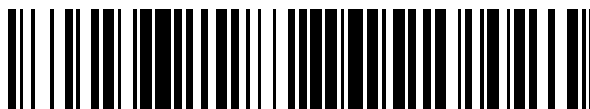


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 530**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 38/53 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2011** **PCT/US2011/022561**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012** **WO12141674**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2011** **E 11859017 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 2531224**

54 Título: **Composiciones y métodos relacionados con la argininosuccinato sintetasa**

30 Prioridad:

26.01.2010 US 298309 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.12.2019

73 Titular/es:

BIOREGENCY, INC. (100.0%)
12085 Research Drive, Box BR213
Alachua, FL 32615, US

72 Inventor/es:

PRIMA, VICTOR;
WANG, ALVIN;
MOLINA, GABRIEL;
WANG, KEVIN, KA-WANG y
SVETLOV, STANISLAV, I.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 735 530 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos relacionados con la argininosuccinato sintetasa

Esta solicitud reclama la prioridad de la Solicitud Provisional de EE.UU. No: 61/298,309 presentada el 26 de enero de 2010.

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere en general a composiciones y métodos para la detección y tratamiento de infecciones microbianas en un sujeto. En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a composiciones y métodos para la detección y tratamiento de la exposición a endotoxinas bacterianas en un sujeto.

Antecedentes de la invención

- 10 La infección por patógenos gramnegativos se asocia con patologías particularmente graves, como la sepsis y el choque endotóxico. A pesar de los avances en la comprensión de la fisiopatología del choque endotóxico y la sepsis, las terapias siguen siendo en gran medida sintomáticas y de apoyo.

- 15 La sepsis generalmente se caracteriza por un fallo multiorgánico que incluye riñón, hígado, corazón y cerebro debido a las toxinas bacterianas absorbidas por las heridas infectadas y que circulan en la sangre. Debido a la propagación de la resistencia frente a antimicrobianos convencionales en la última década, se necesitan nuevos agentes y nuevas composiciones y métodos para contrarrestar los problemas sépticos. Se requieren métodos y composiciones para la detección de la exposición a endotoxinas bacterianas en un sujeto para una intervención terapéutica a tiempo y apropiada.

- 20 Motonobu Satoh et al.: "Liver argininosuccinate synthase binds to bacterial lipopolysaccharides and lipid A and inactivates their biological activities", JOURNAL OF ENDOTOXIN RESEARCH, SAGE, UK, vol. 12, no. 1, 1 Enero 2006 (2006-01-01), páginas 21-38, describe un proceso para detectar la exposición a la endotoxina bacteriana de un sujeto, que comprende obtener una muestra de dicho sujeto expuesto a una endotoxina bacteriana antes de dicha obtención; y determinar la presencia, nivel o actividad de ASS en dicha muestra de dicho sujeto.

Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones.

- 25 Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. El siguiente sumario de la invención se proporciona para facilitar una comprensión de algunas de las características innovadoras únicas de la presente invención y no pretende ser una descripción completa. Se puede obtener una apreciación completa de los diversos aspectos de la invención tomando la memoria descriptiva completa, las reivindicaciones, los dibujos y el resumen como una totalidad.

Se proporcionan procesos para tratar la exposición de un sujeto a una endotoxina bacteriana que incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa a un sujeto que lo necesite.

- 35 Una argininosuccinato sintetasa como se usa en las invenciones se expresa opcionalmente de forma recombinante. En algunas realizaciones, la argininosuccinato sintetasa tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una variante de la misma, siendo opcionalmente una argininosuccinato sintetasa humana truncada. La argininosuccinato sintetasa truncada retiene opcionalmente un sitio de unión a LPS.

- 40 En algunas realizaciones, la argininosuccinato sintetasa está PEGilada. Una argininosuccinato sintetasa PEGilada se PEGila opcionalmente con un PEG que comprende PEG₁₂. La argininosuccinato sintetasa PEGilada se PEGila opcionalmente con un PEG no ramificado, un PEG ramificado o combinaciones de los mismos. Varias relaciones de argininosuccinate sintetasa a PEG son operables. En algunas realizaciones, la argininosuccinato sintetasa y PEG están presentes en una relación que varía de 1:1 a 1:400, respectivamente. La PEGilación de argininosuccinato sintetasa es opcionalmente aleatoria o dirigida al sitio. La PEGilación dirigida al sitio se dirige opcionalmente a argininosuccinato sintetasa lisinas, histidinas, cisteínas o combinaciones de las mismas. Opcionalmente, la PEGilación incluye al menos una molécula de PEG₁₂, opcionalmente exclusivamente PEG₁₂. Opcionalmente, las moléculas de PEG están asociadas con argininosuccinato sintetasa por un enlace amida covalente. Las moléculas de PEG unidas a argininosuccinato son opcionalmente lineales, ramificadas o una combinación de ellas.

Un sujeto en los procesos inventivos es opcionalmente un humano. En algunas realizaciones, un sujeto está infectado con una o más bacterias Gram-negativas de manera que la infección produce un sujeto que necesita terapia.

- 50 También se proporcionan procesos para detectar la exposición a la endotoxina bacteriana por un sujeto que incluyen obtener una muestra de un sujeto expuesto a una endotoxina bacteriana antes de obtener la muestra y determinar la presencia, nivel o actividad de argininosuccinato sintetasa en la muestra del sujeto. Una muestra es opcionalmente sangre o una fracción de sangre, opcionalmente suero.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra aumentos en la argininosuccinato sintetasa endógena en el suero de sujetos expuestos a LPS solo o junto con el agente de cebado de lesión hepática D-galactosamina;

5 **La Fig. 2** son ejemplos de rASS o rASS PEGilada ilustrados después de SDS-PAGE teñidas con azul de Coomassie o visualizadas por transferencia Western;

La Fig. 3 ilustra la inhibición del crecimiento de *E. coli* por rASS o rASS-PEGilada;

La Fig. 4 ilustra la atenuación de la toxicidad de LPS por rASS en cultivos de células macrófagas;

La Fig. 5 ilustra disminuciones en la citotoxicidad celular inducida por LPS mediante rASS, medidas por la reducción en la degradación de la α II-espectrina citoesquelética (A) o en un ensayo de reducción de MTS (B);

10 **La figura 6** ilustra la reducción en la citotoxicidad inducida por LPS de una manera dependiente de la dosis de rASS;

La Fig. 7 ilustra los efectos beneficiosos del tratamiento con rASS en la supervivencia del ratón (A) y la rata (B) después de la exposición a LPS;

La Fig. 8 ilustra la supresión de la liberación de TNF- α (A) y los niveles de proteína C reactiva (B) por rASS en endotoxemia de rata;

15 **La Fig. 9** ilustra la inhibición de la liberación de LDH en suero en sujetos mediante la administración simultánea o secuencial de rASS;

La Fig. 10 ilustra la actividad casi 3 veces mayor de la proteína rASS-PEGilada/mg vs. rASS no PEGilada;

La Fig. 11 ilustra que la rASS PEGilada es significativamente más estable y se mantiene en circulación durante mucho más tiempo después de la inyección i.p. en sujetos vs. rASS no PEGilada.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

La siguiente descripción de realización(ones) particulare(s) de la invención es de naturaleza meramente ejemplar.

Se proporcionan composiciones y métodos para la detección y el tratamiento de la exposición a endotoxina bacteriana en un sujeto. Como tal, la invención tiene utilidad para detectar la presencia de endotoxina en una muestra o un organismo y para el tratamiento de la infección por bacterias Gram-negativas.

25 Los términos "endotoxina bacteriana", "lipopolisacárido" y "LPS" se usan de manera intercambiable en este documento para referirse a este componente estructural bien conocido de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas que se menciona de forma intercambiable en la técnica.

La exposición de un sujeto a la endotoxina bacteriana ocurre con mayor frecuencia cuando el sujeto está infectado por bacterias Gramnegativas. Ejemplos ilustrativos de bacterias Gramnegativas incluyen ilustrativamente *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* y *Vibrio cholerae*.

30 Los métodos para tratar los efectos de la exposición a la endotoxina bacteriana se proporcionan de acuerdo con las realizaciones de la presente invención que incluyen administrar argininosuccinato sintetasa, o, alternativamente, conocida como argininosuccinato sintasa (ASS) a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de infección por bacterias que contienen endotoxina y/o exposición a material sospechoso de contener endotoxinas bacterianas.

35 Los términos "argininosuccinato sintetasa" y "ASS" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a la enzima argininosuccinato sintetasa, opcionalmente derivada de humano, identificada opcionalmente en este documento como SEQ ID NO: 1, o variantes de las mismas.

40 Además de la proteína argininosuccinato sintetasa de la SEQ ID NO: 1, el término argininosuccinato sintetasa abarca variantes de la SEQ ID NO: 1 que pueden incluirse en composiciones y métodos de la presente invención. Como se usa en este documento, el término "variante" se refiere a las variaciones genéticas naturales de la SEQ ID NO.1 y las variaciones preparadas de forma recombinante de la SEQ ID NO.1, cada una de las cuales contiene uno o más cambios en su secuencia de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO.1. Tales cambios incluyen aquellos en los que uno o más restos de aminoácidos han sido modificados por sustitución, adición o eliminación de aminoácidos.

45 El término "variante" abarca ortólogos de argininosuccinato sintetasa humana, que incluyen, por ejemplo, argininosuccinato sintetasa de mamíferos y aves, particularmente ortólogos de argininosuccinato sintetasa de primates no humanos, gatos, perros, vacas, caballos, roedores, cerdos, ovejas, cabras, peces y aves de corral.

Las variantes son argininosuccinato sintetas que tiene opcionalmente al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

Se pueden introducir mutaciones utilizando técnicas estándar de biología molecular, como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Un experto en la materia reconocerá que pueden introducirse una o más mutaciones de aminoácidos sin alterar las propiedades funcionales de la proteína argininosuccinato sintetasa de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos sin alterar las propiedades funcionales de la proteína argininosuccinato sintetasa de la SEQ ID NO: 1.

Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos conservativas en la proteína argininosuccinato sintetasa de la SEQ ID NO: 1 para producir variantes de proteína argininosuccinato sintetasa. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son sustituciones reconocidas en la técnica de un aminoácido por otro aminoácido que tiene características similares. Por ejemplo, cada aminoácido se puede describir como que tiene una o más de las siguientes características: electropositivo, electronegativo, alifático, aromático, polar, hidrófobo e hidrófilo. Una sustitución conservativa es una sustitución de un aminoácido que tiene una característica estructural o funcional especificada por otro aminoácido que tiene la misma característica. Los aminoácidos ácidos incluyen aspartato, glutamato; los aminoácidos básicos incluyen histidina, lisina, arginina; los aminoácidos alifáticos incluyen isoleucina, leucina y valina; los aminoácidos aromáticos incluyen fenilalanina, glicina, tirosina y triptófano; los aminoácidos polares incluyen aspartato, glutamato, histidina, lisina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina y tirosina; y los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, valina y triptófano; y las sustituciones conservativas incluyen la sustitución entre aminoácidos dentro de cada grupo. Los aminoácidos también pueden describirse en términos de tamaño relativo, alanina, cisteína, aspartato, glicina, asparagina, prolina, treonina, serina, valina, que todos típicamente se considera que son pequeños.

