/es:

AERASE, INC. (100.0%)
901 S. MoPac Expressway, Barton Plaza One,
Suite 250
Austin, TX 78746, US

72 Inventor/es:

GEORGIU, GEORGE y
STONE, EVERETT

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 574 139 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

Composiciones de arginasas humanas modificadas por ingeniería y métodos para tratar el cáncer

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 61/110.218, presentada el 31 de octubre de 2008.

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La invención se refiere de manera general al tratamiento de cáncer con enzimas que empobrecen la L-arginina en suero. En algunas realizaciones, el cáncer es uno que no expresa, o es de otro modo deficiente en, argininosuccinato sintetasa (ASS), ornitina transcarbamilasa (OTC), u otras enzimas requeridas para la biosíntesis de arginina.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 Desde hace más de 50 años se ha reconocido que determinadas células tumorales tienen una alta demanda de aminoácidos, tales como L-arginina, y se destruyen en condiciones de empobrecimiento de L-arginina (Wheatley y Campbell, 2002). En células humanas, la L-arginina se sintetiza en dos etapas; en primer lugar la argininosuccinato sintetasa (ASS) convierte L-citrulina y aspartato en argininosuccinato, seguido por conversión de argininosuccinato en L-arginina y fumarato mediante argininosuccinato liasa. La propia L-citrulina se sintetiza a partir de L-ornitina y fosfato de carbamoilo mediante la enzima ornitina transcarbamilasa (OTC). Un gran número de carcinomas hepatocelulares, melanomas y, tal como se descubrió recientemente, carcinomas de células renales (Ensor *et al.*, 2002; Feun *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2007) no expresan ASS y por tanto son sensibles al empobrecimiento de L-arginina. La base molecular para la falta de expresión de ASS parece ser diversa e incluye regulación génica aberrante y defectos de corte y empalme. Mientras que las células no malignas entran en quiescencia (Go) cuando se empobrecen en cuanto a L-arginina y por tanto permanecen viables durante varias semanas, las células tumorales tienen defectos en el ciclo celular que conducen al reinicio de la síntesis de ADN aunque se inhibe la síntesis de proteínas, dando a su vez como resultado desequilibrios principales y muerte celular rápida (Shen *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2000). La toxicidad selectiva del empobrecimiento de L-arginina para HCC, melanoma y otras células cancerosas deficientes en ASS se ha demostrado ampliamente *in vitro*, en modelos de animal con xenoinjerto y en ensayos clínicos (Ensor *et al.*, 2002; Feun *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2006; Izzo *et al.*, 2004). Recientemente Cheng *et al.* (2007) demostraron que muchas HCC células también son deficientes en la expresión de ornitina transcarbamilasa y, por tanto, también son sensibles al empobrecimiento de L-arginina enzimática.

Además, Carvajal *et al.* (2008, Molecular Biology of the Cell, Vol. 13, suplemento, pág. 546A) dan a conocer consecuencias de mutaciones de ligandos metálicos en arginasa I hepática humana.

Además, Rehner *et al.* (1970, Medizin und Ernährung, págs. 32-35) examinan los efectos de manganeso, cobalto y níquel sobre la actividad de la arginasa hepática.

35 Existe interés en el uso de enzimas hidrolíticas de L-arginina para la terapia contra el cáncer, especialmente el tratamiento de hepatocarcinomas, melanomas y carcinomas de células renales, que son formas comunes de cáncer asociado con alta morbilidad. Se han usado dos enzimas degradantes de L-arginina para la terapia contra el cáncer: arginina desiminasa bacteriana y arginasas humanas. Desafortunadamente, ambas de las enzimas presentan inconvenientes significativos que presentan impedimentos principales para su uso clínico (inmunogenicidad y baja actividad catalítica y muy poca estabilidad en suero, respectivamente). Por tanto, el éxito terapéutico de la terapia de empobrecimiento de L-arginina se basará en abordar estos inconvenientes.

Sumario de la invención

45 La divulgación se refiere de manera general a proteínas para su uso en el tratamiento de cáncer con enzimas que empobrecen la L-arginina en suero. En algunas realizaciones, el cáncer es uno que no expresa, o es de otro modo deficiente en, argininosuccinato sintetasa (ASS), ornitina transcarbamilasa (OTC), u otras enzimas requeridas para la biosíntesis de arginina.

50 En algunos aspectos, la presente descripción contempla proteínas arginasas en las que el cofactor metálico natural (Mn^{2+}) se sustituye por otro metal. En realizaciones particulares, la proteína arginasa comprende una secuencia de aminoácidos de arginasa I humana o una secuencia de aminoácidos de arginasa II humana y un cofactor metálico no nativo, concretamente cobalto (Co^{2+}). Las proteínas arginasa I y II humanas de la presente invención tienen dos

sitios de Mn(II); uno cualquiera o ambos sitios pueden sustituirse para generar una proteína arginasa I o II mutada con un cofactor metálico no nativo. En algunas realizaciones, la proteína presenta una k_{cat}/K_m mayor de $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4. En una realización particular, la proteína presenta una k_{cat}/K_m de entre $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $4.000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4. En otra realización, la proteína presenta una k_{cat}/K_m de entre $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2.500 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4 a 37°C. En una realización particular, la presente invención usa una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de arginasa I o II humana y un cofactor metálico no nativo, en la que dicha proteína muestra una k_{cat}/K_m mayor de $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37°C, pH 7,4.

En algunas realizaciones, la arginasa nativa se modifica únicamente mediante la sustitución del cofactor metálico. En otras realizaciones, la arginasa se modifica mediante la sustitución del cofactor metálico además de otras modificaciones, tales como sustituciones, delecciones y truncamientos. En una realización particular, la divulgación usa una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos nativa de arginasa I o II humana y un cofactor metálico no nativo, en la que la secuencia de aminoácidos carece de parte de la secuencia nativa, y en la que el cofactor metálico no nativo es cobalto. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de arginasa I humana comprende SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos de arginasa II humana comprende SEQ ID NO: 2. En aún otras realizaciones, la arginasa carece de una parte de la secuencia de tipo natural. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de arginasa I o arginasa II truncada. En una realización particular, la arginasa es arginasa II y carece de los primeros 21 aminoácidos de la secuencia de tipo natural. En otra realización, las arginasas nativas carecen de una metionina N-terminal.

En otro aspecto, la presente divulgación emplea una proteína arginasa que comprende al menos una sustitución de aminoácido, en la que la proteína presenta una actividad catalítica aumentada en condiciones fisiológicas y especialmente al pH de suero humano (pH 7,4) en comparación con proteína arginasa I o II humana nativa. En algunas realizaciones, la proteína arginasa es una proteína arginasa I humana o proteína arginasa II humana. La proteína para su uso en la invención comprende además un cofactor metálico no nativo, en la que el cofactor metálico no nativo es Co^{+2} . La sustitución del cofactor Mn^{+2} por Co^{+2} da como resultado un marcado aumento en la actividad catalítica y una drástica reducción en K_m a pH fisiológico.

En una realización, la presente divulgación usa una proteína arginasa I humana que comprende al menos una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a metales, en la que la proteína presenta un aumento en la hidrólisis de arginina que da como resultado una k_{cat}/K_m al menos dos veces mayor que la de una arginasa I humana nativa que tiene SEQ ID NO: 1. En otra realización, la presente divulgación usa una proteína arginasa II humana que comprende al menos una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a metales, en la que la proteína presenta un aumento en la hidrólisis de arginina que da como resultado una k_{cat}/K_m al menos dos veces mayor que la de una arginasa II humana nativa que tiene SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína presenta una k_{cat}/K_m mayor de $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4. En una realización particular, la proteína presenta una k_{cat}/K_m entre $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $4.000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4. En otra realización, la proteína presenta una k_{cat}/K_m de entre $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2.500 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4 a 37°C. En algunos aspectos, la invención emplea mutaciones que aumentan la estabilidad de arginasas humanas en suero con respecto a la estabilidad de arginasas humanas nativas.

En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido está en His101, Asp124, His126, Asp128, Asp232, Asp234, Trp122, Asp181, Ser230, His120, Asp143, His145, Asp147, Asp251, Asp253, Trp141, Asp200, Ser249, Cys303 o Glu256. Se ha encontrado que varias mutaciones aumentan la actividad catalítica y reducen drásticamente la K_m para L-arginina en condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, las mutaciones son mutaciones de sustitución seleccionadas del grupo que consiste en Asp181Ser, Ser230Cys, Ser230Gly, Cys303Phe, Cys303Ile, Glu256Gln, Asp181Glu y Ser230Ala. En algunos aspectos, la presente invención proporciona realizaciones en las que se introducen dos o más mutaciones en arginasa humana. En algunas realizaciones, la proteína arginasa humana comprende al menos dos sustituciones de aminoácido. En una realización particular, las sustituciones son Asp181Glu y Ser230Ala.

En algunos aspectos, la presente divulgación emplea arginasas que comprenden cambios adicionales con respecto a la proteína de tipo natural o nativa. En algunas realizaciones, los cambios incluyen sustitución, delecciones (por ejemplo que carecen de parte de la secuencia nativa), truncamientos, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la presente invención también contempla arginasas nativas, en las que los únicos cambios en la secuencia de aminoácidos son delecciones. En una realización particular, la presente divulgación contempla una proteína arginasa I humana, en la que la proteína carece de una metionina N-terminal. También se contemplan otras delecciones y delecciones más grandes para las diversas arginasas mutantes descritas en el presente documento. Por ejemplo, se ha notificado arginasa truncada que carece de los 14 aminoácidos C-terminales, dejando Arg-308 como el último residuo en la secuencia (Mora *et al.*, 2000). En aún otra realización, la arginasa carece de los primeros 21 aminoácidos de la secuencia de tipo natural.

En algunos aspectos, la presente divulgación también contempla proteínas de fusión que comprenden una arginasa unida a una secuencia de aminoácidos distinta de arginasa. En una realización, la secuencia distinta de arginasa comprende al menos una parte de la región Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, para aumentar la semivida de la arginasa en suero cuando se administra a un paciente. La región Fc o parte de la misma puede ser cualquier

región Fc adecuada. En una realización, la región Fc o parte de la misma es una región Fc de IgG. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos que tiene actividad arginasa se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos nativa o mutada de arginasa I humana y una secuencia de aminoácidos nativa o mutada de arginasa II humana. En una realización, se contempla una proteína de fusión dimérica de Fc-arginasa.

- 5 La arginasa en la proteína de fusión puede ser nativa, mutada y/o modificada de otro modo, por ejemplo, modificada con cofactor metálico. En algunas realizaciones, la arginasa puede contener delecciones, sustituciones, truncamientos o una combinación de los mismos. En una realización particular, la presente invención contempla una proteína de fusión que contiene Fc-arginasa, en la que la arginasa es una arginasa I. En una realización, la arginasa carece de una parte de la secuencia de tipo natural. En otra realización, la arginasa es arginasa I que carece de una metionina N-terminal. En aún otra realización, la arginasa es arginasa II, en la que la arginasa II carece de los primeros 21 aminoácidos de la secuencia de arginasa II de tipo natural. En algunas realizaciones, en la arginasa, que comprende además un cofactor metálico no nativo, uno cualquiera o ambos sitios pueden sustituirse para generar una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos de arginasa I o II humana y un cofactor metálico no nativo, en la que el cofactor metálico no nativo es cobalto. En algunas realizaciones, la arginasa contiene una sustitución. En una realización, la sustitución es Glu256Gln. En otra realización, la sustitución es Asp181Ser. En aún otra realización, la sustitución es Ser230Cys. En todavía otra realización, la sustitución es Ser230Gly. En aún otra realización, la sustitución es Cys303Phe. En todavía otra realización, la sustitución es Cys303Ile. En algunas realizaciones, la arginasa I humana comprende al menos dos sustituciones de aminoácido. En una realización, las sustituciones son Asp181Glu y Ser230Asp.
- 10 En algunos aspectos, la presente divulgación emplea además ácido nucleico que codifica para tales arginasas. El ácido nucleico puede tener codones optimizados para su expresión en bacterias. Las bacterias pueden ser *E. coli*. En otros aspectos, la presente invención emplea además vectores que contienen tales ácidos nucleicos. El ácido nucleico que codifica para la arginasa mutante puede estar operativamente unido a un promotor, incluyendo, pero sin limitarse a, promotores heterólogos. En aspectos todavía adicionales, la presente divulgación emplea además células huésped que comprenden tales vectores. Las células huésped pueden ser células huésped transfectadas o transformadas que expresan las arginasas mutantes. Las proteínas pueden expresarse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, las proteínas pueden expresarse en una célula huésped de tal manera que la proteína está glicosilada. Por ejemplo, las proteínas pueden expresarse en una célula huésped de tal manera que la proteína está aglicosilada.
- 20 La presente invención proporciona las proteínas arginasas descritas en el presente documento para su uso en métodos de tratamiento de sujetos que comprenden administrar dichas proteínas tal como se definen en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el cáncer es uno que no expresa, o es de otro modo deficiente en, argininosuccinato sintetasa (ASS) u ornitina transcarbamilasa (OTC). En realizaciones particulares, el cáncer humano es un cáncer auxotrófico para arginina. Tal como se comentó anteriormente, la proteína arginasa puede ser nativa, mutada, y/o modificada de otro modo. En una realización, la presente invención contempla un uso en un método de tratamiento de un paciente humano con cáncer que comprende administrar una formulación que comprende una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión una secuencia de aminoácidos que tiene actividad arginasa y al menos una parte de la región Fc de una inmunoglobulina humana al paciente. En algunas realizaciones, la administración se produce en condiciones tales que se destruye al menos una parte de las células cancerosas del cáncer. En otra realización, la formulación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene actividad arginasa humana superior a la presentada por las arginasas humanas auténticas en condiciones fisiológicas y que comprende además una cadena de polietilenglicol unida. En alguna realización, la formulación es una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las proteínas arginasas comentadas anteriormente y unos excipientes farmacéuticamente aceptables. Tales excipientes farmacéuticamente aceptables los conocen bien los expertos en la técnica. Se contempla que todas las variantes de arginasa anteriores son útiles para terapia en seres humanos.
- 30
- 35
- 40
- 45

El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer o tipo de tumor. En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, melanoma, cáncer próstata o cáncer pancreático. En algunas realizaciones, la formulación se administra por vía tópica, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracranial, intraarticular, intraprostática, intrapleurale, intratraqueal, intraocular, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericardica, intraumbilical, oral, mediante inhalación, mediante inyección, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada bañando directamente las células diana, a través de un catéter o a través de un lavado. En una realización, para aumentar la semivida en suero, las variantes de arginasa descritas en el presente documento están "pegiladas".

50

55

En una realización preferida se contempla que todas las arginasas, variantes y similares mencionadas anteriormente son proteínas purificadas o aisladas, y preferiblemente proteínas monoméricas.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para querer decir "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación

respalda una definición que se refiere únicamente a alternativas y a “y/o”.

A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que esté empleándose para determinar el valor.

- 5 Según la ley de patentes de larga tradición, las palabras “un” y “uno”, cuando se usan junto con la palabra “que comprende” en las reivindicaciones o la memoria descriptiva, indican uno o más, a menos que se indique específicamente.

- 10 El término “terapéuticamente eficaz” tal como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de células y/o composición terapéutica (tal como un polinucleótido terapéutico y/o polipéptido terapéutico) que se emplea en la presente invención para lograr un efecto terapéutico, tal como en la que al menos se mejora al menos un síntoma de un estado que está tratándose, y/o al análisis de los procedimientos o materiales usados junto con estas células.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se facilitan únicamente a modo de ilustración.

Breve descripción de las figuras

- 15 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor mediante referencia a uno o más de esos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La figura 1 muestra secuencias de ácido nucleico de arginasa I (SEQ ID NO: 1) y arginasa II (SEQ ID NO: 2).

- 20 La figura 2 es una fotografía de una SDS-PAGE que muestra etapas de purificación para arginasa I humana. L = Marcador de peso molecular; WC = fracción de células completas, SN = sobrenadante; FT = flujo a través de una columna de IMAC; W = lavado de columna; E = fracción de elución de arginasa.

- 25 La figura 3 es un gráfico representativo de la cinética en estado estacionario de la hidrólisis de L-arginina mediante Co-hArgI (•) y Mn-hArgI (○) en un tampón Hepes 100 mM, pH 7,4, 37°C. Co-hArgI tenía una k_{cat} de $240 \pm 14 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $190 \pm 40 \text{ } \mu\text{M}$, y k_{cat}/K_M de $1.270 \pm 330 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Mn-ArgI tenía una k_{cat} de $300 \pm 12 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $2.330 \pm 260 \text{ } \mu\text{M}$, y k_{cat}/K_M de $129 \pm 20 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La figura 4 es una representación gráfica de k_{cat}/K_M frente a pH para Co-hArgI (•) con una pK_a de sección ascendente de 7,5 y Mn-hArgI (■) con un pK_a de sección ascendente de 8,5.

- 30 La figura 5 es un gráfico que muestra la estabilidad de Co-hArgI y Mn-hArgI (1 μM) incubados en suero humano combinado a 37°C a lo largo del tiempo en suero humano combinado. Se extrajeron alícuotas a lo largo del tiempo y se sometieron a ensayo frente a 1 mM de L-Arg en un tampón Hepes 100 mM, pH 7,4, a 37°C. Mn-hArgI (○) presentó una pérdida exponencial de actividad con una vida de $T_{1/2}$ de $4,8 \pm 0,8 \text{ h}$. En cambio, Co-hArgI (•) presentó una pérdida bifásica de actividad con una primera $T_{1/2}$ aparente de $6,1 \pm 0,6 \text{ h}$ seguida por una segunda $T_{1/2}$ mucho más larga de $37 \pm 3 \text{ h}$.

- 35 La figura 6 es un gráfico que muestra perfiles de HPLC de los 20 aminoácidos convencionales incubados o bien con Co-hArgI (panel superior) o bien con tampón de diálisis (panel inferior). Co-hArgI incubada con los 20 aminoácidos convencionales dio como resultado la pérdida de un único pico a $TA = 12,3 \text{ min}$, que coincide con el de controles de L-arginina, y la aparición de un nuevo pico individual a $TA = 18,8 \text{ min}$, que coincide con el de controles de L-ornitina.

