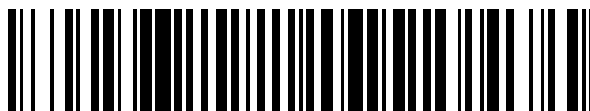


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 120**

51 Int. Cl.:

C12N 15/60 (2006.01)

A61K 38/51 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2014 PCT/US2014/053359**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15031726**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014 E 14841106 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3039139**

54 Título: **L-metioninasa de primate obtenida por ingeniería genética con fines terapéuticos**

30 Prioridad:

29.08.2013 US 201361871768 P

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

27.02.2019

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**GEORGIU, GEORGE;
STONE, EVERETT y
LU, WEI-CHENG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 702 120 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

L-metioninasa de primate obtenida por ingeniería genética con fines terapéuticos

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a los campos de la medicina y la biología. Más en particular, se refiere a una metionina-γ-liasa humana (hMGL) mejorada para su uso en el tratamiento del cáncer.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La demanda del aminoácido esencial, L-metionina, es excepcionalmente alta en tejidos cancerosos. Se ha demostrado que el agotamiento de metionina es eficaz para destruir una amplia diversidad de tipos de tumores sin afectar adversamente a los tejidos no cancerosos. El agotamiento de metionina puede efectuarse a través de la acción de enzimas que hidrolizan el aminoácido. Si bien no existían enzimas humanas que agotaran la metionina se demostró que una enzima bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*, la metionina-γ-liasa, era terapéuticamente eficaz en la clínica y se ha evaluado en ensayos clínicos. Sin embargo, la metionina-γ-liasa, que es una proteína bacteriana, es altamente inmunógena, lo que desencadena la formación de anticuerpos específicos, conduciendo a reacciones adversas y también a una actividad reducida. La metionina-γ-liasa también tiene una semivida muy corta de solo 2 h *in vitro* e *in vivo*, lo que requiere una dosificación muy frecuente y poco prácticamente alta para conseguir el agotamiento sistémico.

25 El agotamiento sistémico de metionina es el foco de numerosas investigaciones y tiene el potencial de tratar cánceres, tales como el cáncer de mama metastásico, el de próstata, el neuroblastoma y el carcinoma pancreático, entre otros. Aunque hay mucho entusiasmo por este enfoque terapéutico, la metionina-γ-liasa derivada de bacterias tiene inconvenientes graves (inmunogenia y rápida desactivación en suero, como se ha mencionado anteriormente) que reducen en gran medida el entusiasmo por su uso como agente quimioterápico.

30 Anteriormente, se creó una metionina-γ-liasa humana (hMGL-NLV) obtenida por ingeniería genética mediante la introducción de tres sustituciones de aminoácidos clave en la enzima cistationina-γ-liasa humana (CGL): E59N, R119L, E339V. Véase, la Patente de los EE.UU. N.º 8.709.407.

35 A diferencia de la CGL nativa, que esencialmente no muestra ninguna actividad catalítica hacia la L-metionina, la variante enzimática E33N, R119L, E339V (hMGL-NLV) muestra una actividad degradadora de L-metionina robusta *in vivo* e *in vitro*. No obstante, sigue existiendo la necesidad de desarrollar enzimas que degraden la L-metionina humana con mayor actividad catalítica para que se pueda conseguir un efecto terapéutico con una dosis más baja y/o una administración menos frecuente de la enzima.

40

Sumario de la invención

En el presente documento se proporcionan mutantes de metionina-γ-liasa (hMGL) humanos con mayor actividad catalítica que hMGL-NLV. Las proteínas hMGL mejoradas preferidas presentan una actividad 6-10 veces mayor. Debido a la mayor actividad catalítica, las proteínas hMGL proporcionadas pueden mostrar una mayor potencia terapéutica para el agotamiento de metionina y, por tanto, pueden necesitarse concentraciones más bajas de agente terapéutico para la dosificación de los pacientes. Esta enzima se obtuvo por ingeniería genética mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos en la enzima humana cistationina-γ-liasa (CGL) en las posiciones que comprenden los restos E59, R119 o E339. Por tanto, en una realización de la presente invención, las sustituciones de E59, R119 y E339 en hCGL incluyen, respectivamente, L-soleucina o L-asparagina (en la posición 59), L-alanina o L-leucina (en la posición 119) y L-valina (en la posición 339) con respecto a una secuencia de aminoácidos de CGL de primate nativa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y 7-10 y una o más mutaciones seleccionadas entre T311G, S63L, L91M, K268R y/o I353S. La presente invención desvela composiciones de materia que muestran una mayor actividad catalítica con respecto a las variantes de hMGL-NLV. Éstas contienen sustituciones en al menos dos de las posiciones E59, R119 o E339 identificadas como críticas para conferir actividad L-metionina-γ-liasa en comparación con las variantes de hMGL-NLV. La mayor actividad catalítica de estas variantes es importante porque pueden necesitarse concentraciones más bajas de agente terapéutico para la dosificación de pacientes.

60 Las variantes que tienen sustituciones de aminoácidos adicionales incluyen la SEQ ID NO: 3, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-1); la SEQ ID NO: 4, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-2); la SEQ ID NO: 5, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-3); y la SEQ ID NO: 6, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-4).

65 Determinados aspectos de la presente invención superan una deficiencia importante en la técnica al proporcionar enzimas mejoradas que comprenden secuencias polipeptídicas humanas que tienen actividad metionina-γ-liasa

(MGL), que pueden ser adecuadas para la terapia antineoplásica y tienen baja inmunogenia, estabilidad en suero mejorada y actividad catalítica mejorada. En consecuencia, en una primera realización se proporciona un polipéptido modificado (es decir, enzima), en particular una variante enzimática con actividad degradadora de metionina derivada de enzimas de primate relacionadas con MGL. Por ejemplo, la nueva variante enzimática puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3-6. En particular, la variante puede derivar de enzimas humanas, tales como la cistationina-γ-liasa humana (CGL). En determinados aspectos, puede haber un polipéptido que comprenda una CGL humana modificada capaz de degradar la metionina. En algunas realizaciones, el polipéptido puede ser capaz de degradar la metionina en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una eficacia catalítica para la metionina (k_{cat}/K_M) de al menos o aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10^4 , 10^5 , 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ o cualquier intervalo derivado de estos valores. En aspectos adicionales, el polipéptido puede mostrar una actividad catalítica hacia la L-homocistina de hasta una k_{cat}/K_M de 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 $M^{-1}s^{-1}$ o cualquier intervalo derivado de estos valores.

Un polipéptido modificado como se ha analizado anteriormente puede caracterizarse por tener un determinado porcentaje de identidad en comparación con un polipéptido sin modificar (por ejemplo, un polipéptido nativo) o con cualquier secuencia de polipéptidos desvelada en el presente documento. Por ejemplo, el polipéptido sin modificar puede comprender al menos o hasta aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 restos (o cualquier intervalo derivado de estos valores) de una cistationasa de primate nativa (es decir, cistationina-γ-liasa). El porcentaje de identidad puede ser de, como máximo o al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % (o cualquier intervalo derivado de estos valores) entre las porciones sin modificar de un polipéptido modificado (es decir, la secuencia del polipéptido modificado excluyendo cualquier sustitución en las posiciones de aminoácido 59, 63, 91, 119, 268, 311, 339 y/o 353) y el polipéptido nativo. También se contempla que el porcentaje de identidad analizado anteriormente pueda relacionarse con una región modificada particular de un polipéptido en comparación con una región sin modificar de un polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido puede contener un sitio de reconocimiento de sustrato modificado o mutante de la cistationasa que puede caracterizarse en función de la identidad de la secuencia de aminoácidos del sitio de reconocimiento de sustrato modificado o mutante de la cistationasa con respecto a una cistationasa sin modificar o mutante de la misma especie o en toda la especie. Un polipéptido humano modificado o mutante caracterizado, por ejemplo, por tener al menos un 90 % de identidad con una cistationasa sin modificar significa que al menos el 90 % de los aminoácidos en ese polipéptido humano modificado o mutante son idénticos a los aminoácidos en el polipéptido sin modificar.

Un polipéptido sin modificar de este tipo puede ser una cistationasa nativa, en particular una isoforma humana u otras isoformas de primates. Por ejemplo, la cistationasa humana nativa puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Los ejemplos no limitantes de otras cistationasas de primates nativas incluyen la cistationasa de *Pongo abelii* (ID de Genbank: NP_001124635.1; SEQ ID NO: 7), la cistationasa de *Macaca fascicularis* (ID de Genbank: AAW71993.1; SEQ ID NO: 8), la cistationasa de *Pan troglodytes* (ID de Genbank: XP_513486.2; SEQ ID NO: 9) y la cistationasa de *Pan paniscus* (ID de Genbank: XP_003830652.1; SEQ ID NO: 10). Los polipéptidos nativos de ejemplo incluyen una secuencia que tiene aproximadamente, como máximo o al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad (o cualquier intervalo derivado de estos valores) con la SEQ ID NO: 1 o 7-10 o un fragmento de las mismas. Por ejemplo, el polipéptido nativo puede comprender al menos o hasta aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 415 restos (o cualquier intervalo derivado de estos valores) de la secuencia de las SEQ ID NO: 1 o 7-10.

En algunas realizaciones, la CGL nativa puede modificarse mediante una o más modificaciones, tales como modificaciones químicas, sustituciones, inserciones, supresiones y/o truncamientos. Por ejemplo, las modificaciones pueden estar en un sitio de reconocimiento de sustrato de la enzima nativa. En una realización particular, la CGL nativa puede modificarse mediante sustituciones. Por ejemplo, el número de sustituciones puede ser cuatro, cinco, seis, siete o más. En realizaciones adicionales, la CGL nativa puede modificarse en el sitio de reconocimiento del sustrato o en cualquier ubicación que pueda afectar a la especificidad del sustrato. Por ejemplo, el polipéptido modificado descrito en el presente documento puede tener la al menos una sustitución de aminoácido en las posiciones de aminoácido correspondientes a E59, S63, L91, R119, K268, T311, E339 y/o 1353 de la SEQ ID NO: 1 o las posiciones de aminoácido 59, 63, 91, 119, 268, 311, 339 y/o 353 de una CGL de primate. Por ejemplo, el primate puede ser un ser humano, *Pongo abelii*, *Macaca fascicularis*, *Pan troglodyte* o *Pan paniscus*.

En el presente documento se describen sustituciones en las que las sustituciones en las posiciones de aminoácido 59, 63, 91, 119, 268, 311, 339 y/o 353 son un ácido aspártico (N), una valina (V), una leucina (L), una metionina (M), una arginina (R), una glicina (G), una alanina (A) o una serina (S). En realizaciones particulares de la presente invención, las modificaciones contienen las siguientes sustituciones: E59N o E59I, S63L, L91M, R119L o R119A, K268R, T311G, E339V e I353S.

En algunas realizaciones, la CGL nativa puede ser una CGL humana. En una realización particular, las sustituciones

son una combinación de E59N, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, I353S y E339V de la CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, un fragmento u homólogo de la misma), una combinación de E59I, S63L, L91M, R119L, K268R, T311G, I353S, E339V de la CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, un fragmento u homólogo de la misma), una combinación de E59N, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, I353S y E339V de la CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, un fragmento u homólogo de la misma) o una combinación de E59I, S63L, L91M, R119A, K268R, T311G, I353S y E339V de la CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, un fragmento u homólogo de la misma). En una realización adicional, el polipéptido modificado puede ser un mutante de CGL-NLMLRGSV de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 11), mutante de CGL-ILMLRGSV de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 12), mutante de CGL-NLMARGSV de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 13), mutante de CGLILMARGSV de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 14), mutante de CGL-NLMLRGSV de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 15), mutante de CGL-NLLGGGSV de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 16), mutante de CGL-NLMGGGVV de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 17), mutante de CGLILMARGSV de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 18), mutante de CGL-NLMLRGSV de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 19), mutante de CGL-ILMLRGSV de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 20), mutante de CGL-NLMARGSV de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 21), mutante de CGL-ILMARGSV de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 22), mutante de CGL-NLMLRGSV de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 23), mutante de CGL-ILMLRGSV de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 24), mutante de CGL-NLMARGSV de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 25) o mutante de CGL-ILMARGSV de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 26).

En algunos aspectos, la presente invención también contempla polipéptidos que comprenden la CGL modificada unida a una secuencia de aminoácidos heteróloga. Por ejemplo, la CGL modificada puede estar unida a la secuencia de aminoácidos heteróloga como una proteína de fusión. En una realización particular, la CGL modificada puede unirse a secuencias de aminoácidos, tales como un Fc de IgG, albúmina, un péptido de unión a albúmina o un polipéptido XTEN para aumentar la semivida *in vivo*.

Para aumentar la estabilidad del suero, la CGL modificado puede estar unida a una o más moléculas de poliéter. En una realización particular, el poliéter puede ser polietilenglicol (PEG). El polipéptido modificado puede unirse a PEG a través de restos de aminoácidos específicos, tales como lisina o cisteína. Para la administración terapéutica, puede dispersarse un polipéptido de este tipo que comprende la CGL modificada en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos, se contempla un ácido nucleico que codifique una CGL modificada de este tipo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión en bacterias. En realizaciones particulares, la bacteria es *E. coli*. En otros aspectos, el ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión en hongos (por ejemplo, levadura), insectos o mamíferos. La presente invención contempla adicionalmente vectores, tales como vectores de expresión, que contienen dichos ácidos nucleicos. En realizaciones particulares, el ácido nucleico que codifica la CGL modificada está unido operativamente a un promotor, incluyendo, pero no limitado a promotores heterólogos. En una realización, una CGL modificada puede administrarse a una célula diana mediante un vector (por ejemplo, un vector de terapia génica). Dichos virus pueden haberse modificado mediante tecnología de ADN recombinante para permitir la expresión del ácido nucleico que codifica la CGL modificada en la célula diana. Estos vectores pueden derivar de vectores de origen no vírico (por ejemplo, plásmidos) o vírico (por ejemplo, adenovirus, virus asociados a adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus del herpes o virus de la vacuna). Los vectores no víricos forman complejos preferentemente con agentes para facilitar la entrada del ADN a través de la membrana celular. Los ejemplos de dichos complejos de vectores no víricos incluyen la formulación con agentes policatiónicos, que facilitan la condensación del ADN y los sistemas de entrega a base de lípidos. Un ejemplo de un sistema de entrega a base de lípidos incluiría la entrega a base de liposomas de ácidos nucleicos.

En otros aspectos adicionales, la presente invención contempla adicionalmente células hospedadoras que comprenden dichos vectores. Las células hospedadoras pueden ser bacterias (por ejemplo, *E. coli*), células fúngicas (por ejemplo, levadura), células de insectos o células de mamíferos. Para diferenciar adicionalmente los mutantes de CGL deseados con actividad degradadora de metionina de la CGL nativa, pueden prepararse células hospedadoras que tengan supresiones de *ilvA* y *metA* (por ejemplo, *E. coli ilvA⁻metA⁻*) y pueden usarse para identificar los mutantes deseados.

En algunas realizaciones, los vectores se introducen en células hospedadoras para expresar la CGL modificada. Las proteínas pueden expresarse de cualquier manera adecuada. En una realización, las proteínas se expresan en una célula hospedadora de manera que la proteína esté glucosilada. En otra realización, las proteínas se expresan en una célula hospedadora de manera que la proteína esté aglucosilada.

Se desvelan métodos de tratamiento mediante la administración del péptido CGL modificado, el ácido nucleico que codifica la CGL modificada en un vector de terapia génica o la formulación de la presente invención y, en particular, métodos de tratamiento de células tumorales o sujetos con cáncer. El sujeto puede ser cualquier animal, tal como un ratón. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero, en particular un primate y, más en particular, un paciente humano. En algunas realizaciones, el método puede comprender seleccionar un paciente con cáncer. En determinados aspectos, el sujeto o el paciente puede mantenerse en una dieta restringida en metionina o una dieta

normal.

5 En algunas realizaciones, el cáncer es cualquier cáncer que sea sensible al agotamiento de metionina. Se desvela un método de tratamiento de una célula tumoral o un paciente con cáncer que comprende administrar una formulación que comprende un polipéptido de este tipo. En algunas realizaciones, la administración se produce en condiciones de manera que al menos una parte de las células del cáncer se destruyan. En otra realización, la formulación comprende una CGL modificada de este tipo con actividad degradadora de metionina en condiciones fisiológicas y que comprende adicionalmente una cadena de polietilenglicol unida. En alguna realización, la formulación es una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las variantes de CGL analizadas anteriormente y excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia. Todas las variantes de CGL anteriores pueden considerarse útiles para la terapia de seres humanos.

15 Se desvela adicionalmente un método de tratamiento de una célula tumoral que comprende administrar una formulación que comprende una CGL modificada no bacteriana (de mamífero, por ejemplo, de primate o de ratón) que tiene actividad degradadora de metionina o un ácido nucleico que codifica la misma.

20 Debido a que las células tumorales dependen de su medio nutriente para obtener metionina, la administración o el tratamiento pueden dirigirse a la fuente de nutrientes para las células y no necesariamente a las propias células. Por tanto, en una aplicación *in vivo*, tratar una célula tumoral incluye poner en contacto el medio nutriente para una población de células tumorales con la metioninasa obtenida por ingeniería genética. En esta realización, el medio puede ser sangre, fluido linfático, fluido espinal y un fluido corporal similar donde se desee el agotamiento de metionina.

25 De acuerdo con determinados aspectos de la presente invención, una formulación de este tipo que contiene la metioninasa obtenida por ingeniería genética puede administrarse por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intracraneal, por vía intraarticular, por vía intraprostática, por vía intrapleural, por vía intrasinovial, por vía intratecal, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía intratumoral, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía subconjuntival, por vía intravesical, por vía mucosa, por vía intrapericárdica, por vía intraumbilical, por vía intraocular, por vía oral, por vía tópica, por inhalación, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada, a través de un catéter, través de un lavado, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas) o por otro método o cualquier combinación de lo anterior como sabría un experto habitual en la materia.

35 En una realización adicional, el método también puede comprender administrar al menos una segunda terapia antineoplásica al sujeto. La segunda terapia antineoplásica puede ser una terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o terapia con citocinas.

40 En una realización, se proporciona una composición que comprende una metioninasa obtenida por ingeniería genética o un ácido nucleico que codifica una metioninasa obtenida por ingeniería genética para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto. Se desvela el uso de una metioninasa obtenida por ingeniería genética o se proporciona un ácido nucleico que codifica una metioninasa obtenida por ingeniería genética en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor. Dicha metioninasa obtenida por ingeniería genética puede ser cualquier metioninasa obtenida por ingeniería genética de las realizaciones.

45 Pueden emplearse realizaciones analizadas en el contexto de las composiciones de la invención con respecto a cualquier otra composición descrita en el presente documento. Por tanto, una realización que pertenece a una composición puede aplicarse también a otras composiciones de la invención.

50 Como se usan en el presente documento, las expresiones "codificar" o "que codifica", con referencia a un ácido nucleico, se usan para hacer que la invención sea fácilmente comprensible para el experto en la materia; sin embargo, estas expresiones pueden usarse indistintamente con "comprender" o "que comprende", respectivamente.

55 Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva, "un" o "una" pueden significar uno o más. Como se usan en el presente documento en la reivindicación o reivindicaciones, cuando se usan junto con la frase "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno.

60 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o". Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

65 En toda la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan a modo de ilustración solamente, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la presente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

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 comprenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas que se presentan en el presente documento.