Las variantes de argininosuccinato sintetasa pueden incluir análogos de aminoácidos sintéticos, derivados de aminoácidos y/o aminoácidos no estándar, que incluyen ilustrativamente, sin limitación, ácido alfa-aminobutírico, citrulina, canavanina, cianoalanina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, dihidroxi-fenilalanina, ácido djenkólico, homoarginina, hidroxiprolina, norleucina, norvalina, 3-fosfoserina, homoserina, 5-hidroxitriptófano, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina y ornitina.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos). A continuación se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones superpuestas idénticas/número total de posiciones X 100%). En una realización, las dos secuencias son de la misma longitud.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, PNAS 87: 2264 2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, PNAS. 90: 5873 5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el conjunto de parámetros del programa de nucleótidos NBLAST, por ejemplo, para puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la presente invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el conjunto de parámetros del programa XBLAST, por ejemplo, para puntuar 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente invención. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389 3402. Alternativamente, se usa PSI BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI Blast, se utilizan los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (consulte, por ejemplo, el sitio web de NCBI). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4:11 17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se utiliza una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias se determina utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, típicamente solo se cuentan las coincidencias exactas.

La argininosuccinato sintetasa incluida en los métodos y composiciones de la presente invención se produce opcionalmente usando tecnología de ácido nucleico recombinante. La producción de argininosuccinato sintetasa incluye la introducción de un vector de expresión recombinante que abarca una secuencia de ADN que codifica la argininosuccinato sintetasa.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica argininosuccinato sintetasa introducida en una célula huésped para producir argininosuccinato sintetasa codifica la SEQ ID NO: 1. En realizaciones de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico identificada en este documento como SEQ ID NO: 2 codifica la SEQ ID NO: 1 y se incluye en un vector de expresión y se expresa para producir argininosuccinato sintetasa.

- 5 Se aprecia que debido a la naturaleza degenerada del código genético, las secuencias de ácido nucleico sustancialmente idénticas a SEQ ID NO: 2 codifican argininosuccinato sintetasa y variantes de argininosuccinato sintetasa, y que tales ácidos nucleicos alternativos pueden incluirse en un vector de expresión y expresarse para producir argininosuccinato sintetasa y variantes de argininosuccinato sintetasa.

- 10 Una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID N° 2 se caracteriza por tener una secuencia de ácido nucleico complementaria capaz de hibridar con la SEQ ID N° 2 en condiciones de hibridación de alta exigencia.

- 15 El término "ácido nucleico" se refiere a moléculas de ARN o ADN que tienen más de un nucleótido en cualquier forma, incluyendo oligonucleótido o polinucleótido monocatenario, de doble cadena. El término "secuencia de nucleótidos" se refiere al ordenamiento de los nucleótidos en un oligonucleótido o polinucleótido en una forma monocatenaria de ácido nucleico.

- 20 El término "complementario" se refiere al emparejamiento de bases de Watson-Crick entre nucleótidos y se refiere específicamente a nucleótidos unidos entre sí por enlaces de hidrógeno con restos de timina o uracilo unidos a restos de adenina por dos enlaces de hidrógeno y restos de citosina y guanina unidos por tres enlaces de hidrógeno. En general, un ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos descrita como que tiene un "porcentaje de complementariedad" con una segunda secuencia de nucleótidos específica. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos puede tener una complementariedad del 80%, 90% o 100% con una segunda secuencia de nucleótidos específica, lo que indica que 8 de 10, 9 de 10 o 10 de 10 nucleótidos de una secuencia son complementarios de la segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA-5' es 100% complementaria de la secuencia de nucleótidos 5'-AGCT-3'. Además, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA- es complementaria al 100% de una región de la secuencia de nucleótidos 5'-TTAGCTGG-3'.

- 30 Los términos "hibridación" e "hibrida" se refieren al emparejamiento y unión de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación ocurre en diferentes grados entre dos ácidos nucleicos, dependiendo de factores tales como el grado de complementariedad de los ácidos nucleicos, la temperatura de fusión, T_m , de los ácidos nucleicos y la exigencia de las condiciones de hibridación, como es bien conocido en la técnica. El término "exigencia de las condiciones de hibridación" se refiere a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y composición de un medio de hibridación con respecto a aditivos comunes particulares tales como formamida y disolución de Denhardt. La determinación de condiciones de hibridación particulares con relación a un ácido nucleico específico es rutinaria y es bien conocida en la técnica, por ejemplo, como se describe en J. Sambrook y DW Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª ed., 2001; y FM Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002. Las condiciones de hibridación de alta exigencia son aquellas que solo permiten la hibridación de ácidos nucleicos sustancialmente complementarios. Típicamente, los ácidos nucleicos que tienen una complementariedad de aproximadamente 85-100% se consideran altamente complementarios e hibridan en condiciones de alta exigencia. Las condiciones de exigencia intermedia se ejemplifican mediante condiciones en las que los ácidos nucleicos que tienen una complementariedad intermedia, aproximadamente un 50-84% de complementariedad, así como aquellos que tienen un alto grado de complementariedad, hibridan. En contraste, las condiciones de hibridación de baja exigencia son aquellas en las que hibridan los ácidos nucleicos que tienen un grado bajo de complementariedad.

- 45 Los términos "hibridación específica" e "hibrida específicamente" se refieren a la hibridación de un ácido nucleico particular a un ácido nucleico diana sin hibridación sustancial a ácidos nucleicos distintos del ácido nucleico diana en una muestra.

- 50 La exigencia de las condiciones de hibridación y lavado depende de varios factores, que incluyen la T_m de la sonda y la diana y la fuerza iónica de las condiciones de hibridación y lavado, como es bien sabido por los expertos en la materia. La hibridación y las condiciones para lograr una exigencia de hibridación deseada se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; y Ausubel, F. et al., (Eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, Wiley, 2002.

- 55 Un ejemplo de condiciones de hibridación de alta exigencia es la hibridación de ácidos nucleicos por encima de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud en una disolución que contiene 6X de SSC, disolución de Denhardt 5X, formamida al 30% y 100 microgramos/ml de esperma de salmón desnaturalizado a 37 °C durante la noche seguido lavado en una disolución 0,1X de SSC y SDS al 0,1% a 60 °C durante 15 minutos. SSC es NaCl 0,15 M/citrato de Na 0,015 M. La disolución de Denhardt es 0,02% de albúmina de suero bovino/0,02% de FI-COLL/0,02% de polivinilpirrolidona. En condiciones altamente exigentes, la SEQ ID N° 2 se hibridará con el complemento de dianas sustancialmente idénticas y no con secuencias no relacionadas.

El término "vector de expresión" se refiere a un vehículo recombinante para introducir un ácido nucleico que codifica

argininosuccinato sintetasa en una célula huésped donde el ácido nucleico se expresa para producir argininosuccinato sintetasa. En realizaciones particulares, un vector de expresión que incluye la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de ácido nucleico sustancialmente idéntica se expresa para producir argininosuccinato sintetasa en células que contienen el vector de expresión.

- 5 Además de uno o más ácidos nucleicos que codifican argininosuccinato sintetasa, pueden incluirse en un vector de expresión una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas adicionales. Por ejemplo, tales proteínas adicionales incluyen proteínas distintas de argininosuccinato sintetasa tales como informadores, que incluyen, pero no se limitan a, beta-galactosidasa, proteína fluorescente verde e informadores de resistencia a antibióticos.

- 10 Los vectores de expresión son conocidos en la técnica e incluyen plásmidos y virus, por ejemplo. Un vector de expresión contiene un ácido nucleico que incluye un segmento que codifica un polipéptido de interés unido operativamente a uno o más elementos reguladores que proporcionan la transcripción del segmento que codifica el polipéptido de interés. Tales elementos reguladores incluyen, pero no se limitan a, promotores, terminadores, potenciadores, orígenes de replicación y señales de poliadenilación.

- 15 En realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante codifica al menos argininosuccinato sintetasa de la SEQ ID NO: 1, una proteína que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, o una proteína codificada por una secuencia de ácido nucleico sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 2.

- 20 La expresión de argininosuccinato sintetasa usando un vector de expresión recombinante se logra mediante la introducción del vector de expresión en un sistema de expresión de célula huésped eucariótica o procariota, tal como una célula de insecto, célula de mamífero, célula de levadura, célula bacteriana o cualquier otro organismo único o multicelular reconocido en la técnica. Las células huésped son opcionalmente células primarias o células derivadas inmortalizadas. Las células inmortalizadas son aquellas que pueden mantenerse *in vitro* durante al menos 5 pasos de replicación.

- 25 Las células huésped que contienen el vector de expresión recombinante se mantienen bajo condiciones en las que se produce argininosuccinato sintetasa. Las células huésped se pueden cultivar y mantener utilizando técnicas conocidas de cultivo celular como las descritas en Celis, Julio, ed., 1994, Cell Biology Laboratory Handbook, Academic Press, NY. Las diversas condiciones de cultivo para estas células, que incluyen formulaciones del medio con respecto a nutrientes específicos, oxígeno, tensión, dióxido de carbono y niveles reducidos de suero, pueden ser seleccionadas y optimizadas por un experto en la materia.

- 30 La argininosuccinato sintetasa tiene opcionalmente una secuencia de aminoácidos idéntica a una argininosuccinato sintetasa encontrada en la naturaleza. Ilustrativamente, la argininosuccinato sintetasa tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Algunas realizaciones de la invención usan una variante de argininosuccinato sintetasa opcionalmente con una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia encontrada en la naturaleza. Las variantes de argininosuccinato sintetasa se crean opcionalmente por mutagénesis dirigida al sitio de una secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje que codifica argininosuccinato sintetasa. Ilustrativamente, la secuencia de SEQ ID NO: 2 se usa como una secuencia de ácido nucleico fuente para la mutagénesis dirigida.

- 35 En algunas realizaciones, se crea una variante de argininosuccinato sintetasa que mantiene el sitio de unión de LPS, pero se altera en otra parte de la molécula. Una variante es opcionalmente una forma truncada de argininosuccinato sintetasa. Una argininosuccinato sintetasa truncada retiene opcionalmente el sitio de unión de LPS de tipo salvaje, pero se trunca en otra parte de la molécula. Opcionalmente, una variante también, o independientemente, altera el sitio de unión de LPS para aumentar o disminuir la afinidad de argininosuccinato sintetasa para LPS. Los métodos de mutagénesis dirigida al sitio y la selección de afinidad entre moléculas son bien conocidos en la técnica.

- 40 La argininosuccinato sintetasa está opcionalmente PEGilada. Una proteína se PEGila cuando se une covalentemente o de otra manera a una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) ya sea directamente o a través de un enlazador. La unión covalente del polímero PEG inerte, no tóxico y biodegradable a las moléculas tiene aplicaciones importantes en biotecnología y medicina. La PEGilación de proteínas biológicamente y farmacéuticamente activas generalmente mejora la farmacocinética, lo que da como resultado una duración sostenida, mejora la seguridad (por ejemplo, menor toxicidad, inmunogenicidad y antigenicidad), aumenta la eficacia, disminuye la frecuencia de dosificación, mejora la solubilidad y estabilidad del fármaco, reduce la proteólisis y facilita la liberación controlada del fármaco (Roberts et al., 2002, Adv Drug Deliv Rev, 54: 459-76; Harris & Chess, 2003, Nat Rev Drug Discov, 2: 214-221). Cada uno de estos atributos positivos de la PEGilación de proteínas es atribuible a la alteración en la farmacocinética de la proteína. De hecho, se reconoce en la técnica que la PEGilación reduce la actividad biológica *in vitro*. Esta reducción de la actividad se supera *in vivo* con una vida terapéutica más larga. (Ver Jevsevar S, et al., Biotechnol. J., 2010; 5: 113-128.)