- 40 Las figuras 7A-B son gráficos que muestran la supervivencia de HCC en cultivo tisular cuando se trata con diversas variantes de arginasa (junto con controles). La figura 7A demuestra la supervivencia de cultivo tisular de HCC (Hep3b) cuando se trató con arginasa 0-100 nM (día 5). Mn-hArgI (▲) dio como resultado una CI_{50} aparente de $5 \pm 0,3 \text{ nM}$ ($\sim 0,18 \text{ } \mu\text{g/ml}$). Las incubaciones con Co-hArgI (•) condujeron a un aumento de 15 veces en la citotoxicidad con una CI_{50} aparente de $0,33 \pm 0,02 \text{ nM}$ ($\sim 0,012 \text{ } \mu\text{g/ml}$). La figura 7B es un gráfico que muestra el efecto de hArgI sobre el crecimiento de células de melanoma A375 (día 5). Mn-hArgI (▲) dio como resultado una CI_{50} aparente de $4,1 \pm 0,1 \text{ nM}$ ($\sim 0,15 \text{ } \mu\text{g/ml}$). La incubación con Co-hArgI (•) condujo a un aumento de 13 veces en la citotoxicidad con una CI_{50} aparente de $0,32 \pm 0,06 \text{ nM}$ ($\sim 0,012 \text{ } \mu\text{g/ml}$).

La figura 8 es una fotografía de un gel de electroforesis no desnaturalizante que muestra que la variante hArgI-E256Q es monomérica a diferencia de la h-ArgI de tipo natural trimérica.

La figura 9 es un gráfico representativo de la cinética en estado estacionario de la hidrólisis de L-arginina mediante Co-hArg-II (•) y Mn-hArg-II (○). Hidrólisis de L-Arg con hArg-II (•) sustituida con cobalto a pH 7,4 y 37°C, con una k_{cat} de $182 \pm 7 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $126 \pm 18 \text{ } \mu\text{M}$, y una k_{cat}/K_M de $1.440 \pm 260 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Hidrólisis de L-Arg con hArg-II (○) sustituida con manganeso a pH 7,4 y 37°C, con una k_{cat} de $48 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $2.900 \pm 300 \text{ } \mu\text{M}$, y k_{cat}/K_M de $17 \pm 2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La figura 10 es un gráfico que muestra el empobrecimiento de L-arginina en suero en el modelo de ratón. Las concentraciones de L-Arg en suero de ratones Balb/c tratados con una única dosis i.p. de Co-hArgI se mantienen $\leq 3\text{-}4 \text{ } \mu\text{M}$ durante más de 3 días.

La figura 11 es un gráfico que muestra la reducción de xenoinjerto de tumor de HCC cuando se trata con Co-hArgI en comparación con controles. Se trataron ratones desnudos que portaban xenoinjertos de tumor de Hep3b dos veces mediante inyección i.p. o bien con PBS (○) o bien con Co-hArgI (•) en el día 9 y en el día 12. Se observó contracción del tumor en los ratones tratados con Co-hArgI mientras que los tumores tratados con PBS crecieron sin control.

Figura 12, SDS-PAGE al 14-20% que muestra hArgI conjugada a PEG PM 5000, con un PM aparente de $\sim 150 \text{ kDa}$.

Descripción de las realizaciones ilustrativas

La presente invención se refiere a proteínas para su uso en métodos de tratamiento de pacientes que tienen cáncer tal como se define en las reivindicaciones y por ejemplo usa enzimas que empobrecen la L-arginina en suero. En algunas realizaciones, el cáncer es uno que no expresa, o es de otro modo deficiente en, argininosuccinato sintetasa (ASS), ornitina transcarbamilasa (OTC), u otras enzimas requeridas para la biosíntesis de arginina. Se contemplan enzimas tanto nativas como mutadas, así como enzimas con cofactores metálicos modificados, enzimas fusionadas a otros polipéptidos así como enzimas conjugadas a polímeros que aumentan la persistencia en suero, por ejemplo, polietilenglicol de alto peso molecular.

I. Arginasa

La arginasa es una enzima que contiene manganeso. Es la enzima final del ciclo de la urea. La arginasa es la quinta y última etapa en el ciclo de la urea, una serie de reacciones biofísicas en mamíferos durante la cual el organismo elimina amoníaco dañino. Específicamente, la arginasa convierte L-arginina en L-ornitina y urea.

La L-arginina es el sustrato donador de nitrógeno para la óxido nítrico sintasa (NOS), produciendo L-citrulina y NO. Aunque se ha notificado que la K_M de arginasa ($2\text{-}5 \text{ mM}$) es mucho mayor que la de NOS para L-arginina ($2\text{-}20 \text{ } \mu\text{M}$), la arginasa también puede desempeñar un papel en la regulación de la actividad de NOS. En determinadas condiciones la arginasa I se Cys-S-nitrosila, dando como resultado una mayor afinidad por L-arginina y una disponibilidad reducida de sustrato para NOS.

La arginasa es una enzima homo-trimérica con un plegamiento α/β de una lámina β de ocho cadenas paralelas rodeada por varias hélices. La enzima contiene un agrupamiento de metales di-nuclear que es esencial para generar un hidróxido para el ataque nucleófilo en el carbono de guanidinio de L-arginina. El metal nativo para arginasa es Mn^{2+} . Estos iones Mn^{2+} se coordinan con agua, orientando y estabilizando la molécula y permitiendo que el agua actúe como nucleófilo y ataque a la L-arginina, hidrolizándola para dar ornitina y urea.

Los mamíferos tienen dos isozimas de arginasa (EC 3.5.3.1) que catalizan la hidrólisis de L-arginina para dar urea y L-ornitina. El gen de arginasa I está ubicado en el cromosoma 6 (6q.23), se expresa altamente en el citosol de los hepatocitos y funciona en la eliminación de nitrógeno como etapa final del ciclo de la urea. El gen de arginasa II se encuentra en el cromosoma 14 (14q.24.1). La arginasa II está ubicada en la mitocondria en tejidos tales como riñón, cerebro y músculo esquelético en los que se piensa que proporciona un suministro de L-ornitina para la biosíntesis de prolina y poliamina (Lopez *et al.*, 2005).

Se han investigado las arginasas durante casi 50 años como método para degradar la L-arginina extracelular (Dillon *et al.*, 2002). Se han logrado algunos resultados clínicos prometedores introduciendo arginasa mediante embolización arterial transhepática; tras lo cual varios pacientes experimentaron una remisión parcial de HCC (Cheng *et al.*, 2005). Sin embargo, dado que la arginasa tiene una alta K_M ($\sim 2\text{-}5 \text{ mM}$) y muestra muy baja actividad a valores de pH fisiológicos, se requiere una alta dosificación para fines quimioterápico (Dillon *et al.*, 2002). Aunque la arginasa nativa se aclara de la circulación en el plazo de minutos (Savoca *et al.*, 1984), una única inyección de PEG-arginasa PM 5000 en ratas fue suficiente para lograr un empobrecimiento de arginina casi completo durante ~ 3 días (Cheng *et al.*, 2007).

Cheng *et al.* hicieron la sorprendente observación de que muchas líneas celulares de HCC humanas no expresan

OTC (además de ASS) y por tanto son sensibles a PEG-arginasa (Cheng *et al.*, 2007). En ratones en los que se implantaron células de hepatocarcinoma Hep3b, la administración semanal de PEG-arginasa dio como resultado la ralentización del crecimiento tumoral que se acentuó mediante coadministración de 5-fluorouracilo (5-FU). Sin embargo, se usó PEG-arginasa a dosis muy altas que no resultan prácticas para la terapia en seres humanos, reflejando su actividad fisiológica inferior.

Para abordar estas cuestiones se ha sometido a prueba *in vitro* una enzima hidrolizante de arginina bacteriana, arginina desiminasa o ADI, que presenta buena cinética y estabilidad. Una forma pegilada de ADI está actualmente sometiéndose a ensayos clínicos en fase II/III. Desafortunadamente, ADI es una enzima bacteriana y por tanto induce fuertes respuestas inmunitarias y efectos adversos en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, para aquellos pacientes que no desarrollan respuestas adversas significativas, un porcentaje impresionante muestra enfermedad estable o remisión. No obstante, debido a su perfil inmunológico desfavorable, es poco probable que el empobrecimiento de L-arginina mediante ADI se convierta en un tratamiento convencional para el cáncer de hígado.

Para el uso clínico, resulta esencial que la arginasa se modifique por ingeniería para permitir que persista durante periodos más largos (por ejemplo, días) en la circulación. En ausencia de cualquier modificación, la arginasa humana tiene una semivida de tan sólo unos pocos minutos en la circulación principalmente debido a que su tamaño no es lo suficientemente grande como para evitar la filtración a través de los riñones. La arginasa humana no modificada es muy propensa a desactivación en suero y se degrada con una semivida de tan sólo cuatro horas. Por tanto, los presentes inventores desarrollaron formas novedosas y mejoradas de arginasa para investigación clínica y posible uso terapéutico con persistencia en circulación mejorada.

II. Variantes de arginasa

Los mamíferos tienen dos isozimas de arginasa (EC 3.5.3.1) que catalizan la hidrólisis de L-arginina para dar urea y L-ornitina. El gen de arginasa I está ubicado en el cromosoma 6 (6q.23), se expresa altamente en el citosol de hepatocitos, y funciona en la eliminación de nitrógeno como etapa final del ciclo de la urea. El gen de arginasa II se encuentra en el cromosoma 14 (14q.24.1). La arginasa II está ubicada en la mitocondria en tejidos tales como riñón, cerebro y músculo esquelético en los que se piensa que proporciona un suministro de L-ornitina para la biosíntesis de prolina y poliamina (Lopez *et al.*, 2005).

La L-arginina es el único sustrato para la óxido nítrico sintasa (NOS), produciendo L-citrulina y NO. Aunque se ha notificado que la K_M de arginasa (2-5 mM) es mucho mayor que la de NOS para L-arginina (2-20 μ M), la arginasa también puede desempeñar un papel en la regulación de la actividad de NOS (Durante *et al.*, 2007). En determinadas condiciones la arginasa I se Cys-S-nitrosila, dando como resultado una mayor afinidad por L-arginina y una disponibilidad reducida de sustrato para NOS (Santhanam *et al.*, 2007). La arginasa es una enzima homotrimérica con un plegamiento α/β de una lámina β de ocho cadenas paralela rodeada por varias hélices. La enzima contiene un agrupamiento de metales di-nuclear que es esencial para generar un hidróxido para el ataque nucleófilo en el carbono de guanidinio de L-arginina (Cama *et al.*, 2003; Dowling *et al.*, 2008). El metal nativo para arginasa es Mn^{2+} . La arginasa con el metal nativo (es decir Mn^{2+}) muestra un pH óptimo de 9. A pH fisiológico la enzima muestra una k_{cat}/K_M más de 10 veces inferior en la hidrólisis de L-arginina (figura 4). La baja actividad catalítica presentada por la arginasa humana auténtica con la enzima con Mn^{2+} nativa presenta un problema para la terapia en seres humanos ya que significa que tienen que usarse dosis no prácticas de la enzima para lograr una reducción terapéuticamente relevante en los niveles en plasma de L-arginina.

En algunos aspectos, la presente invención contempla arginasas mutantes en las que el cofactor metálico natural (Mn^{2+}) se sustituye por otro metal. Se ha encontrado que la sustitución del cofactor metálico en arginasa humana ejerce un efecto beneficioso sobre la tasa de hidrólisis de L-arginina y la estabilidad en condiciones fisiológicas en comparación con arginasa humana nativa con el cofactor metálico natural. La sustitución del metal nativo (Mn^{2+}) por otros cationes divalentes puede aprovecharse para desplazar el pH óptimo de la enzima a valores inferiores y por tanto lograr altas tasas de hidrólisis de L-arginina en condiciones fisiológicas. Las proteínas arginasa I y II humanas para su uso en la presente invención tienen dos sitios de $Mn(II)$; por tanto, uno cualquiera o ambos sitios pueden sustituirse para generar una proteína arginasa I o II mutada con un cofactor metálico no nativo.

En la presente invención, dicho cofactor metálico no nativo es cobalto (Co^{2+}). La incorporación de Co^{2+} en lugar de Mn^{2+} en arginasa I humana o arginasa II humana da como resultado una actividad drásticamente superior a pH fisiológico. Se encontró que una enzima que contenía Co^{2+} ("Co-hArgI") presentaba un aumento de 10 veces en la k_{cat}/K_M *in vitro* a pH 7.4, lo que a su vez se tradujo en un aumento de 15 veces en la citotoxicidad de HCC y un aumento de 13 veces en la citotoxicidad de melanoma en comparación con la arginasa I humana que contiene Mn^{2+} . También se encontró que una preparación farmacológica de Co-hArgI podía aclarar L-Arg en suero durante más de 3 días en ratones con una única inyección. Además, se encontró que una preparación farmacológica de Co-hArgI podía contraer xenoinjertos de tumor de HCC en ratones desnudos mientras que Mn-hArgI sólo ralentizó el crecimiento tumoral (Ensor, Holsberg *et al.*, 2002).

En algunas realizaciones, la presente invención emplea una proteína arginasa humana que comprende al menos una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a metales. La estructura de arginasa muestra una hendidura de sitio activo que contiene dos iones Mn^{2+} , denominándose el ion ubicado más profundamente Mn_A coordinado con H101, D124, D128, D232 e hidróxido de puente. El otro metal se denomina Mn_B y se coordina mediante H126, D124, D232, D234 e hidróxido de puente (Christianson y Cox, 1999). Los residuos que comprenden el sitio de unión a metales para la primera cubierta de arginasa I son H101, D124, H126, D128, D232 y D234 y para la segunda cubierta son W122, D181 y S230. De manera similar, los residuos que comprenden el sitio de unión a metales para la primera cubierta de arginasa II son H120, D143, H145, D147, D251 D253 y para la segunda cubierta son W141, D200, S249.

Se ha mostrado que la arginasa requiere ambos iones Mn^{2+} para su actividad completa, sin embargo Mn_A puede disociarse de manera reversible dando como resultado una enzima con la mitad de su actividad catalítica (Scolnick *et al.*, 1997). El metal (A) de hArgI se coordina con el imidazol de H101, que a su vez se une mediante hidrógeno al hidroxilo de S230. El metal (B) de hArgI se coordina con el imidazol de H126, que tiene un enlace de hidrógeno de la 2ª cubierta con el carboxilo de D181. Las posiciones implicadas en la unión del metal se sometieron a mutagénesis por saturación y se examinaron las bibliotecas resultantes usando un ensayo con placa de pocillos de microtitulación para determinar la actividad arginasa (descrito en más detalle a continuación en los ejemplos) para aislar clones que expresaban proteínas que presentaban una mayor actividad catalítica. Se identificaron clones novedosos mediante secuenciación, volvieron a transformarse en *E. coli* (BL21) y se purificaron y se caracterizaron cinéticamente tal como se describe a continuación en los ejemplos. Se purificaron variantes que presentaban actividad aparente $\geq$ a la de tipo natural en mayor escala y se sometieron a ensayo para determinar sus parámetros cinéticos en estado estacionario de k_{cat} y K_M . Se encontró que las siguientes variantes tenían constantes k_{cat}/K_M mayores que Co-hArgI: D181S, D181E/S230A (mutante doble que contiene dos sustituciones). De manera similar se encontró que las sustituciones de aminoácido S230C y S230G tenían un efecto particularmente importante sobre la actividad catalítica y también sobre la estabilidad en suero. Adicionalmente, también se sometieron aminoácidos retirados del sitio de unión a metales a mutagénesis por saturación combinatoria. Por ejemplo, se encontró que una sustitución C303P en Co-hArg I confería una k_{cat}/K_M 10 veces superior con respecto a la Mn-hArg I nativa a pH 7,4. Muchas de estas formas variantes o mutantes de la arginasa se contemplan para su uso en el tratamiento de cáncer, incluyendo en las que se preparan como proteínas de fusión, por ejemplo con una región Fc (o parte de la misma) de una inmunoglobulina (con el fin de aumentar la semivida).

También se sometieron a prueba las variantes Cys₃₀₃ para determinar la estabilidad en suero. Se encontró que una variante C303P, es decir una sustitución de aminoácido individual en arginasa, muestra un aumento del ~60% en la estabilidad en suero lo que a su vez se traduce en un aumento de 30 veces en la citotoxicidad de HCC en comparación con la enzima sustituida con Mn a pH 7,4. En una realización, la presente invención contempla el tratamiento con esta enzima novedosa o esta enzima novedosa con mutaciones adicionales. En una realización particular, esta enzima novedosa se emplea para el tratamiento como proteína de fusión de arginasa-Fc que aprovecha la recirculación endosómica del dominio Fc de IgG para garantizar una larga persistencia en suero de la variante de arginasa. La larga persistencia en suero mejora el uso de arginasa como producto terapéutico.

III. Pegilación

En determinados aspectos de la invención, se dan a conocer métodos y composiciones relacionados con arginasa pegilada. Específicamente, puede usarse la pegilación de arginasa en un residuo de cisteína modificado por ingeniería (por ejemplo, que sustituye al tercer residuo del extremo N-terminal) para producir una composición de arginasa pegilada homogénea. También se dan a conocer métodos para el aislamiento de arginasa pegilada basándose en la alteración temporal de la polimerización.

La pegilación es el procedimiento de unión covalente de cadenas poliméricas de polietilenglicol a otra molécula, normalmente un fármaco o proteína terapéutica. La pegilación se logra de manera rutinaria mediante incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula diana. La unión covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede "enmascarar" al agente frente al sistema inmunitario del huésped (inmunogenicidad y antigenicidad reducidas), aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en disolución) del agente lo que prolonga su tiempo en circulación reduciendo el aclaramiento renal. La pegilación también puede proporcionar solubilidad en agua a fármacos y proteínas hidrófobos.