FIG. 1 - Alineación de secuencias de hCGL con hCGL-8mut-1-4. Los restos resaltados indican restos mutados y su posición. hCGL = SEQ ID NO: 1; hCGL-8mut-1 = SEQ ID NO: 3; hCGL-8mut-2 = SEQ ID NO: 4; hCGL-8mut-3 = SEQ ID NO: 5; y hCGL-8mut-4 = SEQ ID NO: 6.

FIG. 2 - El efecto sobre las estirpes celulares de tumor de próstata PC3 (círculo abierto) y DU145 (cuadrado continuo) tratadas con titulaciones de hCGL-8mut-1 que dan como resultado valores de CI_{50} aparentes de 0,25 μ M y 0,21 μ M, respectivamente.

FIG. 3 - Actividad de hCGL-8mut-1 PEGilada incubada en suero humano combinado a 37 °C en función del tiempo: $T_{0,5}$ aparente = 100 ± 4 h.

FIG. 4 - Una sola dosis de PEG-hCGL-8mut-1 puede reducir la L-metionina sérica a niveles terapéuticamente relevantes durante más de 15 h sin intervención dietética en un modelo de ratón.

FIG. 5 - Comparación de dosis únicas de PEG-hCGL-NLV 200 mg/kg (cuadrado abierto) y PEG-hCGL-8mut-1 50 mg/kg (círculo abierto) en la reducción de L-metionina sérica en ratones con una dieta normal.

Descripción de realizaciones ilustrativas

La presente invención describe composiciones de materia para metionina- γ -liasa humana (hMGL) mejorada con respecto al mutante hMGL-NLV (E59N, R119L, E339V). Estos mutantes muestran una mayor actividad catalítica y, por tanto, pueden requerirse concentraciones más bajas de agente terapéutico para la dosificación de pacientes. Estas enzimas humanas diseñadas degradan el aminoácido L-metionina.

Estas composiciones proporcionan una manera de atacar específicamente las células tumorales a través de un defecto metabólico específico del cáncer. Si bien las enzimas bacterianas también pueden realizar la química, su uso ha demostrado ser altamente inestable e inmunogénico.

I. Definiciones

Como se usan 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 indistintamente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de fusión" se refiere a una proteína quimérica que contiene proteínas o fragmentos de proteína operativamente unidos de una manera no nativa.

Como se usa en el presente documento, el término "semivida" ($\frac{1}{2}$ vida) se refiere al tiempo que se requeriría para que la concentración de un polipéptido del mismo disminuya a la mitad *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, después de la inyección en un mamífero.

Las expresiones "en combinación operable", "en orden operable" y "unido operativamente" se refieren a un enlace en el que los componentes descritos de este modo están en una relación que les permite funcionar de la manera deseada, por ejemplo, una unión de secuencias de ácido nucleico de manera que una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de la molécula de proteína deseada, o una unión de secuencias de aminoácidos de manera que se produzca una proteína de fusión.

El término "enlazador" se refiere a un compuesto o grupo que actúa como un puente molecular para unir operativamente dos moléculas diferentes, en el que una porción del enlazador está operativamente unida a una primera molécula y el que otra porción del enlazador está operativamente unida a una segunda molécula.

El término "PEGilado" se refiere a la conjugación con polietilenglicol (PEG), que se ha utilizado ampliamente como vehículo de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. El PEG puede acoplarse (por ejemplo, puede unirse covalentemente) a agentes activos a través de los grupos hidroxilo al final de la cadena de

PEG a través de métodos químicos; sin embargo, el propio PEG se limita a la mayoría de los dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, se han explorado copolímeros de PEG y aminoácidos como biomaterial nuevo que conservaría la biocompatibilidad de PEG, pero que tendría la ventaja adicional de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando de este modo una mayor carga de fármaco) y que puede diseñarse mediante síntesis para adaptarse a diversas aplicaciones.

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

El término "nativo" se refiere a la forma típica de un gen, un producto génico, o una característica de ese gen o producto génico, cuando se aísla de una fuente de origen natural. Una forma nativa es la que se observa con mayor frecuencia en una población natural y, por tanto, se designa arbitrariamente como forma normal o de tipo silvestre. Por el contrario, los términos "modificado", "variante" o "mutante" se refieren a un gen o producto génico que muestra modificaciones en la secuencia y propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico nativo.

El término "vector" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico transportadora en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula donde pueda replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña a la célula en la que se está introduciendo el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que la secuencia normalmente no se encuentra. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien dotado para construir un vector a través de técnicas recombinantes convencionales (véanse, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994, ambos incorporados en el presente documento por referencia).

La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprenda un ácido nucleico que codifique un ARN que pueda transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN después se traducen en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas no codificantes o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener diversas "secuencias de control", que se refieren a las secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y, posiblemente, la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en una célula hospedadora particular. Además de controlar las secuencias que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven también para otras funciones y que se describen a continuación.

La expresión "beneficio terapéutico" o "terapéuticamente eficaz" como se usa en toda la presente solicitud se refiere a cualquier cosa que promueva o potencie el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de esta afección. Esto incluye, pero no se limita a, una reducción en la frecuencia o gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento del cáncer puede implicar, por ejemplo, una reducción en el tamaño de un tumor, una reducción en la invasividad de un tumor, una reducción en la tasa de crecimiento del cáncer o la prevención de la metástasis. El tratamiento del cáncer también puede referirse a prolongar la supervivencia de un sujeto con cáncer.

El término " K_M ", como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de Michaelis-Menten para una enzima y se define como la concentración del sustrato específico a la que una enzima dada produce la mitad de su velocidad máxima en una reacción catalizada por enzimas. El término " k_{cat} ", como se usa en el presente documento, se refiere al número de recambio o al número de moléculas de sustrato que cada sitio de la enzima convierte en producto por unidad de tiempo y en el que la enzima funciona con la máxima eficiencia. El término " k_{cat}/K_M " como se usa en el presente documento es la constante de especificidad, que es una medida de qué tan eficientemente una enzima convierte un sustrato en producto.

La expresión "cistationina-γ-liasa" (CGL o cistationasa) se refiere a cualquier enzima que cataliza la hidrólisis de la cistationina en cisteína. Por ejemplo, incluye formas de primate de cistationina-γ-liasa o, en particular, formas humanas de cistationina-γ-liasa.

"Tratamiento" y "tratar" se refieren a la administración o aplicación de un agente terapéutico a un sujeto o a la realización de un procedimiento o modalidad en un sujeto con el fin de obtener un beneficio terapéutico de una enfermedad o afección relacionada con la salud. Por ejemplo, un tratamiento puede incluir la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una metioninasa.

"Sujeto" y "paciente" se refieren a un ser humano o no humano, tal como primates, mamíferos y vertebrados. En realizaciones particulares, el sujeto es un ser humano.

II. Metionina-γ-liasa y Cistationina-γ-liasa

Una liasa es una enzima que cataliza la ruptura de diversos enlaces químicos, formando con frecuencia un nuevo doble enlace o una nueva estructura de anillo. Por ejemplo, una enzima que cataliza esta reacción sería una liasa:
 5 $ATP \rightarrow AMPc + PPI$. Las liasas difieren de otras enzimas en que solo requieren un solo sustrato para la reacción en una dirección, pero dos sustratos para la reacción inversa.

Una serie de enzimas dependientes de pirioxal-5'-fosfato (PLP) están implicadas en el metabolismo de la cisteína, la homocisteína y la metionina, y estas enzimas forman una familia relacionada evolutivamente, designada como
 10 enzimas dependientes de PLP del metabolismo de Cys/Met. Estas enzimas son proteínas de aproximadamente 400 aminoácidos y el grupo PLP se une a un resto de lisina ubicado en la ubicación central del polipéptido. Los miembros de esta familia incluyen la cistationina-γ-liasa (CGL), la cistationina-γ-sintasa (CGS), la cistationina-β-liasa (CBL), la metionina-γ-liasa (MGL) y la O-acetilhomoserina (OAH)/O-acetil-serina (OAS) sulfhidrilasa (OSHS). Común a todas ellas es la formación de un complejo de Michaelis que conduce a un sustrato externo aldimina. El curso
 15 adicional de la reacción está determinado por la especificidad de sustrato de la enzima particular.

Por ejemplo, los inventores introdujeron mutaciones específicas en un miembro de la familia de la liasa dependiente de PLP, tal como la cistationina-γ-liasa humana, para cambiar su especificidad de sustrato. De esta manera, los
 20 inventores produjeron nuevas variantes con la capacidad *de novo* para degradar L-Met como un sustrato con una actividad catalítica sustancialmente más alta que hMGL-NLV. En otras realizaciones, también puede contemplarse una modificación de otras enzimas dependientes de PLP para producir una nueva actividad degradadora de metionina.

Como enzima dependiente de PLP, una metionina-γ-liasa (EC 4.4.1.11) es una enzima que cataliza la reacción
 25 química: $L\text{-metionina} + H_2O \rightarrow \text{metanotiol} + NH_3 + 2\text{-oxobutanoato}$. Por tanto, los dos sustratos de esta enzima son L-metionina y H_2O , mientras que sus tres productos son metanotiol, NH_3 y 2-oxobutanoato. Esta enzima pertenece a la familia de las liasas, específicamente a la clase de liasas de carbono-azufre. El nombre sistemático de esta clase de enzimas es L-metionina metanotiol-liasa (que forma 2-oxobutanoato desaminante). Otros nombres de uso común
 30 incluyen L-metioninasa, metionina liasa, metioninasa, metionina destiometilasa, L-metionina-gamma-liasa y L-metionina metanotiol-liasa (desaminante). Esta enzima participa en el metabolismo del selenoaminoácido. Emplea un cofactor, piridoxal-5'-fosfato.

La metioninasa por lo general consiste en 389-441 aminoácidos y forma un homotetrámero. Las enzimas
 35 metioninasa generalmente están compuestas por cuatro subunidades idénticas de un peso molecular de ~45 kDa (Sridhar *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 1984). La estructura de la enzima se dilucidó mediante cristalización (Kudou *et al.*, 2007). Cada segmento del tetrámero está compuesto por tres regiones: un dominio N-terminal prolongado (restos 1-63) que incluye dos hélices y tres cadenas beta, un dominio de unión a PLP grande (restos 64-262) que está formado por una lámina beta de siete cadenas en su mayor parte paralela que se intercala entre ocho hélices
 40 alfa y un dominio C-terminal (restos 263-398). El cofactor PLP es necesario para la función catalítica. Los aminoácidos importantes para la catálisis se han identificado basándose en la estructura. Tyr59 y Arg61 de subunidades vecinas, que también están fuertemente conservadas en otras enzimas de la familia, están en contacto con el grupo fosfato de PLP. Estos restos son importantes como el ancla principal dentro del sitio activo. Lys240, Asp241 y Arg61 de un monómero y Tyr114 y Cys116 de un monómero adyacente forman una red de enlaces de hidrógeno en el sitio activo de la metioninasa que confiere especificidad a la enzima.

La cistationina-γ-liasa (CGL o cistationasa) es una enzima que descompone la cistationina en cisteína y α-
 45 cetobutirato. El piridoxal fosfato es un grupo prostético de esta enzima. Aunque los mamíferos no tienen una metioninasa (MGL), sí tienen cistationasa con homología de secuencia, estructural y química con las enzimas MGL bacterianas. Como se muestra en los Ejemplos, la obtención de proteínas por ingeniería genética se usó para
 50 convertir la cistationasa, que no tiene actividad para la degradación de la L-Metionina, en una enzima que puede degradar este aminoácido a una alta velocidad.

III. Obtención por ingeniería genética de metioninasa

Puesto que los seres humanos no producen metionina-γ-liasa (MGL o metioninasa), es necesario obtener por
 55 ingeniería genética metioninasas para la terapia de seres humanos que tengan una alta actividad y especificidad para degradar la metionina en condiciones fisiológicas, así como una alta estabilidad en fluidos fisiológicos, tales como suero, y que además no sean inmunógenas porque son proteínas nativas que normalmente desencadenan tolerancia inmunitaria.

Debido a los efectos inmunógenos no deseados observados en estudios en animales con pMGL (MGL de *P. putida*),
 60 es deseable obtener por ingeniería genética la actividad degradadora de L-metionina en una enzima humana. La tolerancia inmunitaria a las proteínas humanas hace que sea probable que dicha enzima sea no inmunógena o mínimamente inmunógena y, por tanto, bien tolerada.

65 Determinados aspectos de las nuevas enzimas con actividad MGL como la metioninasa obtenida por ingeniería

genética abordan estas necesidades. Aunque los mamíferos no tienen una MGL, sí tienen una cistationina-γ-liasa (CGL) que tiene homología de secuencia, estructural y química con las enzimas MGL bacterianas. La CGL es un tetrámero que cataliza la última etapa en la vía de transulfuración de mamíferos (Rao *et al.*, 1990). La CGL cataliza la conversión de L-cistationina en L-cisteína, alfa-cetobutirato y amoniaco. El ADNc humano de CGL (hCGL) se ha clonado y expresado anteriormente, pero con rendimientos relativamente bajos (~ 5 mg/l de cultivo) (Lu *et al.*, 1992; Steegborn *et al.*, 1999).

Por ejemplo, se han proporcionado métodos y composiciones relacionadas con una cistationina-γ-liasa (CGL o cistationasa) de primate (en particular de ser humano) modificada a través de mutagenia para hidrolizar metionina con una alta eficacia, mientras que la cistationina-γ-liasa no presenta actividad metioninasa en su forma nativa.

Algunas realizaciones se refieren a proteínas y polipéptidos modificados. Las realizaciones particulares se refieren a una proteína o un polipéptido modificados que presentan al menos una actividad funcional que es comparable a la versión sin modificar, preferentemente, la actividad de la enzima metioninasa. En aspectos adicionales, la proteína o el polipéptido puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad en suero. Por tanto, cuando la presente solicitud se refiere a la función o actividad de "proteína modificada" o un "polipéptido modificado", un experto en la materia entenderá que esto incluye, por ejemplo, una proteína o polipéptido que posee una ventaja adicional sobre la proteína o polipéptido sin modificar, tal como la actividad de la enzima metioninasa. En determinadas realizaciones, la proteína o polipéptido sin modificar es una cistationina-γ-liasa nativa, específicamente una cistationina-γ-liasa humana. Se contempla específicamente que las realizaciones que se refieren a una "proteína modificada" puedan implementarse con respecto a un "polipéptido modificado" y viceversa.

La determinación de la actividad puede conseguirse usando ensayos familiares para los expertos en la materia, en particular con respecto a la actividad de la proteína y puede incluir con fines de comparación, por ejemplo, el uso de versiones nativas y/o recombinantes ya sea de la proteína o el polipéptido modificados o sin modificar. Por ejemplo, la actividad metioninasa puede determinarse mediante cualquier ensayo para detectar la producción de cualquier sustrato que sea resultado de la conversión de metionina, tal como el alfa-cetobutirato, el metanotiol y/o el amoniaco.

En determinadas realizaciones, un polipéptido modificado, tal como una cistationina-γ-liasa modificada, puede identificarse basándose en su aumento de la actividad degradadora de metionina. Por ejemplo, pueden identificarse sitios de reconocimiento de sustrato del polipéptido sin modificar. Esta identificación puede basarse en el análisis estructural o el análisis de homología. Puede generarse una población de mutantes que impliquen modificaciones de dichos sitios de reconocimiento de sustrato. En una realización adicional, pueden seleccionarse mutantes con una mayor actividad degradadora de metionina a partir de la población mutante. La selección de los mutantes deseados puede incluir métodos, tales como la detección de subproductos o productos de la degradación de metionina.

Las proteínas modificadas pueden poseer supresiones y/o sustituciones de aminoácidos; por tanto, una proteína con una supresión, una proteína con una sustitución y una proteína con una supresión y una sustitución son proteínas modificadas. En algunas realizaciones, estas proteínas modificadas pueden incluir adicionalmente inserciones o aminoácidos añadidos, tales como proteínas de fusión o proteínas con enlazadores, por ejemplo. Una "proteína suprimida modificada" carece de uno o más restos de la proteína nativa, pero puede poseer la especificidad y/o actividad de la proteína nativa. Una "proteína suprimida modificada" también puede tener una inmunogenia o una antigenicidad reducidas. Un ejemplo de una proteína suprimida modificada es una que tiene un resto de aminoácido suprimido de al menos una región antigénica, es decir, una región de la proteína que se determina que es antigénica en un organismo particular, tal como el tipo de organismo al que se le puede administrar la proteína modificada.

Las variantes de sustitución o reemplazo normalmente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, en particular sus funciones efectoras y/o biodisponibilidad. Las sustituciones pueden o no ser conservadoras, es decir, un aminoácido se reemplaza por uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.

Además de una supresión o sustitución, una proteína modificada puede poseer una inserción de restos, que normalmente implica la adición de al menos un resto en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un péptido o polipéptido de direccionamiento o simplemente un único resto. Se analizan a continuación adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión.

La expresión "equivalente biológicamente funcional" se entiende bien en la técnica y se define con más detalle en el presente documento. En consecuencia, se incluyen secuencias que tienen entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 80 %, o entre aproximadamente el 81 % y aproximadamente el 90 %, o incluso entre aproximadamente el 91 % y aproximadamente el 99 % de aminoácidos que son idénticos o funcionalmente

equivalentes a los aminoácidos de un polipéptido de control, a condición de que se mantenga la actividad biológica de la proteína. Una proteína modificada puede ser biológicamente funcionalmente equivalente a su homólogo nativo en determinados aspectos.

- 5 También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos N o C-terminales o secuencias 5' o 3' adicionales y, aun así, ser esencialmente como se establece en una de las secuencias desveladas en el presente documento, siempre que la secuencia satisfaga los criterios establecidos anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad de la proteína biológica en lo que concierne a la expresión de la proteína. La adición de secuencias terminales se aplica en particular a las secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir diversas secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que aparecen dentro de los genes.

15 IV. Agotamiento enzimático de L-metionina para terapia

En determinados aspectos, los polipéptidos pueden usarse para el tratamiento de enfermedades, incluyendo cánceres que son sensibles al agotamiento de metionina, tales como el carcinoma hepatocelular, el melanoma y el carcinoma de células renales, con nuevas enzimas que agotan la L-metionina. La invención desvela específicamente métodos de tratamiento que usan cistationina- γ -liasa modificada con actividad degradadora de metionina. Como se describe a continuación, como las metionina- γ -liasas disponibles actualmente son normalmente proteínas derivadas de bacterias, siguen existiendo varios problemas para su uso en terapia de seres humanos. Determinadas realizaciones de la presente invención proporcionan nuevas enzimas con actividad metionina- γ -liasa para aumentar la eficacia terapéutica.

25 El agotamiento de metionina (L-Met) se ha estudiado durante mucho tiempo como un posible tratamiento para el cáncer. Si bien la L-Met es un aminoácido esencial, se ha demostrado que muchas estirpes celulares y tumores malignos humanos tienen una necesidad de metionina relativamente mayor (Halpern *et al.*, 1974; Kreis y Goodenow, 1978; Breillout *et al.*, 1990; Kreis *et al.*, 1980; Kreis, 1979). Las estirpes celulares tumorales dependientes de metionina presentan niveles nulos o bajos de metionina sintasa, la enzima que normalmente recicla la homocisteína de nuevo a L-Met (Halpern *et al.*, 1974; Ashe *et al.*, 1974). La mayoría de las células normales pueden crecer con precursores, tales como la homocisteína y la homocistina, mientras que muchas células malignas deben recatar la L-Met directamente de su entorno extracelular. Además, cualquier neoplasia en rápido crecimiento puede verse afectada negativamente por la falta de elementos componentes básicos para el crecimiento. La metionina es particularmente importante ya que su agotamiento conduce no solo a la disminución de la síntesis de proteínas, sino también a la desregulación de las vías de metilación dependientes de S-adenosilmetionina (SAM), que son particularmente importantes para la regulación génica.