- 45 Los inventores descubrieron inesperadamente que la PEGilación de la argininosuccinato sintetasa no solo aumenta la estabilidad de la proteína, sino que también mejora la actividad enzimática de la argininosuccinato sintetasa. Como tales, algunas realizaciones de la invención incluyen la administración de una argininosuccinato sintetasa PEGilada que muestra una eficacia inesperadamente superior *in vivo* e *in vitro*.

- 50 La argininosuccinato sintetasa es opcionalmente homogénea o heterogéneamente PEGilada con moléculas de PEG que varían de 3 a 1000 unidades de PEG, opcionalmente de 3 a 100 unidades de PEG, opcionalmente de 3 a 50

unidades de PEG, o cualquier valor o sub-intervalo entre ellas. El peso molecular total de las moléculas de PEG unidas a argininosuccinato sintetasa es opcionalmente de 300 Daltons a 50000 Daltons o cualquier intervalo o subdivisión entre ellos.

Las moléculas de PEG utilizadas para PEGilar la argininosuccinato sintetasa son opcionalmente lineales, ramificadas o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, solo se usan moléculas de PEG lineales para PEGilar argininosuccinato sintetasa. En algunas realizaciones, solo se usan moléculas de PEG ramificadas para PEGilar la argininosuccinato sintetasa. Las relaciones relativas de moléculas de PEG no ramificadas a ramificadas son apreciadas por ser cualquier intervalo adecuado para mejorar la estabilidad de la argininosuccinato sintetasa PEGilada resultante. Ilustrativamente, la relación de PEG no ramificado a ramificado varía de 0,001: 1 a 1: 0,001, o cualquier valor o intervalo entre ellos.

La extensión de la PEGilación en cada molécula de argininosuccinato sintetasa individual varía opcionalmente. La relación de argininosuccinato sintetasa a PEG es opcionalmente cualquier lugar de 1:1 a 1:500, o cualquier valor o intervalo entre ellos. En algunas realizaciones, la relación de argininosuccinato sintetasa a PEG es de 1:1 a 1:100, opcionalmente 1:1 a 1:10, opcionalmente, 1:1 a 1:5. En algunas realizaciones, la proporción de argininosuccinato sintetasa a PEG es 1:10. Estos intervalos ilustran las relaciones molares, por lo que un mol de argininosuccinato sintetasa se une a cualquier lugar de 1 a 500 moles de especies de PEG.

Numerosas especies de PEG son operables a PEGilato de argininosuccinato sintetasa. Los ejemplos ilustrativos incluyen PEG-clorotriazina, PEG succinimidil succinato (SS-PEG), carbonato de succinimidilo PEG (SC-PEG), los PEG N-hidroxisuccinimida que incluyen PEG metil succinimidilo (MS-PEG) y PEG trimetil succinimidilo (TMS-PEG), así como otras moléculas de PEG conocidas en la técnica. Los ejemplos específicos de moléculas de PEG operables en este documento incluyen MS-PEG₁₂ y TMS-PEG₁₂.

La PEGilación de argininosuccinato sintetasa es ilustrativamente aleatoria o específica del sitio. La PEGilación aleatoria se logra ilustrativamente mediante un enlazador que interactúa con proteínas para formar un enlace amida o un enlace uretano. Los enlaces amida permiten una unión estable de PEG a restos de lisina, así como a la proteína N-terminal. Los enlaces de uretano son capaces de interactuar con restos de lisina e histidina. Un enlace uretano puede ser relativamente inestable en comparación con un enlace amida, pero puede tener la ventaja en la preparación de formulaciones de profármaco o de liberación controlada de argininosuccinato sintetasa PEGilada.

La PEGilación de argininosuccinato sintetasa es opcionalmente específica del sitio, lo que significa que la preparación de argininosuccinato sintetasa PEGilada típicamente tiene una uniformidad aumentada sobre la PEGilación aleatoria. La PEGilación es opcionalmente específica para el N-terminal u otra localización sobre la argininosuccinate sintetasa o una variante de la misma. Las técnicas para la PEGilación N-terminal y específica de cisteína son bien conocidas en la técnica. La PEGilación N-terminal se logra ilustrativamente con un reactivo de PEG-aldehído. La PEGilación de los grupos tiol se logra ilustrativamente usando reactivos específicos de tiol tales como maleimida, disulfuro de piridilo y vinil sulfona, entre otros conocidos en la técnica. Ejemplos ilustrativos de técnicas adecuadas para la PEGilación dirigida al sitio incluyen condiciones desnaturalizantes transitorias de Veronese, FM, et al., Bioconjug. Chem., 2007; 18: 1824-1830. Alternativamente, se pueden usar los métodos presentados en las solicitudes de patente de EE. UU. Números de publicación: 2010/0247508 o 2009/047500. En algunas realizaciones, se incorporan cisteínas libres (u otro aminoácido específico, o química de aminoácidos) en la secuencia de argininosuccinato sintetasa tal como por mutagénesis dirigida al sitio para crear sitios de PEGilación. Otro método opcional para la PEGilación dirigida al sitio es el de la PEGilación enzimática. La PEGilación enzimática de reactivos de PEG-alquilamina se describe ilustrativamente por Sato, H, Adv. Drugs Deliv. Rev., 2002; 54: 487-504.

La extensión de la PEGilación sobre la argininosuccinato sintetasa es opcionalmente homogénea o heterogénea en una disolución terapéuticamente efectiva de argininosuccinate sintetasa PEGilada. En algunas realizaciones, más o bien el PEG lineal o ramificado está presente en una muestra. Como tal una disolución de argininosuccinato sintetasa incluye opcionalmente moléculas de argininosuccinato sintetasa con tipo, extensión o masa de PEGilación uniforme o variable.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por signos y/o síntomas de exposición a endotoxinas bacterianas, que incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye argininosuccinato sintetasa a un sujeto que la necesite. En realizaciones particulares, una composición de acuerdo con la presente invención se administra a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno o que está en riesgo de padecer una enfermedad o trastorno caracterizado por la exposición del sujeto a una endotoxina bacteriana.

En términos generales, un método de acuerdo con realizaciones de la presente invención incluye la administración de argininosuccinato sintetasa a un organismo, una célula o tejido, *in vitro* o *in vivo*.

La administración de argininosuccinato sintetasa es seguida opcionalmente por un ensayo de los efectos de la argininosuccinato sintetasa en el organismo, célula o tejido objeto.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, pretende significar una cantidad de una composición inventiva que es eficaz para aliviar, mejorar o prevenir un síntoma o signo de una afección que se va

a tratar. En realizaciones particulares, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que tiene un efecto beneficioso en un sujeto que tiene signos y/o síntomas de exposición a la endotoxina bacteriana.

Así, por ejemplo, en realizaciones particulares, el tratamiento de un sujeto para prevenir o tratar los efectos de la exposición a la endotoxina bacteriana en el sujeto se caracteriza por la prevención o mejora de los efectos patógenos de la endotoxina bacteriana. La mejora de los signos y síntomas de sepsis y/o choque endotóxico se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica y descritas en este documento.

Los signos y síntomas de la exposición a la endotoxina bacteriana incluyen, entre otros, fiebre, latidos cardíacos rápidos, respiración rápida, presión arterial baja, reacción de Shwartzman local o generalizada e insuficiencia orgánica.

El término "sujeto" se refiere a cualquier individuo a quien se administra una composición de la presente invención. El término "sujeto" incluye mamíferos y aves, particularmente humanos, primates no humanos, gatos, perros, vacas, caballos, roedores, cerdos, ovejas, cabras y aves de corral. Un sujeto que lo necesita es un sujeto que sufre una forma de sepsis bacteriana. Un sujeto que lo necesita sufre o ha sufrido opcionalmente: una punción intravenosa; una estructura intraabdominal o pélvica perforada, comprometida o rota; bacteruria; u otra infección ilustrativa con la al menos una de las bacterias patógenas *Streptococcus pneumonia*, *Neisseria meningitides*, *Staphylococcus aureus*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumonia*, *Legionella* spp., *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., u otras bacterias gramnegativas patógenas conocidas en la técnica. Cuando la infección es por una bacteria que se encuentra normalmente en un sujeto, un sujeto que lo necesita es un sujeto que sufre una infección bacteriana en un compartimento diferente a aquel en el que normalmente se encuentra la bacteria. Como tal, el término "infectado con" significa la presencia de una bacteria gramnegativa en un compartimento biológico donde normalmente no se encuentra la bacteria.

La cantidad de una composición de la presente invención administrada a un sujeto y la vía de administración dependen de factores tales como la gravedad de una infección que afecta al sujeto, la actividad y la tasa de excreción de la argininosuccinato sintetasa y las características físicas generales del sujeto que incluyen edad, sexo y peso corporal. Un experto en la técnica podría determinar una cantidad terapéuticamente eficaz y una vía de administración a la vista de estas y otras consideraciones típicas en la práctica médica.

Las cantidades de argininosuccinato sintetasa usadas en un método para inhibir la endotoxina bacteriana serán determinadas por un experto en la técnica sin experimentación indebida.

En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa en una composición está en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg/kg - 100 mg/kg de peso corporal. En realizaciones particulares, una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa en una composición está en el intervalo de aproximadamente 0,01 - 10 mg/kg, y en realizaciones adicionales, una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa en una composición está en el intervalo de aproximadamente 0,1 - 5 mg/kg. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la presente invención puede fabricarse y/o administrarse en formas de dosis unitarias simples o múltiples.

En algunas realizaciones, un método de acuerdo con la presente invención incluye la administración a un sujeto de un agente terapéutico además de la argininosuccinato sintetasa. Un agente terapéutico puede ser cualquiera de diversos agentes adecuados para uso junto con la mejora de la infección por bacterias que contienen endotoxinas o la exposición a endotoxinas bacterianas. Por ejemplo, un agente terapéutico es un antibiótico en una realización de la presente invención. Los antibióticos incluyen, por ejemplo, aminoglucósidos, amoxicilina, anfencoles, ansamicinas, polipéptidos de antibióticos, betalactamas, carbapenemasas, cefalosporinas, cefamicinas, oxacefems, lincosamidas, macrolidas, monobactamas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas y tetraciclinas.

En realizaciones particulares, se proporciona una composición de acuerdo con la presente invención que incluye argininosuccinato sintetasa y un portador farmacéuticamente aceptable.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento se refiere a un portador o diluyente que generalmente no es tóxico para un receptor deseado y que no inhibe significativamente la actividad de la argininosuccinato sintetasa u otro agente activo incluido en la composición.

Una composición de acuerdo con la presente invención generalmente incluye aproximadamente 0,1-99% de argininosuccinato sintetasa.

La argininosuccinato sintetasa se incluye en una composición de la presente invención en forma de un ácido libre o una base libre en realizaciones particulares. En otras realizaciones, la argininosuccinato sintetasa se incluye en una composición en forma de una sal farmacéuticamente aceptable tal como una sal de adición a un ácido o base. Una sal farmacéuticamente aceptable se refiere a cualquier forma de sal de argininosuccinato sintetasa que generalmente no es tóxica para un receptor deseado y que no inhibe significativamente la actividad de la argininosuccinato sintetasa u otro agente activo incluido en la composición. La argininosuccinato sintetasa se incluye en una composición en forma de un hidrato en realizaciones de la presente invención.