La primera etapa en la pegilación es la funcionalización adecuada del polímero PEG en uno o ambos extremos terminales. Los PEG que se activan en cada extremo terminal con el mismo resto reactivo se conocen como "homobifuncionales", mientras que si los grupos funcionales presentes son diferentes, entonces el derivado de PEG se denomina "heterobifuncional" o "heterofuncional". Los derivados químicamente activos o activados del polímero de PEG se preparan para unir el PEG a la molécula deseada.

La elección del grupo funcional adecuado para el derivado de PEG se basa en el tipo de grupo reactivo disponible en la molécula que se acoplará al PEG. Para proteínas, los aminoácidos reactivos típicos incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina. También pueden usarse el grupo

amino N-terminal y el ácido carboxílico C-terminal.

Las técnicas usadas para formar derivados de PEG de primera generación son generalmente hacer reaccionar el polímero de PEG con un grupo que es reactivo con grupos hidroxilo, normalmente anhídridos, cloruros de ácido, cloroformatos y carbonatos. En la química de pegilación de segunda generación se ponen grupos funcional más eficaces, tales como aldehído, ésteres, amidas, etc. a disposición para la conjugación.

A medida que las aplicaciones de pegilación se vuelven cada vez más avanzadas y sofisticadas, ha habido un aumento en la necesidad de PEG heterobifuncionales para la conjugación. Estos PEG heterobifuncionales son muy útiles en la unión de dos entidades, en las que se necesita un separador hidrófilo, flexible y biocompatible. Grupos terminales preferidos para PEG heterobifuncionales son maleimida, vinilsulfonas, disulfuro de piridilo, amina, ácidos carboxílicos y ésteres de NHS.

Los agentes de modificación, o grupos de unión, más comunes se basan en moléculas de metoxi-PEG (mPEG). Su actividad depende de añadir un grupo modificador de proteína al extremo de alcohol. En algunos casos se usa polietilenglicol (PEG-diol) como molécula precursora. Posteriormente se modifica el diol en ambos extremos con el fin de preparar una molécula unida a PEG hetero u homodimérica (tal como se muestra en el ejemplo con PEG-bis-vinilsulfona).

Las proteínas se pegilan generalmente en sitios nucleófilos tales como tioles no protonados (residuos de cisteinilo) o grupos amino. Los ejemplos de reactivos de modificación específicos de cisteinilo incluyen PEG-maleimida, PEG-yodoacetato, PEG-tioles y PEG-vinilsulfona. Los cuatro son muy específicos de cisteinilo en condiciones leves y a pH de neutro a ligeramente alcalino, pero cada uno tiene inconvenientes. La amida formada con las maleimidas puede ser algo inestable en condiciones alcalinas de modo que puede haber cierta limitación en cuanto a las opciones de formulación con este grupo de unión. El enlace amida formado con yodo-PEG es más estable, pero el yodo libre puede modificar residuos de tirosina en algunas condiciones. Los PEG-tioles forman enlaces de disulfuro con tioles de proteínas, pero esta unión también puede ser inestable en condiciones alcalinas. La reactividad de PEG-vinilsulfona es relativamente baja en comparación con maleimida y yodo-PEG; sin embargo, el enlace tioéter formado es bastante estable. Su velocidad de reacción más lenta también puede hacer que la reacción de PEG-vinilsulfona sea más fácil de controlar.

La pegilación específica del sitio en residuos de cisteinilo nativos se lleva a cabo con poca frecuencia, ya que estos residuos están habitualmente en forma de enlaces disulfuro o se requieren para la actividad biológica. Por otro lado, puede usarse mutagénesis dirigida al sitio para incorporar sitios de pegilación cisteinilo para grupos de unión específicos de tiol. La mutación de cisteína debe diseñarse de tal manera que sea accesible al reactivo de pegilación y todavía sea biológicamente activa tras la pegilación.

Los agentes de modificación específicos de amina incluyen PEG-éster de NHS, PEG-tresilato, PEG-aldehído, PEG-isotiocianato, y varios otros. Todos reaccionan en condiciones suaves y son muy específicos para grupos amino. El PEG-éster de NHS es probablemente uno de los agentes más reactivos; sin embargo, su alta reactividad puede hacer que la reacción de pegilación sea difícil de controlar a gran escala. PEG-aldehído forma una imina con el grupo amino, que después se reduce para dar una amina secundaria con cianoborohidruro de sodio. Al contrario que el borohidruro de sodio, el cianoborohidruro de sodio no reducirá los enlaces disulfuro. Sin embargo, este producto químico es altamente tóxico y debe manipularse con precaución, particularmente a pH inferior en el que se vuelve volátil.

Debido a los múltiples residuos de lisina en la mayoría de las proteínas, la pegilación específica del sitio puede ser un desafío. Afortunadamente, dado que estos reactivos reaccionan con grupos amino no protonados, es posible dirigir la pegilación a grupos amino de pK inferior realizando la reacción a un pH inferior. Generalmente el pK del grupo alfa-amino es 1-2 unidades de pH inferior al del grupo epsilon-amino de residuos de lisina. Pegilando la molécula a pH 7 o inferior, puede alcanzarse con frecuencia una alta selectividad por el extremo N-terminal. Sin embargo, esto sólo es viable si no se requiere la parte N-terminal de la proteína para su actividad biológica. Sin embargo, con frecuencia los beneficios farmacéuticos de la pegilación compensan una pérdida significativa de bioactividad *in vitro*, dando como resultado un producto con una bioactividad *in vivo* mucho mayor independientemente de la química de pegilación.

Hay varios parámetros a tener en cuenta cuando se desarrolla un procedimiento de pegilación. Afortunadamente, habitualmente no hay más de cuatro o cinco parámetros clave. El enfoque de "diseño de experimentos" para la optimización de las condiciones de pegilación puede ser muy útil. Para reacciones de pegilación específicas de tiol, los parámetros a tener en cuenta incluyen: concentración de proteína, razón de PEG con respecto a proteína (en una base molar), temperatura, pH, tiempo de reacción, y en algunos casos, la exclusión de oxígeno. (El oxígeno puede contribuir a la formación de disulfuro intermolecular por la proteína, lo que reducirá el rendimiento del producto pegilado). Deben tenerse en cuenta los mismos factores (con la excepción del oxígeno) para la modificación específica de amina excepto porque el pH puede ser incluso más crítico, particularmente cuando se selecciona como diana el amino grupo N-terminal.

Para modificaciones específicas tanto de amina como de tiol, las condiciones de reacción pueden afectar a la estabilidad de la proteína. Esto puede limitar la temperatura, concentración de proteína y pH. Además, la reactividad del grupo de unión de PEG debe conocerse antes de comenzar la reacción de pegilación. Por ejemplo, si el agente de pegilación sólo es activo al 70 por ciento, la cantidad de PEG usada debe garantizar que sólo se cuentan las moléculas de PEG activo en la estequiometría de reacción de proteína con respecto a PEG. Posteriormente se describirá cómo determinar la reactividad y cualidad de PEG.

IV. Proteínas y péptidos

En determinadas realizaciones, la presente invención emplea composiciones novedosas que comprenden al menos una proteína o péptido, tal como multímeros de arginasa estabilizados. Estos péptidos pueden estar comprendidos en una proteína de fusión o conjugados a un agente tal como se describió anteriormente.

A. Proteínas y péptidos

Tal como se usa en el presente documento, una proteína o péptido se refiere de manera general, pero no se limita a, una proteína de más de aproximadamente 200 aminoácidos, hasta una secuencia de longitud completa traducida a partir de un gen; un polipéptido de más de aproximadamente 100 aminoácidos; y/o un péptido de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 100 aminoácidos. Por conveniencia, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

En determinadas realizaciones el tamaño de al menos una proteína o péptido puede comprender, pero no se limita a, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 210, aproximadamente 220, aproximadamente 230, aproximadamente 240, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 300, aproximadamente 325, aproximadamente 350, aproximadamente 375, aproximadamente 400, aproximadamente 425, aproximadamente 450, aproximadamente 475, aproximadamente 500, aproximadamente 525, aproximadamente 550, aproximadamente 575, aproximadamente 600, aproximadamente 625, aproximadamente 650, aproximadamente 675, aproximadamente 700, aproximadamente 725, aproximadamente 750, aproximadamente 775, aproximadamente 800, aproximadamente 825, aproximadamente 850, aproximadamente 875, aproximadamente 900, aproximadamente 925, aproximadamente 950, aproximadamente 975, aproximadamente 1000, aproximadamente 1100, aproximadamente 1200, aproximadamente 1300, aproximadamente 1400, aproximadamente 1500, aproximadamente 1750, aproximadamente 2000, aproximadamente 2250, aproximadamente 2500 o más residuos de aminoácido.

Tal como se usa en el presente documento, un "residuo de aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido que se produce de manera natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier agente mimético de aminoácido conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, los residuos de la proteína o péptido son secuenciales, sin ningún grupo distinto de aminoácido que interrumpe la secuencia de residuos de aminoácido. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos distintos de aminoácido. En realizaciones particulares, la secuencia de residuos de la proteína o péptido puede estar interrumpida por uno o más restos distintos de aminoácido.

Por consiguiente, el término "proteína o péptido" abarca secuencias de aminoácidos que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes encontrados en proteínas que se producen de manera natural, o al menos un aminoácido modificado o no habitual, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos mostrados en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Aminoácidos modificados y no habituales

Abr.	Aminoácido	Abr.	Aminoácido
Aad	Ácido 2-aminoadípico	EtAsn	N-Etilasparagina
Baad	Ácido 3-aminoadípico	Hyl	Hidroxilisina
Bala	β -alanina, ácido β -amino-propiónico	AHyl	alo-Hidroxilisina
Abu	Ácido 2-aminobutírico	3Hyp	3-Hidroxiprolina
4Abu	Ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico	4Hyp	4-Hidroxiprolina
Acp	Ácido 6-aminocaproico	Ide	Isodesmosina
Ahe	Ácido 2-aminoheptanoico	Alle	alo-Isoleucina
Aib	Ácido 2-aminoisobutírico	MeGly	N-Metilglicina, sarcosina

Abr.	Aminoácido	Abr.	Aminoácido
Baib	Ácido 3-aminoisobutírico	Melle	N-Metilisoleucina
Apm	Ácido 2-aminopimélico	MeLys	6-N-Metilisina
Dbu	Ácido 2,4-diaminobutírico	MeVal	N-Metilvalina
Des	Desmosina	Nva	Norvalina
Dpm	Ácido 2,2'-diaminopimélico	Nle	Norleucina
Dpr	Ácido 2,3-diaminopropiónico	Orn	Ornitina
EtGly	N-Etilglicina		

Pueden prepararse proteínas o péptidos mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos mediante técnicas de biología molecular convencionales, el aislamiento de proteínas o péptidos a partir de fuentes naturales, o la síntesis química de proteínas o péptidos. Anteriormente se han dado a conocer las secuencias de nucleótidos y de proteínas, polipéptidos y péptidos correspondientes a diversos genes, y pueden encontrarse en bases de datos informatizadas conocidas por los expertos habituales en la técnica. Una de tales bases de datos son las bases de datos Genbank y GenPet de National Center for Biotechnology Information (disponibles en la world wide web en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones codificantes para genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas dadas a conocer en el presente documento o tal como conocerán los expertos habituales en la técnica. Alternativamente, los expertos en la técnica conocen diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos.

B. Ácidos nucleicos y vectores

En determinados aspectos de la invención, pueden emplearse secuencias de ácido nucleico que codifican para una proteína de fusión como arginasa multimérica estabilizada. Dependiendo de qué sistema de expresión vaya a usarse, pueden seleccionarse secuencias de ácido nucleico basándose en métodos convencionales. Por ejemplo, arginasa I y II humanas contienen múltiples codones que se usan con poca frecuencia en *E. coli* que pueden interferir con la expresión, por tanto los respectivos genes o variantes de los mismos pueden tener codones optimizados para la expresión en *E. coli*. También pueden usarse diversos vectores para expresar la proteína de interés, tal como una arginasa multimérica de fusión o una arginasa con sustitución de cisteína. Los vectores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, vectores de plásmidos, vectores virales, vectores basados en transposones o liposomas.

C. Células huésped

Las células huésped, preferiblemente células eucariotas, útiles en la presente invención son cualquiera que puede transformarse para permitir la expresión y secreción de arginasa y multímeros de fusión de la misma. Las células huésped pueden ser bacterias, células de mamífero, levadura u hongos filamentosos. Diversas bacterias incluyen *Escherichia* y *Bacillus*. Las levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia* encontrarán uso como célula huésped apropiada. Pueden usarse diversas especies de hongos filamentosos como huéspedes de expresión, incluyendo los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochliobolus* y *Pyricularia*.

Los ejemplos de organismos huésped que pueden usarse incluyen bacterias, por ejemplo, *Escherichia coli* MC1061, derivados de *Bacillus subtilis* BRB1 (Sibakov *et al.*, 1984), *Staphylococcus aureus* SAI123 (Lordanescu, 1975) o *Streptococcus lividans* (Hopwood *et al.*, 1985); levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* AH 22 (Mellor *et al.*, 1983) y *Schizosaccharomyces pombe*; hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus awamori* (Ward, 1989), *Trichoderma reesei* (Penttilä *et al.*, 1987; Harkki *et al.*, 1989).

Los ejemplos de células huésped de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61), células de hipófisis de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658). Lo anterior es ilustrativo pero no limitativo de los muchos organismos huésped posible conocidos en la técnica. En principio, todos los huéspedes que puedan realizar secreción pueden usarse, ya sean procariotas o eucariotas.

Las células huésped de mamífero que expresan la arginasa y/o sus multímeros de fusión se cultivan en condiciones empleadas normalmente para cultivar la línea celular original. Generalmente, se cultivan células en un medio convencional que contiene sales fisiológicas y nutrientes, tales como medio convencional RPMI, MEM, IMEM o DMEM, normalmente complementado con suero al 5-10%, tal como suero bovino fetal. Las condiciones de cultivo también son convencionales, por ejemplo, se incuban cultivos a 37°C en cultivos estacionarios o rotativos hasta que se alcanzan los niveles deseados de las proteínas.

D. Purificación de proteínas

Los expertos en la técnica conocen bien técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, en un nivel, la homogenización y el fraccionamiento en bruto de las células, tejido u órgano para dar fracciones de polipéptido y distintas de polipéptidos. La proteína o polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr una purificación parcial o completa (o purificación hasta

5 homogénea) a menos que se especifique de otro modo. Métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por exclusión en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmovilización e isoelectroenfoque. Un método particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía de líquidos de rápida resolución (FPLC) o incluso cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

10 Se pretende que una proteína o péptido purificado se refiera a una composición, que puede aislarse de otros componentes, en la que la proteína o péptido se purifica hasta cualquier grado con respecto a su estado que puede obtenerse de manera natural. Por tanto, una proteína o péptido aislado o purificado también se refiere a una proteína o péptido libre del entorno en el que se produce de manera natural. Generalmente, "purificado" se referirá a una

15 composición de proteína o péptido que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar diversos otros componentes, y composición que conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término "sustancialmente purificado", esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, tal como que constituye aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más de las proteínas en la composición.

20 Los expertos en la técnica conocen bien diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o mediante desnaturación térmica, seguido por: centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía por intercambio iónico, de filtración en gel, de fase inversa, de hidroxilapatita y de afinidad; isoelectroenfoque; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Tal como se conoce de manera general en la

25 técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse, o que determinadas etapas pueden omitirse, y todavía dar como resultado un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

Los expertos en la técnica conocen diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido a la vista de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un

30 método preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, compararla con la actividad específica del extracto inicial, y calcular así el grado de pureza en el mismo, evaluado mediante un "número de veces de purificación". Evidentemente, las unidades reales empleadas para representar la cantidad de actividad dependerán de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación, y de si la proteína o

35 péptido expresado muestra o no una actividad detectable.

No hay ningún requisito general de que la proteína o péptido tenga que proporcionar siempre en su estado más purificado. De hecho, se contempla que productos sustancialmente menos purificados pueden tener utilidad en determinadas realizaciones. La purificación parcial puede lograrse usando menos etapas de purificación en combinación, o usando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que

40 una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada usando un aparato de HPLC dará generalmente como resultado una purificación de más "veces" que la misma técnica usando un sistema de cromatografía a baja presión. Los métodos que muestran un menor grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total de producto de proteína, o en mantener la actividad de una proteína expresada.

En determinadas realizaciones puede aislarse o purificarse una proteína o péptido, por ejemplo, una proteína de fusión multimérica de arginasa estabilizada o una arginasa, antes o después de la pegilación. Por ejemplo, puede comprenderse una cola de His o un epítopo de afinidad en una variante de arginasa de este tipo para facilitar la purificación. La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre una sustancia que va a aislarse y una molécula a la que puede unirse específicamente. Esto es un tipo de interacción de receptor-ligando. El material de columna se sintetiza acoplando covalentemente una de las parejas de

50 unión a una matriz insoluble. Después el material de columna puede adsorber específicamente la sustancia de la disolución. Se produce elución cambiando las condiciones a aquellas en las que no se producirá la unión (por ejemplo, pH alterado, fuerza iónica, temperatura, etc.). La matriz debe ser una sustancia que en sí misma no adsorbe moléculas en ningún grado significativo y que tiene un amplio intervalo de estabilidad química, física o térmica. El ligando debe acoplarse de tal manera que no afecte a sus propiedades de unión. El ligando también debe

55 proporcionar una unión relativamente estrecha. Y debe ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando.

La cromatografía de exclusión molecular (SEC) es un método cromatográfico en el que moléculas en disolución se separan basándose en su tamaño, o en términos más técnicos, su volumen hidrodinámico. Habitualmente se aplica a moléculas grandes o complejos macromoleculares tales como proteínas y polímeros industriales. Normalmente,

cuando se usa una disolución acuosa para transportar la muestra a través de la columna, la técnica se conoce como cromatografía de filtración en gel, frente al nombre cromatografía de permeación en gel que se usa cuando se usa un disolvente orgánico como fase móvil.