Las diferencias en las necesidades de metionina entre las células normales y las cancerosas proporcionan una oportunidad terapéutica. El agotamiento enzimático de metionina se ha explorado en una serie de estudios en modelos animales, así como en ensayos clínicos de Fase I (Tan *et al.*, 1997a; Tan *et al.*, 1996a; Lishko *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1996b; Yoshioka *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2004a; Yang *et al.*, 2004b; Tan *et al.*, 1997b).

Debido a que los seres humanos carecen de una enzima que hidrolice la metionina, se evaluaron las L-metionina- γ -liasas bacterianas, MGL, de diversas fuentes para la terapia antineoplásica. La metionina- γ -liasa cataliza la conversión de metionina en metanotiol, alfa-cetobutirato y amoníaco. Se han purificado y sometido a ensayo enzimas bacterianas de diversas fuentes como agentes agotadores de metionina contra estirpes celulares cancerosas. La fuente *P. putida* (pMGL) se seleccionó para aplicaciones terapéuticas debido a su alta actividad catalítica, bajo valor de K_M y valor relativamente alto de k_{cat} (Esaki y Soda, 1987; Ito *et al.*, 1976), en comparación con otras fuentes. Además, el gen para pMGL se ha clonado en *E. coli* y la proteína se expresó con un alto rendimiento proteico (Tan *et al.*, 1997a; Hori *et al.*, 1996).

Se han realizado estudios *in vivo* en modelos animales, así como en seres humanos. Tan *et al.* (1997a) realizaron estudios con tumores humanos xenoinjertados en ratones atímicos y descubrieron que los cánceres de pulmón, colon, riñón, cerebro, próstata y el melanoma eran todos sensibles a pMGL. Adicionalmente, no se detectó ninguna toxicidad a dosis eficaces, como se determinó por la ausencia de pérdida de peso en los animales. Se determinó que la semivida en estos experimentos era de solo 2 h, medida a partir de muestras de sangre recogidas. Además, se requiere la infusión de PLP con el fin de mantener la actividad de la MGL. A pesar de la semivida muy corta, Tan *et al.* (1997a) notificaron la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control de solución salina.

60 Yang *et al.* (2004b) estudiaron la farmacocinética, la farmacodinámica en términos de agotamiento de metionina, la antigenicidad y la toxicidad de la MGL en un modelo de primate. Los estudios de búsqueda de dosis se realizaron a 1000-4000 unidades/kg administradas por vía intravenosa. La dosis más alta fue capaz de reducir la metionina plasmática a un nivel indetectable (menos de 0,5 μ M) 30 min después de la inyección, permaneciendo el nivel de metionina indetectable durante 8 h. El análisis farmacocinético mostró que la pMGL se eliminó con una semivida de 2,5 h. Una administración de esa dosis cada 8 h/día durante 2 semanas dio como resultado un agotamiento de metionina plasmática en estado estacionario a menos de 2 μ M. Se observó una leve toxicidad a través de la

disminución de la ingesta de alimentos y una ligera pérdida de peso. Desafortunadamente, la reexposición el día 28 dió como resultado un shock anafiláctico y muerte en un animal, indicando que la pMGL es altamente inmunógena, lo que es una desventaja significativa para la terapia de seres humanos. El pretratamiento posterior con hidrocortisona previno la reacción anafiláctica, aunque con frecuencia se observaron vómitos. Se realizaron reexposiciones adicionales en los días 66, 86 y 116. Se detectaron anticuerpos anti-rMGL después de la primera exposición y aumentaron en concentración a lo largo de la duración del tratamiento.

En respuesta a estos obstáculos observados para la implementación terapéutica de MGL, Yang *et al.* (2004b) estudiaron la PEGilación de la enzima y su efecto sobre la semivida y la inmunogenia. La enzima se acopló a metoxipolietilenglicol succinimidil glutarato (MEGC-PEG-5000). Se realizaron nuevamente estudios de búsqueda de dosis y 4000 unidades/kg (90 mg/kg) fueron suficientes para reducir la metionina plasmática a <5 µmol/l durante 12 h. El análisis farmacocinético mostró una mejora de 36 veces en la semivida de aclaramiento en suero de la enzima PEGilada, en comparación con la enzima no PEGilada. La PEGilación también atenuó la inmunogenia en cierta medida, ya que solo se observaron las toxicidades leves de una menor ingesta de alimentos y una menor pérdida de peso. Sin embargo, la semivida de actividad no mejoró ya que los niveles de L-Met solo se mantuvieron por debajo de los niveles de detección durante 12 h en lugar de 8 h para la enzima no PEGilada. Estos resultados, aunque prometedores para el uso de una enzima agotadora de L-Met como agente antineoplásico, se ven desafiados por las deficiencias significativas de la inmunogenia y la farmacocinética.

Determinados aspectos de la presente invención proporcionan una cistationina-γ-liasa modificada con actividad degradadora de metionina para su uso en el tratamiento de tumores. En particular, el polipéptido modificado puede tener secuencias polipeptídicas humanas y, por tanto, puede prevenir reacciones alérgicas en pacientes humanos, permitir la dosificación repetida y aumentar la eficacia terapéutica.

Los tumores para los que los presentes métodos de tratamiento son útiles incluyen cualquier tipo de célula maligna, tal como las que se encuentran en un tumor sólido o un tumor hemático. Los tumores sólidos de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a, un tumor de un órgano seleccionado entre el grupo que consiste en páncreas, colon, ciego, estómago, cerebro, cabeza, cuello, ovario, riñón, laringe, sarcoma, pulmón, vejiga, melanoma, próstata y mama. Los tumores hemáticos de ejemplo incluyen tumores de la médula ósea, tumores malignos de células T o B, leucemias, linfomas, blastomas, mielomas y similares. Los ejemplos adicionales de cánceres que pueden tratarse usando los métodos proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo el cáncer de pulmón microcítico, el cáncer de pulmón no microcítico, el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma escamoso de pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo el cáncer gastrointestinal y el cáncer de estroma gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello del útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginosos acros, melanomas nodulares, así como linfoma de células B (incluyendo el linfoma no Hodgkin de grado bajo/folicular (LNH); el LNH linfocítico pequeño (LP); el LNH de grado medio/folicular; el LNH difuso de grado medio; el LNH inmunoblástico de grado alto; el LNH linfoblástico de grado alto; el LNH de células pequeñas no escindidas de alto grado; el LNH enfermedad voluminosa; el linfoma de células del manto; el linfoma relacionado con el SIDA; y la macroglobulinemia de Waldenstrom), la leucemia linfocítica crónica (LLC), la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia de células pilosas, el mieloma múltiple, la leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia mieloblástica crónica.

El cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a éstos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma macrocítico y fusocelular; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma de células de transición papilar; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular combinado y colangiocarcinoma; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquiolo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxífilo; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células transparentes; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma corticosuprarrenal; carcinoma endometroide; carcinoma de apéndice cutáneo; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma del conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor de estroma ovárico, maligno; tecoma, maligno; tumor de células granulosa, maligno; androblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extra mamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de propagación superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno;

sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomiomasarcoma; rhabdomiomasarcoma embrionario; rhabdomiomasarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mulleriano mixto; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoide, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; estruma de ovarios, maligno; coriocarcinoma; mesonefroma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes del hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; paragranuloma de Hodgkin; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no de Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mielóide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia mastocítica; leucemia megacarioblástica; sarcoma mielóide; y leucemia de células pilosas.

La metioninasa humana obtenida por ingeniería genética derivada de cistationasa puede usarse en la presente invención como agente antitumoral en diversas modalidades para agotar la metionina de una célula tumoral, tejido tumoral o la circulación de un mamífero con cáncer, o para el agotamiento de metionina donde su agotamiento se considere deseable.

El agotamiento puede realizarse *in vivo* en la circulación de un mamífero, *in vitro* en los casos en que se desee el agotamiento de metionina en cultivos de tejidos u otros medios biológicos, y en procedimientos *ex vivo* donde se manipulan fluidos biológicos, células o tejidos fuera del cuerpo y, posteriormente, regresan al cuerpo del paciente mamífero. El agotamiento de metionina de la circulación, los medios de cultivo, los fluidos biológicos o las células se realiza para reducir la cantidad de metionina accesible para el material que se está tratando y, por tanto, comprende poner en contacto el material que se ha de agotar con una cantidad agotadora de metionina de la metioninasa humana obtenida por ingeniería genética en condiciones de agotamiento de metionina para degradar la metionina ambiental en el material puesto en contacto.

Debido a que las células tumorales dependen de su medio nutriente para obtener metionina, el agotamiento puede dirigirse a la fuente de nutrientes para las células y no necesariamente a las propias células. Por tanto, en una aplicación *in vivo*, tratar una célula tumoral incluye poner en contacto el medio nutriente para una población de células tumorales con la metioninasa obtenida por ingeniería genética. En esta realización, el medio puede ser sangre, fluido linfático, fluido espinal y fluido corporal similar donde se desee el agotamiento de metionina.

La eficiencia del agotamiento de metionina puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación y, normalmente, depende de la cantidad de metionina presente en el material, la tasa de agotamiento deseada y la tolerancia del material a la exposición a la metioninasa. Los niveles de metionina en un material y, por tanto, las tasas de agotamiento de metionina del material pueden controlarse fácilmente mediante diversos métodos químicos y bioquímicos bien conocidos en la técnica. Se describen cantidades que agotan la metionina de ejemplo adicionalmente en el presente documento y pueden variar de 0,001 a 100 unidades (U) de metioninasa obtenida por ingeniería genética, preferentemente de aproximadamente 0,01 a 10 U y, más preferentemente, de aproximadamente 0,1 a 5 U de metioninasa obtenida por ingeniería genética por mililitro (ml) de material que se ha de tratar.

Las condiciones de agotamiento de metionina son condiciones de temperatura y tampón compatibles con la actividad biológica de una enzima metioninasa, e incluyen condiciones de temperatura, sal y pH moderadas compatibles con la enzima, por ejemplo, condiciones fisiológicas. Las condiciones de ejemplo incluyen aproximadamente 4-40 °C, una fuerza iónica equivalente a aproximadamente NaCl 0,05 a 0,2 M y un pH de aproximadamente 5 a 9, mientras que las condiciones fisiológicas están incluidas.

En una realización particular, la invención contempla metioninasa obtenida por ingeniería genética para su uso como agente antitumoral y, por tanto, comprende poner en contacto una población de células tumorales con una cantidad terapéuticamente eficaz de metioninasa obtenida por ingeniería genética durante un período de tiempo suficiente para inhibir el crecimiento de células tumorales.

En una realización, el contacto *in vivo* se realiza administrando, mediante inyección intravenosa o intraperitoneal, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que comprende una metioninasa obtenida por ingeniería genética de la presente invención a un paciente, agotando de este modo la fuente de metionina circulante de las células tumorales presentes en el paciente. La puesta en contacto de la metioninasa obtenida por ingeniería genética también puede conseguirse administrando la metioninasa obtenida por

ingeniería genética en el tejido que contiene las células tumorales.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una metioninasa obtenida por ingeniería genética es una cantidad predeterminada calculada para conseguir el efecto deseado, es decir, para agotar la metionina en el tejido tumoral o en la circulación de un paciente y, por tanto, provocar que las células tumorales dejen de dividirse. Por tanto, los intervalos de dosificación para la administración de metioninasa obtenida por ingeniería genética de la invención son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que se reducen los síntomas de la división celular tumoral y el ciclo celular. La dosis no debe ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. En general, la dosis variará con la edad, el estado, el sexo y la extensión de la enfermedad en el paciente y puede determinarse por un experto en la materia. La dosis puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier complicación.

Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una metioninasa obtenida por ingeniería genética puede ser una cantidad de manera que cuando se administre en una composición fisiológicamente tolerable sea suficiente para conseguir una concentración intravascular (plasmática) o local de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 unidades (U) por ml, preferentemente superior a aproximadamente 0,1 U y más preferentemente superior a 1 U de metioninasa obtenida por ingeniería genética por ml. Las dosis normales pueden administrarse basándose en el peso corporal y están en el intervalo de aproximadamente 5-1000 U/kilogramo (kg)/día, preferentemente de aproximadamente 5-100 U/kg/día, más preferentemente de aproximadamente 10-50 U/kg/día y más preferentemente de aproximadamente 2040 U/kg/día.

La metioninasa obtenida por ingeniería genética puede administrarse por vía parenteral por inyección o por infusión gradual a lo largo del tiempo. La metioninasa obtenida por ingeniería genética puede administrarse por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía oral, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intracavitaria, por vía transdérmica, por vía dérmica, puede entregarse por medios peristálticos, puede inyectarse directamente en el tejido que contiene las células tumorales o puede administrarse mediante una bomba conectada a un catéter que puede contener un posible biosensor de metionina.

Las composiciones terapéuticas que contienen metioninasa obtenida por ingeniería genética se administran convencionalmente por vía intravenosa, como por inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica se refiere a unidades físicamente aisladas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente necesario, es decir, excipiente o vehículo.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se ha de administrar depende del sujeto que se trata, de la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el principio activo y del grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de principio activo necesarias para administrarse dependen del juicio del profesional y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, se desvelan intervalos de dosificación adecuados para la aplicación sistémica en el presente documento y dependen de la vía de administración. También se contemplan pautas adecuadas para la administración inicial e inyecciones de refuerzo y se tipifican por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante una inyección posterior u otra administración. Las administraciones múltiples de ejemplo se describen en el presente documento y se prefieren en particular para mantener niveles séricos y tisulares continuamente altos de metioninasa obtenida por ingeniería genética y, por el contrario, niveles séricos y tisulares bajos de metionina. Como alternativa, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener las concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para las terapias *in vivo*.

V. Conjugados

Las composiciones de la presente invención implican una modificación adicional de la metioninasa obtenida por ingeniería genética para la mejora, tal como la formación de conjugados con segmentos de péptidos o polímeros heterólogos, tales como polietilenglicol. En aspectos adicionales, la metioninasa obtenida por ingeniería genética puede estar unida a PEG para aumentar el radio hidrodinámico de la enzima y, por tanto, aumentar la persistencia sérica. En determinados aspectos, el polipéptido desvelado puede conjugarse con cualquier agente de direccionamiento, tal como un ligando que tenga la capacidad de unirse de manera específica y estable a un receptor externo o sitio de unión en una célula tumoral (Publicación de Patente de los EE.UU. 2009/0304666).

A. Proteínas de fusión

Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a proteínas de fusión. Estas moléculas pueden tener la metioninasa humana obtenida por ingeniería genética unida en el término N o C a un dominio heterólogo. Por ejemplo, las fusiones también pueden emplear secuencias líderes de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un hospedador heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de un marcador de

afinidad de proteínas, tal como un marcador de afinidad de albúmina sérica o seis restos de histidina, o un dominio inmunitariamente activo, tal como un epítipo de anticuerpo, preferentemente escindible, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. Los marcadores de afinidad no limitantes incluyen polihistidina, proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP) y glutatión-S-transferasa (GST).

5 En una realización particular, la metioninasa humana obtenida por ingeniería genética puede unirse a un péptido que aumenta la semivida *in vivo*, tal como un polipéptido XTEN (Schellenberger *et al.*, 2009), dominio Fc de IgG, albúmina o un péptido de unión a albúmina.

10 Los expertos en la materia conocen bien métodos de generación de proteínas de fusión. Dichas proteínas pueden producirse, por ejemplo, mediante síntesis *de novo* de la proteína de fusión completa o mediante la unión de la secuencia de ADN que codifica el dominio heterólogo, seguida de la expresión de la proteína de fusión intacta.

15 La producción de proteínas de fusión que recuperan las actividades funcionales de las proteínas parentales puede facilitarse conectando genes con un segmento de ADN puente que codifica un enlazador peptídico que se corta y empalma entre los polipéptidos conectados en tándem. El enlazador tendría una longitud suficiente para permitir el plegamiento adecuado de la proteína de fusión resultante.

20 B. Enlazadores

En determinadas realizaciones, la metioninasa obtenida por ingeniería genética puede conjugarse químicamente usando reactivos de reticulación bifuncionales o puede fusionarse en el nivel de proteína con enlazadores peptídicos.

25 Se han utilizado reactivos de reticulación bifuncionales ampliamente para diversos fines, incluyendo la preparación de matrices de afinidad, la modificación y la estabilización de diversas estructuras, la identificación de los sitios de unión de ligandos y receptores y los estudios estructurales. También pueden usarse enlazadores peptídicos adecuados para unir la metioninasa obtenida por ingeniería genética, tales como los enlazadores de Gly-Ser.

30 Los reactivos homobifuncionales que llevan dos grupos funcionales idénticos demostraron ser altamente eficientes para la inducción de la reticulación entre macromoléculas o subunidades de una macromolécula idénticas y diferentes, y para la unión de ligandos polipeptídicos a sus sitios de unión específicos. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Mediante el aprovechamiento de las reactividades diferenciales de los dos grupos funcionales diferentes, la reticulación puede controlarse selectiva y secuencialmente.

35 Los reactivos de reticulación bifuncionales pueden dividirse de acuerdo con la especificidad de sus grupos funcionales, por ejemplo, grupos específicos de amino, sulfhidrilo, guanidina, indol, carboxilo. De estos, los reactivos dirigidos a grupos amino libres se han vuelto especialmente populares debido a su disponibilidad comercial, facilidad de síntesis y las condiciones de reacción moderadas en las que pueden aplicarse.

40 Una mayoría de los reactivos de reticulación heterobifuncionales contienen un grupo reactivo con amina primaria y un grupo reactivo con tiol. En otro ejemplo, se describen reactivos de reticulación heterobifuncionales y métodos de uso de los reactivos de reticulación (Patente de los EE.UU. N.º 5.889.155, incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad). Los reactivos de reticulación combinan un resto de hidrazida nucleófila con un resto de maleimida electrófila, permitiendo el acoplamiento, en un ejemplo, de aldehídos con tioles libres. El reactivo de reticulación puede modificarse para reticular diversos grupos funcionales.

45 Adicionalmente, puede usarse cualquier otro agente y/o mecanismo de unión/acoplamiento conocidos por los expertos en la materia para combinar la metioninasa humana obtenida por ingeniería genética, tal como, por ejemplo, interacción anticuerpo-antígeno, enlaces avidina biotina, enlaces amida, enlaces éster, enlaces tioéster, enlaces éter, enlaces tioéter, enlaces fosfoéster, enlaces fosforamida, enlaces anhídrido, enlaces disulfuro, interacciones iónicas e hidrófobas, anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpos o combinaciones de los mismos.

50 Se prefiere que se emplee un reticulante que tenga una estabilidad razonable en sangre. Se conocen numerosos tipos de enlazadores que contienen enlaces disulfuro que pueden emplearse satisfactoriamente para conjugar agentes de direccionamiento y agentes terapéuticos/preventivos. Los enlazadores que contienen un enlace disulfuro que está impedido estéricamente pueden demostrar proporcionar una mayor estabilidad *in vivo*. Estos enlazadores son, por tanto, un grupo de agentes de enlace.

60 Además de los reticulantes impedidos, también pueden emplearse enlazadores no impedidos de acuerdo con esto. Otros reticulantes útiles, que no se considera que contengan o generen un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano (Wawrzynczak y Thorpe, 1987). El uso de dichos reticuladores se comprende bien en la técnica. Otra realización implica el uso de enlazadores flexibles.