Un profármaco de argininosuccinato sintetasa se incluye en una composición de acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención. Un profármaco de argininosuccinato sintetasa es una forma de argininosuccinato sintetasa unida covalentemente a un resto que se libera de la argininosuccinato sintetasa que produce la argininosuccinato sintética activa intacta. Las formas de profármacos son bien conocidas en la técnica como se ejemplifica en Sloan, KB, Prodrugs, M. Dekker, Nueva York, 1992; y Testa, B. y Mayer, JM, Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology, Wiley-VCH, Zürich, 2003.

Más de una forma de argininosuccinato sintetasa se incluye en una composición de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Así, por ejemplo, en realizaciones particulares, la argininosuccinato sintetasa humana y una o más variantes de argininosuccinato sintetasa humana están ambas incluidas en una composición.

La argininosuccinato sintetasa se administra a un sujeto como una proteína argininosuccinato sintetasa aislada de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. El término "proteína aislada de argininosuccinato sintetasa" indica que la proteína argininosuccinato sintetasa se ha separado de materiales biológicos, como células, restos celulares y otras proteínas, que pueden estar presentes en el sistema en el que se produjo la proteína argininosuccinato sintetasa. El término proteína «aislada» argininosuccinato sintetasa puede, pero no necesariamente, indicar que la proteína argininosuccinato sintetasa está purificada. La proteína de argininosuccinato sintetasa purificada incluida en los métodos y composiciones de la presente invención contiene al menos aproximadamente 1 - 100% de la masa, en peso, tal como aproximadamente 25%, 50%, 75%, 85%, 95%, 99% o mayor que aproximadamente 99% de la masa, en peso, de la proteína incluida.

En algunas realizaciones, un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica argininosuccinato sintetasa se administra a un sujeto para producir la proteína argininosuccinato sintetasa in vivo.

Una composición de acuerdo con la presente invención puede formularse en diversas formas. Una composición formulada para administración oral puede ser una formulación sólida, semisólida o líquida preparada de acuerdo con métodos conocidos en la técnica e incluyendo cualquiera de los diversos ingredientes farmacéuticos convencionales.

Se conocen numerosos sistemas de administración y se pueden usar para administrar argininosuccinato sintetasa a un sujeto, que incluye ilustrativamente liposomas y nanopartículas como nanoesferas, nanodendrimeros, nanocoloides, nanodots, nanocolumnas y combinaciones de estos. Se puede encontrar una descripción más detallada de los liposomas y los métodos relacionados con su preparación y uso en Liposomes: A Practical Approach (The Practical Approach Series, 264), V. P. Torchilin y V. Weissig (Eds.), Oxford University Press; 2ª ed., 2003. Otros aspectos de las nanopartículas se describen en S.M. Moghimi et al., FASEB J. 2005, 19, 311-30.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, la argininosuccinato sintetasa se mezcla con al menos un portador farmacéuticamente aceptable, tal como una carga o extensor, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; un aglutinante, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia; un humectante, como por ejemplo, glicerol; un agente disgregante, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidones vegetales tales como almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos y carbonato de sodio; un retardador de disolución, como por ejemplo, parafina; un acelerador de absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario; un agente humectante, como por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y glicoles; un adsorbente, como por ejemplo, caolín y bentonita; un agente tamponante, tal como citrato de sodio y fosfato dicálcico; y un lubricante, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos y laurilsulfato de sodio. Las mezclas de estos u otros portadores farmacéuticamente aceptables también pueden incluirse en realizaciones de una composición de la presente invención.

Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina blandas y rellenas que utilizan excipientes como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

Las formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. Pueden contener agentes opacificantes, y también pueden tener una composición tal que liberen el compuesto o compuestos activos en una cierta parte del tracto intestinal de manera retardada. Ejemplos de composiciones de embebido que pueden usarse son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

El recubrimiento entérico es típicamente un material polimérico. Los materiales de recubrimiento entérico preferidos tienen las características de ser polímeros bioerosionables, gradualmente hidrolizables y/o gradualmente solubles en agua. La cantidad de material de recubrimiento aplicado a una dosis sólida generalmente determina el intervalo de tiempo entre la ingestión y la liberación del fármaco. Se aplica un recubrimiento a un espesor tal que el recubrimiento completo no se disuelve en los fluidos gastrointestinales a un pH inferior a 3 asociado con los ácidos del estómago, pero se disuelve a un pH superior a 3 en el ambiente del intestino delgado. Se espera que cualquier polímero aniónico que presente un perfil de solubilidad dependiente del pH se use fácilmente como un recubrimiento entérico en la

práctica de la presente invención para lograr el suministro del activo al tracto gastrointestinal inferior. La selección del material de recubrimiento entérico específico depende de propiedades como la resistencia a la desintegración en el estómago; impermeabilidad a los fluidos gástricos y la difusión del agente activo en el estómago; capacidad de disiparse en el sitio del intestino objetivo; estabilidad física y química durante el almacenamiento; no toxicidad; y facilidad de aplicación.

Entre los materiales de recubrimiento entérico adecuados se incluyen polímeros celulósicos tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, trimelitato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio, polímeros y copolímeros de ácido acrílico, preferiblemente formados a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, metilacrilato de amonio, acrilato de etilo, metacrilato de metilo y/o etilo; polímeros y copolímeros de vinilo tales como polivinilpirrolidona, acetato de polivinilo, ftalato de acetato de polivinilo, copolímero de ácido crotonico-acetato de vinilo y copolímeros de etileno-acetato de vinilo; goma laca; y combinaciones de los mismos. Un material de recubrimiento entérico particular son aquellos polímeros y copolímeros de ácido acrílico disponibles con el nombre comercial EUDRAGIT, Roehm Pharma (Alemania). Los copolímeros EUDRAGIT serie L, L-30D S y los polímeros reticulados, véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos número 6,136,345, son adecuados en aplicaciones particulares ya que son insolubles en el estómago y se disuelven en el intestino.

El recubrimiento entérico contiene opcionalmente un agente plastificante para evitar la formación de poros y grietas que permiten la penetración de los fluidos gástricos en la dosificación sólida. Los agentes plastificantes adecuados incluyen ilustrativamente, citrato de trietilo (Citroflex 2), triacetina (triacetato de glicerilo), citrato de acetil trietilo (Citroflex A2), Carbowax 400 (polietilenglicol 400), ftalato de dietilo, citrato de tributilo, monoglicéridos acetilados, glicerol, ésteres de ácidos grasos, propilenglicol, y ftalato de dibutilo. En particular, un recubrimiento compuesto por un polímero acrílico carboxílico aniónico contiene típicamente aproximadamente de 10% al 25% en peso de un agente plastificante, particularmente ftalato de dibutilo, polietilenglicol, citrato de trietilo y triacetina. El recubrimiento también puede contener otros excipientes de recubrimiento tales como agentes antipegajosidad, agentes antiespumantes, lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio) y estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, ácidos y bases) para solubilizar o dispersar el material de recubrimiento, y para mejorar el rendimiento del recubrimiento y el producto revestido.

El recubrimiento entérico se aplica a una dosificación sólida utilizando métodos y equipos de recubrimiento convencionales. Por ejemplo, se puede aplicar un recubrimiento entérico a una dosificación sólida utilizando una bandeja de recubrimiento, una técnica de rociado sin aire, un equipo de recubrimiento en lecho fluidizado o similares. Se puede encontrar información detallada sobre los materiales, equipos y procesos para preparar formas de dosificación recubiertas en *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, eds. Lieberman et al. (Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1989), y en L.V. Allen, Jr. et al., *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8ª Ed. (Filadelfia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004).

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen un portador farmacéuticamente aceptable formulado como una emulsión, disolución, suspensión, jarabe o elixir en realizaciones particulares. Además de la argininosuccinato sintetasa, las formas de dosificación líquidas pueden contener uno o más portadores farmacéuticamente aceptables comúnmente utilizados en la técnica, como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicol y ésteres de ácido graso de sorbitán o mezclas de estas sustancias, y/u otros de tales ingredientes farmacéuticos convencionales.

Una composición formulada para administración oral también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Las suspensiones, además de la argininosuccinato sintetasa, pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitol, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar o tragacanto, o mezclas de estas sustancias y/u otros tales ingredientes farmacéuticos convencionales.

En realizaciones particulares, una composición que incluye argininosuccinato sintetasa de la presente invención se formula como una disolución, dispersión, suspensión, emulsión estéril acuosa o no acuosa, fisiológicamente aceptable o polvo estéril para reconstitución en una disolución o dispersión inyectable estéril. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen diluyentes, disolventes y vehículos tales como agua, etanol, polioles tales como propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares, y mezclas adecuadas de los mismos; aceites vegetales tales como aceite de oliva; y ésteres orgánicos inyectables tales como etiloleato. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos como el laurilsulfato de sodio.

Tales formulaciones se administran por una vía adecuada que incluye administración parenteral y oral. La

administración puede incluir inyección sistémica o local, tal como inyección intravenosa.

Una composición de la presente invención también puede contener uno o más adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispensadores. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. También puede ser deseable incluir un agente isotónico, ejemplificado por azúcares y cloruro de sodio. El suministro prolongado de una forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se puede encontrar información detallada sobre los materiales, equipos y procesos para preparar y fabricar diversas formas de dosificación en *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, eds. HA Lieberman et al., Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1989, y en L.V. Allen, Jr. et al., *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8ª Ed., Filadelfia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004. Otros ejemplos y detalles de formulaciones farmacológicas e ingredientes se encuentran en referencias estándar tales como: AA. R. Gennaro, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins, 20ª ed., 2003; L.V. Allen, Jr. et al., *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8ª Ed., Philadelphia, PA, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; y J. G. Hardman et al., Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Professional, 10ª ed., 2001.

Una composición que incluye argininosuccinato sintetasa puede administrarse por vía sistémica y/o por vía local. Las vías de administración adecuadas incluyen ilustrativamente intravenosa, oral, bucal, parenteral, intratecal, intracerebroventricular, intraperitoneal, ocular, intraocular, rectal, vaginal, subcutánea, intradérmica, intramuscular, tópica, intranasal, ótica y mucosal.

En realizaciones adicionales de los métodos de la invención, la presencia, los niveles y/o la actividad de la argininosuccinato sintetasa se evalúan en una muestra sospechosa de exposición a la endotoxina bacteriana. Es un descubrimiento de la presente invención que los niveles y la actividad de la argininosuccinato sintetasa tienen valores elevados sobre los niveles y actividades normales en muestras obtenidas de sujetos expuestos a endotoxinas bacterianas.

Los ensayos para los niveles y/o actividad de la argininosuccinato sintetasa se realizan opcionalmente en cualquier material que se sospecha que ha estado expuesto a endotoxinas bacterianas, como una muestra de un sujeto, células y/o tejidos o líneas celulares primarias cultivadas. Los ensayos para los niveles y/o la actividad de la argininosuccinato sintetasa se realizan opcionalmente utilizando cualquiera de los diversos métodos de ensayo que incluyen de manera ilustrativa el ensayo inmunoenzimático (ELISA), la citometría de flujo, la inmunotransferencia, la inmunoprecipitación, la inmunocitoquímica, el radioinmunoensayo, la RT-PCR, la hibridación de transferencia de northern, protección con RNAasa o una combinación de cualquiera de estos. Los métodos de ensayo pueden usarse para obtener resultados cualitativos y/o cuantitativos. Los detalles específicos de los métodos de ensayo adecuados para el ensayo tanto cualitativo como cuantitativo de una muestra se describen en referencias estándar, que incluyen de manera ilustrativa a E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; F. Breitling and S. Dübel, *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999; H. Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives*, Basics: From Background to Bench, BIOS Scientific Publishers, 2000; B.K.C. Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2003; F. M. Ausubel et al., Eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, Wiley, 2002; S. Klussman, Ed., *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*, Wiley, 2006; Ormerod, M. G., *Flow Cytometry: a practical approach*, Oxford University Press, 2000; Givan, A. L., *Flow Cytometry: first principles*, Wiley, New York, 2001; Gorczyca, W., *Flow Cytometry in Neoplastic Hematology: morphologic-immunophenotypic correlation*, Taylor & Francis, 2006; y J. Sambrook and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª Ed., 2001, o por métodos descritos en la presente memoria.