El principio subyacente de SEC es que partículas de diferentes tamaños se eluirán (filtrarán) a través de una fase estacionaria a diferentes velocidades. Esto da como resultado la separación de una disolución de partículas basada en el tamaño. Siempre que todas las partículas se carguen simultáneamente o casi simultáneamente, las partículas del mismo tamaño deberán eluirse juntas. Cada columna de exclusión molecular tiene un intervalo de pesos moleculares que pueden separarse. El límite de exclusión define el peso molecular en el extremo superior de este intervalo y es en el que las moléculas son demasiado grandes como para atraparse en la fase estacionaria. El límite de permeación define el peso molecular en el extremo inferior del intervalo de separación y es en el que las moléculas de un tamaño lo suficientemente pequeño pueden penetrar completamente en los poros de la fase estacionaria y todas las moléculas por debajo de esta masa molecular son tan pequeñas que se eluyen como una única banda.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (o cromatografía de líquidos a alta presión, HPLC) es una forma de cromatografía en columna usada con frecuencia en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos. La HPLC usa una columna que contiene material de empaquetamiento cromatográfico (fase estacionaria), una bomba que mueve la(s) fase(s) móvil(es) a través de la columna, y un detector que muestra los tiempos de retención de las moléculas. El tiempo de retención varía dependiendo de las interacciones entre la fase estacionaria, las moléculas que están analizándose y el/los disolvente(s) usado(s).

V. Composiciones farmacéuticas

Se contempla que las arginasas para su uso en la presente invención pueden administrarse de manera sistémica o local para inhibir el crecimiento de células tumorales y, lo más preferiblemente, para destruir células cancerosas en pacientes con cáncer con cánceres localmente avanzados o metastásicos. Pueden administrarse por vía intravenosa, intratecal y/o intraperitoneal. Pueden administrarse solas o en combinación con fármacos antiproliferativos. En una realización, se administran para reducir la carga de cáncer en el paciente antes de la cirugía u otros procedimientos. Alternativamente, pueden administrarse tras la cirugía para garantizar que cualquier cáncer restante (por ejemplo cáncer que la cirugía no logró eliminar) no sobreviva.

No se pretende que la presente invención se limite por la naturaleza particular de la preparación terapéutica. Por ejemplo, tales composiciones pueden proporcionarse en formulaciones junto con portadores, diluyentes y excipientes líquidos, en gel o sólidos fisiológicamente tolerables. Estas preparaciones terapéuticas pueden administrarse a mamíferos para uso veterinario, tal como con animales domésticos, y uso clínico en seres humanos de una manera similar a otros agentes terapéuticos. En general, la dosificación requerida para la eficacia terapéutica variará según el tipo de uso y modo de administración, así como los requisitos particulares de sujetos individuales.

Tales composiciones se preparan normalmente como disoluciones o suspensiones líquidas, como productos inyectables. Diluyentes y excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, las composiciones pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes estabilizantes o de tamponamiento del pH.

Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, puede ser necesario preparar composiciones farmacéuticas (vectores de expresión, reservas de virus, proteínas, anticuerpos y fármacos) en una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, las composiciones farmacéuticas empleadas en la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una o más variantes de arginasa o agente adicional disuelta o dispersada en un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra prejudicial cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una variante de arginasa, tal como una arginasa multimérica estabilizada o una arginasa pegilada aislada mediante el método dado a conocer en el presente documento, o principio activo adicional, la conocerán los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación, tal como se muestra a modo de ejemplo por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., 1990. Además, para la administración a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridas por la Oficina de normas biológicas de la FDA.

Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales materiales de este tipo y combinaciones de los

misimos, tal como conocerá un experto habitual en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., 1990). Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

La presente invención puede usar diferentes tipos de portadores dependiendo de si va a administrarse en forma sólida, líquida o de aerosol, y si se necesita que sea estéril para vías de administración tales como inyección. Las proteínas, formulaciones y composiciones para su uso en la presente invención pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intramuscular, subcutánea, mucosa, oral, tópica, local, mediante inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando directamente las células diana, a través de un catéter, a través de un lavado, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o mediante otro método o cualquier combinación de lo anterior tal como conocerá un experto habitual en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., 1990).

Las variantes de arginasa pueden formularse en una composición en una forma de base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libre de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácidos acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libre también pueden derivarse a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal como sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como formuladas para administraciones parenterales tales como disoluciones inyectables, o aerosoles para administración a los pulmones, o formuladas para administraciones alimentarias tales como cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Adicionalmente según la presente invención, la composición usada en la presente invención adecuada para la administración se proporciona en un portador farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El portador debe ser asimilable e incluye portadores líquidos, semisólidos, es decir, pastas, o sólidos. Excepto en la medida en que cualquier medio, agente, diluyente o portador convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de la composición contenida en el mismo, su uso en una composición administrable para su uso en la puesta en práctica de los métodos en el contexto de la presente invención es apropiado. Los ejemplos de portadores o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, cargas y similares, o combinaciones de los mismos. La composición también puede comprender diversos antioxidantes para retrasar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos puede provocarse mediante conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero sin limitarse a, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

Según la presente invención, la composición se combina con el portador de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, mediante disolución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Tales procedimientos son rutinarios para los expertos en la técnica.

En una realización específica de la presente invención, la composición se combina o mezcla exhaustivamente con un portador sólido o semisólido. El mezclado puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente tal como trituración. También pueden añadirse agentes estabilizantes en el procedimiento de mezclado con el fin de proteger la composición frente a la pérdida de actividad terapéutica, es decir, desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizadores para su uso en la composición incluyen tampones, aminoácidos tales como glicina y lisina, hidratos de carbono tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

En realizaciones adicionales, la presente invención puede implicar el uso de composiciones de vehículo lipídico farmacéuticas que incluyen variantes de arginasa, uno o más lípidos, y un disolvente acuoso. Tal como se usa en el presente documento, el término "lípidos" se definirá para que incluya cualquiera de la amplia gama de sustancias que son característicamente insolubles en agua y extraíbles con un disolvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos la conocen bien los expertos en la técnica, y tal como se usa el término "lípidos" en el presente documento, no se limita a ninguna estructura particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede producirse de manera natural o ser sintético (es decir, diseñado o producido por el ser humano). Sin embargo, un lípido es habitualmente una sustancia biológica. Los lípidos biológicos se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicosfingolípidos, glicolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos unidos mediante éter y éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos. Evidentemente, compuestos distintos de los descritos específicamente en el presente documento que un experto en la técnica entiende como lípidos también se consideran dentro del contexto de la presente invención.

Un experto habitual en la técnica estará familiarizado con la gama de técnicas que pueden emplearse para dispersar una composición en un vehículo lipídico. Por ejemplo, la arginasa multimérica estabilizada o arginasa pegilada puede dispersarse en una disolución que contiene un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente a un lípido, estar contenida como suspensión en un lípido, estar contenida o complejada con una micela o liposoma, o asociarse de otro modo con un lípido o estructura lipídica mediante cualquier medio conocido por los expertos habituales en la técnica. La dispersión puede dar como resultado o no la formación de liposomas.

La cantidad de dosificación real de una composición para su uso en la presente invención administrada a un paciente animal puede determinarse mediante factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad del estado, tipo de enfermedad que está tratándose, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y la vía de administración. Dependiendo de la dosificación y la vía de administración, el número de administraciones de una dosificación preferida y/o una cantidad eficaz puede variar según la respuesta del sujeto. En cualquier caso, el profesional responsable de la administración determinará la concentración de principio(s) activo(s) en una composición y dosis apropiada(s) para el sujeto individual.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1% de un compuesto activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente el 2% y aproximadamente el 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en el mismo. Naturalmente, la cantidad de compuesto(s) activo(s) en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Un experto en la técnica de preparación de tales formulaciones farmacéuticas tendrá en cuenta factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, vida útil de almacenamiento del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, y como tal, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, hasta aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en el mismo. En ejemplos no limitativos de un intervalo derivable a partir de los números indicados en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente.

VII. Definiciones

El término "aa" se refiere a aminoácido(s). Las sustituciones de aminoácido se indican mediante la posición de aminoácido, por ejemplo 303, en la molécula usando un código de letras (la letra delante del número indica el aminoácido que está sustituyéndose, mientras que la letra detrás del número indica el aminoácido que está introduciéndose).

Tal como se usa en el presente documento el término "parte" cuando hace referencia a una proteína (como en "una parte de una proteína dada") se refiere a fragmentos de esa proteína. El tamaño de los fragmentos puede oscilar entre cuatro residuos de aminoácido y la secuencia de aminoácidos completa menos un aminoácido.

Tal como se usa en el presente documento los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos y se usan de manera intercambiable.

Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína de fusión" se refiere a una proteína quimérica que contiene la proteína de interés (es decir, una arginasa humana o variante de la misma) unida (u operativamente unida) a un fragmento de proteína exógena (la pareja de fusión que consiste en una proteína distinta de arginasa). La pareja de fusión puede potenciar la semivida en suero, solubilidad, o ambas. También puede proporcionar una etiqueta de afinidad (por ejemplo cola de his) para permitir la purificación de la proteína de fusión recombinante de la célula huésped o el sobrenadante de cultivo, o ambos.

Los términos "en combinación operativa", "en orden operativo" y "operativamente unido" se refieren a la unión de secuencias de ácido nucleico de tal manera que se produce una molécula de ácido nucleico que puede dirigir la

transcripción un gen dado y/o la síntesis de una molécula de proteína deseada. El término también se refiere a la unión de secuencias de aminoácidos de tal manera que se produce una proteína funcional.

Tal como se usa en el presente documento el término " K_m " se refiere a la constante de Michaelis-Menton para una enzima y se define como la concentración del sustrato específico a la que una enzima dada proporciona la mitad de su velocidad máxima en una reacción catalizada por enzima.

Tal como se usa en el presente documento el término k_{cat} se refiere al número de recambio o el número de moléculas de sustrato que cada sitio de la enzima convierte en producto por unidad de tiempo, y en el que la enzima está funcionando a máxima eficacia.

Tal como se usa en el presente documento el término K_{cat}/K_m es la constante de especificidad que es una medida de con cuánta eficacia una enzima convierte un sustrato en un producto.

El término "Mn-hArgI" se refiere una arginasa I humana con un cofactor Mn(II). El término "Co-hArgI" se refiere una arginasa I humana (mutante o nativa) con un cofactor Co(II).

El término " CI_{50} " es la mitad (50%) de la concentración inhibitoria (CI) máxima y por tanto una medida de la eficacia.

El término "pegilado" se refiere a la conjugación con polietilenglicol (PEG), que se ha usado ampliamente como portador de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. (Harris *et al.*, 2001). Se ha mostrado que la unión a diversos fármacos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. (Greenwald *et al.*, 2000; Zalipsky *et al.*, 1997). PEG puede acoplarse (por ejemplo unirse covalentemente) a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y mediante otros métodos químicos; sin embargo, el propio PEG está limitado a como máximo dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, se han explorado copolímeros de PEG y aminoácidos como biomateriales novedosos que conservarán las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendrán la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando una mayor carga de fármaco), y que pueden diseñarse sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones (Nathan *et al.*, 1992; Nathan *et al.*, 1993).

El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias de control y codificante necesarias para la producción de un polipéptido o precursor del mismo. El polipéptido puede codificarse por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante siempre que se conserve la actividad enzimática deseada.

El término "sujeto" se refiere a animales, incluyendo seres humanos.

El término "de tipo natural" se refiere a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente que se produce de manera natural. Un gen de tipo natural es aquél que se observa con la mayor frecuencia en una población y por tanto se denomina arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo natural" del gen. En cambio, el término "modificado" o "variante" o "mutante" se refiere a un gen o producto génico que presenta modificaciones en la secuencia y/o las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen o producto génico de tipo natural. Se indica que pueden aislarse mutantes que se producen de manera natural; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas en comparación con el gen o producto génico de tipo natural.

VIII. Kits

La presente invención puede implicar el uso de kits, tales como kits terapéuticos. Por ejemplo, un kit puede comprender una o más composiciones farmacéuticas tal como se describen en el presente documento y opcionalmente instrucciones para su uso. Los kits también pueden comprender uno o más dispositivos para lograr la administración de tales composiciones. Por ejemplo, un kit objeto puede comprender una composición farmacéutica y un catéter para lograr la inyección intravenosa directa de la composición en un tumor canceroso. En otras realizaciones, un kit objeto puede comprender ampollas precargadas de una arginasa multimérica estabilizada o arginasa pegilada aislada, opcionalmente formulada como producto farmacéutico, o liofilizada, para su uso con un dispositivo de administración.

Los kits pueden comprender un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener una composición que incluye un anticuerpo que es eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tal como se describió anteriormente. La etiqueta en el recipiente puede indicar que la composición se usa para una terapia o aplicación no terapéutica específica, y también puede indicar instrucciones para su uso o bien *in vivo* o bien *in vitro*, tal como los descritos anteriormente. El kit comprenderá normalmente el recipiente descrito anteriormente y uno o más de otros recipientes que comprenden materiales

deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones para su uso.

IX. Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar determinadas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la misma. En la siguiente divulgación de experimentos, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar); μM (micromolar); mM (milimolar); N (normal); mol (moles); mmol (milimoles); μmol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μg (microgramos); l (litros); ml (mililitros); μl (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μm (micrómetros); nm (nanómetros); $^{\circ}\text{C}$ (grados centígrados); PM (peso molecular); PBS (solución salina tamponada con fosfato); min (minutos).

EJEMPLO 1

SÍNTESIS Y EXPRESIÓN GÉNICA DE ARGINASA I Y II HUMANAS

Los genes de arginasa I y II humanas contienen ambos múltiples codones que se usan con poca frecuencia en *E. coli* que pueden interferir con la expresión. Por tanto, con el fin de optimizar la expresión de proteínas en *E. coli*, se ensamblaron los genes respectivos con oligonucleótidos con codones optimizados diseñados con el software DNA-Works (Hoover *et al.*, 2002). Cada constructo contiene un sitio de restricción NcoI N-terminal, una cola de His6 N-terminal en marco seguida por un sitio de proteasa de virus del grabado del tabaco (TEV) y un sitio BamHI C-terminal para simplificar la clonación. La escisión mediante proteasa de TEV elimina el péptido His6 y el Met N-terminal de arginasa. Se diseñó un gen de arginasa II con un sitio de escisión de proteasa de TEV y sin los primeros 21 aa nativos. Los primeros 21 aa son una supuesta secuencia de direccionamiento a la mitocondria y su eliminación da como resultado un mayor rendimiento y estabilidad de la proteína (Colleluori *et al.*, 2001). Tras la clonación en un vector pET28a (Novagen), se hicieron crecer *E. coli* (BL21) que contenían un vector de expresión de arginasa apropiado a 37°C usando medio de caldo Terrific (TB) que contenía kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en matraces de agitación a 250 rpm hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0,5-0,6. En ese punto se transfirieron los cultivos hasta 25°C, se indujeron con IPTG 0,5 mM y se dejó que expresaran proteína durante 12 h adicionales. Después se recogieron los sedimentos celulares mediante centrifugación y se resuspendieron en un tampón de IMAC (NaPO_4 10 mM/imidazol 10 mM/ NaCl 300 mM, pH 8). Tras la lisis mediante una célula de presión francesa, se centrifugaron los lisados a 20.000 x g durante 20 min a 4°C, y se aplicó el sobrenadante resultante a una columna de IMAC de cobalto o níquel, se lavó con 10-20 volúmenes de columna de tampón de IMAC, y después se eluyó con un tampón de elución de IMAC (NaPO_4 50 mM/imidazol 250 mM/ NaCl 300 mM, pH 8). Se incorpora el catión de metal divalente deseado mediante incubación con metal 10 mM (CoCl_2 o MnSO_4) durante 15 min a 50°-55°C, seguido por filtración a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm . Usando un dispositivo de filtro de centrifugación con un MWCO de 10.000 (Amicon), después se sometieron las proteínas a intercambio de tampón varias veces en una disolución de Hepes 100 mM, glicerol al 10%, pH 7,4. Después se congelaron inmediatamente alícuotas de enzima arginasa en nitrógeno líquido y se almacenaron a - 80°C. La arginasa purificada de esta manera tiene una homogeneidad de > 95% tal como se evalúa mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie (figura 2). Se calcula que el rendimiento es de ~200 mg/l de cultivo basándose en el coeficiente de extinción calculado, $\epsilon_{280} = 24.180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en una concentración de tampón final de clorhidrato de guanidinio 6 M, tampón fosfato 20 mM, pH 6,5 (Gill y von Hippel, 1989).

EJEMPLO 2

INCORPORACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METAL EN ARGINASA I

Tal como se mencionó en el ejemplo 1, la incorporación de Mn^{2+} y Co^{2+} puede lograrse mediante purificación de arginasa, seguido por una etapa de incubación con metal 10 mM a 50°C durante 10 min. Con el fin de determinar el contenido de metal final y la identidad de las preparaciones de arginasa, se diluyeron muestras de proteína de Mn-hArgI (145 μM), Co-hArgI (182 μM) y tampones de diálisis asociados (Hepes 100 mM, pH 7,4) en ácido nítrico al 2% y se analizaron mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-EM, Department of Geological Sciences, University of Texas en Austin) para cuantificar el contenido de cobalto, hierro, manganeso y zinc en la proteína restando la concentración de metales encontrados en el tampón de diálisis de la concentración de metal de las muestras de proteína finales y dividiendo entre la concentración de proteína. Para determinar las concentraciones de proteína, se calculó un coeficiente de extinción para hArgI basándose en la secuencia de aminoácidos (Gill y von Hippel, 1989). Se calcularon todas las concentraciones de proteína para arginasa I basándose en el $\epsilon_{280} = 24.180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ calculado en una concentración de tampón final de clorhidrato de guanidinio 6 M, tampón fosfato 20 mM, pH 6,5. Para comparación, también se calculó la concentración de arginasa mediante ensayo BCA usando diluciones de BSA como patrón. Usando este método se encontró que muestras de arginasa incubadas con Co^{2+} contenían $2,1 \pm 0,5$ equivalentes de Co y $0,4 \pm 0,1$ equivalentes de Fe, sin cantidades detectables de Zn o Mn. Las muestras incubadas con Mn^{2+} contienen $1,5 \pm 0,2$ equivalentes de Mn y $0,4 \pm 0,1$ equivalentes de Fe, y ninguna cantidad detectable de Zn o Co. Por tanto, la incubación con calor es un método

eficaz para la incorporación de cobalto.