65 Una vez conjugado químicamente, el péptido generalmente se purificará para separar el conjugado de los agentes no conjugados y de otros contaminantes. Se dispone de un gran número de técnicas de purificación para su uso en

proporcionar conjugados con un grado de pureza suficiente para volverlos clínicamente útiles.

Los métodos de purificación basados en la separación por tamaño, tales como la filtración en gel, la permeación en gel o la cromatografía líquida de alto rendimiento, generalmente serán de mayor utilidad. También pueden usarse otras técnicas cromatográficas, tales como la separación con Blue-Sepharose. Pueden ser útiles métodos convencionales para purificar las proteínas de fusión de los cuerpos de inclusión, tales como el uso de detergentes débiles, tales como N-lauroil-sarcosina de sodio (SLS).

C. PEGilación

En determinados aspectos de la invención, se desvelan composiciones relacionadas con la PEGilación de metioninasa obtenida por ingeniería genética. Por ejemplo, la metioninasa obtenida por ingeniería genética puede PEGilarse de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento.

La PEGilación es el proceso de unión covalente de cadenas de polímeros de poli(etilenglicol) a otra molécula, normalmente un fármaco o una proteína terapéutica. La PEGilación se consigue habitualmente mediante la incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula diana. La unión covalente de PEG con un fármaco o proteína terapéutica puede "enmascarar" el agente frente al sistema inmunitario del hospedador (inmunogenia y antigenicidad reducidas) o puede aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente, lo que prolonga su tiempo circulatorio mediante la reducción del aclaramiento renal. La PEGilación también puede proporcionar solubilidad en agua a los fármacos y proteínas hidrófobos.

La primera etapa de la PEGilación es la funcionalización adecuada del polímero de PEG en uno o ambos extremos. Los PEG que se activan en cada extremo 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 prepara 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 las proteínas, los aminoácidos reactivos normales incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina. También pueden usarse el grupo amino N-terminal y el ácido carboxílico C-terminal.

Las técnicas utilizadas 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, cloroformiatos y carbonatos. En la química de PEGilación de segunda generación, los grupos funcionales más eficientes, tales como el aldehído, los ésteres, las amidas, etc., se vuelven disponibles para la conjugación.

A medida que las aplicaciones de la PEGilación se han vuelto 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 para unir dos entidades, donde se necesita un espaciador hidrófilo, flexible y biocompatible. Los grupos terminales preferidos para los PEG heterobifuncionales son maleimida, vinil sulfonas, disulfuro de piridilo, amina, ácidos carboxílicos y ésteres de NHS.

Los agentes de modificación más comunes, o enlazadores, se basan en moléculas de metoxi PEG (mPEG). Su actividad depende de la adición de un grupo modificador de proteínas al extremo del alcohol. En algunos casos, se usa polietilenglicol (PEG diol) como molécula precursora. El diol se modifica posteriormente en ambos extremos con el fin de fabricar una molécula unida a PEG homo o heterodimérica.

Las proteínas generalmente están PEGiladas en los sitios nucleófilos, tales como los tioles no protonados (restos de cisteinilo) o los grupos amino. Los ejemplos de reactivos de modificación específicos de cisteinilo incluyen maleimida de PEG, yodoacetato de PEG, tioles de PEG y vinilsulfona de PEG. Los cuatro son fuertemente específicos de cisteinilo en condiciones suaves y de pH neutro a ligeramente alcalino, pero cada uno de ellos tiene algunos inconvenientes. El tioéter formado con las maleimidias puede ser algo inestable en condiciones alcalinas, por lo que puede haber alguna limitación en las opciones de formulación con este enlazador. El enlace carbamotioato formado con PEG de yodo es más estable, pero el yodo libre puede modificar los restos de tirosina en algunas condiciones. Los tioles de PEG forman enlaces disulfuro con los tioles de proteínas, pero este enlace también puede ser inestable en condiciones alcalinas. La reactividad de la PEG-vinilsulfona es relativamente lenta en comparación con el PEG de maleimida y yodo; 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.

Rara vez se realiza la PEGilación específica del sitio en restos de cisteinilo nativos, puesto que estos restos por lo general están en forma de enlaces disulfuro o son necesarios para la actividad biológica. Por otro lado, la mutagenia dirigida al sitio puede usarse para incorporar sitios de PEGilación de cisteinilo para enlazadores específicos de tiol. La mutación de cisteína debe diseñarse de manera que sea accesible para el reactivo de PEGilación y aún sea biológicamente activa después de la PEGilación.

Los agentes de modificación específicos de amina incluyen éster de PEG NHS, tresilato de PEG, aldehído de PEG, isotiocianato de PEG y varios otros. Todos reaccionan en condiciones suaves y son muy específicos para los grupos amino. El éster de PEG 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. El aldehído de PEG forma una imina con el grupo amino, que después se reduce a una amina secundaria con cianoborohidruro de sodio. A diferencia del 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, en particular a un pH más bajo donde se vuelve volátil.

Debido a los múltiples restos de lisina en la mayoría de las proteínas, la PEGilación específica de sitio puede ser un problema. Afortunadamente, debido a 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 más bajo. En general, el pK del grupo alfa-amino es 1-2 unidades de pH más bajo que el del grupo épsilon-amino de los restos de lisina. Mediante la PEGilación de la molécula a pH 7 o por debajo, con frecuencia puede alcanzarse una alta selectividad para el extremo N-terminal. Sin embargo, esto solo es factible si la porción N-terminal de la proteína no es necesaria para la actividad biológica. Aun así, los beneficios farmacocinéticos de la PEGilación con frecuencia superan una pérdida significativa de bioactividad *in vitro*, lo que da como resultado un producto con una bioactividad *in vivo* mucho mayor independientemente de la química de PEGilación.

Hay varios parámetros que considerar cuando se desarrolla un procedimiento de PEGilación. Afortunadamente, por lo general 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 las reacciones de PEGilación específicas de tiol, los parámetros que se han de considerar incluyen: concentración de proteína, relación de PEG a proteína (sobre 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). Se deben considerar los mismos factores (con la excepción del oxígeno) para la modificación específica de amina, excepto porque el pH puede ser aún más crítico, en particular cuando se refiere al grupo amino 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, la concentración de proteínas y el pH. Además, la reactividad del enlazador de PEG debe conocerse antes de comenzar la reacción de PEGilación. Por ejemplo, si el agente de PEGilación tiene solo un 70 % de actividad, la cantidad de PEG utilizada debe garantizar que solo las moléculas de PEG activas se cuenten en la estequiometría de la reacción de proteína a PEG.

VI. Proteínas y péptidos

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones nuevas que comprenden al menos una metioninasa obtenida por ingeniería genética como se define en las reivindicaciones. Estos péptidos pueden estar comprendidos en una proteína de fusión o estar conjugados con un agente como se ha descrito anteriormente.

Como se usa en el presente documento, una proteína o péptido generalmente se refiere, 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 aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos. Por comodidad, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, un "resto de aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier mimético de aminoácido conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, los restos de la proteína o el péptido son secuenciales, sin ningún aminoácido interrumpiendo la secuencia de restos de aminoácidos. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos no aminoacídicos. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la proteína o péptido puede estar interrumpida por uno o más restos no aminoacídicos.

En consecuencia, la expresión "proteína o péptido" abarca secuencias de aminoácidos que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en proteínas de origen natural o, al menos, un aminoácido modificado o inusual.

Las proteínas o péptidos pueden hacerse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas biológicas moleculares convencionales, el aislamiento de proteínas o péptidos de fuentes naturales o la síntesis química de proteínas o péptidos. Las secuencias de nucleótidos y proteínas, polipéptidos y péptidos correspondientes a diversos genes se han desvelado anteriormente y pueden encontrarse en bases de datos computarizadas conocidas por los expertos en la materia. Una de esas bases de datos es la base de datos Genbank y GenPept del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (disponible en el sitio web ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones

codificantes para genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas desveladas en el presente documento o como saben los expertos en la materia. Como alternativa, los expertos en la materia conocen diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos.

5 VII. Ácidos nucleicos y vectores

En determinados aspectos de la invención, pueden desvelarse secuencias de ácidos nucleicos que codifican una metioninasa obtenida por ingeniería genética o una proteína de fusión que contiene una metioninasa humana obtenida por ingeniería genética. Dependiendo del sistema de expresión que se use, las secuencias de ácido nucleico pueden seleccionarse basándose en métodos convencionales. Por ejemplo, si la metioninasa obtenida por ingeniería genética deriva de la cistationasa humana y contiene múltiples codones que rara vez se utilizan en *E. coli*, entonces eso puede interferir con la expresión. Por tanto, los genes o variantes respectivos de los mismos pueden tener codones optimizados para la expresión en *E. coli*. También pueden usarse diversos vectores para expresar la proteína de interés, tales como la metioninasa obtenida por ingeniería genética. Los vectores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, vectores plasmídicos, vectores víricos, transposones o vectores a base de liposomas.

VIII. Células hospedadoras

Las células hospedadoras pueden ser cualquiera que pueda transformarse para permitir la expresión y secreción de metioninasa obtenida por ingeniería genética y conjugados de la misma. Las células hospedadoras pueden ser bacterias, células de mamíferos, levadura u hongos filamentosos. Diversas bacterias incluyen *Escherichia* y *Bacillus*. Las levaduras que pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia* encontrarían un uso como una célula hospedadora apropiada. Pueden usarse diversas especies de hongos filamentosos como hospedadores de expresión, incluyendo los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochliobolus* y *Pyricularia*.

Los ejemplos de organismos hospedadores utilizables 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) o *Schizosaccharomyces pombe*; y hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus awamori* (Ward, 1989) o *Trichoderma reesei* (Penttila *et al.*, 1987; Harkki *et al.*, 1989).

Los ejemplos de células hospedadoras 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 renales de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658). Lo anterior pretende ser ilustrativo, pero no limitante de los muchos posibles organismos hospedadores conocidos en la técnica. En principio, pueden usarse todos los hospedadores capaces de secreción ya sea procarióticos o eucarióticos.

Las células hospedadoras de mamíferos que expresan las metioninasas obtenidas por ingeniería genética y/o sus proteínas de fusión se cultivan en condiciones normalmente empleadas para cultivar la estirpe celular parental. En general, las células se cultivan en un medio convencional que contenga sales fisiológicas y nutrientes, tales como RPMI, MEM, IMEM o DMEM convencionales, normalmente complementados con un 5 %-10 % de suero, tal como un suero fetal bovino. Las condiciones de cultivo también son convencionales, por ejemplo, los cultivos se incuban a 37 °C en cultivos estacionarios o en rodillo hasta que se consiguen los niveles deseados de las proteínas.

IX. Purificación de proteínas

Las técnicas de purificación de proteínas son bien conocidas por los expertos en la materia. Estas técnicas implican, en un nivel, la homogeneización y el fraccionamiento en bruto de las células, tejidos u órganos a fracciones polipeptídicas y no polipeptídicas. La proteína o polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para conseguir una purificación parcial o completa (o purificación a homogeneidad) a menos que se especifique lo contrario. Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión en gel, la electroforesis en gel de poliacrilamida, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de inmunoafinidad y el enfoque isoelectrico. Un método particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía líquida de rendimiento rápido (FPLC) o incluso la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Se pretende que una proteína o un péptido purificados se refieran a una composición, aislable de otros componentes, en la que la proteína o el péptido se purifica en cualquier grado con respecto a su estado obtenible de forma natural. Una proteína o un péptido aislados o purificados, por tanto, también se refiere a una proteína o un péptido libres del entorno en el que puede originarse de forma natural. En general, "purificada" se refiere a una composición de proteína o péptido que se ha sometido a fraccionamiento para retirar diversos otros componentes y cuya composición conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se use la expresión "sustancialmente purificada", esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o el péptido forman el componente principal de la composición, tal como constituyendo 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.

5 Los expertos en la materia conocen bien diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Éstas incluyen, por ejemplo, la precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o por desnaturalización por calor, seguida de centrifugación; etapas de cromatografía, tal como cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxipatita y afinidad; enfoque isoelectrico; electroforesis en gel; y combinaciones de éstas y otras técnicas. Como se conoce generalmente en la técnica, se cree que puede cambiarse el orden de realización de las diversas etapas de purificación o que pueden omitirse determinadas etapas y aún dar como resultado un método adecuado para la preparación de una proteína o un péptido sustancialmente purificados.

15 Los expertos en la materia conocen diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o el péptido a la luz 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 por SDS/PAGE. Un 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, por tanto, calcular el grado de pureza en la misma, evaluado mediante la "número de purificación en número de veces". Las unidades reales utilizadas para representar la cantidad de actividad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación y si la proteína o el péptido expresados presentan una actividad detectable o no.

25 No existe ningún requisito general de que la proteína o el péptido siempre se proporcionen en su estado más purificado. De hecho, se contempla que productos sustancialmente menos purificados puedan tener utilidad en determinadas realizaciones. La purificación parcial puede conseguirse usando menos etapas de purificación en combinación o usando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía de columna de intercambio catiónico realizada usando un aparato de HPLC generalmente dará como resultado una mayor purificación en "número de veces" que la misma técnica que utiliza un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que presentan un grado menor de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto proteico o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

35 En determinadas realizaciones, puede aislarse o purificarse una proteína o un péptido, por ejemplo, una metioninasa obtenida por ingeniería genética, una proteína de fusión que contiene la metioninasa obtenida por ingeniería genética o una metioninasa obtenida por ingeniería genética posterior a la PEGilación. Por ejemplo, puede haber comprendido un marcador de His o un epítipo de afinidad en una metioninasa diseñada para facilitar la purificación. La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre una sustancia que se ha de aislar y una molécula a la que puede unirse específicamente. Este es un tipo de interacción receptor-ligando. El material de la columna se sintetiza mediante el acoplamiento covalente de uno de los compañeros de unión a una matriz insoluble. Después, el material de la columna puede adsorber específicamente la sustancia desde la solución. La elución se produce 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 no adsorba moléculas de manera significativa y que tenga un amplio intervalo de estabilidad química, física y térmica. El ligando debe estar acoplado de manera que no afecte a sus propiedades de unión. El ligando también debe proporcionar una unión relativamente estrecha. Debe ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando.

50 La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un método cromatográfico en el que las moléculas en solución se separan basándose en su tamaño o en términos más técnicos, su volumen hidrodinámico. Por lo general se aplica a moléculas grandes o complejos macromoleculares, tales como proteínas y polímeros industriales. Normalmente, cuando se usa una solución acuosa para transportar la muestra a través de la columna, la técnica se conoce como cromatografía de filtración en gel, en lugar del nombre de cromatografía de permeación en gel, que se usa cuando se usa un disolvente orgánico como fase móvil.

55 El principio subyacente de la SEC es que las partículas de diferentes tamaños se eluirán (filtrarán) a través de una fase estacionaria a diferentes velocidades. Esto da como resultado la separación de una solución de partículas basada en el tamaño. A condición de que todas las partículas se carguen simultáneamente o casi simultáneamente, las partículas del mismo tamaño deben eluirse juntas. Cada columna de exclusión por tamaño 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 donde las moléculas son demasiado grandes para ser atrapadas en la fase estacionaria. El límite de permeación define el peso molecular en el extremo inferior del intervalo de separación y es donde las moléculas de un tamaño lo suficientemente pequeño pueden penetrar completamente en los poros de la fase estacionaria y todas las moléculas debajo de esta masa molecular son tan pequeñas que se eluyen como una sola banda.

65 La cromatografía líquida de alto rendimiento (o cromatografía líquida de alta presión, HPLC) es una forma de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos. La HPLC utiliza una columna que contiene material de relleno cromatográfico (fase

estacionaria), una bomba que mueve la fase o fases móviles 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 se analizan y el disolvente o disolventes utilizados.

5 X. Composiciones farmacéuticas

Se contempla que la nueva metioninasa pueda administrarse por vía sistémica o por vía local para inhibir el crecimiento de células tumorales y, más preferentemente, para destruir células cancerosas en pacientes de cáncer con cánceres avanzados localmente o metastásicos. Se puede administrar por vía intravenosa, por vía intratecal y/por vía o intraperitoneal. Se puede administrar sola o en combinación con fármacos antiproliferativos. En una realización, se administra para reducir la carga de cáncer en el paciente antes de la cirugía u otros procedimientos. Como alternativa, puede administrarse después de la cirugía para garantizar que el cáncer restante (por ejemplo, el cáncer que la cirugía no consiguió eliminar) no sobreviva.

No se pretende que la presente invención esté limitada por la naturaleza particular de la preparación terapéutica. Por ejemplo, dichas composiciones pueden proporcionarse en formulaciones junto con vehículos, diluyentes y excipientes líquidos, geles o sólidos fisiológicamente tolerables. Estas preparaciones terapéuticas pueden administrarse a mamíferos para su uso veterinario, tal como con animales domésticos, y para su uso clínico en seres humanos de una manera similar a otros agentes terapéuticos. En general, la dosis necesaria para la eficacia terapéutica variará de acuerdo con el tipo de uso y el modo de administración, así como de las necesidades particulares de los sujetos individuales.

Dichas composiciones se preparan normalmente como soluciones o suspensiones líquidas, para su uso como inyectables. Son diluyentes y excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, las composiciones pueden contener cantidades menores de sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes estabilizantes o agentes de tamponamiento del pH.

Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, puede ser necesario preparar composiciones farmacéuticas que comprendan proteínas, anticuerpos y fármacos en una forma apropiada para la aplicación prevista. En general, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad eficaz de una o más metioninasas obtenidas por ingeniería genética o agentes adicionales disueltos o dispersados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptables" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según corresponda. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una metioninasa obtenida por ingeniería genética aislada mediante el método desvelado en el presente documento o principio activo adicional será conocida para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed., 1990, incorporado en el presente documento por referencia. Además, para la administración animal (por ejemplo, humana), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con las normas de esterilidad, pirogenia, seguridad general y pureza que exige la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

Como se usa en el presente documento, "vehículo 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 disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sabría un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., 1990, incorporado en el presente documento por referencia). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

Determinadas realizaciones de la presente invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol y si necesita ser estéril para la vía de administración, tal como la inyección. Las composiciones pueden administrarse por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía intratecal, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intranasal, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía mucosa, por vía oral, por vía tópica, por vía local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), por inyección, por infusión, por infusión continua, por 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 otros métodos o cualquier combinación de los anteriores, como sabría experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, 1990, incorporado en el presente documento por referencia).

Los polipéptidos modificados pueden formularse en una composición en 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 libres de una composición proteica o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, ácido tartárico o mandélico. Las sales

formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación, tales como las formuladas para administraciones parenterales, tales como soluciones inyectables o aerosoles para la entrega a los pulmones o formuladas para administraciones alimentarias, tales como cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Adicionalmente, de acuerdo con determinados aspectos de la presente invención, la composición adecuada para la administración puede proporcionarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El vehículo debe ser asimilable e incluye líquidos, semisólidos, es decir, pastas o vehículos sólidos. Excepto en la medida en que cualquier medio, agente, diluyente o vehículo convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de la composición contenida en el mismo, su uso en la composición administrable para su uso en la práctica de los métodos es apropiado. Los ejemplos de vehículos 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 retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante conservantes, tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero no limitados a, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con determinados aspectos de la presente invención, la composición se combina con el vehículo de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, por solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Dichos procedimientos son habituales para los expertos en la materia.