Una muestra de un sujeto es ilustrativamente una muestra de un tejido, células, un fluido corporal que puede incluir o no células, o una muestra obtenida del medio ambiente como suelo, agua u otra muestra ambiental. Los ejemplos ilustrativos de una muestra incluyen sangre, plasma, suero, saliva, moco, semen, lágrimas, linfa y orina. Como tal, la obtención de una muestra es mediante cualquier método conocido en la técnica para adquirir una muestra que incluye ilustrativamente la venopunción para obtener sangre completa por lo que el suero se logra ilustrativamente mediante la coagulación de la sangre y la eliminación de la fracción soluble, el plasma se obtiene por centrifugación de la sangre completa y la eliminación de la sección superior de plasma, u otras técnicas de recolección estándar.

Un método para tratar la exposición a la endotoxina bacteriana es aplicable a un sujeto humano así como a un sujeto no humano. En realizaciones particulares, un método para tratar la exposición a la endotoxina bacteriana incluye la administración de argininosuccinato sintetasa a un sujeto humano o no humano como primates no humanos, gatos, perros, vacas, caballos, roedores, cerdos, ovejas, cabras y aves de corral u otro mamífero no humano o ave.

Las realizaciones de composiciones y métodos de la invención se ilustran en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Reactivos

El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O111: B4 y *Salmonella enterica typhimurium* se adquieren de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Los kits ELISA de rata TNF- α y CRP se compran de eBioscience (San Diego, CA) y BioVendor (Modrice, Rep. Checa) respectivamente. Los anticuerpos contra la polihistidina, α II-espectrina y el núcleo de LPS (clon WN1 222-5) se compran en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Biomol Co. (Plymouth Meeting, PA) y HyCult Biotechnology (Uden, Países Bajos) respectivamente. Los anticuerpos contra ASS humano se producen en Banyan Biomarkers, Inc. mediante técnicas estándar.

Ejemplo 1: el tratamiento con LPS induce la acumulación en suero del biomarcador de ASS endógeno *in vivo*.

Ratas macho adultas Sprague-Dawley (200-225 g) y ratones Balb/c (19-22 g) (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN) se alojan a temperatura constante (22 °C) y humedad con ciclos de 12 horas de luz/ oscuridad con acceso a comida y agua a voluntad.

Los niveles de ASS endógeno en suero se determinan después del tratamiento con LPS en combinación con el agente de cebado de la lesión hepática D-galactosamina (D-Gal). El lipopolisacárido de *E. coli* (LPS, 10 μ g/kg) más D-galactosamina (D-Gal, 500 mg/kg), LPS solo (100 μ g/kg) o disolución salina se inyectan por vía intraperitoneal (i.p.) en ratas Sprague-Dawley. La sangre se extrae del corazón de los animales anestesiados 1 h, 2 h, 3 h, 24 h y 72 h después del tratamiento, utilizando al menos 3 ratas por cada punto de tiempo. Como se ve en la **Fig. 1**, el ASS es un marcador extremadamente sensible de la lesión hepática inducida por endotoxinas y aumenta significativamente en suero en la hora después de la inyección de endotoxina y D-galactosamina (**Fig. 1A**). La acumulación de ASS en sangre alcanza 1000 ng/ml en ratas que sobrevivieron 24 horas después del tratamiento. En ratas que se recuperan de la inyección, los niveles séricos de ASS disminuyen a las 72 horas hasta casi la línea de base, pero todavía están elevadas con respecto al control, ratas tratadas con disolución salina (**Fig. 1A**). Cuando se inyecta LPS a dosis 10 veces más altas sin D-Gal, los aumentos de ASS en suero mostraron un perfil similar pero los niveles son de una magnitud significativamente menor que en presencia de D-galactosamina (**Fig. 1B**).

Ejemplo 2: clonación de argininosuccinato sintetasa recombinante, expresión y purificación de proteínas

La región de codificación (restos 1-412) del gen de argininosuccinato sintetasa humana (GenBank n.º de acceso BC009243.2; nombre Swiss-Prot ASSY_HUMAN) se amplifica utilizando el clon original de Open Biosystems (Huntsville, AL) (Clon ID: 3010137) como una plantilla para la amplificación por PCR. Los cebadores son los siguientes: 32-mer directo (incluyendo ATG), 5'- ATGTCCAGCAAAGGCTCCGTGGTTCTGGCCTA-3'; 50-mer inverso (creado para contener un sitio HindIII y una fusión de cola de Histidinas C-terminal), 5'- TATAAAGCTTTCAATGGTGATGGTGATGATGTTTGGCAGTGACCTTGCTC-3'. Se realizan treinta ciclos de PCR de la siguiente manera: desnaturalización durante 1 min a 94 °C, recocido durante 1 min a 53 °C y elongación durante 2 min a 72 °C. Esto da como resultado la amplificación de un producto único del tamaño predicho para la fusión ASS1-6xHis humana (1254 pares de bases) que se purifica en gel y se liga directamente en el vector pETBlue-1 usando el kit Vector AccepTor (Novagen, Madison, WI). La secuencia correcta del cDNA se verifica mediante la secuenciación de Sanger.

Para la expresión inducible de cDNA de ASS1 bajo el control del promotor T7lac, la construcción se transforma en la cepa de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (Novagen). Después de la transformación mediante una técnica de choque térmico estándar y el crecimiento en cultivo líquido en caldo Luria Broth (LB) utilizando métodos estándar, se induce la expresión de argininosuccinato sintetasa humana recombinante (rASS) mediante la adición de isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG). Las condiciones de inducción (16 h a 18 °C en presencia de IPTG 0,5 mM) se optimizan para lograr el mayor rendimiento de rASS soluble. Después de la recolección, los pelets celulares se someten a congelación a -70 °C y se descongelan a 37 °C y se suspenden en tampón de lisis SoluLyse (GenLantis, San Diego, CA) suplementado con inhibidor de proteasa y ADNasa. La rASS se purifica mediante cromatografía de afinidad sobre columna HisPur Cobalt Spin (Pierce, Rockford, IL). El tampón de unión/lavado contiene fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM pH 7,4. El tampón de elución es idéntico, excepto que la concentración de imidazol se eleva a 150 mM. La proteína se concentra y el tampón se intercambia por disolución salina tamponada con fosfato (PBS) utilizando concentradores de tubo en U (Novagen). La disolución tampón final a pH 7,4 se suplementa con citrulina 1 mM y aspartato 1 mM para conservar la solubilidad de la proteína y la actividad catalítica.

La proteína purificada por afinidad es una proteína pura al -95% como lo indica la tinción con azul de Coomassie (**Fig. 2A**).

Se prepara rASS PEGilado utilizando MS-PEG₁₂ o TMS-PEG₁₂ de Pierce Biotechnology, Rockford, IL. Brevemente, se prepara una disolución de MS-PEG₁₂ o TMS-PEG₁₂ en dimetilformamida anhidra y se añade gota a gota a una disolución de proteína rASS en proporciones de 200:1 o 400:1, PEG a ASS, respectivamente. La mezcla de reacción se incuba a temperatura ambiente durante 0,5 h y la disolución de proteína se purifica en una columna Desalt Spin calibrada mediante centrifugación a 1.000 g durante 5 min. La pureza y la finalización de la reacción se evalúa utilizando SDS-PAGE. (**Fig. 2A, E**) La pureza inmunogénica de rASS se establece mediante transferencia de western con anticuerpo frente a 6xHis (**Fig. 2B, E**), así como anticuerpo policlonal (ASS1) generado en conejos frente a un péptido derivado de ASS (**Fig. 2C, E**).

Ejemplo 3: Cinética de crecimiento bacteriano

Una fuerte interacción física de ASS con LPS podría ser responsable de una deposición de rASS sintetizada *de novo* en cuerpos de inclusión en bacterias a 37 °C. El efecto inhibitorio de rASS o rASS PEGilada sobre el crecimiento bacteriano de *E. coli* o *B. subtilis* se evalúa como densidad óptica a 600 nm a diferentes concentraciones de rASS. Se dejan crecer *E. coli* (cepa K-12) que expresa LPS en la superficie celular o *B. subtilis* (control) en ausencia o presencia de rASS o rASS PEGilada (0,25 o 0,5 µg/ml) en una placa de 96 pocillos en medio LB (Luria-Bertani) (Novagen) con una densidad inicial de 0,06 unidades ópticas (a 600 nm). Después de cada hora hasta 6 horas, se mide la DO a 600 nm para determinar la velocidad de crecimiento bacteriano. **La Fig. 3** muestra que 3 a 6 horas después de la adición a los cultivos en suspensión, 50 µg/ml de rASS (**Fig. 3A**) o rASS PEGilado (**Fig. 3C**) suprimen significativamente el crecimiento de *E. coli*, lo que demuestra los efectos antibacterianos directos del suplemento de rASS. La rASS y la rASS PEGilada inhiben el crecimiento de forma similar. La rASS no muestra una reducción aparente en el crecimiento de *B. subtilis*. (**Fig. 3B**)

Ejemplo 4: Análisis de transferencia Western

Para los análisis de transferencia Western las muestras se homogeneizan en hielo en tampón de transferencia Western. Las muestras se someten a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se electrotransfieren sobre membranas de difluoruro de polivinilideno. Las membranas se bloquean en Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM y Tween-20 al 0,1% que contiene 5% de leche seca sin grasa durante 60 min a temperatura ambiente. Después de la incubación durante la noche con anticuerpos primarios, las proteínas se detectan utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sistema de detección por quimioluminiscencia, o un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (ALP) y un sistema de detección colorimétrico.

Ejemplo 5: Atenuación de la toxicidad de LPS por rASS en cultivos celulares de macrófagos

Los efectos beneficiosos de rASS frente a la toxicidad de LPS se examinan en células de mamíferos en cultivo utilizando la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio como indicador de toxicidad de LPS.

Los macrófagos RAW 264.7 de ratón se compran en American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivan en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y disolución antibiótico-antimicótica (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina B) en 5% de CO₂ a 37 °C. Los cultivos se traspasan cada 3 a 5 días, y las células se separan mediante un breve tratamiento con tripsina y se visualizan en un microscopio invertido.

Los macrófagos se tratan con LPS (0,1-1 µg/ml), rASS (1 y 10 µg/ml) y anticuerpos centrales anti-LPS (0,1 µg/ml). En diferentes momentos los medios acondicionados celulares de cada pocillo se guardan para el ensayo de liberación de LDH. Las células en los puntos temporales terminales (6 o 18 h) se lavan y se someten a ensayo MTS. Las células se lisan para análisis de transferencia Western de productos de degradación de la αII-espectrina.