EJEMPLO 3

INCORPORACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METAL EN ARGINASA II

Se logró la incorporación eficaz de metal en arginasa II cultivando *E.coli* que albergaba el gen de ArgII en medio mínimo hasta que se alcanzó una DO_{600} de 1, tras lo cual se expresó la proteína con IPTG 1 mM y $CoCl_2$ 100 μM durante 12 h adicionales. Con el fin de determinar el contenido de metal final y la identidad de las preparaciones de arginasa, se diluyeron muestras de proteína de Co-hArgI (290 μM) y tapones de diálisis asociados (Hepes 100 mM, pH 7,4) en ácido nítrico al 1% y se analizaron mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-EM, Department of Geological Sciences, University of Texas en Austin) para cuantificar el contenido de cobalto, hierro, manganeso y zinc de la proteína restando la concentración de metales encontrados en el tampón de diálisis de la concentración de metal de las muestras de proteína finales y dividiendo entre la concentración de proteína. Para determinar las concentraciones de proteína, se calculó un coeficiente de extinción para hArgI basándose en la secuencia de aminoácidos (Gill y von Hippel, 1989). Se calcularon todas las concentraciones de proteína para arginasa II basándose en el $\epsilon_{280} = 22.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ calculado en una concentración de tampón final de clorhidrato de guanidinio 6 M, tampón fosfato 20 mM, pH 6,5. Para comparación, también se calculó la concentración de arginasa mediante ensayo BCA usando diluciones de BSA como patrón. Usando este método se encontró que las muestras de arginasa expresadas con Co^{2+} contenían $1,35 \pm 0,1$ equivalentes de Co y $0,63 \pm 0,1$ equivalentes de Fe, sin cantidades detectables de Zn o Mn.

EJEMPLO 4

CINÉTICA EN ESTADO ESTACIONARIO DE COBALTO-ARGINASA I A PH FISIOLÓGICO

Se usó la derivatización con diacetilmonoxina (DAMO) de productos de urea en presencia de ácidos fuertes, tiosemicarbazida y Fe^{3+} con calentamiento para producir un cromóforo con una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de $\sim 530 \text{ nm}$, para monitorizar la producción de urea tras la hidrólisis de L-arginina mediante arginasa. La estructura del colorante no se conoce de manera definitiva, pero se plantea la hipótesis de que la reacción es una condensación de DAMO y urea/ureido que se estabiliza posiblemente mediante iones Fe^{3+} (Beale y Croft, 1961). Se construyó una curva patrón de urea frente a A530 que se encontró que era lineal para urea entre 0 - 300 μM con un límite de detección inferior de 1-2 μM . Se examinó la cinética en estado estacionario de Co-hArgI y Mn-hArgI a lo largo de un intervalo de concentraciones de L-arginina (0-40 μM) en un tampón Hepes 100 mM, pH 7,4, 37°C. Normalmente se realizaron las reacciones equilibrando 200 μl en tubos Eppendorf de 1,5 ml a 37°C en un bloque térmico, iniciando la reacción mediante la adición de 5 μl de enzima durante 30 s y extinguiendo con 15 μl de HCl 12 N. Después se mezclaron las reacciones y los blancos con 800 μl de reactivo de revelado de color (COLDER) (Knipp y Vasak, 2000) y se sometieron a ebullición durante 15 min. Tras enfriar durante 10 min, se transfirieron las muestras a cubetas y se leyeron a 530 nm con un espectrofotómetro. L-arginina tiene una absorbancia de fondo que hace necesaria la corrección, por tanto se incluyeron blancos de L-arginina para todas las concentraciones usadas. Después se corrigieron los datos resultantes para compensar el fondo y se calcularon las concentraciones de producto formado a partir de la curva patrón. Después se divide el producto entre el tiempo y la concentración de enzima usada y se representa gráficamente $v_0/[E]$ frente a la concentración de sustrato y se ajusta directamente con la ecuación de Michaelis-Menten (figura 3), en la que $v_0/[E] = k_{cat}*[S]/([S] + K_M)$. Con este método, Co-hArgI tenía una k_{cat} de $240 \pm 14 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $190 \pm 40 \text{ }\mu M$, y k_{cat}/K_M de $1.270 \pm 330 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, en comparación con Mn-hArgI, que tenía una k_{cat} de $300 \pm 12 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $2.330 \pm 260 \text{ }\mu M$, y k_{cat}/K_M de $129 \pm 20 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. El uso de cobalto como cofactor a pH fisiológico conduce a un aumento de 10 veces en la constante de especificidad.

EJEMPLO 5

CINÉTICA EN ESTADO ESTACIONARIO DE COBALTO-ARGINASA II A PH FISIOLÓGICO

Se encontró que arginasa II purificada tal como se describió en el ejemplo 3 y caracterizada tal como se describió en el ejemplo 4 tenía una k_{cat} de $182 \pm 7 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $126 \pm 18 \text{ }\mu M$, y una k_{cat}/K_M de $1.440 \pm 260 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ en comparación con Mn-hArgII en la que se encontró una k_{cat} de $48 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $2.900 \pm 300 \text{ }\mu M$, y k_{cat}/K_M de $17 \pm 2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. El uso de cobalto como cofactor a pH fisiológico conduce a un aumento de 80 veces en la constante de especificidad para arginasa II.

EJEMPLO 6

EXAMEN EN PLACAS DE 96 POCILLOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE ARGINASA Y CLASIFICACIÓN DE CLONES

La hidrólisis mediante arginasa de L-arginina produce L-ornitina y urea. Se adaptó el ensayo de hidrólisis de L-arginina del ejemplo 3 a formato de placa de 96 pocillos para la detección de urea y se usó para examinar bibliotecas de mutantes de proteína y para ordenar mediante clasificación clones con la mayor actividad arginasa. Se seleccionaron clones que presentaban un aumento de más de 2 veces en la actividad para su caracterización adicional. Se mostró que el ensayo tenía un intervalo dinámico de ~5-200 μM para la detección de producto de ureido. Pueden examinarse fácilmente más de 500 clones al día mediante examen manual. La salida de señal, es decir, la intensidad de color, refleja tres parámetros principales, concretamente la constante de especificidad (k_{cat}/K_M), la concentración de enzima $[\text{Enz}]$ y el tiempo (t). Si es necesario, pueden detectarse niveles de enzima en clones individuales mediante ELISA; sin embargo, generalmente la expresión enzimática de arginasa varía menos de dos veces y por tanto las diferencias en la expresión no constituyen un problema significativo.

Se escogieron colonias individuales en placas de cultivo de 96 pocillos que contenían 75 μl de medio de TB/pocillo que contenía kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$. Después se hicieron crecer estos cultivos a 37°C en un agitador de placas hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0,8-1, se enfriaron hasta 25°C, tras lo cual se añadieron 75 μl adicionales de medio que contenía kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ e IPTG 0,5 mM. Se realizó la expresión a 25°C con agitación durante ~2 h, tras lo cual se transfirieron 100 μl de cultivo/pocillo a una placa de ensayo de 96 pocillos. Después se centrifugaron las placas de ensayo para sedimentar las células, se retiró el medio y se sometieron las células a lisis mediante adición de 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de reactivo de extracción de proteínas B-PER (Pierce). Posteriormente se añadieron 50 $\mu\text{l/pocillo}$ adicionales de L-arginina 200 μM , CoCl_2 1 mM, en un tampón Hepes 100 mM, pH 7,4 y se dejaron reaccionar a 37°C. Tras reaccionar ~1-2 min, se añadieron 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de reactivo de revelado de color y se procesó la placa (Knipp y Vasak, 2000). Las colonias que tenían la capacidad de producir urea dieron como resultado la formación de un colorante rojo brillante con una $\lambda_{\text{máx}}$ de 530 nm.

EJEMPLO 7

DEPENDENCIA DE LA TASA DE PH DE COBALTO-ARGINASA Y MANGANESO-ARGINASA

Para examinar la dependencia del pH de k_{cat}/K_M de arginasa sustituida con cobalto y manganeso, se determinaron las constantes cinéticas en estado estacionario a lo largo de un amplio intervalo de valores de pH. Se usaron los siguientes tampones: acetato de sodio (pH 5-5,5), MES (pH 6-6,5), HEPES (pH 7-7,8), Tris (pH 8-9), Capso (pH 9-10,5), todos a una concentración de 100 mM. Se determinaron todas las cinéticas al menos por triplicado a 37°C. Tras ajustar los datos cinéticos a la ecuación de Michaelis-Menten, se calcularon los valores de k_{cat}/K_M y se ajustaron a una ecuación de Henderson-Hasselbach para determinar los valores de pK_a . Dado que ajustes a dos valores de pK_a más próximos que 3,5 unidades tienden a subestimar $y_{\text{máx}}$, se usó el método de Segel para calcular los valores de pK_a corregidos para cada sección de los perfiles de k_{cat}/K_M (Segel, 1975). Los ajustes ajustados de k_{cat}/K_M frente a pH dieron como resultado una curva en forma de campana con Co-hArgI que tenía un pK_a de sección ascendente de $7,5 \pm 0,1$ y un pK_a de sección descendente de $9,8 \pm 0,1$. Mn-hArgI también tenía una curva en forma de campana con un pK_a de sección ascendente de $8,5 \pm 0,1$ y una sección descendente que presentaba un valor de pK_a aparente de $10,1 \pm 0,1$ (figura 4). Las enzimas Mn-hArgI y Co-ArgI mostraron un ΔpK_a de 1 unidad de pH. Este desplazamiento en el pK_a tras la sustitución con Co confiere probablemente gran parte de la mejora observada en la constante de especificidad. A pH fisiológico, aproximadamente el 44% de Co-hArgI tendrá enlace de hidróxido en contraposición al 7% con Mn-hArgI.

EJEMPLO 8

EL EFECTO DE MUTACIONES EN LA POSICIÓN 303

Se construyó una biblioteca de saturación de codón NNS en la posición 303 y se examinó usando los siguientes cebadores mutagénicos: directo '5-cgatcacgttagcaNNSsttcggttagcccg (SEQ ID NO: 3), e inverso '5-CGGGCTAAACCGAAsnnTGCTAACGTGATCG (SEQ ID NO: 4), usando el gen de hArgI como ADN de molde y cebadores terminales específicos; directo '5-GATATACCATGGGTTCTTCTCACCATCATCACCACCACAGCTCTGGCG (SEQ ID NO: 5) e inverso '5-CGAATTCGGATCCTCACTTCGGTGGATTGAGATAATCAATT (SEQ ID NO: 6). Se digirió el producto de PCR con NcoI y BamHI y se ligó en un vector pET28a con ADN ligasa de T4. Se transformó la ligación resultante directamente en *E. coli* (BL21), se sembró en placas de LB-kanamicina para su posterior examen tal como se describió en el ejemplo 4. Se aislaron clones que mostraban la mayor actividad y se secuenció el ADN. Se purificaron las variantes de enzimas respectivas tal como se describió en el ejemplo 1 y se incubaron con calor con cobalto tal como se describió en el ejemplo 2. Se purificaron todas las proteínas hasta una homogeneidad del >95% tal como se evaluó mediante SDS-PAGE. Se determinó la cinética de hidrólisis de arginina con un intervalo de concentraciones de L-arginina (0 - 2 mM) a 37°C en un tampón Hepes 100 mM, pH 7,4, y se ajustaron los datos resultantes a la ecuación de Michaelis-Menten en Kaleidagraph. Cys₃₀₃ sustituida por Phe o Ile condujo a un aumento de 2 veces y 1,6 veces en k_{cat}/K_M respectivamente en comparación con Co-hArgI de tipo natural. Las sustituciones con Leu, Pro, His y Arg tuvieron aproximadamente el 90% de la actividad de tipo natural.

También se sometieron a prueba las variantes de Cys₃₀₃ para determinar la estabilidad en suero a 37°C de la siguiente manera: se añadieron enzimas purificadas a suero humano combinado (Innovative) a una concentración de 1 µM y se incubaron a 37°C. Cada ~24 horas, se extrajeron alícuotas y se sometieron a prueba por triplicado para determinar su capacidad para hidrolizar L-arginina 1 mM en un tampón Hepes 100 mM, pH 7,4. Tras ~4 días se ajustaron los datos resultantes a un modelo de disminución o bien exponencial o bien logístico para calcular valores de $T_{1/2}$. Se usó la estabilidad de la enzima de tipo natural como patrón y se calculó que tenía una $T_{1/2}$ de 33 ± 3 h. Las enzimas sustituidas con Phe, Ile, Leu y His sólo eran aproximadamente la mitad de estables que el tipo natural. Mn-hArgI (○) presentaron una pérdida exponencial de actividad con una vida $T_{1/2}$ de $4,8 \pm 0,8$ h. En cambio, Co-hArgI (●) presentó una pérdida bifásica de actividad con una primera $T_{1/2}$ aparente de $6,1 \pm 0,6$ h seguida por una segunda $T_{1/2}$ mucho más larga de 37 ± 3 h.

EJEMPLO 9

ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

Se evaluó la selectividad de la arginasa humana modificada por ingeniería para la hidrólisis de arginina. Se incubó Co-hArgI (1 µM) o tampón de diálisis con los 20 aa (5 mM cada uno) durante 12 h a 37°C en un tampón fosfato 220 mM, pH 7,4. Se derivatizaron los patrones, controles y experimentos con OPA y FMOC (Agilent) y se separaron en una columna de HPLC de fase inversa C18 (Agilent) (5 µm, 4,6 x 150 mm) esencialmente tal como se describe por Agilent Technologies (número de publicación: 5980-3088) excepto por la modificación del protocolo de separación ligeramente reduciendo la velocidad de flujo en la mitad y duplicando el tiempo de adquisición para obtener una mejor separación de picos. Los 20 aminoácidos convencionales incubados con tampón de diálisis mostraron 20 picos con buena resolución, y los 20 aminoácidos convencionales incubados con Co-hArgI mostraron 20 picos (figura 6) con desaparición del pico de L-arginina ($TR = 12,3$ min) y aparición de un nuevo pico con un tiempo de retención que coincidía con el de L-ornitina ($TR = 18,8$ min). No se observó que ninguno de los otros aminoácidos se viera afectado por Co-hArg I.

EJEMPLO 10

PURIFICACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO Y EXAMEN DE LA CINÉTICA DE VARIANTES

Se desarrolló un esquema de purificación a pequeña escala para purificar rápidamente docenas de proteínas a la vez y llevar a cabo un análisis de la cinética enzimática de alto rendimiento. Se expresaron cultivos de 50 ml de hArg I en matraces de agitación de 125 ml tal como se describió en el ejemplo 1. Se recogieron 5 ml del cultivo resultante mediante centrifugación. Después se sometieron a lisis los sedimentos celulares con 400 µl de reactivo de extracción de proteínas B-PER (Pierce). Se mezcló la fracción soluble con 500 µl de tampón de lisis de IMAC y 100 µl de perlas de IMAC en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se incubó durante dos minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 s en una centrifugadora de sobremesa. Se desechó el sobrenadante y se lavaron las perlas con 2 x 1 ml de tampón de lisis de IMAC mediante mezclado/centrifugación y desechando el sobrenadante. Después se eluyó hArg I de las perlas mediante adición de 300 µl de tampón de elución de IMAC y otra etapa de centrifugación. Se sometió el sobrenadante que contenía hArg I resultante a intercambio de tampón dos veces con un tampón Hepes 100 mM, pH 7,4 usando un dispositivo de concentración por centrifugación con un MWCO de 10.000 (YM-10 Amicon). Después se cuantificó la proteína mediante A_{280} , se calentó en presencia de cobalto como anteriormente, y se evaluó la Co-hArg I resultante mediante SDS-PAGE tal como se describió en el ejemplo 1. Este método permite la purificación de 12 - 16 proteínas en ~2 h con un rendimiento de 200 - 300 µg de proteína con una pureza del 90 - 95% tal como se evalúa mediante SDS-PAGE.

Después se sometieron a prueba las variantes de enzimas para determinar su capacidad para hidrolizar L-arginina mediante incubación de 24 nM de enzima con 200 µM de L-arginina en pocillos de placas de microtitulación. Se recogieron alícuotas en diferentes puntos de tiempo y se extinguieron directamente en el reactivo de revelado de color ácido (COLDER). Tras revelar el colorante y leer la absorción, se ajustaron los datos de curva de progreso a una ecuación exponencial para estimar un valor de k_{cat}/K_M aparente.