En una realización específica de la presente invención, la composición se combina o se mezcla completamente con un vehículo semisólido o sólido. La mezcla puede realizarse de cualquier manera conveniente, tal como molienda. También pueden añadirse agentes estabilizantes en el proceso de mezcla con el fin de proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, es decir, la desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizadores para su uso en una composición incluyen tampones, aminoácidos, tales como glicina y lisina, carbohidratos, tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

En realizaciones adicionales, la presente invención. invención puede referirse al uso de una composición farmacéutica de vehículo lipídico que incluye una metioninasa obtenida por ingeniería genética, uno o más lípidos y un disolvente acuoso. Como se usa en el presente documento, el término "lípidos" se definirá para incluir cualquiera de una amplia gama de sustancias que son característicamente insolubles en agua y extraíbles con un disolvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos es bien conocida por los expertos en la materia y, 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 derivados de los mismos. Un lípido puede ser de origen natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípido suele ser una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos unidos a éster, lípidos polimerizables y combinaciones de los mismos. Por supuesto, las composiciones y métodos también abarcan compuestos distintos de los descritos específicamente en el presente documento que son entendidos por un experto en la materia como lípidos.

Un experto habitual en la materia estaría familiarizado con la gama de técnicas que pueden emplearse para dispersar una composición en un vehículo lipídico. Por ejemplo, la metioninasa obtenida por ingeniería genética o una proteína de fusión de la misma puede dispersarse en una solución que contiene un lípido, puede disolverse con un lípido, puede emulsionarse con un lípido, puede mezclarse con un lípido, puede combinarse con un lípido, puede unirse covalentemente a un lípido, puede estar contenida como suspensión en un lípido, puede estar contenida o formando complejo con una micela o liposoma, o puede asociarse de otro modo a un lípido o estructura lipídica por cualquier medio conocido por los expertos en la materia. La dispersión puede o no dar como resultado la formación de liposomas.

La cantidad de dosificación real de una composición administrada a un paciente animal puede determinarse por factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se trata, las intervenciones terapéuticas anteriores o simultáneas, la idiopatía del paciente y la vía de administración. Dependiendo de la dosis y la vía de administración, el número de administraciones de una dosificación preferida y/o una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la respuesta del sujeto. El profesional responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración de principio o principios activos en una composición y las dosis apropiadas 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, un 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 derivado de estos valores. Naturalmente, la cantidad de compuesto o compuestos activos en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de manera que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. El experto en la materia de la preparación de dichas formulaciones farmacéuticas contemplará factores tales como la solubilidad, la biodisponibilidad, la semivida biológica, la vía de administración, la vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas y, como tales, puede ser deseable diversas dosis y pautas de tratamiento.

En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, hasta aproximadamente 1000 miligramos/kg/peso corporal o más por administración y cualquier intervalo derivado de estos valores. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivado de los números enumerados en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal a aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente.

XI. Tratamientos de combinación

En determinadas realizaciones, las composiciones de las presentes realizaciones implican la administración de una metioninasa obtenida por ingeniería genética en combinación con una segunda terapia o terapia adicional. Dicha terapia puede aplicarse en el tratamiento de cualquier enfermedad que se asocie a la dependencia de metionina. Por ejemplo, la enfermedad puede ser cáncer.

Los métodos y composiciones, incluyendo las terapias de combinación, potencian el efecto terapéutico o protector, y/o aumentan el efecto terapéutico de otra terapia antineoplásica o antihiperproliferativa. Los métodos y composiciones terapéuticos y profilácticos pueden proporcionarse en una cantidad combinada eficaz para conseguir el efecto deseado, tal como la destrucción de una célula cancerosa y/o la inhibición de la hiperproliferación celular. Este proceso puede implicar el contacto de las células tanto con una metioninasa obtenida por ingeniería genética como con una segunda terapia. Un tejido, tumor o célula puede ponerse en contacto con una o más composiciones o formulaciones farmacológicas que comprendan uno o más de los agentes (es decir, una metioninasa obtenida por ingeniería genética o un agente anticanceroso) o poniendo en contacto el tejido, tumor, y/o célula con dos o más composiciones o formulaciones distintas, en las que una composición proporciona 1) una metioninasa obtenida por ingeniería genética, 2) un agente antineoplásico o 3) tanto una metioninasa obtenida por ingeniería genética como un agente antineoplásico. Además, se contempla que una terapia de combinación de este tipo pueda usarse junto con quimioterapia, radioterapia, terapia quirúrgica o inmunoterapia.

Las expresiones "puestos en contacto" y "expuestos", cuando se aplican a una célula, se usan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterápico o radioterápico se entregan a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir la destrucción celular, por ejemplo, ambos agentes se entregan a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o evitar que se divida.

Puede administrarse una metioninasa diseñada antes, durante, después o en diversas combinaciones con respecto a un tratamiento antineoplásico. Las administraciones pueden estar en intervalos que van desde simultáneamente hasta minutos o días o semanas. En realizaciones en las que la metioninasa modificada se proporciona a un paciente por separado de un agente antineoplásico, generalmente se garantizaría que un período de tiempo significativo no expirara entre el momento de cada entrega, de manera que los dos compuestos aún podrían ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre el paciente. En dichos casos, se contempla que puede proporcionarse a un paciente la metioninasa obtenida por ingeniería genética y la terapia antineoplásica dentro de aproximadamente 12 a 24 o 72 h entre sí y, más en particular, dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el período de tiempo del tratamiento de manera significativa con un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las respectivas administraciones.

En determinadas realizaciones, un ciclo de tratamiento durará de 1 a 90 días o más (este intervalo incluye los días intermedios). Se contempla que un agente puede administrarse en cualquier día del día 1 al día 90 (este intervalo incluye los días intermedios) o cualquier combinación de los mismos, y otro agente se administra en cualquier día del día 1 al día 90 (este intervalo incluye días los intermedios) o cualquier combinación de los mismos. En un solo día (período de 24 horas), el paciente puede recibir una o múltiples administraciones del agente o agentes. Además, después de un ciclo de tratamiento, se contempla que hay un período de tiempo en el que no se administra ningún tratamiento antineoplásico. Este período de tiempo puede durar de 1 a 7 días, y/o de 1 a 5 semanas, y/o de 1 a 12

meses o más (este intervalo incluye los días intermedios), dependiendo del estado del paciente, tal como su pronóstico, fuerza, salud, etc. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario.

5 Pueden emplearse diversas combinaciones. Para el siguiente ejemplo, una metioninasa obtenida por ingeniería genética es "A" y una terapia antineoplásica es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

10 La administración de cualquier compuesto o terapia de las presentes realizaciones a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de dichos compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, de los agentes. Por tanto, en algunas realizaciones hay una etapa de control de la toxicidad que es atribuible a la terapia de combinación.

15 A. Quimioterapia

Puede usarse una amplia diversidad de agentes quimioterápicos de acuerdo con las presentes realizaciones. El término "quimioterapia" se refiere al uso de fármacos para tratar el cáncer. Un "agente quimioterápico" se usa para connotar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento del cáncer. Estos agentes o fármacos se clasifican por su modo de actividad en una célula, por ejemplo, si y en qué etapa afectan al ciclo celular. Como alternativa, un agente puede caracterizarse en función de su capacidad para reticular directamente el ADN, para intercalarse en el ADN o para inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas afectando a la síntesis de ácido nucleico.

25 Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1 y caliqueamicina omega1); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una espiamicina; tal como cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos de cromoproteína antibiótico enediina relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcellomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina y tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina y floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano y testolactona; anti-adrenales, tales como mitotano y trilostano; abastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; Complejo PSKpolisacárido; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (por ejemplo, CPT-11); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometililornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; carboplatino, procarbazona, plicomicina, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

65 B. Radioterapia

Otros factores que provocan daño en el ADN y se han utilizado ampliamente incluyen lo que habitualmente se conoce como rayos γ , rayos X y/o la entrega dirigida de radioisótopos a células tumorales. También se contemplan otras formas de factores perjudiciales para el ADN, tales como microondas, irradiación con haz de protones (Patentes de los EE.UU. 5.760.395 y 4.870.287) y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores afecten a una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para los rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgen. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, de la fuerza y del tipo de radiación emitida y de la absorción por las células neoplásicas.

C. Inmunoterapia

El experto en la materia entenderá que las inmunoterapias pueden usarse en combinación o en conjunto con los métodos de las realizaciones. En el contexto del tratamiento del cáncer, los productos inmunoterápicos generalmente se basan en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para dirigirse a y destruir células cancerosas. Rituximab (RITUXAN®) es un ejemplo de este tipo. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de la terapia o puede reclutar otras células para afectar realmente a la destrucción celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterápico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina colérica, toxina pertúsica, etc.) y puede servir simplemente como un agente de direccionamiento. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa, directa o indirectamente, con una célula tumoral diana. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK.

En un aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral debe llevar algún marcador que sea susceptible de direccionamiento, es decir, que no esté presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para el direccionamiento en el contexto de las presentes realizaciones. Los marcadores tumorales comunes incluyen CD20, antígeno carcinoembrionario, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno Sialil Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de laminina, erb B y pi55. Un aspecto alternativo de la inmunoterapia es combinar los efectos antineoplásicos con los efectos estimulantes inmunitarios. También existen moléculas de estimulación inmunitaria que incluyen: citocinas, tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gamma-IFN, quimiocinas, tales como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores de crecimiento, como el ligando FLT3.

Los ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso son adyuvantes inmunitarios, por ejemplo, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos (Patentes de los EE.UU. 5.801.005 y 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998); terapia con citocinas, por ejemplo, interferones α , β y γ , IL-1, GM-CSF y TNF (Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998); terapia génica, por ejemplo, TNF, IL-1, IL-2 y p53 (Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; Patentes de los EE.UU. 5.830.880 y 5.846.945); y anticuerpos monoclonales, por ejemplo, anti-CD20, anti-gangliósido GM2 y anti-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi *et al.*, 1998; patente de los EE.UU. 5.824.311). Se contempla que puedan emplearse una o más terapias contra el cáncer con las terapias de anticuerpos descritas en el presente documento.

D. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterá a algún tipo de cirugía, que incluye la cirugía preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa incluye la resección en la que todo o parte del tejido canceroso se extirpa físicamente, se extrae y/o se destruye, y puede usarse junto con otras terapias, tales como el tratamiento de las presentes realizaciones, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas. La resección del tumor se refiere a la retirada física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento quirúrgico incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada por microscopía (cirugía de Mohs).

Tras la extirpación de una parte o la totalidad de las células, tejido o tumor cancerosos, puede formarse una cavidad en el cuerpo. El tratamiento puede conseguirse por perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia adicional contra el cáncer. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser de dosis variables también.

E. Otros agentes

Se contempla que otros agentes puedan usarse en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes que afectan a la regulación positiva de los receptores de la superficie celular y las uniones comunicantes, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a inductores apoptóticos u otros agentes biológicos. Los aumentos en la señalización

intercelular mediante la elevación del número de uniones comunicantes aumentarían los efectos anti-hiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas vecinas. En otras realizaciones, los agentes citostáticos o de diferenciación pueden usarse en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones para mejorar la eficacia anti-hiperproliferativa de los tratamientos. Se contemplan inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de las presentes realizaciones. Son ejemplos de inhibidores de la adhesión celular los inhibidores de la cinasa de adhesión focal (FAK) y Lovastatina. Se contempla adicionalmente que otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225, puedan usarse en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones para mejorar la eficacia del tratamiento.

XII. Kits

Se develan kits, tales como kits terapéuticos. Por ejemplo, un kit puede comprender una o más composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento y opcionalmente instrucciones para su uso. Los kits también pueden comprender uno o más dispositivos para realizar la administración de dichas composiciones. Por ejemplo, un kit objeto puede comprender una composición farmacéutica y un catéter para realizar la inyección intravenosa directa de la composición en un tumor canceroso. En otras realizaciones, un kit objeto puede comprender ampollas precargadas de una metioninasa obtenida por ingeniería genética, formulada opcionalmente como un producto farmacéutico o liofilizado, para su uso con un dispositivo de entrega.

Los kits pueden comprender un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener una composición que incluya una metioninasa obtenida por ingeniería genética que sea eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tales como las descritas anteriormente. La etiqueta en el recipiente puede indicar que la composición se usa para una terapia específica o una aplicación no terapéutica y también puede indicar instrucciones para los usos *in vivo* o *in vitro*, tales como los descritos anteriormente. El kit de la invención comprenderá normalmente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

XIII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos a continuación representan técnicas que el inventor descubrió que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su puesta en práctica. Sin embargo, los expertos en la materia, a la luz de la presente divulgación, deben apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin apartarse del alcance de la invención.

40 Ejemplo 1 - Cistationina- γ -liasa obtenida por ingeniería genética para obtener la actividad de metionina- γ -liasa

CGL es un tetrámero que cataliza la última etapa en la vía de transulfuración de mamíferos (Rao *et al.*, 1990). CGL cataliza la conversión de L-cistationina en L-cisteína, alfa-cetobutirato y amoníaco. El ADNc humano de CGL (hCGL) se ha clonado y expresado anteriormente, pero con rendimientos relativamente bajos (~5 mg/l de cultivo) (Lu *et al.*, 1992; Steegbom *et al.*, 1999). Usando la secuencia y las alineaciones estructurales de las enzimas CGL y MGL como guía, hCGL se convirtió en una enzima para la degradación eficiente de la metionina.

50 Ejemplo 2 - Síntesis y expresión génica de cistationina- γ -liasa humana modificada mejorada

El gen de la cistationina- γ -liasa humana contiene múltiples codones que rara vez se utilizan en *E. coli* y que pueden interferir con la expresión. Por tanto, con el fin de optimizar la expresión de proteínas en *E. coli*, los genes respectivos se ensamblaron con oligonucleótidos con codones optimizados diseñados usando el software DNA-Works (Hoover *et al.*, 2002). Cada construcción contiene un sitio de restricción N-terminal *Nco*I, un marcador His₆ N-terminal en fase de lectura y un sitio *Eco*RI C-terminal para simplificar la clonación. Después de la clonación en un vector pET28a (Novagen), se cultivó *E. coli* (BL21) que contenía un vector de expresión de cistationasa apropiado a 37 °C usando el medio Terrific Broth (TB) que contenía kanamicina 50 μ g/ml en matraces de agitación a 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de ~ 0,5-0,6. En este punto, los cultivos se cambiaron a un agitador a 25 °C, se indujeron con IPTG 0,5 mM y se dejó que expresaran la proteína durante 12 h adicionales. Los sedimentos celulares se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en un tampón IMAC (NaPO₄ 10 mM/imidazol 10 mM/NaCl 300 mM, pH 8). Después de la lisis con una célula de presión francesa, los lisados se centrifugaron a 20.000 x g durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante se aplicó a una columna IMAC de níquel, se lavó con 10-20 volúmenes de columna de tampón IMAC y después se eluyó con un tampón de elución IMAC (NaPO₄ 50 mM/imidazol 250 mM/NaCl 300 mM, pH 8). Las fracciones que contenían enzimas se incubaron después con piridoxal-5'-fosfato (PLP) 10 mM durante una hora a 25 °C. Usando un dispositivo de filtro centrífugo de PCPM 10.000 (AMICON®), después las proteínas se intercambiaron con tampón varias veces en un PBS 100 mM, glicerol

al 10 %, solución de pH 7,3. Después, las alícuotas de enzima se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Las variantes de CGL y CGL que se purificaron de esta manera fueron un > 95 % homogéneas según se evaluó por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Se calculó que el rendimiento era de ~400 mg/l de cultivo basado en el coeficiente de extinción calculado, $\lambda_{280} = 29.870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en una concentración final de tampón de clorhidrato de guanidinio 6 M, tampón fosfato 20 mM, pH 6,5 (Gill y D von Hippel, 1989).

Ejemplo 3 – Cribado de placa de 96 pocillos para determinar la actividad de metionina- γ -liasa y clasificación de clones

Tanto MGL como CGL producen ácido 2-ketobutanoico a partir de sus respectivos sustratos. Un ensayo colorimétrico para la detección de α -ceto ácidos usando 3-metilbenzotiazolin-2-ona hidrazona (MBTH) (Takakura *et al.*, 2004) se escaló a un formato de placa de 96 pocillos para cribar bibliotecas pequeñas y para clasificar clones con la mejor actividad METasa (metionina- γ -liasa). Este cribado de la placa proporciona un método fácil para seleccionar los clones más activos de las bibliotecas mutágenas. Los clones que muestran una mayor actividad que los controles parentales se seleccionan para su caracterización adicional, eliminando de este modo la necesidad de purificar más de unas pocas variantes para el análisis cinético.

Las colonias individuales que contienen hCGL, hCGL o PpMGL mutagenizadas se recogieron en placas de cultivo de 96 pocillos que contenían 75 μl de medio TB/pocillo que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina. Después, estos cultivos se cultivaron a 37 °C en un agitador de placas hasta alcanzar una DO_{600} de ~0,8-1. Después de enfriar a 25 °C, se añadieron adicionalmente 75 μl de medio/pocillo que contenían 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina e IPTG 0,5 mM. La expresión se realizó a 25 °C con agitación durante 2 h, después de lo cual se transfirieron 100 μl de cultivo/pocillo a una placa de ensayo de 96 pocillos. Después, las placas de ensayo se centrifugaron para sedimentar las células, se retiraron los medios y las células se lisaron mediante la adición de 50 μl /pocillo de reactivo de extracción de proteínas B-PER® (Pierce). Después de aclarar por centrifugación, el lisado se incubó con L-Met 5 mM a 37 °C durante 10-12 h. Después, la reacción se derivatizó por adición de 3 partes de solución de MBTH al 0,03 % en acetato de sodio 1 M, pH 5. Las placas se calentaron a 50 °C durante 40 minutos y después de enfriar se leyeron a 320 nm en un lector de placas de microtitulación.

30 Ejemplo 4 - Diseño de biblioteca para la generación de variantes degradantes de metionina mejoradas derivadas de hCGL-E59N-R119L-E339V

El gen para la enzima degradadora de metionina hCGL-E59N-R119L-E339V (hCGL-NLV) se usó como punto de partida para generar otras variantes adicionales con mejoras en la actividad. Se generaron alineamientos de secuencias de aminoácidos usando secuencias de MGL y CGL de diversos organismos. Las regiones seleccionadas para la mutagenia se identificaron en sitios de alineación específicos donde las enzimas MGL tenían un resto conservado y todas las enzimas CGL tenían un resto conservado diferente. Aunque MGL y CGL tienen estructuras altamente homólogas, no degradan el sustrato respectivo de cada una, por tanto, las diferencias de secuencia de aminoácidos conservada filogenéticamente entre las enzimas MGL y CGL pueden indicar restos que son importantes para degradar su sustrato respectivo. Las bibliotecas se generaron mediante PCR de extensión por solapamiento usando oligonucleótidos que contenían un codón para el molde de hCGL-NLV parental que codifica un resto conservado o un codón para el resto conservado MGL correspondiente. Los productos de PCR ensamblados finales se digirieron con *NcoI* y *EcoRI* y se ligaron en el vector pET28a con ADN ligasa T4. Las ligaduras resultantes se transformaron directamente en *E. coli* (BL21) y se sembraron en placas de LB-kanamicina para su posterior cribado como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se cribaron dos veces más colonias que la diversidad teórica de las bibliotecas (es decir, todas las posibles secuencias génicas codificadas por la biblioteca). Los clones que mostraron una mayor actividad que la variante hCGL-NLV parental se aislaron y secuenciaron para identificar las mutaciones que confieren una actividad mejorada. Los clones con actividad degradadora de L-metionina mejorada se usaron como moldes en rondas iterativas de mutagenia como se describe.