A 1 mg/ml, el LPS tanto de *E. coli*, LPS(E) como de *S. enterica*, LPS(S) exhibe una notable citotoxicidad, como lo indica un fuerte aumento de los niveles de LDH en el medio a las 6 y 18 horas después del desafío con LPS (**Fig. 4 A y 4B**). La incubación previa de LPS con rASS (1 µg/ml) durante 1 hora antes de la adición reduce significativamente la liberación de LDH en dos tipos de LPS a 6 y 18 horas después del tratamiento (**Figs. 4A y 4B**). En contraste, la incubación previa de LPS con anticuerpo anti-LPS (0,1 µg/ml) disminuye la liberación de LDH inducida por LPS(S) a las 6 horas y no afecta a la toxicidad de LPS(E) ni a los efectos de LPS(S) 18 horas después de la adición. (**Figs. 4 A y 4B**). Por lo tanto, la lesión celular inducida por LPS por bien *E. coli* o *S. enterica* puede mitigarse por la presencia de rASS en medios de crecimiento incluso de manera más consistente que por los anticuerpos anti-LPS. La acción protectora de rASS es significativa en ambos puntos de tiempo estudiados (6 y 18 horas).

Ejemplo 6: Liberación de LDH y ensayos de función mitocondrial de MTS

El ensayo de citotoxicidad CytoTox 96® (Promega, Madison, WI) se usa para medir cuantitativamente la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) para evaluar el número relativo de células lisadas según las instrucciones del fabricante. El ensayo CellTiter 96 AQ (Promega) se utiliza para medir cuantitativamente la conversión de un compuesto de tetrazolio, MTS, en un producto de formazán por parte de las mitocondrias de las células vivas para evaluar la viabilidad celular relativa de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La citotoxicidad y la muerte celular en muchos tejidos implican la activación de la caspasa-3 y la calpaína-2, lo que da como resultado una escisión de varias proteínas comunes, como αII-espectrina de citoesqueleto principal. En las células RAW264.7, ambos tipos de LPS a 1 µg/ml inducen la degradación de la αII-espectrina y la generación de un fragmento de 150 kDa (SBDP150) en las 18 horas posteriores al tratamiento (**Fig. 5A**), mientras que el tratamiento previo con rASS (1 µg/ml) atenúa significativamente la formación de SBDP150 inducida por LPS. La liberación de LDH y la descomposición de la αII-espectrina en respuesta a LPS están acompañadas por una disminución en la viabilidad celular como indica la actividad de respiración mitocondrial de los macrófagos cultivados medida usando un ensayo de reducción de MTS. La incubación previa con rASS protege las células y aumenta la viabilidad celular a las 18 horas después del tratamiento con LPS (**Fig. 5B**). Por el contrario, el daño celular inducido por LPS evaluado mediante el ensayo MTS no se ve afectado por el anticuerpo anti-LPS (0,1 mg/ml) (**Fig. 5B**). El bloqueo completo de la disfunción mitocondrial causada tanto por el LPS(E) como por el LPS(S) se logra con una relación en masa rASS:LPS de

aproximadamente 1:1. Finalmente, la rASS es capaz de mitigar el daño celular inducido por endotoxinas cuando se agrega después del LPS. Como se muestra en la **Fig. 6**, la adición de rASS 1 hora después de LPS casi elimina la citotoxicidad inducida por LPS en una forma dependiente de la dosis de rASS en macrófagos de ratón.

Ejemplo 7: análisis ELISA

- 5 Ensayo ELISA ASS SW. Los niveles de ASS endógeno en suero se determinan mediante el ensayo ELISA SW (Banyan Biomarkers, Inc.) utilizando un anticuerpo ASS policlonal como anticuerpo de captura y monoclonal de ratón como anticuerpo de detección. El desarrollo del color se logra utilizando Abs conjugados con HRP anti-ratón seguido de incubación con sustrato TMB. Los niveles de ASS se calculan a partir de una curva de calibración utilizando rASS humana o rASS PEGilada preparadas como se indica anteriormente como un patrón de ASS.
- 10 Se realizó la detección cuantitativa de TNF- α y CRP en suero de sangre animal utilizando kits ELISA sándwich de eBioscience Inc. y BioVendor LLC, respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 8: Formación de complejos LPS y ASS

- 15 Las preparaciones de rASS se examinan para determinar la afinidad de unión a LPS mediante el ensayo de desplazamiento de gel o formación del complejo rASS-LPS. LPS purificados (*E. coli*), LPS (*S. Enterica*) y rASS solos o en combinación se incuban durante 1 hora a 37 °C, después se someten a electroforesis en gel no desnaturizante, se utilizan con Tris 192 mM, glicina 325 mM (pH 8,3) a 25 mA durante 2,5 horas utilizando geles de poliacrilamida (PAA) con gradiente del 4-20% (Invitrogen, Carlsbad, CA) en una bandeja rellena con una suspensión de hielo-agua. Los geles se utilizan previamente primero con el mismo tampón durante 15 min. La rASS se visualiza en el gel con Azul Coomassie como una sola banda, mientras que el LPS solo no se detecta (**Fig. 2D**). En contraste, esta
- 20 técnica revela los complejos rASS-LPS incubados previamente como parches heterogéneos con un desplazamiento de movilidad dramática en comparación con el rASS solo (**Fig. 2D**) y similar al LPS visualizado mediante tinción con plata.

Ejemplo 9: Efectos beneficiosos de rASS en modelos de roedores de choque endotóxico.

- 25 Se utiliza un modelo de endotoxemia experimental en ratones Balb/c para caracterizar la eficacia de rASS en la protección de un huésped inmunológicamente intacto frente a un ataque grave de LPS. Grupos de 6 ratones reciben inyecciones intra-peritoneales (i.p.) de disolución salina con bien 15 mg/kg de LPS de *E. coli* o 15 mg/kg de LPS de *S. enterica* seguido 1 h después de infusión con 5 mg/kg de rASS. La supervivencia se registra durante un período de 32 h. Como se muestra en la **Fig. 7A**, los ratones LPS tienen una mortalidad del 80% a las 24 h y todos mueren a las 30 h. En contraste, el 50% de los ratones expuestos a LPS y posteriormente tratados una vez con rASS con una relación de masa de 3:1 sobreviven a las 32 h (**Fig. 7A**).
- 30

Para los experimentos de supervivencia, las ratas Sprague-Dawley se dividen aleatoriamente en tres grupos (al menos 4 en cada grupo). El grupo 1 recibe una inyección i.p. de 5 mg/kg de rASS, el grupo 2 recibe 25 mg/kg de LPS de *E. coli* seguido en 1 h de infusión con 5 mg/kg de rASS y el grupo 3 recibe 25 mg/kg de LPS de *E. coli* solo. La supervivencia se registra durante un período de 72 h.

- 35 En el modelo de endotoxemia de rata, una inyección de bolo de LPS (25 mg/kg, i.p.) da como resultado una supervivencia de 72 h del 60% (**Fig. 7B**). En contraste, el 100% de las ratas sobreviven cuando se inyecta rASS 1 hora después del ensayo de LPS con una relación de masa rASS/LPS de 1:5 (**Fig. 7B**).

Ejemplo 10: Efectos de rASS sobre la liberación de marcadores relacionados con el choque endotóxico

- 40 Para evaluar la inflamación sistémica inducida por endotoxinas y la lesión orgánica se evalúan varios marcadores séricos comunes. Para estos estudios de liberación de biomarcadores, a las ratas se administra i.p. LPS de *E. coli* (25 mg/kg o 5 mg/kg) solo o LPS incubado previamente (1 h, 37 °C) con rASS (5 mg/kg), o LPS Seguido en 1 h de infusión con rASS. Los niveles de TNF- α , LDH y CRP se evalúan en sueros preparados a partir de muestras de sangre de rata 3 h (detección de TNF- α) o 72 h (detección de LDH y CRP) después de la inyección de LPS.

Ejemplo 11: Supresión de los niveles de liberación de TNF- α y proteína C reactiva (CRP) por rASS en endotoxemia de rata

- 45 Para determinar si la actividad protectora de ASS está asociada con la atenuación de citoquinas proinflamatorias *in vivo*, medimos el nivel de TNF- α en suero en ratas endotoxémicas expuestas como en el Ejemplo 10. Como se muestra en la **Fig. 8A**, el LPS inyectado a 25 mg/kg induce un aumento de TNF- α en el suero hasta aproximadamente 125 pg/ml 3 horas después de la inyección, mientras que la administración de 5 mg/kg de rASS una hora después del
- 50 LPS disminuye la producción de TNF- α en un 40% (**Fig. 8A**). Además, los aumentos de menor magnitud de TNF- α inducidos por el tratamiento i.p. con 5 mg/kg de LPS se anulan mediante una inyección posterior de 5 mg/kg de rASS (**Fig. 8A**).

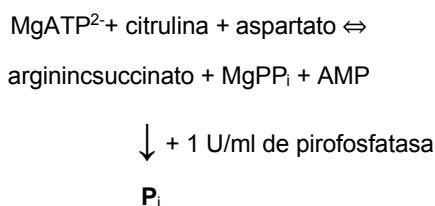
El aumento concomitante de los niveles de CRP en suero se anula mediante rASS inyectada 1 h después de la exposición sub-letal de 25 mg/kg de LPS, volviendo así el CRP a los niveles de control (**Fig. 8B**).

Ejemplo 12: Inhibición de la liberación de LDH en suero en ratas con endotoxemia

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica presente en muchos tejidos corporales, incluido el hígado. Por lo tanto, los niveles séricos elevados de LDH indican una pérdida de LDH en los tejidos, potencialmente debido a un daño multiorgánico provocado por diversas lesiones. La Fig. 9 muestra que el LPS administrado a ratas a la dosis sub-lethal de 25 mg/kg induce un aumento de casi 7 veces más de LDH en suero en comparación con el control. Sin embargo, cuando la exposición a LPS está acompañada o seguida de una inyección i.p. de 5 mg/kg de rASS, la liberación de LDH se reduce en un 45% y un 49%. (Fig. 9)

Ejemplo 13: La PEGilación de ASS aumenta la actividad enzimática de rASS

La rASS se usa sola o está PEGilada como se describe en el Ejemplo 2. Se desarrolla un ensayo de actividad enzimática de rASS y rASS PEGilada de acuerdo con el principio de reacción enzimática catalizada por ASS seguido de la determinación del fosfato inorgánico producido por la pirofosfatasa (Esquema 1).

**Ensayo de Malaquita Verde (I)**

Brevemente, se añaden 5 ml de la muestra a 45 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) que contiene de MgCl₂ 6 mM, KCl 20 mM, ATP 1 mM, y 1 U/ml de pirofosfatasa más o menos sustratos de ácido aspártico 1 mM y citrulina 12,5 mM de en una placa de microtitulación de 96 pocillos. El fosfato inorgánico (P_i) generado en la reacción se determina utilizando el kit de ensayo de verde de malaquita utilizando las instrucciones del fabricante (RND Systems, Minneapolis, MN).

La Fig. 10 ilustra una actividad enzimática *in vitro* incrementada en más de 2,5 veces de rASS PEGilado con relación a rASS solo (p < 0,01) que indica inesperadamente que la PEGilación mejora la actividad enzimática *in vitro* de rASS.

Ejemplo 14: La pegilación de ASS aumenta la estabilidad *in vivo* de rASS.