EJEMPLO 11

MODIFICACIÓN POR INGENIERÍA DE LOS LIGANDOS DE METAL DE LA 2ª CUBIERTA DE ARGINASA PARA ACTIVIDAD ÓPTIMA

La potencia catalítica de una metalohidrolasa surge en parte de su excepcional capacidad para reducir el valor de pK_a normal del agua (~16) hasta un valor muy inferior y coordinarse con el ion hidróxido altamente reactivo para el ataque en el sustrato. Tanto la clase de metal como su entorno local que comprende ligandos de 1ª y 2ª cubierta influyen sobre el pK_a de la molécula nucleófila de agua/hidróxido (Christianson y Cox, 1999). El metal (A) de hArgI se coordina con el imidazol de H101, que a su vez se une mediante hidrógeno al hidroxilo de S230. El metal (B) de

hArgI se coordina con el imidazol de H126, que tiene un enlace de hidrógeno de la 2ª cubierta con el carboxilo de D181. Se construyó una biblioteca de saturación de codón NNS en las posiciones 181 y 230 usando los siguientes cebadores mutagénicos: (D181) directo '5- cattggcttacgtNNSgtcgaccagg (SEQ ID NO: 7), inverso '5-CCTGGGTCGACSNACGTAAGCCAATG (SEQ ID NO: 8); (S230) directo '5-cgtccaatccatctgNNSitcgatgttgacg (SEQ ID NO: 9), inverso '5-CGTC AACATCGAASNNCAGATGGATTGGACG (SEQ ID NO: 10), junto con el gen de hArgI y cebadores terminales específicos mediante PCR por extensión de solapamiento. Tras la clonación, se transformó la biblioteca en *E. coli* (BL21) y se examinó tal como se describió en el ejemplo 4. Se identificaron clones novedosos mediante secuenciación, volvieron a transformarse en *E. coli* (BL21) y se purificaron y caracterizaron cinéticamente tal como se describió en el ejemplo 8. Se purificaron variantes que presentaban una actividad aparente $\geq$ a la de tipo natural a mayor escala y se sometieron a ensayo para evaluar sus parámetros cinéticos en estado estacionario de k_{cat} y K_M . Se encontró que las siguientes variantes tenían constantes de k_{cat}/K_M mayores que Co-hArgI: hArg I D181S: $1420 \pm 200 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, hArg I D181E/S230A: $1.450 \pm 200 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, hArg I S230C: $2.290 \pm 200 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, y hArg I S230G: $2.340 \pm 70 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

EJEMPLO 12

CITOTOXICIDAD DE Co-ARG Y SUS VARIANTES HACIA CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR Y MELANOMAS METASTÁSICOS

Con el fin de someter a prueba la citotoxicidad *in vitro* de arginasa modificada por ingeniería, se incubaron concentraciones variables (0 - 100 nM) de variantes Mn-ArgI, Co-ArgI o Co-hArgI con células HCC (Hep 3b) o células de melanoma (A375) (Colección americana de cultivos tipo) en placas de 96 pocillos a una densidad de sembrado de 500 células/pocillo, en medio DMEM complementado con suero bovino fetal. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se trataron las células con medio que contenía arginasa por triplicado a diversas concentraciones. La disolución de control era una solución salina equilibrada en medio. Se mantuvieron las células tratadas a 37°C y CO₂ al 5%. Se sometieron a prueba las células mediante ensayo de MTT convencional (Sigma-Aldrich) en los días 1, 3, 5 y 7 mediante adición de 100 µl/pocillo de MTT (5 mg/ml), y se incubaron durante 4 horas con agitación suave de una a dos veces por hora. Después de esto, se aspiró la disolución y después se añadieron 200 µl de DMSO a cada pocillo. Se interpretó la absorbancia a 570 nm para cada pocillo usando un lector de placas automatizado para determinar el número relativo de células supervivientes en comparación con controles. Se ajustaron los datos resultantes a una ecuación exponencial para determinar un valor de CI₅₀ aparente para la citotoxicidad de arginasa. La figura 7A muestra el efecto de la adición de Mn-ArgI o Co-ArgI sobre el % de absorbancia de MTT de células HCC. Se calcularon los valores de CI₅₀ a partir del día 5, proporcionando un valor de CI₅₀ para Mn-hArgI de $5 \pm 0,3 \text{ nM}$ ($\sim 0,18 \text{ µg/ml}$) y un valor de $0,33 \pm 0,02 \text{ nM}$ para Co-hArgI ($\sim 0,012 \text{ µg/ml}$). Por tanto, la enzima Co-ArgI parece ser 15 veces más citotóxica que la enzima sustituida con Mn frente a HCC. Frente a la línea celular de melanoma metastásico (A375), Mn-hArgI (figura 7B) dio como resultado una CI₅₀ aparente de $4,1 \pm 0,1 \text{ nM}$ ($\sim 0,15 \text{ µg/ml}$). La incubación con Co-hArgI condujo a un aumento de 13 veces en la citotoxicidad con una CI₅₀ aparente de $0,32 \pm 0,06 \text{ nM}$ ($\sim 0,012 \text{ µg/ml}$).

EJEMPLO 13

MODIFICACIÓN POR INGENIERÍA DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN DE FC-ARGINASA PARA UNA SEMIVIDA *IN VIVO* POTENCIADA

Se ha empleado la fusión al dominio Fc de IgG de manera extensa para prolongar las semividas *in vivo* de polipéptidos terapéuticos tales como el inhibidor de TNF- α etanercept (Enbri®). El dominio Fc se une al receptor Fc γ Rn, que se expresa en el endotelio vascular y muchos otros tejidos (Roopenian y Akilesh, 2007). La afinidad de Fc γ Rn por el dominio Fc de IgG depende fuertemente del pH. Se produce unión al pH ácido de compartimentos endosómicos permitiendo que la proteína se recircule sobre la superficie celular y por tanto escape de la degradación proteolítica. En la superficie celular, el dominio Fc se libera de Fc γ Rn porque la afinidad de unión es muy baja a pH fisiológico. Se estima que la recirculación endosómica a través de Fc γ Rn aumenta la semivida en suero de inmunoglobulinas al menos 4-7 veces, hasta aproximadamente 7-14 días en seres humanos. Las fusiones con Fc aprovechan esta propiedad para dotar de una semivida larga a moléculas de vida corta. Sin embargo, la arginasa humana es un homotrímero y por tanto si se fusiona a Fc de IgG, que es en sí mismo un dímero, el polipéptido Fc-arginasa resultante formará probablemente agregados de alto peso molecular.

Este problema se evitó empleando formas mutantes de arginasa que interrumpen la trimerización y son estables en forma monomérica. Se han estudiado con cierto detalle la trimerización y la superficie de contacto de subunidades de arginasa I (Lavulo *et al.*, 2001). Se ha mostrado que una sustitución de un único aa en Glu256Gln interrumpe la trimerización dando como resultado la formación de enzima arginasa I monomérica (Sabio *et al.*, 2001). Se introdujo esta mutación en hArgI mediante el uso de dos cebadores mutagénicos: directo '5-ggtttaacgtatcgCAGggcctgtatatcacgg (SEQ ID NO: 11) e inverso '5-CCGTGATATACAGGCCCTGGCGATACGTTAAACC (SEQ ID NO: 12), y dos cebadores terminales específicos (ejemplo 1) mediante PCR por extensión de solapamiento, y clonación en un vector pET28a. Tras la expresión y

purificación de esta variante, los análisis cinéticos en estado estacionario revelaron una actividad casi idéntica en comparación con Co-hArgI con una k_{cat}/K_M de $1.320 \text{ s}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. La figura 8 muestra un gel de PAGE no desnaturante que muestra que Co-hArgI-E256Q es un monómero, tal como se esperaba.

Después se clonó este constructo en vectores de expresión de Fc disponibles. El vector de expresión de Fc es un constructo basado en un plásmido pTRC99a (Amersham) que contiene una secuencia líder de DsbA seguida por la región codificante de Fc de IgG, un sitio de restricción EcoRI y un codón de terminación. Se colocó el gen de arginasa monomérica en marco detrás de la región codificante de Fc digiriendo tanto el vector como el gen con EcoRI, y posteriormente se ligó y se transformó en *E. coli* (BL21) para la secuenciación y expresión. Dado que Fc de IgG es normalmente una proteína glicosilada, hasta ahora la expresión de IgG recombinantes o de fusiones con Fc se ha llevado a cabo en células de mamífero recombinantes que, al contrario que las bacterias, pueden realizar glicosilación con enlace en N. Sin embargo, aunque la glicosilación en Asn297 es crítica para la unión a los receptores de Fcγ activadores e inhibidores (FcγRI-III en seres humanos) no tiene ningún efecto apreciable sobre la afinidad o la unión dependiente del pH a FcγRn (Tao y Morrison, 1989; Simmons *et al.*, 2002). Por tanto, los anticuerpos IgG aglicosilados expresados en bacterias muestran persistencia en suero en primates que casi no puede distinguirse de la de anticuerpos completamente glicosilados expresados en células de mamífero (Simmons *et al.*, 2002). En contra de las nociones anteriores predominantes, los anticuerpos IgG y las proteínas de Fc pueden expresarse eficazmente en *E. coli* hasta niveles de g/l en fermentadores. La expresión en *E. coli* es técnicamente mucho más sencilla y más rápida. Además, dado que la proteína resultante está aglicosilada, no presenta heterogeneidad de glicanos, un problema importante en la expresión de glicoproteínas terapéuticas (Jefferis, 2007). Se purifica la proteína de fusión mediante cromatografía de proteína A y se cuantifica mediante cromatografía por filtración en gel FPLC el rendimiento de la fusión de Fc-arginasa dimérica correctamente plegada con respecto a polipéptidos que no logran dimerizarse. Esta formulación condujo a una forma altamente activa y muy estable de arginasa humana, adecuada para ensayos *in vivo*.

EJEMPLO 14

PEGILACIÓN DE ARGINASA

Se purificó arginasa tal como se describió en el ejemplo 10 con una excepción: tras la unión a la columna de IMAC, se lavó la proteína extensamente (80-90 volúmenes de columna) con un tampón de IMAC que contenía Triton 114 al 0,1% (esta etapa elimina la mayor parte de la endotoxina), 10-20 volúmenes de columna de tampón de IMAC, y después se eluyó con un tampón de elución de IMAC (NaPO_4 50 mM/imidazol 250 mM/NaCl 300 mM, pH 8). Se sometió la arginasa a intercambio de tampón en un tampón NaPO_4 100 mM a pH 8,3 usando un dispositivo de filtración con un MWCO de 10.000 (Amicon). Usando un pequeño recipiente de reacción, se añadió éster carboximetílico de metoxi-PEG-succinimidilo con PM de 5000 (JenKem Technology) a arginasa a una razón molar de 40:1 y se dejó reaccionar durante 1 h a 25°C con agitación constante. Después se llevó la mezcla resultante a 10 mM con CoCl_2 y se calentó a 50°C durante 10 minutos. Tras la centrifugación para eliminar cualquier precipitado, se sometió extensamente la PEG-5000-arginasa a intercambio de tampón (PBS con glicerol al 10%) usando un dispositivo de filtración con un MWCO de 100.000 (Amicon), y se esterilizó con un filtro de jeringa de 0,2 micrómetros (VWR). Se analizó toda la enzima pegilada para determinar el contenido de lipopolisacárido (LPS) usando un kit de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (Cape Cod Incorporated).

Se encontró que la Co-hArgI pegilada tenía una estabilidad en suero casi idéntica a la enzima de tipo natural y presentaba un valor de k_{cat}/K_M de $1690 \pm 290 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. La figura 12 muestra un gel desnaturante del producto final con un PM aparente de $\sim 150 \text{ kDa}$.

EJEMPLO 15

EMPOBRECIMIENTO EN SUERO DE L-ARG EN EL MODELO DE RATÓN

Se trataron ratones Balb/c mediante una única inyección i.p. con 500 µg de Co-hArgI pegilada, preparada farmacológicamente, o un volumen igual de PBS. Se sacrificaron los ratones mediante venopunción cardíaca para la extracción de sangre en los puntos de tiempo de 0, 48, 72 y 96 h. Se mezclaron inmediatamente las muestras de sangre 50:50 (v/v) un tampón citrato de sodio 400 mM, pH 4, se dejaron coagular durante 30 min y se centrifugaron para la separación de suero. Después se filtró el suero resultante con un dispositivo con un MWCO de 10.000 (Amicon) para la eliminación de proteínas grandes y precipitados y se recogió el flujo pasante para su análisis. Se derivatizaron patrones de L-arginina, suero de ratón de control y experimentos con OPA (Agilent) y se separaron en una columna de HPLC de fase inversa C18 (Agilent) (5 µm, 4,6 x 150 mm) esencialmente tal como se describe por Agilent Technologies (número de publicación: 5980-3088) excepto por la modificación del protocolo de separación ligeramente reduciendo la velocidad de flujo en la mitad y duplicando el tiempo de adquisición para obtener una mejor separación de picos. Se construyó una curva patrón de L-arginina representando gráficamente el área del pico de L-Arg frente a la concentración con el fin de cuantificar los niveles de L-Arg en suero. Una única dosis de Co-hArgI preparada farmacológicamente fue suficiente para mantener L-Arg a o por debajo de límites de detección

durante más de 3 días (figura 10).

EJEMPLO 16

TRATAMIENTO DE XENOINJERTO DE TUMOR DE HCC CON CO-HARGI

5 A ratones desnudos se les inyectaron por vía subcutánea en el costado $\sim 10^6$ células HCC recogidas de un cultivo tisular confluyente al 75%. Después de que los tumores de HCC xenoinjertados hubieron crecido hasta $\sim 0,5 \text{ cm}^3$ de diámetro (día 9), se clasificaron los ratones en dos grupos. El grupo experimental recibió una inyección i.p. de 500 μg de Co-hArgI farmacológicamente optimizada en el día 9 y en el día 12. El grupo de control recibió inyecciones i.p. de PBS en los días 9 y 12. Tal como puede observarse en la figura 11, los tumores tratados con PBS habían aumentado 3 veces de tamaño en el día 15. En marcado contraste, los tumores tratados con Co-hArgI
10 habían disminuido de tamaño en el día 15. Los tumores tratados con Mn-hArgI sólo habían mostrado un retraso en la tasa de crecimiento (Cheng *et al.*, 2007). Co-hArgI parece ser un agente quimioterápico altamente eficaz frente a HCC tanto *in vitro* como *in vivo*.

Bibliografía

15 La siguiente bibliografía puede proporcionar detalles de procedimiento a modo de ejemplo u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento.

Beale y Croft, J. Clin. Pathol., 14:418-424, 1961.

Cama *et al.*, Biochemistry, 42:7748-7758, 2003.

Cheng *et al.*, Cancer Lett., 224:67-80, 2005.

Cheng *et al.*, Cancer Res., 67:309, 2007.

20 Cheng *et al.*, Cancer Res., 67:4869-4877, 2007.

Christianson y Cox, Annu. Rev. Biochem., 68:33-57, 1999.

Colleluori *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 389:135-143, 2001.

Dillon *et al.*, Med. Sci. Monit., 8:BR248-253, 2002.

Dowling *et al.*, Cell Mol. Life Sci., 65(13):2039-55, 2008.

25 Durante *et al.*, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 34:906-911, 2007.

Ensor *et al.*, Cancer Res., 62:5443-5450, 2002.

Feun *et al.*, J. Neurooncol., 82:177-181, 2007.

Gill y von Hippel, Anal. Biochem., 182:319-326, 1989.

Greenwald *et al.*, Crit Rev Therap Drug Carrier Syst., 17:101-161, 2000.

30 Harkki *et al.*, BioTechnology, 7:596-603, 1989.

Harris *et al.*, Clin. Pharmacokinet., 40(7):539-51, 2001.

Hoover *et al.*, J. Biol. Chem., 277:37647-37654, 2002.

Hopwood *et al.*, en: Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, CT, 1985.

35 Izzo *et al.*, J. Clin. Oncol., 22:1815-1822, 2004.

Jefferis, Expert Opin. Biol. Ther., 7:1401-1413, 2007.

- Knipp y Vasak, Anal. Biochem., 286:257-264, 2000.
- Lavulo *et al.*, J. Biol. Chem., 276:14242-14248, 2001.
- Lopez *et al.*, Febs J., 272:4540-4548, 2005.
- Lordanescu, J. Bacteriol, 12:597 601,1975.
- 5 Mellor *et al.*, Gene, 24:1-14, 1983.
- Mora *et al.*, Biochemica Biophysica Acta, 1476:181, 2000.
- Nathan *et al.*, Bioconj Chem., 4:54-62, 1993.
- Nathan *et al.*, Macromolecules, 25:4476-4484, 1992.
- Penttila *et al.*, Gene, 61:155-164,1987.
- 10 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- Roopenian y Akilesh, Nat. Rev. Immunol., 7:715-725, 2007.
- Sabio *et al.*, FEBS Lett., 501:161-165, 2001.
- Santhanam *et al.*, Circ. Res., 101:692-702, 2007.
- Savoca *et al.*, Cancer Biochem. Biophys., 7:261-268, 1984.
- 15 Scolnick *et al.*, Biochemistry, 36:10558-10565, 1997.
- Scott *et al.*, Br. J. Cancer, 83:800-810, 2000.
- Segel, en: Enzyme Kinetics, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975.
- Shen *et al.*, Cancer Lett., 231:30-35, 2006.
- Sibakov *et al.*, Eur. J. Biochem., 145:567 572, 1984.
- 20 Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods, 263:133-147, 2002.
- Tao *et al.*, J. Immunol., 143:2595-2601, 1989.
- Ward, Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.
- Wheatley y Campbell, Pathol. Oncol. Res., 8:18-25, 2002.
- Yoon *et al.*, Int. J. Cancer, 120:897-905, 2007.
- 25 Zalipsky *et al.*, Bioconjug Chem., 8:111-118, 1997.
- Lista de secuencias
- <110> GEORGIU, GEORGE STONE, EVERETT
- <120> COMPOSICIONES DE ARGINASAS HUMANAS MODIFICADAS POR INGENIERÍA Y MÉTODOS PARA
- 30 TRATAR EL CANCER
- <130> UTFB:736WO
- <140> DESCONOCIDO
- 35 <141> 01-11-2009

<150> Documento 61/110.218
<151> 31-10-2008

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1044

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 1

gatataccat gggttcttct caccatcatc accaccacag ctctggcgag aacctgtact	60
tccagtctgc gaagagccgt acgatcggca ttattgggtgc gccgttctct aaaggtcagc	120
cacgcggtgg tgtggaagag ggtccgacgg ttctgcgtaa ggccggttta ttagaaaagc	180
tgaaagagca ggagtgcgac gttaaggact acggtgactt accattcgcg gacatcccga	240
atgatagccc gttccaaatc gttaagaatc cgcgctctgt gggtaaagca agcgagcagt	300
tagcaggtaa ggtggccgag gtcaagaaaa acggtcgtat tagcctgggt ttaggcggtg	360
atcatagctt agcaattggc tctatctctg gtcatgcccg tgtgcaccca gatttaggtg	420
tcatttgggt tgacgccc atcgatatca atacgccatt aacgaccacc agcggcaatc	480
tgcatggcca gccggttagc ttcttactga aggagctgaa gggtaaaatt ccagatgttc	540
cgggcttttag ctgggtcacg ccatgtatct ctgccaagga tatcgtgtac attggcttac	600
gtgacgtcga cccaggtgag cactacatct taaagaccct gggatatcaag tatttcagca	660
tgacggaagt ggaccgctta ggcatcggca aggtgatgga ggagacgctg agctatctgc	720
tgggccgtaa gaaacgtcca atccatctga gcttcgatgt tgacggctta gacccgagct	780
ttacgccagc caccggcacg ccggtcgttg gtggtttaac gtatcgcgaa ggccgtgata	840
tcacggagga aatctataag acgggtttac tgagcgtctt ggacattatg gaggttaatc	900
caagcttagg taagacgccg gaagaagtta cccgtaccgt taacacggcg gtcgcgatca	960
cgtttagcatg tttcggttta gcccgcgagg gcaaccataa accaattgat tatctgaatc	1020
caccgaagtg aggatccgaa ttctg	1044