50 Ejemplo 5 - Caracterización de variantes degradadoras de metionina humana mejoradas

Después de varias rondas de mutagenia y cribado como se describen en los Ejemplos 3 y 4, se descubrió que cinco posiciones de aminoácido además de los tres sitios de mutación originales (es decir, E59N-R119L-E339V) confirieron una actividad degradadora de metionina mejorada en comparación con hCGL-NLV. Estas posiciones adicionales están ubicadas en los restos 63, 91, 268, 311 y 353 de hCGL (SEQ ID NO: 1) (véase la FIG. 1). La mutación de una o más de estas posiciones a S63L, L91M, K268R, T311G y I353S, en combinación con mutaciones de restos en las posiciones 59, 119 y 339, dio como resultado valores mejorados de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ para degradar L-metionina en comparación con hCGL-NLV. En particular, se demostró que las variantes que contenían sustituciones de aminoácidos correspondientes a la SEQ ID NO: 3, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119L-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-1); la SEQ ID NO: 4, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119L-K268R-T311GE339V-I353S (hCGL-8mut-2); la SEQ ID NO: 5, hCGL-E59N-S63L-L91M-R119A-K268RT311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-3); y la SEQ ID NO: 6, hCGL-E59I-S63L-L91M-R119A-K268R-T311G-E339V-I353S (hCGL-8mut-4) tenían los valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ más altos para degradar la L-metionina. Estas variantes (hCGL-8mut-(1-4)) se purificaron hasta una homogeneidad superior al 95 % según se evaluó por SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 2 y se caracterizaron cinéticamente por su capacidad para degradar L-Met en un tampón de PBS 100 mM a pH 7,3 y 37 °C usando un ensayo de MBTH a

escala de 1 ml similar al descrito en el Ejemplo 3.

Tabla 1. Comparación de la cinética de Michaelis-Menten de la degradación de L-metionina a pH 7,3 y 37 °C usando hCGL, hCGL-NLV y variantes hCGL-8mut(1-4) mejoradas.

Variante	$k_{cat} \text{ s}^{-1}$	$K_M \text{ mM}$	$k_{cat}/K_M \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$
hCGL	0	0	0
hCGL-NLV	7,9	14	560
hCGL-8mut-1	7,9	2,2	3590
hCGL-8mut-2	7,1	1,4	5070
hCGL-8mut-3	ND	ND	ND
hCGL-8mut-4	9,8	1,8	5440
ND = no determinado			

5

Ejemplo 6 - Citotoxicidad de hCGL-8mut-1 contra estirpes celulares tumorales

La citotoxicidad *in vitro* de hCGL-8mut-1 se evaluó contra estirpes celulares de melanoma A375 y estirpes celulares de cáncer de próstata DU145 y PC3. Las células se sembraron a ~3000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos en medio DMEM para las células A375 o medio RPMI1640 para las estirpes celulares de tumor de próstata y se dejaron crecer durante 24 h antes del tratamiento con concentraciones variables de enzima. Después de 5 días de tratamiento, la proliferación se midió usando el ensayo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS). El análisis de los datos resultantes para A375 produjeron un valor de CI_{50} aparente de 0,08 μM y valores de CI_{50} aparentes de 0,21 μM para DU145 y 0,25 μM para las células de tumor de próstata PC3 (Figura 2).

15

Ejemplo 7 - Preparación farmacológica de hCGL-8mut-1

La enzima hCGL-8mut-1 se purificó como se describe en el Ejemplo 2 con una excepción: después de la unión a la columna IMAC, la proteína se lavó exhaustivamente (90-100 volúmenes de columna) con un tampón IMAC que contenía TRITON® 114 al 0,1 %. Después, la columna se lavó con 10-20 volúmenes de columna de tampón IMAC y se eluyó con un tampón de elución IMAC (NaPO_4 50 mM/imidazol 250 mM/NaCl 300 mM, pH 8). Se empleó el lavado con TRITON® 114 para retirar endotoxinas. La proteína purificada se sometió a intercambio de tampón en un tampón de NaPO_4 100 mM a pH 8,3 usando un dispositivo de filtración de PCPM 10.000 (Amicon). Posteriormente, se añadió PLP a una concentración de 10 mM y la proteína se incubó durante 1 h a 25 °C. Después, se añadió metoxi PEG succinimidil carboximetil éster 5000 PM (JenKem Technology) a hCGL-8mut-1 a una relación molar de 80:1 y se dejaron reaccionar durante 1 h a 25 °C con agitación constante. A la mezcla resultante se le intercambió exhaustivamente el tampón (PBS con glicerol al 10 %) usando un dispositivo de filtración de PCPM 100.000 (Amicon) y se esterilizó con un filtro de jeringa de 0,2 micrómetros (VWR). Todas las enzimas PEGiladas se analizaron para determinar el contenido de lipopolisacáridos (LPS) usando un kit de Lisado de Amebocitos Limulus (LAL) (Cape Cod Incorporated).

20

Ejemplo 8 - Estabilidad sérica de hCGL-8mut-1 PEGilada

La estabilidad sérica de hCGL-8mut-1 PEGilada se sometió a ensayo mediante incubación de la enzima en suero humano agrupado a 37 °C a una concentración final de 10 μM . En diferentes puntos temporales, se retiraron alícuotas y se sometió a ensayo su actividad usando el ensayo DTNB como se describe en la Publicación de Patente de los EE.UU. 2011/0200576, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Después de trazar los datos, se calculó que la hCGL-8mut-1 PEGilada tenía una semivida ($T_{0,5}$) de 101 ± 4 h (Figura 3).

25

Ejemplo 9 - Análisis farmacodinámico de hCGL-8mut-1 PEGilada en ratones

Para evaluar la eficacia de las enzimas degradadoras de metionina humanas obtenidas por ingeniería desveladas en los Ejemplos 4-7 anteriores para aclarar la L-metionina en un modelo de ratón, a tres grupos de tres animales cada uno se les administraron 50 mg/kg de PEG-hCGL-8mut-1 mediante inyección en la vena de la cola, mientras se mantenían con una dieta normal. Los grupos se sacrificaron en puntos temporales correspondientes a 8, 24 y 48 h mediante venopunción cardíaca para la recogida de suero. Después, las muestras de suero se analizaron para determinar el contenido de L-metionina mediante derivatización con o-ftalaldehído (OPA), seguida de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) esencialmente como se describe por Agilent Technologies (en el sitio web chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/5980-3088.PDF). Este esquema de dosificación que usa PEG-hCGL-8mut-1 permitió el agotamiento de L-metionina a niveles inferiores a 5 μM durante más de 15 h (Figura 4). Por el contrario, la administración de 200 mg/kg de hCGL-NLV PEGilada a ratones con una dieta normal solo disminuyó la L-metionina sérica a ~10 μM durante 4 h (Figura 5).

30

Todos los métodos desvelados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación

excesiva a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método que se describen en el presente documento sin alejarse del concepto y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que determinados agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en el presente documento mientras se obtendrían los mismos resultados o similares.

Referencias

- 10 Patente de los EE.UU. N.º 4.870.287
 Patente de los EE.UU. N.º 5.739.169
 Patente de los EE.UU. N.º 5.760.395
 Patente de los EE.UU. N.º 5.801.005
 Patente de los EE.UU. N.º 5.824.344
 15 Patente de los EE.UU. N.º 5.830.880
 Patente de los EE.UU. N.º 5.846.945
 Patente de los EE.UU. N.º 5.889.155
 Patente de los EE.UU. N.º 8.709.407
 Publicación de patente de los EE.UU. 2009/0304666
 20 Publicación de patente de los EE.UU. 2011/0200576
 Ashe et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57: 417, 1974.
 Austin-Ward y Villaseca, *Revista Médica de Chile*, 126 (7): 838-845, 1998.
 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1994.
 25 Breillout et al., en: *Methionine dependency of malignant tumors: a possible approach for therapy*, Oxford University Press, 1628-1632, 1990.
 Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4 (10): 2337-2347, 1998.
 Christodoulides et al., *Microbiology*, 144 (Parte 11): 3027-3037, 1998.
 Davidson et al., *J. Immunother.*, 21 (5): 389-398, 1998.
 30 Esaki y Soda, *Methods Enzymol.*, 143: 459, 1987.
 Gill y von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal Biochem*, 182 (2): 319-326, 1989.
 Halpern et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71: 1133-1136, 1974.
 Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78 (4): 480-485, 1998.
 35 Harkki et al., *BioTechnology*, 7: 596-603, 1989.
 Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37 (4): 347-353, 1998.
 Hollander, *Front. Immun.*, 3: 3, 2012.
 Hopwood et al., en: *Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.
 40 Hori et al., *Cancer Res.*, 56: 2116-2122, 1996.
 Hui y Hashimoto, *Infection Immun.*, 66 (11): 5329-5336, 1998.
 Ito et al., *J. Biochem.*, 79: 1263, 1976.
 Kreis y Goodenow, *Cancer Res.*, 38: 2259-2262, 1978.
 Kreis et al., *Cancer Res.*, 40: 634-641, 1980.
 45 Kreis, *Cancer Treatment Rpts.*, 63: 1069, 1979.
 Kudou et al., *J. Biochem.*, 141: 535, 2007.
 Lishko et al., *Anticancer Res.*, 13: 1465-1468, 1993.
 Lordanescu, *J. Bacteriol.*, 12: 597-601, 1975.
 Lu et al., *Cloning and nucleotide sequence of human liver cDNA encoding for cystathionine gamma-lyase. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 189 (2): 749-758, 1992.
 50 Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
 Mellor et al., *Gene*, 24: 1-14, 1983.
 Nakamura et al., *Anal. Biochem.*, 138: 421-424, 1984.
 55 Penttila et al., *Gene*, 61: 155-164, 1987.
 Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (24): 14411-14416, 1998.
 Rao et al., *Role of the Transsulfuration Pathway and of {gamma}-Cystathionase Activity in the Formation of Cysteine and Sulfate from Methionine in Rat Hepatocytes. Journal of Nutrition*, 120 (8): 837, 1990.
Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
 60 Sibakov et al., *Eur. J. Biochem.*, 145: 567-572, 1984.
 Sridhar et al., *Acta Crystall. Sección D: Biolog, Crystall.*, 56: 1665-1667, 2000.
 Steegborn et al., *Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine gamma-lyase. Toward the rational control of transsulfuration. Journal of Biological Chemistry*, 274 (18): 12675, 1999.
 Stone et al., *De novo engineering of a human cystathionine-lyase for systemic L-methionine depletion cancer therapy. ACS Chemical Biology*, 7 (11): 1822-1829, 2012.
 65 Takakura et al., *Assay method for antitumor L-methionine -lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex*

reaction with L-methionine. *Analytical Biochemistry*, 327 (2): 233-240, 2004.

Tan et al., *Anticancer Res.*, 16: 3937-3942, 1996a.

Tan et al., *Anticancer Res.*, 16: 3931-3936, 1996b.

Tan et al., *Protein Express. Purif.*, 9: 233-245, 1997a.

5 Tan et al., *Anticancer Res.*, 17: 3857-3860, 1997b.

Ward, *Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi*, Helsinki, 119-128, 1989.

Wawrzynczak y Thorpe, en: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

10 Yang et al., en: *PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates*, AACR, 6673-6678, 2004a.

Yang et al., en: *Pharmacokinetics, methionine depletion, and antigenicity of recombinant methioninase in primates*, AACR, 2131-2138, 2004b.

Yoshioka et al., *Cancer Res.*, 58: 2583-2587, 1998.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Board of Regents, The University of Texas System

20 <120> L-metioninasa de primate obtenida por ingeniería genética con fines terapéuticos

<130> UTFB.P1011WO

<150> 61/871.768

<151> 29-08-2013

25

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1

<211> 405

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 1

ES 2 702 120 T3

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Glu Tyr Ser Arg Ser Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Leu Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Arg Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Gly Cys Ala His Ile Val

ES 2 702 120 T3

				165						170						175
His	Lys	His	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Met	Ser	
			180					185					190			
Pro	Tyr	Phe	Gln	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Ser	Met	Tyr	
		195					200					205				
Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr	Met	Asn	Gly	His	Ser	Asp	Val	Val	Met	Gly	Leu	
	210					215					220					
Val	Ser	Val	Asn	Cys	Glu	Ser	Leu	His	Asn	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln	
225					230					235					240	
Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Cys	Tyr	Leu	Cys	Asn	
				245					250					255		
Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	His	Val	Arg	Met	Glu	Lys	His	Phe	Lys	Asn	
			260					265					270			
Gly	Met	Ala	Val	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Trp	Val	Glu	Lys	
		275					280					285				
Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Val	Lys	
	290					295					300					
Arg	Gln	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Met	Val	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly	
305					310					315					320	
Thr	Leu	Gln	His	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Lys	Leu	Phe	Thr	
				325					330					335		
Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala	
			340					345					350			
Ile	Met	Thr	His	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Asp	Val	Leu	Gly	
		355					360					365				
Ile	Ser	Asp	Thr	Leu	Ile	Arg	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Asp	Glu	Glu	
	370					375					380					
Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	His	Pro	Pro	
385					390					395					400	
Ser	Gly	Ser	His	Ser												
				405												

ES 2 702 120 T3

<210> 2
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

```

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1          5          10          15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
          20          25          30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
          35          40          45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Ser Gly
 50          55          60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
65          70          75          80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Leu Ala Ala Thr Val Thr
          85          90          95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
          100          105          110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
          115          120          125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130          135          140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145          150          155          160

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Gly Cys Ala His Ile Val
          165          170          175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
          180          185          190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Ser Met Tyr
195          200          205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
    
```

ES 2 702 120 T3

210	215	220																		
Val	Ser	Val	Asn	Cys	Glu	Ser	Leu	His	Asn	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln					
225					230					235					240					
Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Cys	Tyr	Leu	Cys	Asn					
				245					250					255						
Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	His	Val	Arg	Met	Glu	Lys	His	Phe	Lys	Asn					
			260					265					270							
Gly	Met	Ala	Val	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Trp	Val	Glu	Lys					
		275					280					285								
Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Val	Lys					
	290					295					300									
Arg	Gln	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Met	Val	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly					
305					310					315					320					
Thr	Leu	Gln	His	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Lys	Leu	Phe	Thr					
				325					330					335						
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala					
			340					345					350							
Ile	Met	Thr	His	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Asp	Val	Leu	Gly					
		355					360					365								
Ile	Ser	Asp	Thr	Leu	Ile	Arg	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Asp	Glu	Glu					
	370					375					380									
Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	His	Pro	Pro					
385					390					395					400					
Ser	Gly	Ser	His	Ser																
				405																

<210> 3
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 3

Met	Gln	Glu	Lys	Asp	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Phe	Leu	Pro	His	Phe	Gln
1				5					10					15	

ES 2 702 120 T3

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30
 Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45
 Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60
 Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95
 Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110
 Val Tyr Gly Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125
 Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140
 Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160
 Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Gly Cys Ala His Ile Val
 165 170 175
 His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
 180 185 190
 Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Ser Met Tyr
 195 200 205
 Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
 210 215 220
 Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255
 Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn

ES 2 702 120 T3

			260						265						270
Gly	Met	Ala	Val	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Trp	Val	Glu	Lys
		275					280					285			
Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Val	Lys
	290					295					300				
Arg	Gln	Cys	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Met	Val	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly
305					310					315					320
Thr	Leu	Gln	His	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Lys	Leu	Phe	Thr
				325					330					335	
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala
			340					345					350		
Ser	Met	Thr	His	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Asp	Val	Leu	Gly
		355					360					365			
Ile	Ser	Asp	Thr	Leu	Ile	Arg	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Asp	Glu	Glu
	370					375					380				
Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	His	Pro	Pro
385					390					395					400
Ser	Gly	Ser	His	Ser											
				405											

<210> 4
 <211> 405
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 4

Met	Gln	Glu	Lys	Asp	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Phe	Leu	Pro	His	Phe	Gln
1				5					10					15	
His	Phe	Ala	Thr	Gln	Ala	Ile	His	Val	Gly	Gln	Asp	Pro	Glu	Gln	Trp
			20					25					30		
Thr	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Pro	Pro	Ile	Ser	Leu	Ser	Thr	Thr	Phe	Lys
		35					40					45			
Gln	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	His	Ser	Gly	Phe	Ile	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly
	50					55					60				

ES 2 702 120 T3

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95
 Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110
 Val Tyr Gly Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125
 Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140
 Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160
 Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Gly Cys Ala His Ile Val
 165 170 175
 His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
 180 185 190
 Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Ser Met Tyr
 195 200 205
 Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
 210 215 220
 Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255
 Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
 260 265 270
 Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
 275 280 285
 Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
 290 295 300
 Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly

ES 2 702 120 T3

305		310		315		320
Thr Leu Gln His	Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr	325		330		335
Leu Ala Val Ser	Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala	340		345		350
Ser Met Thr His	Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly	355		360		365
Ile Ser Asp Thr	Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu	370		375		380
Asp Leu Leu Glu Asp	Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro	385		390		395
						400
Ser Gly Ser His	Ser	405				

<210> 5
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 5

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln	1	5	10	15
His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp	20	25	30	
Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys	35	40	45	
Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly	50	55	60	
Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly	65	70	75	80
Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr	85	90	95	
Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp	100	105	110	

ES 2 702 120 T3

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Gly Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Ser Met Tyr
195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly

ES 2 702 120 T3

355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 6
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 6

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Ile Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160

ES 2 702 120 T3

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Gly Cys Ala His Ile Val
 165 170 175
 His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
 180 185 190
 Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Ser Met Tyr
 195 200 205
 Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
 210 215 220
 Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255
 Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
 260 265 270
 Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
 275 280 285
 Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
 290 295 300
 Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
 305 310 315 320
 Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
 340 345 350
 Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365
 Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380
 Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400
 Ser Gly Ser His Ser

405

- <210> 7
- <211> 405
- <212> PRT
- 5 <213> *Pongo abelii*

- <400> 7

ES 2 702 120 T3

Met Gln Glu Lys Glu Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp
20 25 30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Pro Ser Val Thr Phe Lys
35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Val Tyr Ser Arg Ser Gly
50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Leu Ala Ala Thr Val Thr
85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
100 105 110

Val Tyr Ala Gly Thr Asn Arg Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Met Thr Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Cys
195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu

ES 2 702 120 T3

210						215						220					
Val	Ser	Val	Asn	Cys	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asn	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln		
225					230					235					240		
Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Cys	Tyr	Leu	Cys	Asn		
				245					250					255			
Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	Gln	Val	Arg	Met	Glu	Lys	His	Phe	Lys	Asn		
			260					265					270				
Gly	Met	Ala	Val	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Trp	Val	Glu	Lys		
		275					280					285					
Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Val	Lys		
	290					295					300						
Arg	Gln	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Met	Val	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly		
305					310					315					320		
Thr	Leu	Gln	His	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Lys	Leu	Phe	Thr		
				325					330					335			
Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Pro	Ala		
			340					345					350				
Val	Met	Thr	His	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Arg	Asp	Val	Leu	Gly		
		355					360					365					
Ile	Ser	Asp	Thr	Leu	Ile	Arg	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Asp	Glu	Glu		
	370					375					380						
Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	His	Pro	Pro		
385					390					395					400		
Ser	Gly	Ser	His	Ser													
				405													