La estabilidad de rASS PEGilada se estudia y compara con la de rASS sola. 5mg/kg de rASS y rASS PEGilada se inyectan por vía intraperitoneal (i.p.) en ratas Sprague-Dawley macho adultas (200-225 g) (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN) alojadas a temperatura (22 °C) y humedad constante durante ciclos de 12 horas luz/oscuridad con acceso a comida y agua a voluntad. La sangre se extrae del corazón de los animales anestesiados 3 h y 20 h después de la inyección, utilizando al menos 3 ratas por cada punto en el tiempo. El nivel de rASS o rASS PEGilada se determina mediante SW-ELISA como se describe en el Ejemplo 7.

Como se ilustra en la Fig. 11, la PEG-rASS es significativamente más estable y se mantiene en circulación durante mucho más tiempo después de la inyección i.p. en comparación con la rASS no PEGilada. Estos resultados, combinados con el aumento de la actividad enzimática de rASS PEGilada, indicaron que la PEGilación produce una molécula rASS más robusta con una capacidad general inesperadamente mayor para unirse y eliminar el LPS de un sujeto patógeno infectado con bacterias Gram-negativas.

Estadísticas

Los análisis estadísticos se realizan utilizando el software GraphPad Prism 5. Los datos se evalúan mediante un ensayo t no pareado de 2 colas. El criterio de significación estadística se establece en p < 0,05 o p < 0,01.

Secuencias

SEQ ID No. 1: proteína (412 aa) de argininosuccinato sintetasa 1 de Homo sapiens (ASS):

MSSKGSVVLAYSGGLDTSCILVWLKEQGYDVIA YLANIGQKEDFEEARKKALKLGAKK
VFIEDVSREFVEEFIWPAIQSSALYEDRYLLGTSLARPCIAKQVEIAQREGAKYVSHGAT
GKGNDQVRFELSCYSLAPQIKVIAPWRMPEFYNRFKGRNDLMEYAKQHGIPIVTPKNP
WSMDENLMHISYEAGILENPKNQAPPGLYTKTQDPAKAPNTPDILEIEFKKGVPVKVTN
VKDGTTHQTSLELFMYLNEVAGKHGVGRIDIVENRFIGMKSRGIYETPAGTILYHAHLDI
EAFMDREVRRKIKQGLGLKFAELVYTGFWHSPECFVRHCAKSQERVEGKVQVSVLK
GQVYILGRESPLSLYNEELVSMNVQGDYEPTDATGFININSLRLKEYHRLQSKVTAK

SEQ ID No. 2: cADN (1239 nt) de argininosuccinato sintetasa 1 (ASS) de Homo sapiens:

ATGTCCAGCAAAGGCTCCGTGGTTCTGGCCTACAGTGGCGGCCTGGACACCTCGTG
 ATCCTCGTGTGGCTGAAGGAACAAGGCTATGACGTCATTGCCTATCTGGCCAACATT
 GGCCAGAAGGAAGACTTCGAGGAAGCCAGGAAGAAGGCACTGAAGCTTGGGGCCA
 AAAAGGTGTTTCATTGAGGATGTCAGCAGGGAGTTTGTGGAGGAGTTCATCTGGCCG
 GCCATCCAGTCCAGCGCACTGTATGAGGACCGCTACCTCCTGGGCACCTCTCTTGCC
 AGGCCCTGCATCGCCCGCAAACAAGTGGAAATCGCCCAGCGGGAGGGGGCCAAGTA
 TGTGTCCACGGCGCCACAGGAAAGGGGAACGATCAGGTCCGGTTTGAGCTCAGCT
 GCTACTCACTGGCCCCCAGATAAAGGTCATTGCTCCCTGGAGGATGCCTGAATTCT
 ACAACCGGTTCAAGGGCCGCAATGACCTGATGGAGTACGCAAAGCAACACGGGATT
 CCCATCCCGGTCACTCCCAAGAACCCGTGGAGCATGGATGAGAACCTCATGCACAT
 CAGCTACGAGGCTGGAATCCTGGAGAACCCCAAGAACCAAGCGCCTCCAGGTCTCT
 ACACGAAGACCCAGGACCCAGCCAAAGCCCCCAACACCCCTGACATTCTCGAGATC
 GAGTTCAAAAAAGGGGTCCCTGTGAAGGTGACCAACGTCAAGGATGGCACCACCCA
 CCAGACCTCCTTGGAGCTCTTCATGTACCTGAACGAAGTCGCGGGCAAGCATGGCGT
 GGGCCGTATTGACATCGTGGAGAACCGCTTCATTGGAATGAAGTCCCGAGGTATCTA
 ATGTCCAGCAAAGGCTCCGTGGTTCTGGCCTACAGTGGCGGCCTGGACACCTCGTG
 ATCCTCGTGTGGCTGAAGGAACAAGGCTATGACGTCATTGCCTATCTGGCCAACATT
 GGCCAGAAGGAAGACTTCGAGGAAGCCAGGAAGAAGGCACTGAAGCTTGGGGCCA
 AAAAGGTGTTTCATTGAGGATGTCAGCAGGGAGTTTGTGGAGGAGTTCATCTGGCCG
 GCCATCCAGTCCAGCGCACTGTATGAGGACCGCTACCTCCTGGGCACCTCTCTTGCC
 AGGCCCTGCATCGCCCGCAAACAAGTGGAAATCGCCCAGCGGGAGGGGGCCAAGTA
 TGTGTCCACGGCGCCACAGGAAAGGGGAACGATCAGGTCCGGTTTGAGCTCAGCT
 GCTACTCACTGGCCCCCAGATAAAGGTCATTGCTCCCTGGAGGATGCCTGAATTCT
 ACAACCGGTTCAAGGGCCGCAATGACCTGATGGAGTACGCAAAGCAACACGGGATT
 CCCATCCCGGTCACTCCCAAGAACCCGTGGAGCATGGATGAGAACCTCATGCACAT
 CAGCTACGAGGCTGGAATCCTGGAGAACCCCAAGAACCAAGCGCCTCCAGGTCTCT
 ACACGAAGACCCAGGACCCAGCCAAAGCCCCCAACACCCCTGACATTCTCGAGATC
 GAGTTCAAAAAAGGGGTCCCTGTGAAGGTGACCAACGTCAAGGATGGCACCACCCA
 CCAGACCTCCTTGGAGCTCTTCATGTACCTGAACGAAGTCGCGGGCAAGCATGGCGT
 GGGCCGTATTGACATCGTGGAGAACCGCTTCATTGGAATGAAGTCCCGAGGTATCTA

Se aprecia que todos los reactivos pueden obtenerse mediante fuentes conocidas en la técnica, a menos que se especifique lo contrario. Los métodos de amplificación de nucleótidos, transfección celular y expresión y purificación de proteínas están dentro del nivel del experto en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa para uso en un método para tratar la exposición de un sujeto a una endotoxina bacteriana.
- 5 2. Una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha argininosuccinato sintetasa se expresa de forma recombinante.
3. Una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha argininosuccinato sintetasa está PEGilada.
- 10 4. Una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha argininosuccinato sintetasa está PEGilada con un PEG que comprende PEG₁₂ o en la que dicha argininosuccinato sintetasa se PEGila con un PEG no ramificado, un PEG ramificado, o combinaciones de los mismos.
- 5 6. Una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha argininosuccinato sintetasa y dicho PEG están presentes en una relación que varía de 1:1 a 1:400.
- 15 7. Una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en donde dicho sujeto está infectado con una bacteria patógena Gram-negativa.
8. Una cantidad terapéuticamente eficaz de argininosuccinato sintetasa para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3, en donde la argininosuccinato sintetasa tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una variante de la misma.
- 20 8. Una preparación de proteína aislada que comprende:
una proteína de argininosuccinato sintetasa PEGilada.
9. La preparación según la reivindicación 8, en donde dicha argininosuccinato sintetasa está PEGilada aleatoriamente o PEGilada dirigida al sitio.
10. La preparación según la reivindicación 9, en donde dicha argininosuccinato sintetasa se PEGila dirigida al sitio en una o más cisteínas, lisinas, histidinas o combinaciones de las mismas.
- 25 11. La preparación de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde dicha PEGilación comprende PEG₁₂ covalentemente asociada con dicha argininosuccinato sintetasa por un enlace amida.
12. La preparación según la reivindicación 11, en donde dicho PEG₁₂ es un componente de un PEG ramificado.
13. La preparación de cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde dicha PEGilación comprende PEG ramificado.
- 30 14. La preparación de cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en donde dicha proteína argininosuccinato sintetasa tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma.
15. La preparación de cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en donde dicha proteína argininosuccinato sintetasa tiene una secuencia de aminoácidos de un truncamiento de la SEQ ID NO: 1 que retiene el sitio de unión de LPS.

Figura 1

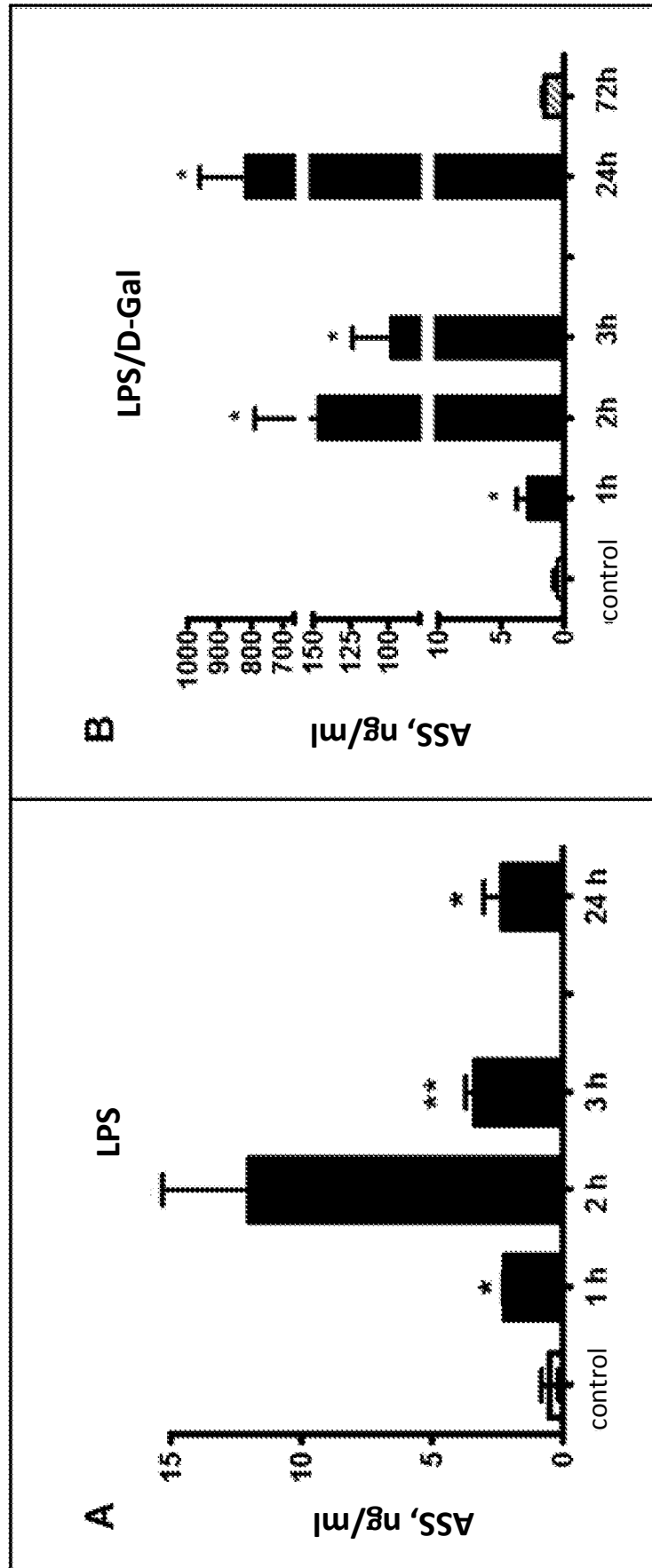
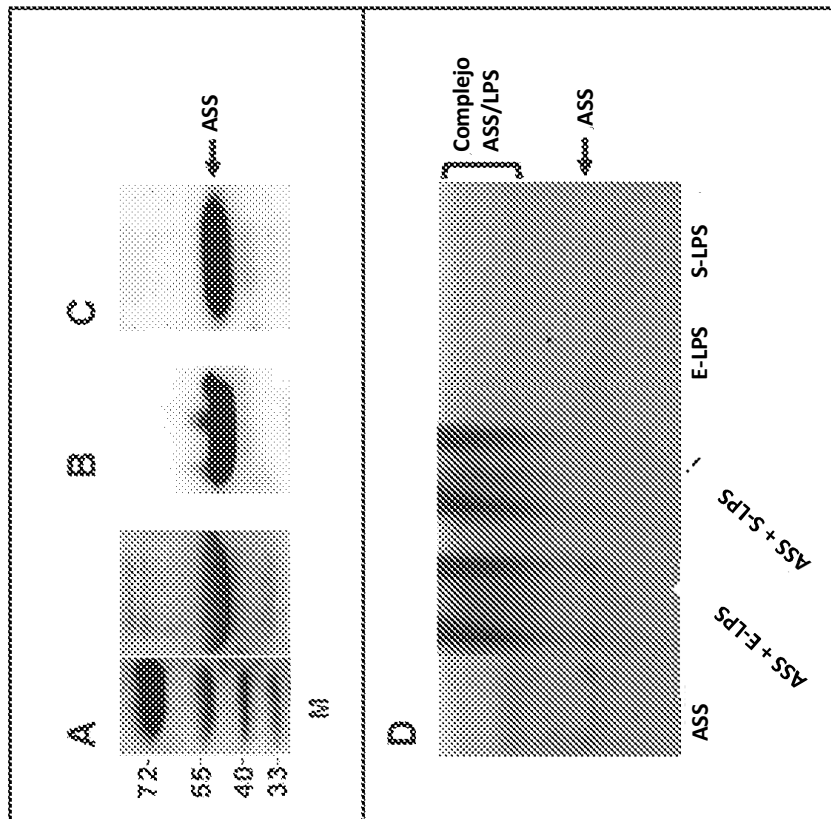