<210> 2

<211> 1080

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 2

5 gatataccat gggcagcagc catcatcacc accatcacag ctctggtgaa aacttatact 60
tccaaagcgt ccatagcgtc gcagtgattg gtgccccgtt tagccaaggt caaaaacgca 120
aggggtgttga acatggtccg gcagcgatcc gcgaagcagg tttaatgaag cgtttaagca 180
gcttaggctg tcaacttaaag gatttcggtg atttaagctt tacgccggtc ccaaaggatg 240
atttatacaa taatctgatc gttaaccac gctctgtggg tctggcgaac caggagctgg 300
cggaggctcg gtctcgtgca gtcagcgacg gttatagctg cgttacgctg ggcggtgatc 360
atagcttagc cattggtacg atttctgggtc atgcccgcca ttgcccggtat ctgtgtgttg 420
tgtgggttga tgcgcacgcg gatatacaata cgccactgac cacgtctagc ggtaatttac 480
acggccagcc ggtagcttc ttattacgtg agctgcaaga caaggtcccg cagttaccag 540
gcttctcttg gatcaaacca tgtatcagca gcgcattctat tgtctacatt ggctgcgtg 600
atgtcgaccc accggagcac ttcattcctga agaattatga catccagtat ttcagcatgc 660
gtgacatcga ccgtctgggt atccaaaaag ttatggagcg cacgttcgat ctgttaatcg 720
gcaagcgcca gcgtccgatt cacctgagct ttgacattga cgcctttgac ccgaccctgg 780
ccccagcaac gggcacgcca gtggttggtg gtttaacctt ccgtgaggggt atgtatatg 840
cagaagagat ccataatacc ggctgttat ctgccctgga tctggttgaa gtcaatccgc 900
agctggcaac ctctgaggag gaagcgaaga cgaccgcca cctggcggtg gacgtcatcg 960
cctcttcttt cggccagacg cgtgaagggt gccatatcgt gtatgaccaa ttaccaacgc 1020
catctagccc ggacgaatct gagaaccaag cacgtgtccg tatttgagga tccgaattcg 1080

<210> 3

<211> 31

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> n es a, c, g o t

20

<400> 3

cgatcacgtt agcannsttc ggttagccc g

31

25

<210> 4

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220> <223> Cebador sintético	
5	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(17) <223> n es a, c, g o t	
10	<400> 4 cgggctaaac cgaasnntgc taacgtgac g	31
15	<210> 5 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético <400> 5 gatataccat ggggtctct caccatcatc accaccacag ctctggcg	48
25	<210> 6 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador sintético <400> 6	
35	cgaattcgga tcctcactc ggtggattca gataatcaat t	41
40	<210> 7 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador sintético <220> <221> misc_feature <222> (14)..(15) <223> n es a, c, g o t	
50	<400> 7 cattggctta cgtnnsgtcg acccagg	27
55	<210> 8 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador sintético <220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n es a, c, g o t	
65		

	<400> 8	
5	cctgggtcga csnnacgtaa gccaatg	27
	<210> 9	
	<211> 31	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(17)	
	<223> n es a, c, g o t	
20	<400> 9	
	cgtccaatcc atctgnnstt cgatgttgac g	31
	<210> 10	
	<211> 31	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(16)	
35	<223> n es a, c, g o t	
	<400> 10	
	cgtcaacatc gaasnncaga tggattggac g	31
40	<210> 11	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 11	
50	ggtttaacgt atcgccaggg cctgtatatc acgg	34
	<210> 12	
	<211> 34	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
60	<400> 12	
	ccgtgatata caggccctgg cgatacgta aacc	34

REIVINDICACIONES

1. Proteína arginasa I o arginasa II humana para su uso en un método de tratamiento de un paciente humano que tiene cáncer, particularmente un cáncer auxotrófico para arginina, que comprende administrar al paciente una formulación que comprende dicha proteína, teniendo dicha proteína arginasa I o arginasa II humana un sitio de unión a metales y comprendiendo al menos una sustitución de aminoácido en el sitio de unión a metales, en la que la proteína presenta un aumento en la hidrólisis de arginina que da como resultado una k_{cat}/K_m al menos dos veces mayor que la de una arginasa I humana nativa que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1 o una arginasa II humana nativa que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 2, en la que dicha proteína arginasa I o arginasa II humana comprende un cofactor metálico no nativo, y en la que dicho cofactor metálico no nativo es cobalto.
2. Proteína para su uso según la reivindicación 1, en la que la proteína presenta una k_{cat}/K_m de entre $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $4.000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4, en particular en la que la proteína presenta una k_{cat}/K_m de entre $400 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2.500 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4.
3. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2,
 - i) en la que la proteína arginasa comprende una cadena polipeptídica; y/o
 - ii) en la que la al menos una sustitución de aminoácido está en His101, Asp124, His126, Asp128, Asp232, Asp234, Trp122, Asp181, Ser230, His120, Asp143, His145, Asp147, Asp251, Asp253, Trp141, Asp200, Ser249, Cys303 o Glu256, preferiblemente en la que la al menos una sustitución de aminoácido es Asp181Ser, Ser230Cys, Ser230Gly, Cys303Phe, Cys303Ile, Glu256Gln, Asp181Glu o Ser230Ala.
4. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la arginasa humana comprende al menos dos sustituciones de aminoácido, en particular en la que las sustituciones de aminoácido en dicha proteína arginasa I humana son Asp181Glu y Ser230Ala.
5. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de arginasa I o arginasa II truncada, en particular en la que la secuencia de aminoácidos carece de una metionina N-terminal o en la que la secuencia de aminoácidos carece de los primeros 21 aminoácidos de la secuencia de tipo natural.
6. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína está covalentemente unida a polietilenglicol.
7. Proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de arginasa I humana o una secuencia de aminoácidos de arginasa II humana y un cofactor metálico no nativo, en la que el cofactor metálico no nativo es cobalto, para su uso en un método de tratamiento de un paciente humano que tiene cáncer, particularmente un cáncer auxotrófico para arginina, que comprende administrar al paciente una formulación que comprende dicha proteína.
8. Proteína para su uso según la reivindicación 7,
 - (a) en la que la arginasa I humana comprende una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1, o
 - (b) en la que la arginasa II humana comprende una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 2.
9. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en la que la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de arginasa I o arginasa II truncada, particularmente en la que la secuencia de aminoácidos carece de una metionina N-terminal o en la que la secuencia de aminoácidos carece de los primeros 21 aminoácidos de la secuencia de tipo natural.
10. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la proteína está covalentemente unida a polietilenglicol.
11. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que la secuencia de aminoácidos se caracteriza además tal como se especifica en las reivindicaciones 2 ó 3, o en la que la proteína comprende además al menos dos sustituciones de aminoácido.
12. Proteína de fusión que comprende la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un segmento peptídico heterólogo, para su uso en un método de tratamiento de un paciente humano que tiene cáncer, particularmente un cáncer auxotrófico para arginina, que comprende administrar al paciente una

formulación que comprende dicha proteína de fusión, en particular en la que el segmento peptídico heterólogo comprende la región Fc de una inmunoglobulina o una parte de la misma.

13. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que al paciente se le ha diagnosticado un carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales o melanoma.

- 5 14. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la formulación se administra por vía tópica, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intraocular, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericardiaca, intraumbilical, oral, mediante inhalación, mediante inyección, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada bañando
10 directamente las células diana, a través de un catéter o a través de un lavado.

15. Proteína para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la formulación farmacéutica comprende dicha proteína y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Secuencia sintética de arginasa I

GATATACCATGGGTTCTTCTCACCATCATCACCACCACAGCTCTGGCGAGAACCTGTACTTCCAGTCTGC
GAAGAGCCGTACGATCGGCATTATTGGTGCGCCGTTCTCTAAAGGTCAGCCACGCGGTGGTGTGGAAGAG
GGTCCGACGGTTCTGCGTAAGGCCGTTTATTAGAAAAGCTGAAAGAGCAGGAGTGCAGACGTTAAGGACT
ACGGTGACTTACCATTTCGCGGACATCCCGAATGATAGCCCGTTCCAAATCGTTAAGAATCCGCGCTCTGT
GGGTAAAGCAAGCAGCAGTTAGCAGGTAAAGGTGGCCGAGGTCAAGAAAAACGGTCGTATTAGCCTGGTT
TTAGGCGGTGATCATAGCTTAGCAATTGGCTCTATCTCTGGTCATGCCCCGTGTGCACCCAGATTTAGGTG
TCATTTGGGTTGACGCCCATACGGATATCAATACGCCATTAACGACCACCAGCGGCAATCTGCATGGCCA
GCCGGTTAGCTTCTTACTGAAGGAGCTGAAGGGTAAAATTCCAGATGTTCCGGGGCTTTAGCTGGGTACAG
CCATGTATTTCTGCCAAGGATATCGTGACATTGGCTTACGTGACGTGACCCAGGTGAGCACTACATCT
TAAAGACCCCTGGGTATCAAGTATTTTCAGCATGACGGAAGTGGACCGCTTAGGCATCGGCAAGGTGATGGA
GGAGACGCTGAGCTATCTGCTGGGCCGTAAAGAACGTCCAATCCATCTGAGCTTCGATGTTGACGGCTTA
GACCCGAGCTTTACGCCAGCCACCGGCACGCCGGTTCGTTGGTGGTTTAAAGTATCGCGAAGGCCTGTATA
TCACGGAGGAAATCTATAAGACGGGTTTACTGAGCGGTCTGGACATTATGGAGGTTAATCCAAGCTTAGG
TAAGACGCCGGAAGAAGTTACCCGTACCGTTAACACGGCGGTTCGCGATCACGTTAGCATGTTTCGGTTTA
GCCCGCGAGGGCAACCATAAACCAATTGATTATCTGAATCCACCGAAGTGAGGATCCGAATTTCG

Secuencia sintética de arginasa II

GATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCACCACCATCACAGCTCTGGTGAAAACCTTATACTTCCAAAGCGT
CCATAGCGTCGCACTGATTGGTGCCCCGTTTAGCCAAGGTCAAAAACGCAAGGGTGTGTAACATGGTCCG
GCAGCGATCCGCGAAGCAGGTTTAATGAAGCGTTTAAAGCAGCTTAGGCTGTCACTTAAAGGATTTTCGGTG
ATTTAAGCTTTACGCCGGTCCCAAAGGATGATTTATACAATAATCTGATCGTTAACCCACGCTCTGTGGG
TCTGGCGAACCAGGAGCTGGCGGAGGTTCGTGTCTCGTGACGTCAGCGACGGTTATAGCTGCGTTACGCTG
GGCGGTGATCATAGCTTAGCCATTGGTACGATTTCTGGTCATGCCCCGCCATTGCCCGGATCTGTGTGTTG
TGTGGGTTGATGCGCACGCGGATATCAATACGCCACTGACCACGTCTAGCGGTAATTTACACGGCCAGCC
GGTTAGCTTCTTATTACGTGAGCTGCAAGACAAGGTCCCGCAGTTACCAGGCTTCTCTTGGATCAAACCA
TGTATCAGCAGCGCATCTATTGTCTACATTGGCCTGCGTGATGTCGACCCACCGGAGCACTTCATCCTGA
AGAATTATGACATCCAGTATTTTCAGCATGCGTGACATCGACCGTCTGGGTATCCAAAAAGTTATGGAGCG
CACGTTTCGATCTGTTAATCGGCAAGCGCCAGCGTCCGATTCACCTGAGCTTTGACATTGACGCCTTTGAC
CCGACCTTGGCCCCAGCAACGGGCACGCCAGTGGTTGGTGGTTTAACTACCGTGAGGGTATGTATATTG
CAGAAGAGATCCATAATACCGGCCTGTTATCTGCCCTGGATCTGGTTGAAGTCAATCCGCAGCTGGCAAC
CTCTGAGGAGGAAGCGAAGACGACGCCAACCTGGCGGTGGACGTCATCGCCTCTTCTTTTCGGCCAGACG
CGTGAAGGTGGCCATATCGTGATGACCAATTACCAACGCCATCTAGCCCGACGAATCTGAGAACCAAG
CACGTGTCCGTAATTTGAGGATCCGAATTTCG