<210> 8
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

5

<400> 8

ES 2 702 120 T3

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp

ES 2 702 120 T3

			20					25						30			
Thr	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Thr	Thr	Phe	Lys		
		35					40					45					
Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln	His	Ser	Gly	Phe	Glu	Tyr	Ser	Arg	Ser	Gly		
	50					55					60						
Asn	Pro	Thr	Arg	Asn	Cys	Leu	Glu	Lys	Ala	Val	Ala	Ala	Leu	Asp	Gly		
65					70					75					80		
Ala	Lys	Tyr	Cys	Leu	Ala	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Thr		
				85					90					95			
Ile	Thr	His	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Gln	Ile	Ile	Cys	Met	Asp	Asp		
			100					105					110				
Val	Tyr	Gly	Gly	Thr	Asn	Arg	Tyr	Phe	Arg	Gln	Val	Ala	Ser	Glu	Phe		
		115					120					125					
Gly	Leu	Lys	Ile	Ser	Phe	Val	Asp	Cys	Ser	Lys	Ile	Lys	Leu	Leu	Glu		
	130					135					140						
Ala	Ala	Ile	Thr	Pro	Glu	Thr	Lys	Leu	Val	Trp	Ile	Glu	Thr	Pro	Thr		
145					150					155					160		
Asn	Pro	Val	Leu	Lys	Met	Ile	Asp	Ile	Glu	Ala	Cys	Ala	His	Ile	Val		
				165					170					175			
His	Lys	Arg	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Met	Ser		
			180					185					190				
Pro	Tyr	Phe	Gln	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Cys	Met	Cys		
		195					200					205					
Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr	Met	Asn	Gly	His	Ser	Asp	Val	Val	Met	Gly	Leu		
	210					215					220						
Val	Ser	Val	Asn	Cys	Glu	Arg	Leu	His	Asn	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln		
225					230					235					240		
Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Leu	Asp	Cys	Tyr	Leu	Cys	Asn		
				245					250					255			
Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	His	Val	Arg	Met	Glu	Lys	His	Phe	Lys	Asn		
			260					265					270				

ES 2 702 120 T3

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Gly Val Glu Lys
 275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Ala Lys
 290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Thr Gly Met Ile Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
 305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335

Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ile Met Thr His Ala Ser Val Pro Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Lys
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Asn
 405

<210> 9
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*

5

<400> 9

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Glu Tyr Ser Arg Ser Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

10

ES 2 702 120 T3

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Leu Ala Ala Thr Val Thr
85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Arg Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Tyr
195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Lys His Phe Lys Asn
260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Thr Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
325 330 335

ES 2 702 120 T3

Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ile Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 10
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> *Pan paniscus*
 <400> 10

5

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Lys Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Glu Tyr Ser Arg Ser Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Leu Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Arg Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140

10

ES 2 702 120 T3

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Tyr
195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Ile Gly Leu
210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Lys His Phe Lys Asn
260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Thr Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
325 330 335

Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
340 345 350

Ile Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
385 390 395 400

ES 2 702 120 T3

Ser Gly Ser His Ser
405

5 <210> 11
<211> 405
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

10 <400> 11

Met Gln Glu Lys Glu Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp
20 25 30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Pro Ser Val Thr Phe Lys
35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
100 105 110

Val Tyr Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Met Thr Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

ES 2 702 120 T3

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Cys
 195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
 210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu Gln Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
 260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
 275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
 290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
 305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Lys Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 12
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

ES 2 702 120 T3

<400> 12

Met Gln Glu Lys Glu Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp
20 25 30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Pro Ser Val Thr Phe Lys
35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Ile Tyr Ser Arg Leu Gly
50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
100 105 110

Val Tyr Ala Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Met Thr Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Cys
195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
225 230 235 240

ES 2 702 120 T3

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu Gln Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
 260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
 275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
 290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
 305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Lys Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 13
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 13

Met Gln Glu Lys Glu Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

5

10

ES 2 702 120 T3

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Pro Ser Val Thr Phe Lys
 35 40 45
 Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60
 Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95
 Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110
 Val Tyr Ala Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125
 Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140
 Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160
 Asn Pro Thr Gln Lys Met Thr Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
 165 170 175
 His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
 180 185 190
 Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Cys
 195 200 205
 Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
 210 215 220
 Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255
 Arg Gly Leu Lys Thr Leu Gln Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
 260 265 270
 Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
 275 280 285

ES 2 702 120 T3

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
 290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
 305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Lys Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 14
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 14

Met Gln Glu Lys Glu Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Pro Ile Ser Pro Ser Val Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Ile Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

ES 2 702 120 T3

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
100 105 110

Val Tyr Ala Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Met Thr Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Cys
195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu Gln Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
325 330 335

ES 2 702 120 T3

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Lys Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 15
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 15

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Leu Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Ala Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125

5

10

ES 2 702 120 T3

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Val Leu Lys Met Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys Arg Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Cys
195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Arg Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Leu Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Gly Val Glu Lys
275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Ala Lys
290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Ile Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Pro Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Lys
370 375 380

ES 2 702 120 T3

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Asn
 405

<210> 16
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 16

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Leu Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Ala Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Ile Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160

Asn Pro Val Leu Lys Met Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
 165 170 175

ES 2 702 120 T3

His Lys Arg Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
 180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Cys
 195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
 210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Arg Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Leu Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
 260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Gly Val Glu Lys
 275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Ala Lys
 290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Ile Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
 305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Pro Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Lys
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Asn
 405

<210> 17
 <211> 405
 <212> PRT

ES 2 702 120 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 17

```

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1           5           10           15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp
          20           25           30

Thr Ser Arg Ala Val Val Pro Leu Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
          35           40           45

Gln Ala Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
 50           55           60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
65           70           75           80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
          85           90           95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
          100          105          110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
          115          120          125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130          135          140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145          150          155          160

Asn Pro Val Leu Lys Met Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
          165          170          175

His Lys Arg Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
          180          185          190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Cys
          195          200          205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
210          215          220

```

ES 2 702 120 T3

Val Ser Val Asn Cys Glu Arg Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Leu Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Gly Val Glu Lys
275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Ala Lys
290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Ile Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Pro Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Lys
370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
385 390 395 400

Ser Gly Ser His Asn
405

<210> 18
<211> 405
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Polipéptido sintético

<400> 18

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Glu Pro Glu Gln Trp

ES 2 702 120 T3

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Gly Val Glu Lys
 275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Ala Lys
 290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Ile Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
 305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Pro Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Lys
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Asn
 405

<210> 19
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 19

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly

ES 2 702 120 T3

65					70						75					80
Ala	Lys	Tyr	Cys	Leu	Ala	Phe	Ala	Ser	Gly	Met	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	
				85					90					95		
Ile	Thr	His	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Gln	Ile	Ile	Cys	Met	Asp	Asp	
			100					105					110			
Val	Tyr	Gly	Gly	Thr	Asn	Leu	Tyr	Phe	Arg	Gln	Val	Ala	Ser	Glu	Phe	
		115					120					125				
Gly	Leu	Lys	Ile	Ser	Phe	Val	Asp	Cys	Ser	Lys	Ile	Lys	Leu	Leu	Glu	
	130					135					140					
Ala	Ala	Ile	Thr	Pro	Glu	Thr	Lys	Leu	Val	Trp	Ile	Glu	Thr	Pro	Thr	
145					150					155					160	
Asn	Pro	Thr	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Ile	Glu	Ala	Cys	Ala	His	Ile	Val	
				165					170					175		
His	Lys	His	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Met	Ser	
			180					185					190			
Pro	Tyr	Phe	Gln	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Cys	Met	Tyr	
		195					200					205				
Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr	Met	Asn	Gly	His	Ser	Asp	Val	Val	Met	Gly	Leu	
	210					215					220					
Val	Ser	Val	Asn	Cys	Glu	Ser	Leu	His	Asn	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln	
225					230					235					240	
Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Cys	Tyr	Leu	Cys	Asn	
				245					250					255		
Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	His	Val	Arg	Met	Glu	Arg	His	Phe	Lys	Asn	
			260					265					270			
Gly	Met	Ala	Val	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Trp	Val	Glu	Lys	
		275					280					285				
Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Val	Lys	
	290					295					300					
Arg	Gln	Cys	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Met	Val	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly	
305					310					315					320	

ES 2 702 120 T3

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 20
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 20

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Ile Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe

5

10

ES 2 702 120 T3

		115						120								125
Gly	Leu	Lys	Ile	Ser	Phe	Val	Asp	Cys	Ser	Lys	Ile	Lys	Leu	Leu	Glu	
	130					135					140					
Ala	Ala	Ile	Thr	Pro	Glu	Thr	Lys	Leu	Val	Trp	Ile	Glu	Thr	Pro	Thr	
145					150					155					160	
Asn	Pro	Thr	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Ile	Glu	Ala	Cys	Ala	His	Ile	Val	
				165					170					175		
His	Lys	His	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Met	Ser	
			180					185					190			
Pro	Tyr	Phe	Gln	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Cys	Met	Tyr	
		195					200					205				
Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr	Met	Asn	Gly	His	Ser	Asp	Val	Val	Met	Gly	Leu	
	210					215					220					
Val	Ser	Val	Asn	Cys	Glu	Ser	Leu	His	Asn	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln	
225					230					235					240	
Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Cys	Tyr	Leu	Cys	Asn	
				245					250					255		
Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	His	Val	Arg	Met	Glu	Arg	His	Phe	Lys	Asn	
			260					265					270			
Gly	Met	Ala	Val	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Trp	Val	Glu	Lys	
		275					280					285				
Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Val	Lys	
	290					295					300					
Arg	Gln	Cys	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Met	Val	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly	
305					310					315					320	
Thr	Leu	Gln	His	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Lys	Leu	Phe	Thr	
				325					330					335		
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala	
			340					345					350			
Ser	Met	Thr	His	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Asp	Val	Leu	Gly	
		355					360					365				

ES 2 702 120 T3

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 21
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 21

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Arg Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val

ES 2 702 120 T3

				165						170					175			
His	Lys	His	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Met	Ser			
			180					185					190					
Pro	Tyr	Phe	Gln	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Cys	Met	Tyr			
		195					200					205						
Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr	Met	Asn	Gly	His	Ser	Asp	Val	Val	Met	Gly	Leu			
	210					215					220							
Val	Ser	Val	Asn	Cys	Glu	Ser	Leu	His	Asn	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln			
225					230					235					240			
Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Cys	Tyr	Leu	Cys	Asn			
				245					250					255				
Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	His	Val	Arg	Met	Glu	Arg	His	Phe	Lys	Asn			
			260					265					270					
Gly	Met	Ala	Val	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Trp	Val	Glu	Lys			
		275					280					285						
Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Val	Lys			
	290					295					300							
Arg	Gln	Cys	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Met	Val	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly			
305					310					315					320			
Thr	Leu	Gln	His	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Lys	Leu	Phe	Thr			
				325					330					335				
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala			
			340					345					350					
Ser	Met	Thr	His	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Asp	Val	Leu	Gly			
		355					360					365						
Ile	Ser	Asp	Thr	Leu	Ile	Arg	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Asp	Glu	Glu			
	370					375					380							
Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	His	Pro	Pro			
385					390					395					400			
Ser	Gly	Ser	His	Ser														
				405														

ES 2 702 120 T3

<210> 22
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

```

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1          5          10          15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
          20          25          30

Thr Ser Arg Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
          35          40          45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Ile Tyr Ser Arg Leu Gly
 50          55          60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65          70          75          80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
          85          90          95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
          100          105          110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
          115          120          125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
          130          135          140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
          145          150          155          160

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
          165          170          175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
          180          185          190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Tyr
          195          200          205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu
  
```

ES 2 702 120 T3

210		215		220											
Val	Ser	Val	Asn	Cys	Glu	Ser	Leu	His	Asn	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln
225					230					235					240
Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Cys	Tyr	Leu	Cys	Asn
				245					250					255	
Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	His	Val	Arg	Met	Glu	Arg	His	Phe	Lys	Asn
			260					265					270		
Gly	Met	Ala	Val	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Trp	Val	Glu	Lys
		275					280					285			
Val	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Val	Lys
	290					295					300				
Arg	Gln	Cys	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Met	Val	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly
305					310					315					320
Thr	Leu	Gln	His	Ala	Glu	Ile	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Lys	Leu	Phe	Thr
				325					330					335	
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala
			340					345					350		
Ser	Met	Thr	His	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Asp	Val	Leu	Gly
		355					360					365			
Ile	Ser	Asp	Thr	Leu	Ile	Arg	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Asp	Glu	Glu
	370					375					380				
Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	His	Pro	Pro
385					390					395					400
Ser	Gly	Ser	His	Ser											
				405											

<210> 23
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 23

Met	Gln	Glu	Lys	Asp	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Phe	Leu	Pro	His	Phe	Gln
1				5					10					15	

ES 2 702 120 T3

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30
 Thr Ser Lys Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45
 Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60
 Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95
 Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110
 Val Tyr Gly Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125
 Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140
 Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160
 Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
 165 170 175
 His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
 180 185 190
 Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Tyr
 195 200 205
 Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Ile Gly Leu
 210 215 220
 Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255
 Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn

ES 2 702 120 T3

260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
405

<210> 24
<211> 405
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Polipéptido sintético

<400> 24

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
20 25 30

Thr Ser Lys Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Ile Tyr Ser Arg Leu Gly
50 55 60

ES 2 702 120 T3

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95
 Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110
 Val Tyr Gly Gly Thr Asn Leu Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125
 Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140
 Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160
 Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
 165 170 175
 His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
 180 185 190
 Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Tyr
 195 200 205
 Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Ile Gly Leu
 210 215 220
 Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255
 Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
 260 265 270
 Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
 275 280 285
 Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
 290 295 300
 Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly

ES 2 702 120 T3

```

305                310                315                320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
      325                330                335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
      340                345                350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
      355                360                365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
      370                375                380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
      385                390                395                400

Ser Gly Ser His Ser
      405

```

<210> 25
 <211> 405
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10 <400> 25

```

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
  1          5          10          15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
      20          25          30

Thr Ser Lys Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
      35          40          45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Gly
      50          55          60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
      65          70          75          80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
      85          90          95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
      100         105         110

```

ES 2 702 120 T3

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Tyr
195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Ile Gly Leu
210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly

ES 2 702 120 T3

355

360

365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
 405

<210> 26
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 26

Met Gln Glu Lys Asp Ala Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln
 1 5 10 15

His Phe Ala Thr Gln Ala Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp
 20 25 30

Thr Ser Lys Ala Leu Val Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys
 35 40 45

Gln Gly Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Ile Tyr Ser Arg Leu Gly
 50 55 60

Asn Pro Thr Arg Asn Cys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Lys Tyr Cys Leu Ala Phe Ala Ser Gly Met Ala Ala Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Thr His Leu Leu Lys Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp
 100 105 110

Val Tyr Gly Gly Thr Asn Ala Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe
 115 120 125

Gly Leu Lys Ile Ser Phe Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu
 130 135 140

Ala Ala Ile Thr Pro Glu Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr
 145 150 155 160

ES 2 702 120 T3

Asn Pro Thr Gln Lys Val Ile Asp Ile Glu Ala Cys Ala His Ile Val
 165 170 175

His Lys His Gly Asp Ile Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser
 180 185 190

Pro Tyr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Cys Met Tyr
 195 200 205

Ser Ala Thr Lys Tyr Met Asn Gly His Ser Asp Val Val Ile Gly Leu
 210 215 220

Val Ser Val Asn Cys Glu Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln
 225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn
 245 250 255

Arg Gly Leu Lys Thr Leu His Val Arg Met Glu Arg His Phe Lys Asn
 260 265 270

Gly Met Ala Val Ala Gln Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys
 275 280 285

Val Ile Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys
 290 295 300

Arg Gln Cys Thr Gly Cys Gly Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly
 305 310 315 320

Thr Leu Gln His Ala Glu Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr
 325 330 335

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Met Thr His Ala Ser Val Leu Lys Asn Asp Arg Asp Val Leu Gly
 355 360 365

Ile Ser Asp Thr Leu Ile Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu
 370 375 380

Asp Leu Leu Glu Asp Leu Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser

405

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una enzima cistationina-γ-liasa (CGL) de primate aislada y modificada que tiene i) Ile o Asn en la posición 59, ii) Ala o Leu en la posición 119 y iii) Val en la posición 339 con respecto a una secuencia de aminoácidos de CGL de primate nativa de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 y 7-10, y una o más mutaciones seleccionadas entre T311G, S63L, L91M, K268R y/o I353S.
- 10 2. Una enzima CGL de primate aislada y modificada que tiene
- 15 (i) una Ile en la posición 59, una Leu en la posición 63, una Met en la posición 91, una Ala en la posición 119, una Arg en la posición 268, una Gly en la posición 311, una Val en la posición 339 y Ser en la posición 353, o
- (ii) una Ile en la posición 59, una Leu en la posición 63, una Met en la posición 91, una Leu en la posición 119, una Arg en la posición 268, una Gly en la posición 311, una Val en la posición 339 y Ser en la posición 353, o
- (iii) una Asn en la posición 59, una Leu en la posición 63, una Met en la posición 91, una Leu en la posición 119, una Arg en la posición 268, una Gly en la posición 311, una Val en la posición 339 y Ser en la posición 353, o
- (iv) una Asn en la posición 59, una Leu en la posición 63, una Met en la posición 91, una Ala en la posición 119, una Arg en la posición 268, una Gly en la posición 311, una Val en la posición 339 y Ser en la posición 353.
- 20 3. La enzima de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende adicionalmente un segmento de péptido heterólogo, en particular en la que el segmento de péptido heterólogo es un péptido XTEN, un Fc de IgG, una albúmina o un péptido de unión a albúmina.
- 25 4. La enzima de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la enzima está acoplada a polietilenglicol (PEG), en particular en donde la enzima está acoplada a PEG a través de uno o más restos de Lys o Cys.
- 30 5. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de las reivindicaciones 1 o 2, en particular en donde el ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión en bacterias, hongos, insectos o mamíferos.
- 35 6. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico optimizado con codones de la reivindicación 5, en particular en donde la célula hospedadora es una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de insecto o una célula de mamífero, más en particular en donde la célula bacteriana es una cepa de *E. coli* que tiene supresiones de los genes *ilvA* y *metA*.
8. Una formulación farmacéutica que comprende la enzima de las reivindicaciones 1 o 2 o el ácido nucleico de la reivindicación 5 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 9. La formulación farmacéutica de la reivindicación 8 para su uso en un método para el tratamiento de una célula tumoral o un sujeto que tiene una célula tumoral, que comprende administrar a la célula tumoral o al sujeto la formulación de la reivindicación 8, en particular en donde se mantiene al sujeto en una dieta con metionina restringida, o en donde se mantiene al sujeto en una dieta normal.
- 45 10. La formulación farmacéutica para su uso en el método de la reivindicación 9, en donde el sujeto es un paciente humano.
- 50 11. La formulación farmacéutica para su uso en el método de la reivindicación 9, en donde la formulación se administra por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intracraneal, por vía intraarticular, por vía intraprostática, por vía intrapleurales, por vía intratraqueal, por vía intraocular, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía subconjuntival, por vía intravesical, por vía mucosa, por vía intrapericárdica, por vía intraumbilical, por vía oral, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada bañando las células diana directamente, a través de un catéter o a través de un lavado.
- 55 12. La formulación farmacéutica para su uso en el método de la reivindicación 9, en donde la formulación se administra a un medio nutriente de la célula tumoral, en particular en donde el medio nutriente es sangre, fluido linfático o fluido espinal.
- 60 13. La formulación farmacéutica para su uso en el método de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente administrar al menos una segunda terapia antineoplásica al sujeto, en particular en donde la segunda terapia antineoplásica es una terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o terapia con citocinas.