FIG. 1

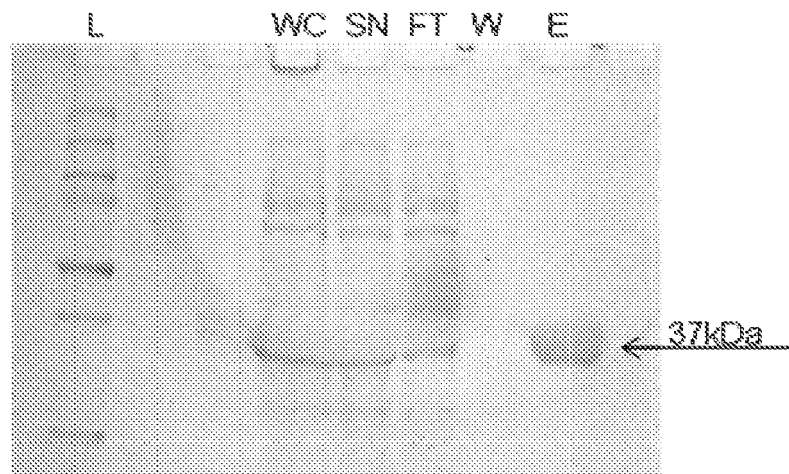


FIG. 2

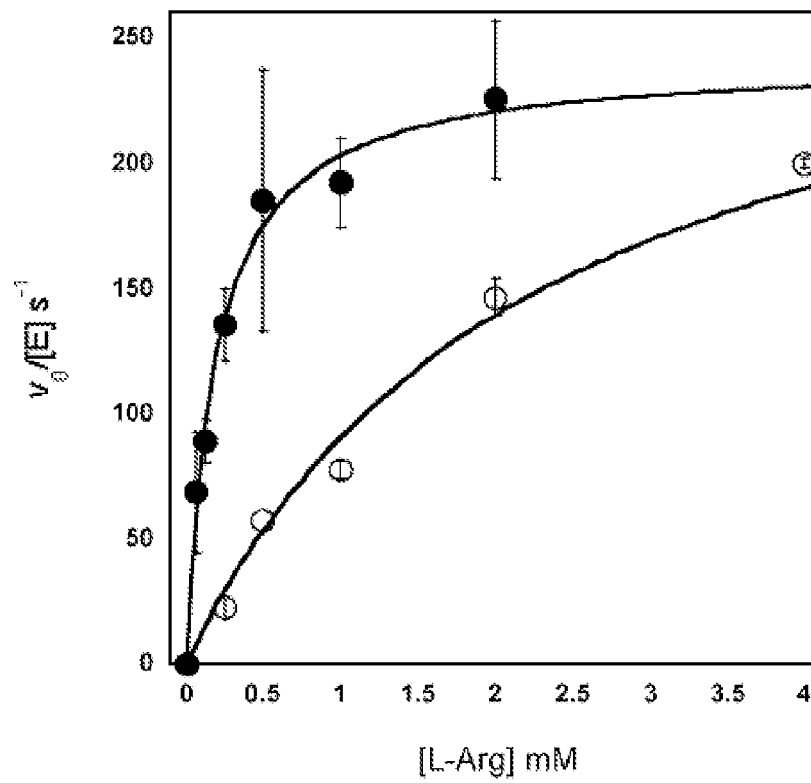


FIG. 3

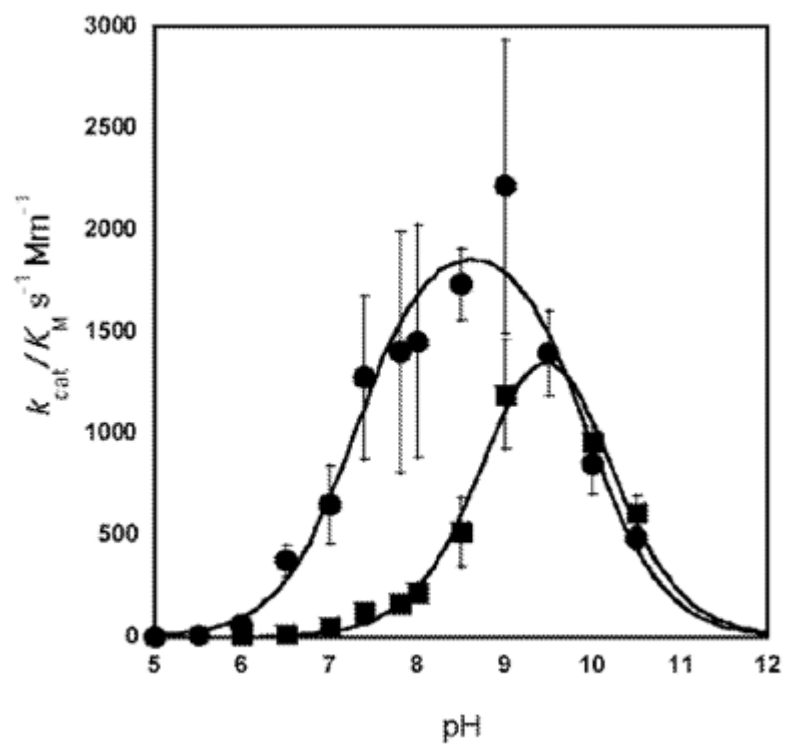


FIG. 4

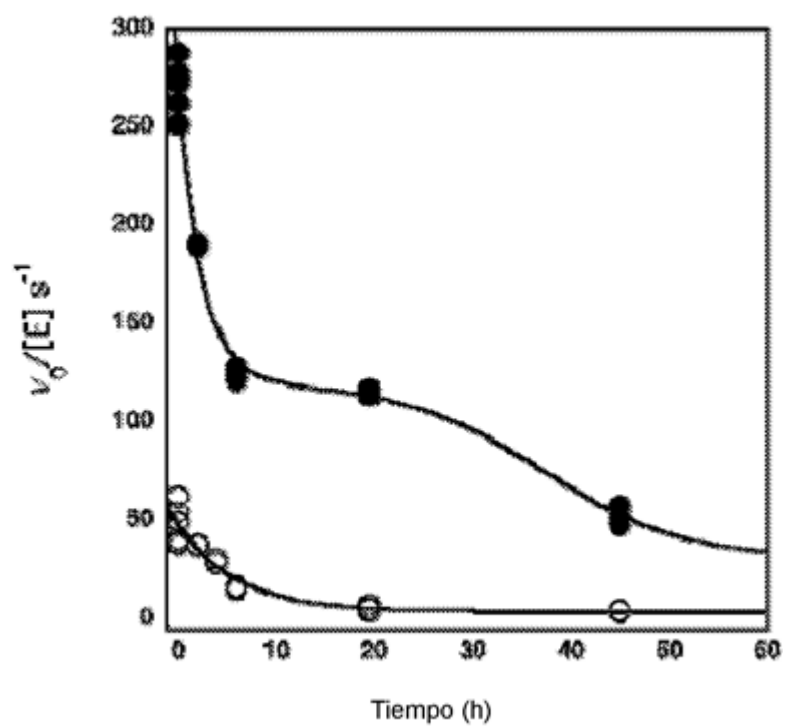
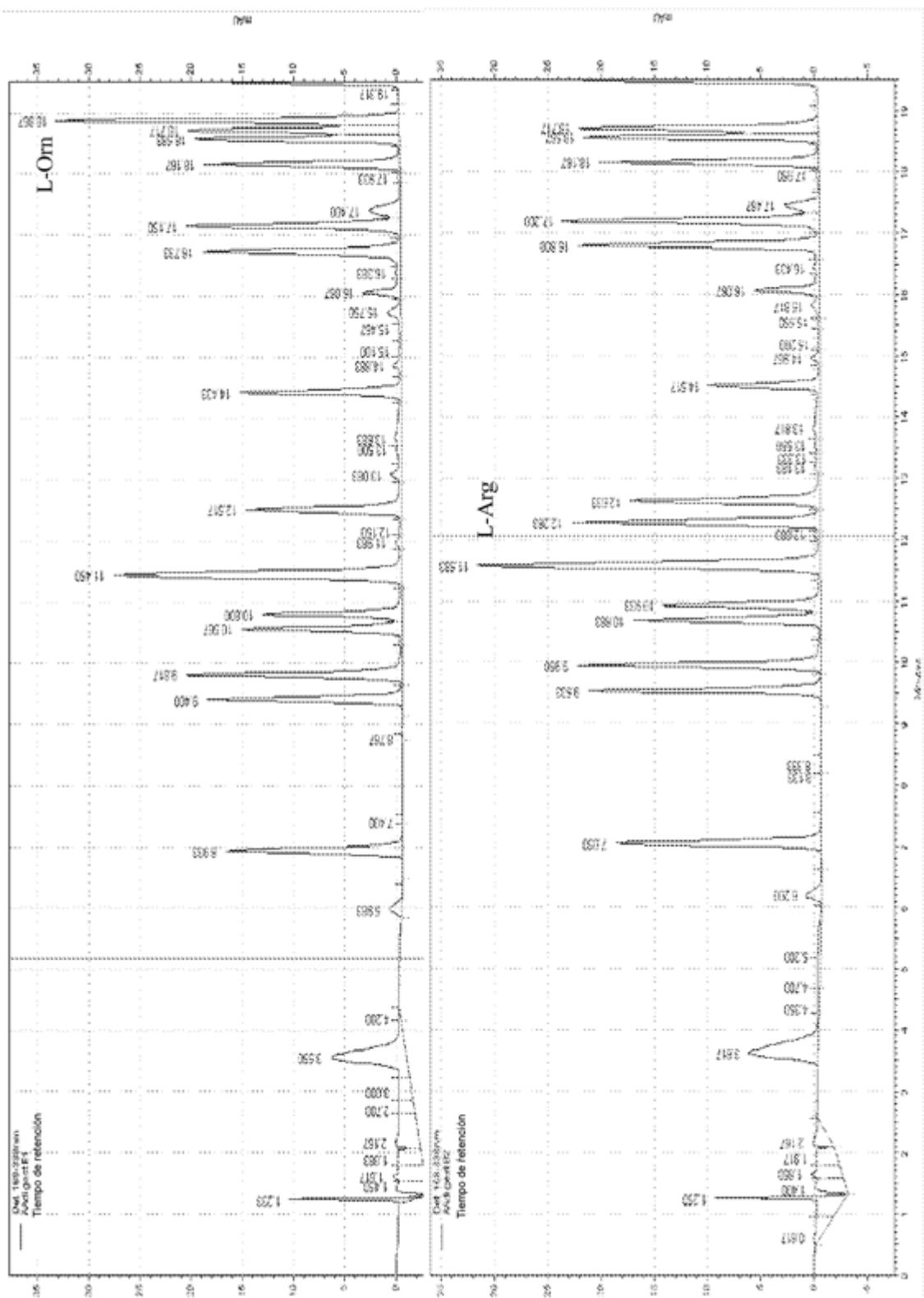
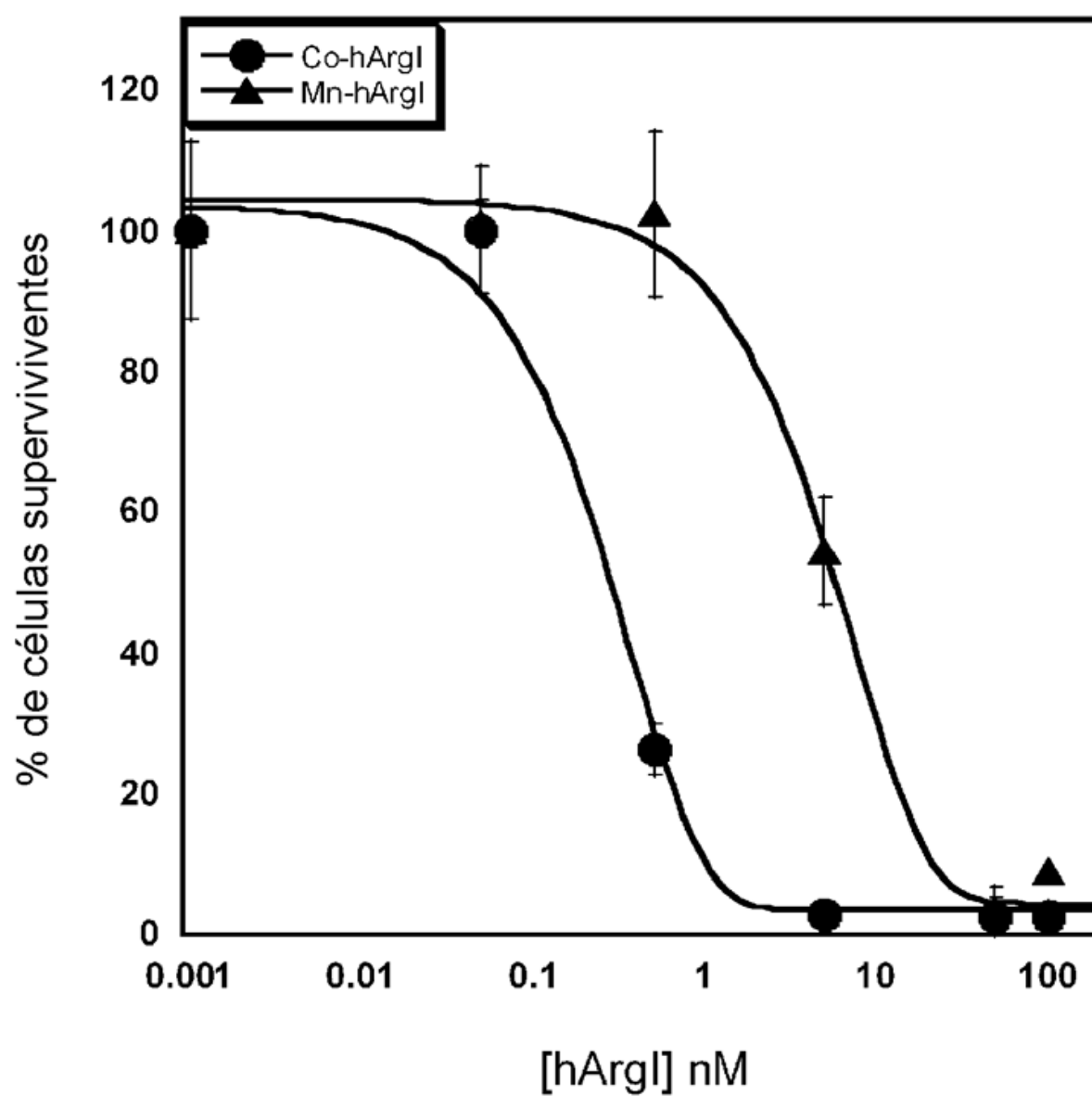


FIG. 5

FIG. 6



**FIG. 7A**

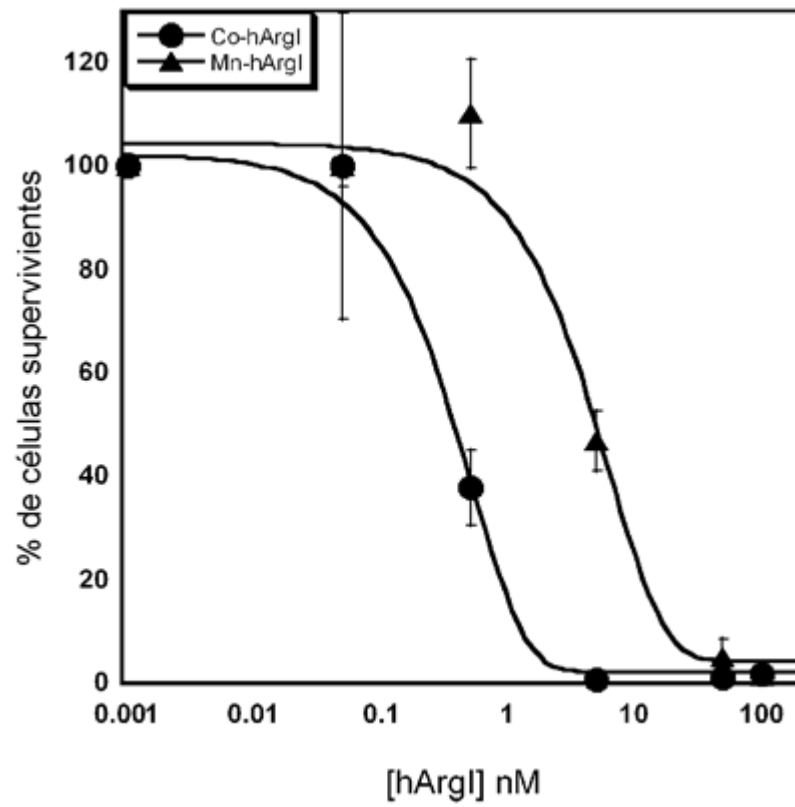


FIG. 7B

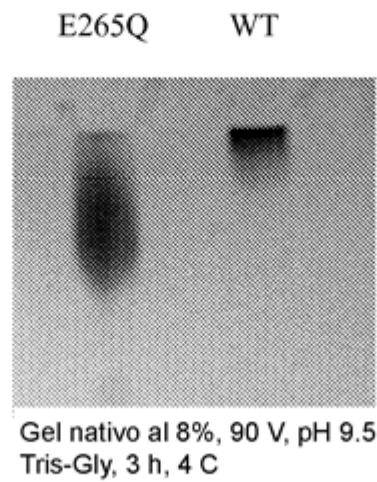


FIG. 8

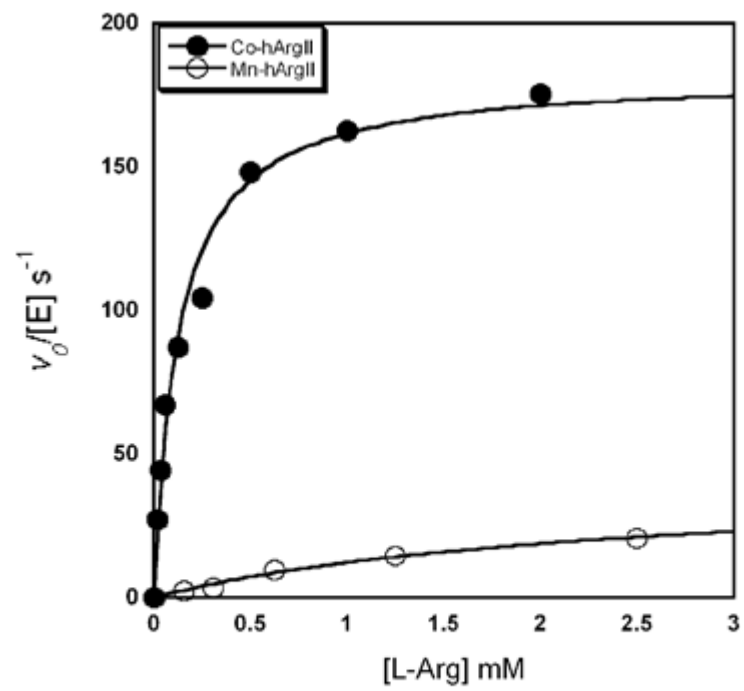


FIG. 9

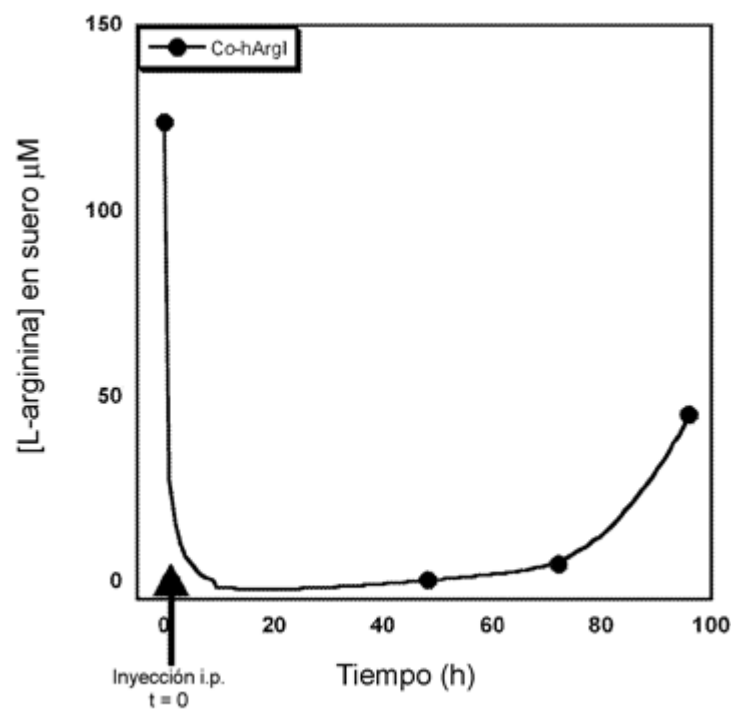


FIG. 10

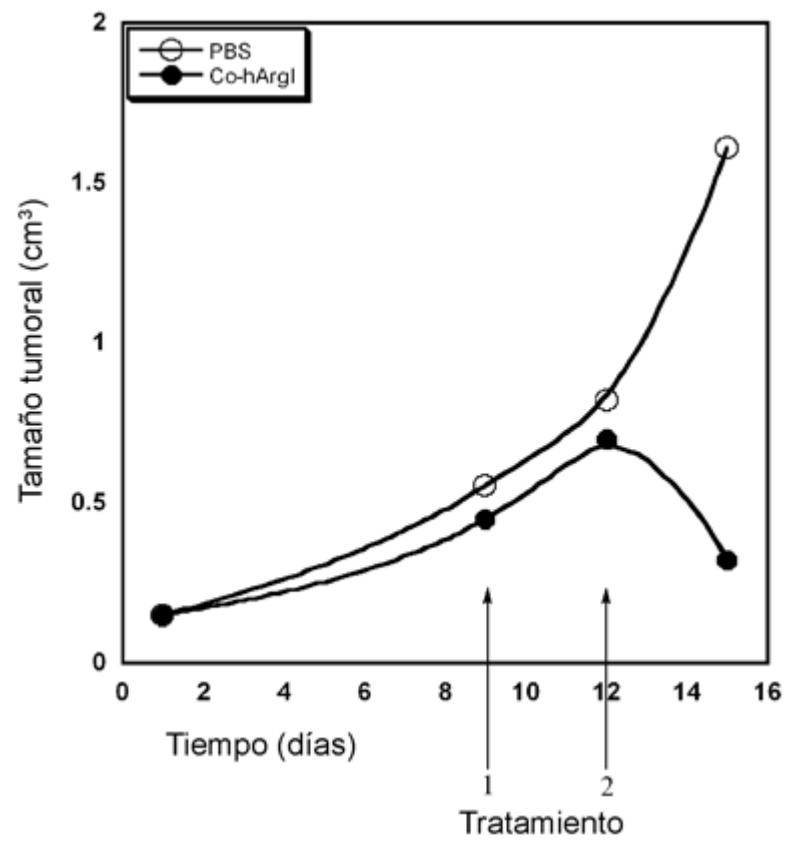


FIG. 11

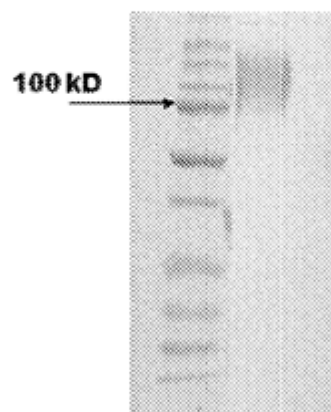


FIG. 12