1	1	10	20	30	40
1.hcGL	M Q E K D A S S Q G F L P H F F Q H F A T Q A I H V G Q D P E Q W T S R A V V P P I	10	20	30	40
2.hcGL-8mut-1	M Q E K D A S S Q G F L P H F F Q H F A T Q A I H V G Q D P E Q W T S R A V V P P I	10	20	30	40
3.hcGL-8mut-2	M Q E K D A S S Q G F L P H F F Q H F A T Q A I H V G Q D P E Q W T S R A V V P P I	10	20	30	40
4.hcGL-8mut-3	M Q E K D A S S Q G F L P H F F Q H F A T Q A I H V G Q D P E Q W T S R A V V P P I	10	20	30	40
5.hcGL-8mut-4	M Q E K D A S S Q G F L P H F F Q H F A T Q A I H V G Q D P E Q W T S R A V V P P I	50	60	70	80
1	1	10	20	30	40
1.hcGL	S L S T T F E K Q G A P G Q H S G F F E Y S R S G N P T R N C L E K A V A A L D G A K	10	20	30	40
2.hcGL-8mut-1	S L S T T F E K Q G A P G Q H S G F F N Y S R L G N P T R N C L E K A V A A L D G A K	50	60	70	80
3.hcGL-8mut-2	S L S T T F E K Q G A P G Q H S G F F I Y S R L G N P T R N C L E K A V A A L D G A K	50	60	70	80
4.hcGL-8mut-3	S L S T T F E K Q G A P G Q H S G F F N Y S R L G N P T R N C L E K A V A A L D G A K	50	60	70	80
5.hcGL-8mut-4	S L S T T F E K Q G A P G Q H S G F F I Y S R L G N P T R N C L E K A V A A L D G A K	50	60	70	80

FIG. 1

	90	100	110	120
1. hCGL	Y C L A E A S G L A A T V T I T H L L K A G D Q I I C M D D V Y G G T N R Y F R Q	100	110	120
2. hCGL-8mut-1	Y C L A F A S G M A A T V T I T H L L K A G D Q I I C M D D V Y G G T N L Y F R Q	100	110	120
3. hCGL-8mut-2	Y C L A F A S G M A A T V T I T H L L K A G D Q I I C M D D V Y G G T N L Y F R Q	100	110	120
4. hCGL-8mut-3	Y C L A F A S G M A A T V T I T H L L K A G D Q I I C M D D V Y G G T N A Y F R Q	100	110	120
5. hCGL-8mut-4	Y C L A F A S G M A A T V T I T H L L K A G D Q I I C M D D V Y G G T N A Y F R Q	130	140	150
	90	100	110	120
1. hCGL	V A S E F G L K I S F V D C S K I K L L E A A I T P E T K L V W I E T P T N P T Q	140	150	160
2. hCGL-8mut-1	V A S E F G L K I S F V D C S K I K L L E A A I T P E T K L V W I E T P T N P T Q	130	140	150
3. hCGL-8mut-2	V A S E F G L K I S F V D C S K I K L L E A A I T P E T K L V W I E T P T N P T Q	130	140	150
4. hCGL-8mut-3	V A S E F G L K I S F V D C S K I K L L E A A I T P E T K L V W I E T P T N P T Q	130	140	150
5. hCGL-8mut-4	V A S E F G L K I S F V D C S K I K L L E A A I T P E T K L V W I E T P T N P T Q	130	140	150

FIG. 1
(Continuación)

	170	180	190	200
1. hCGL	K V I D I E G C A H I V H K H G D I I L V V D N T F M S P Y F Q R P L A L G A D I	180	190	200
2. hCGL-8mut-1	K V I D I E G C A H I V H K H G D I I L V V D N T F M S P Y F Q R P L A L G A D I	180	190	200
3. hCGL-8mut-2	K V I D I E G C A H I V H K H G D I I L V V D N T F M S P Y F Q R P L A L G A D I	180	190	200
4. hCGL-8mut-3	K V I D I E G C A H I V H K H G D I I L V V D N T F M S P Y F Q R P L A L G A D I	180	190	200
5. hCGL-8mut-4	K V I D I E G C A H I V H K H G D I I L V V D N T F M S P Y F Q R P L A L G A D I	180	190	200
	170	180	190	200
1. hCGL	S M Y S A T K Y M N G H S D V V M G L V S V N C E S L H N R L R F L Q N S L G A V	210	220	230
2. hCGL-8mut-1	S M Y S A T K Y M N G H S D V V M G L V S V N C E S L H N R L R F L Q N S L G A V	210	220	230
3. hCGL-8mut-2	S M Y S A T K Y M N G H S D V V M G L V S V N C E S L H N R L R F L Q N S L G A V	210	220	230
4. hCGL-8mut-3	S M Y S A T K Y M N G H S D V V M G L V S V N C E S L H N R L R F L Q N S L G A V	210	220	230
5. hCGL-8mut-4	S M Y S A T K Y M N G H S D V V M G L V S V N C E S L H N R L R F L Q N S L G A V	210	220	230

FIG. 1
(Continuación)

	250	260	270	280
1. hCGL	P S P I D C Y L C N R G L K T L H V R M E K H F K N G M A V A Q F L E S N P W V E	260	270	280
2. hCGL-8mut-1	P S P I D C Y L C N R G L K T L H V R M E R H F K N G M A V A Q F L E S N P W V E	260	270	280
3. hCGL-8mut-2	P S P I D C Y L C N R G L K T L H V R M E R H F K N G M A V A Q F L E S N P W V E	260	270	280
4. hCGL-8mut-3	P S P I D C Y L C N R G L K T L H V R M E R H F K N G M A V A Q F L E S N P W V E	260	270	280
5. hCGL-8mut-4	P S P I D C Y L C N R G L K T L H V R M E R H F K N G M A V A Q F L E S N P W V E	260	270	280
	290	300	310	320
1. hCGL	K V I Y P G L P S H P Q H E L V K R Q C T G C T G M V T F Y I K G T L Q H A E I F	300	310	320
2. hCGL-8mut-1	K V I Y P G L P S H P Q H E L V K R Q C T G C G G M V T F Y I K G T L Q H A E I F	300	310	320
3. hCGL-8mut-2	K V I Y P G L P S H P Q H E L V K R Q C T G C G G M V T F Y I K G T L Q H A E I F	300	310	320
4. hCGL-8mut-3	K V I Y P G L P S H P Q H E L V K R Q C T G C G G M V T F Y I K G T L Q H A E I F	300	310	320
5. hCGL-8mut-4	K V I Y P G L P S H P Q H E L V K R Q C T G C G G M V T F Y I K G T L Q H A E I F	300	310	320

FIG. 1
(Continuación)

	330	340	350	360
1.hCGL	L K N L K L F T L A E S L G G F E S L A E L P A I M T H A S V L K N D R D V L G I			
	330	340	350	360
2.hCGL-8mut-1	L K N L K L F T L A V S L G G F E S L A E L P A S M T H A S V L K N D R D V L G I			
	330	340	350	360
3.hCGL-8mut-2	L K N L K L F T L A V S L G G F E S L A E L P A S M T H A S V L K N D R D V L G I			
	330	340	350	360
4.hCGL-8mut-3	L K N L K L F T L A V S L G G F E S L A E L P A S M T H A S V L K N D R D V L G I			
	330	340	350	360
5.hCGL-8mut-4	L K N L K L F T L A V S L G G F E S L A E L P A S M T H A S V L K N D R D V L G I			
	370	380	390	400
	370	380	390	405
1.hCGL	S D T L I R L S V G L E D E E D L L E D L D Q A L K A A H P P S G S H S			
	370	380	390	405
2.hCGL-8mut-1	S D T L I R L S V G L E D E E D L L E D L D Q A L K A A H P P S G S H S			
	370	380	390	405
3.hCGL-8mut-2	S D T L I R L S V G L E D E E D L L E D L D Q A L K A A H P P S G S H S			
	370	380	390	405
4.hCGL-8mut-3	S D T L I R L S V G L E D E E D L L E D L D Q A L K A A H P P S G S H S			
	370	380	390	405
5.hCGL-8mut-4	S D T L I R L S V G L E D E E D L L E D L D Q A L K A A H P P S G S H S			

FIG. 1
(Continuación)

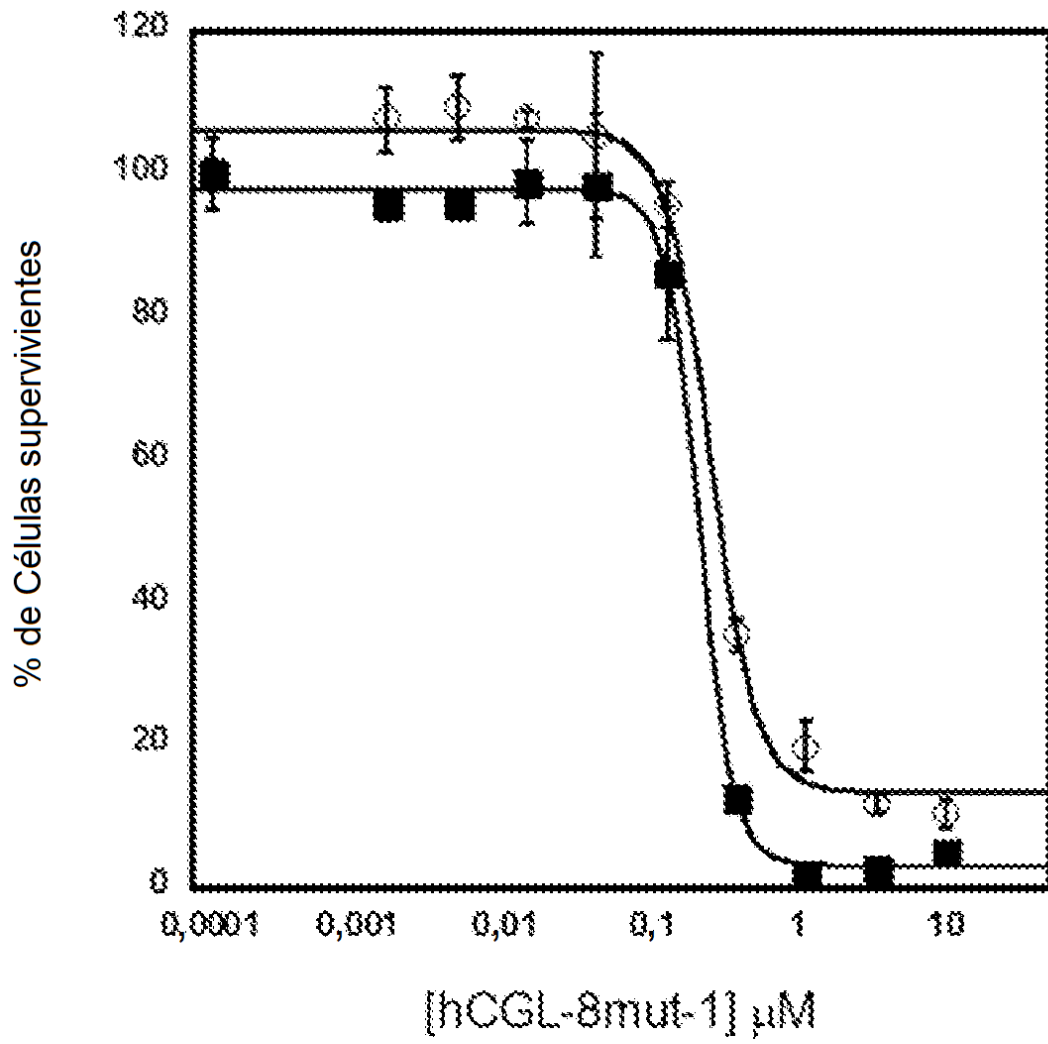


FIG. 2

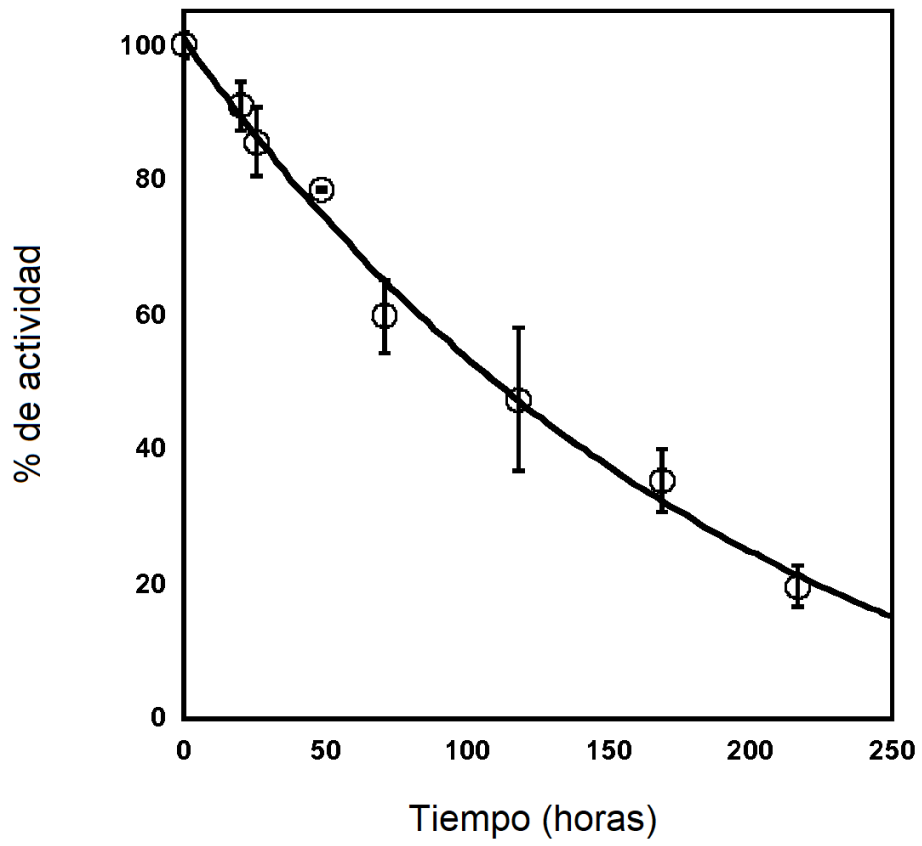


FIG. 3

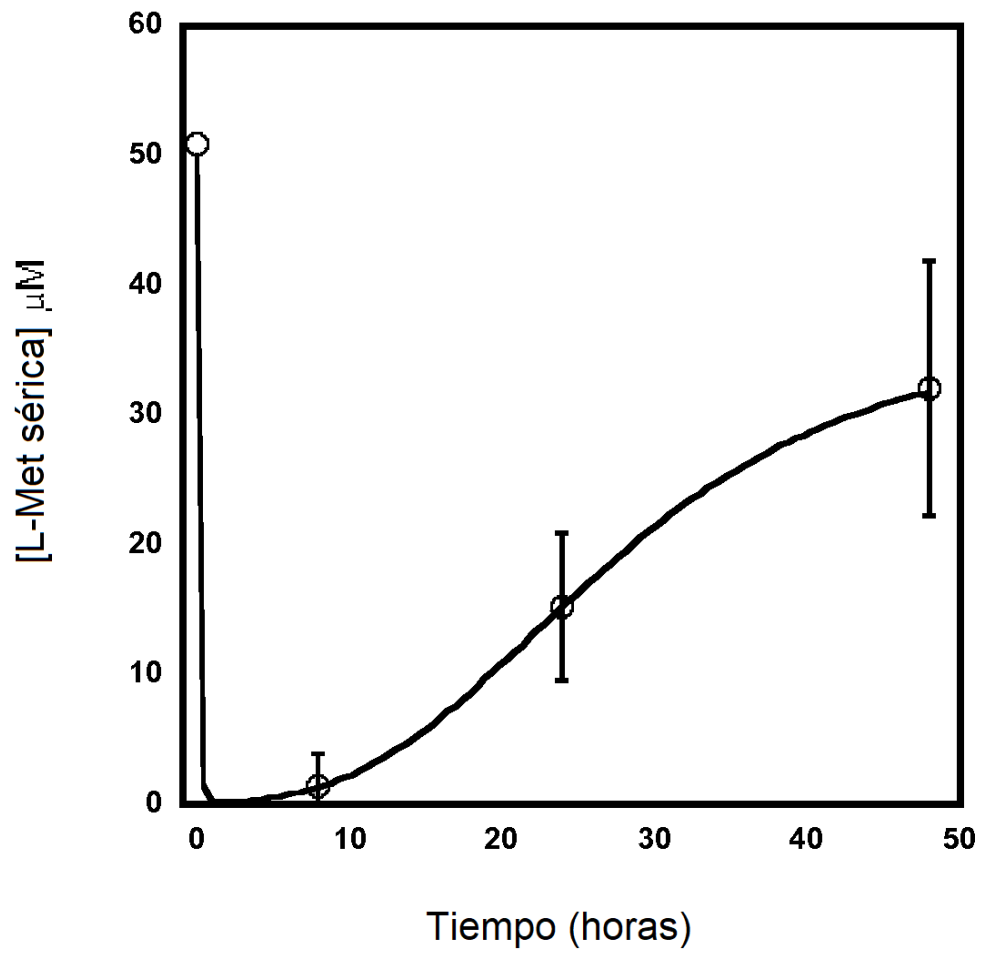


FIG. 4

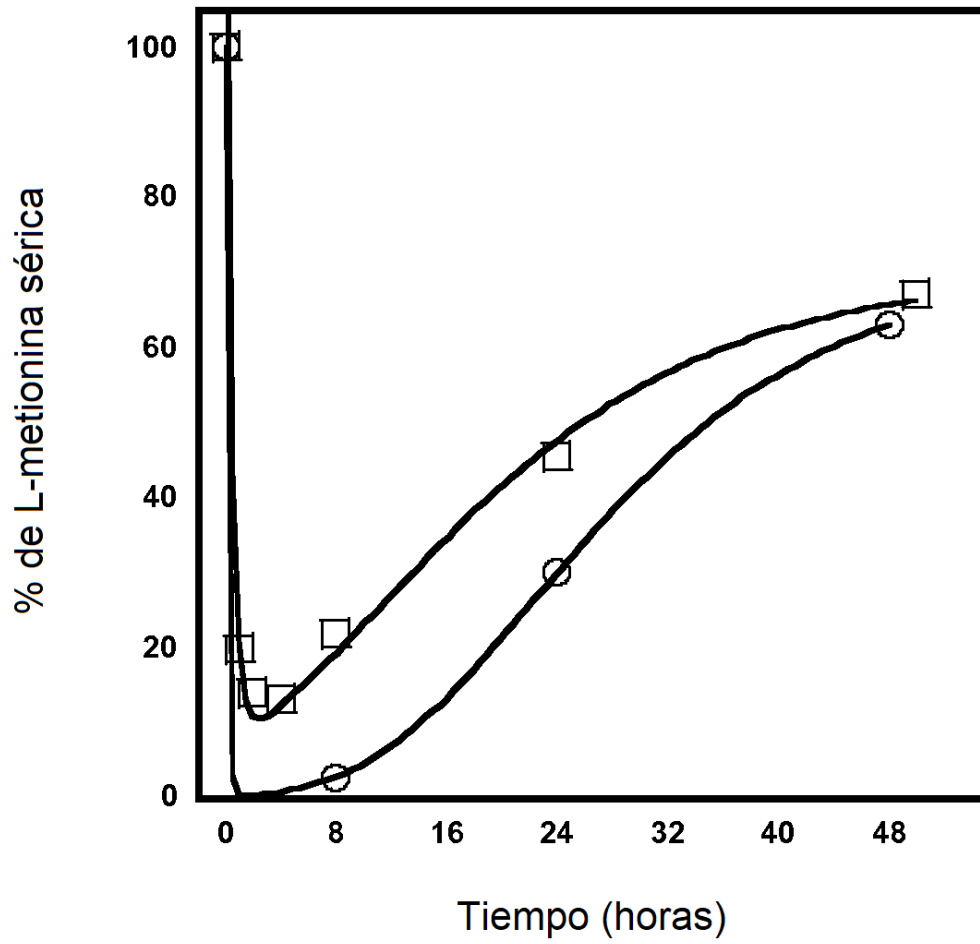


FIG. 5