Figura 2



E

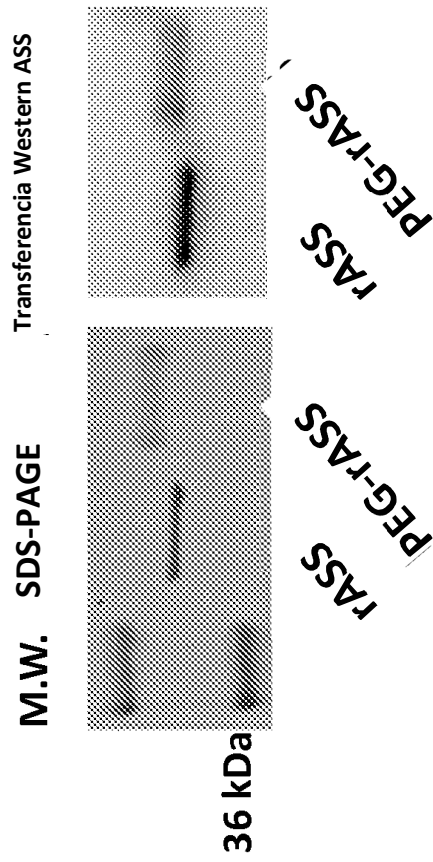


Figura 3

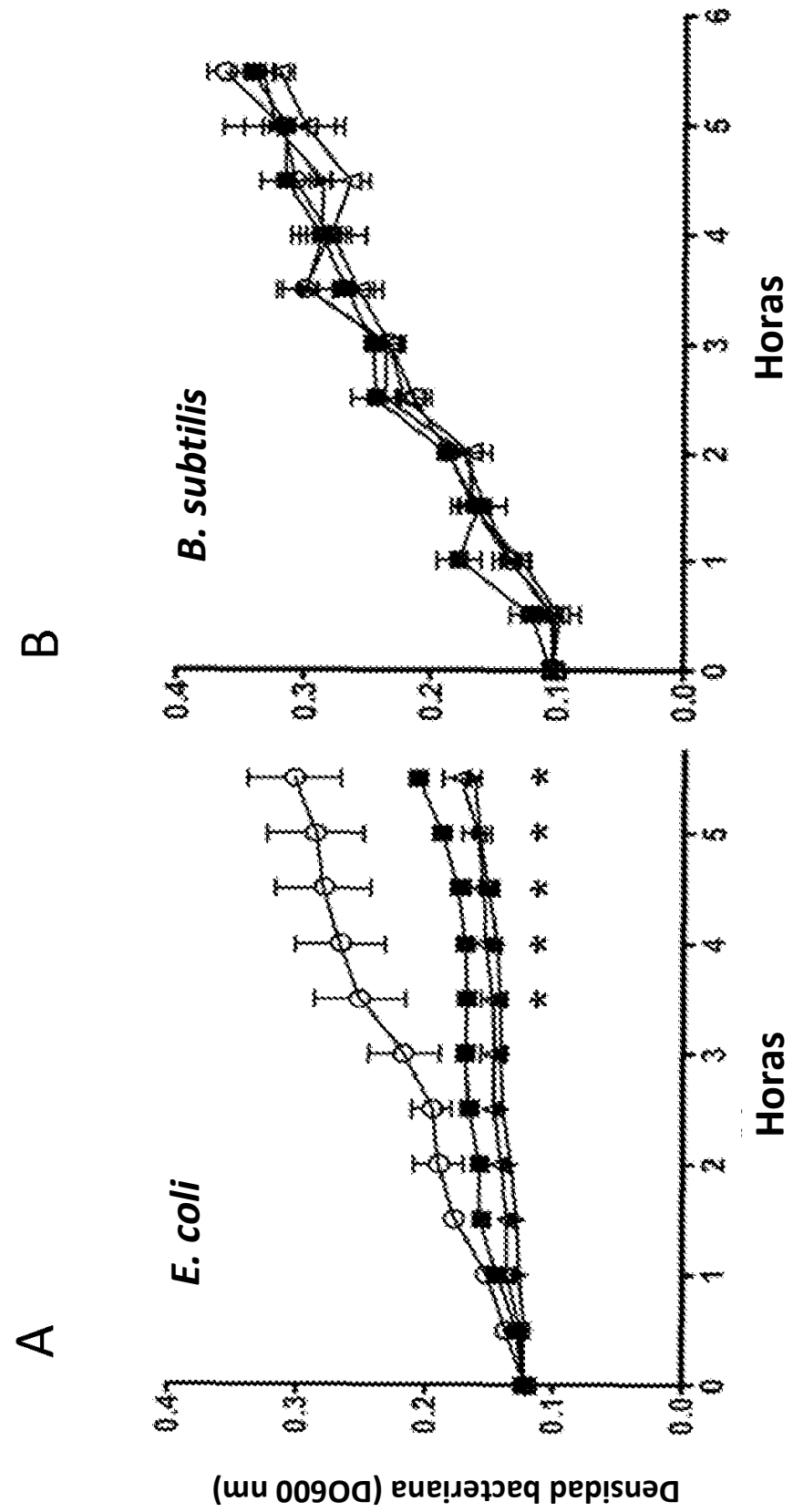


Figura 3C

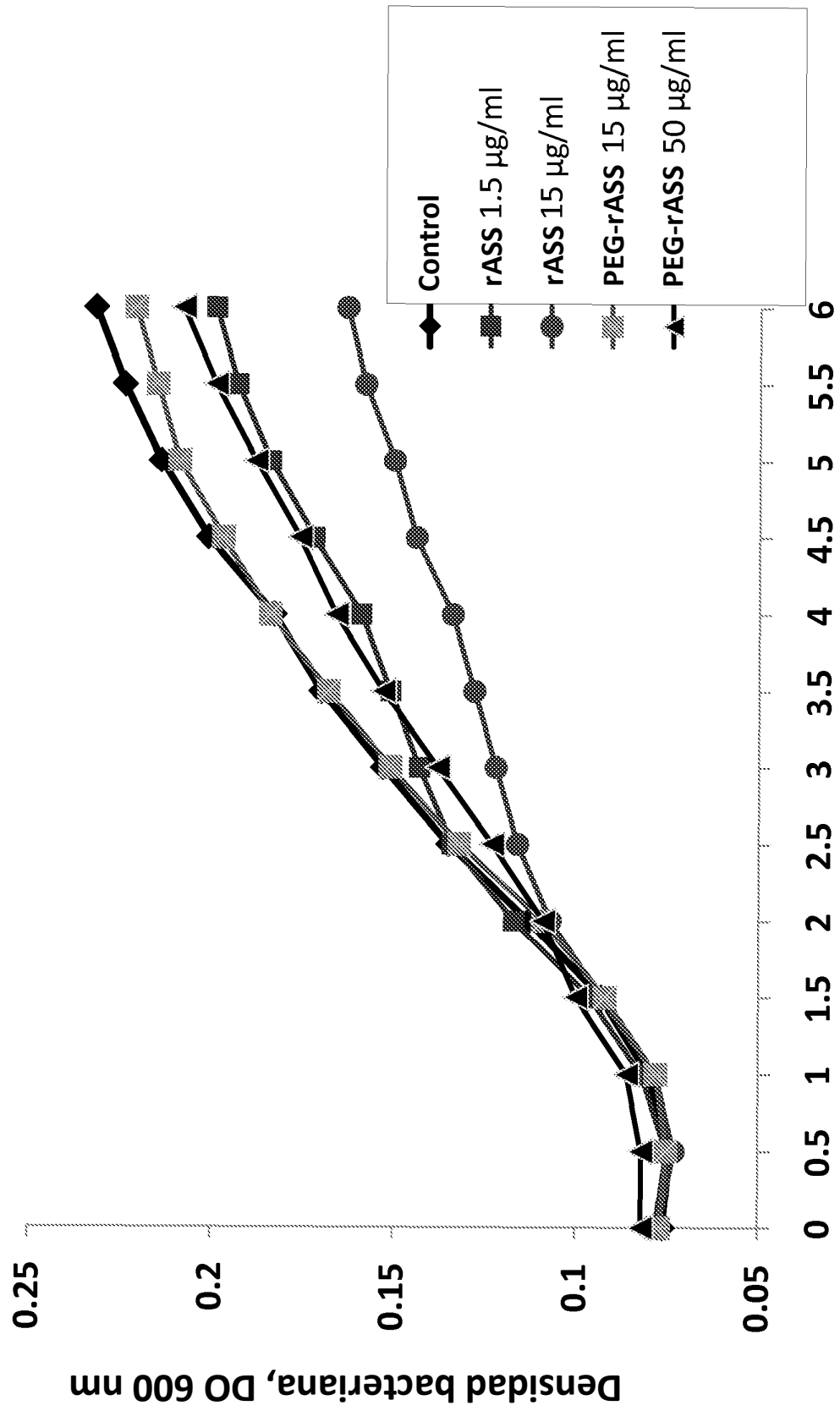


Figura 4

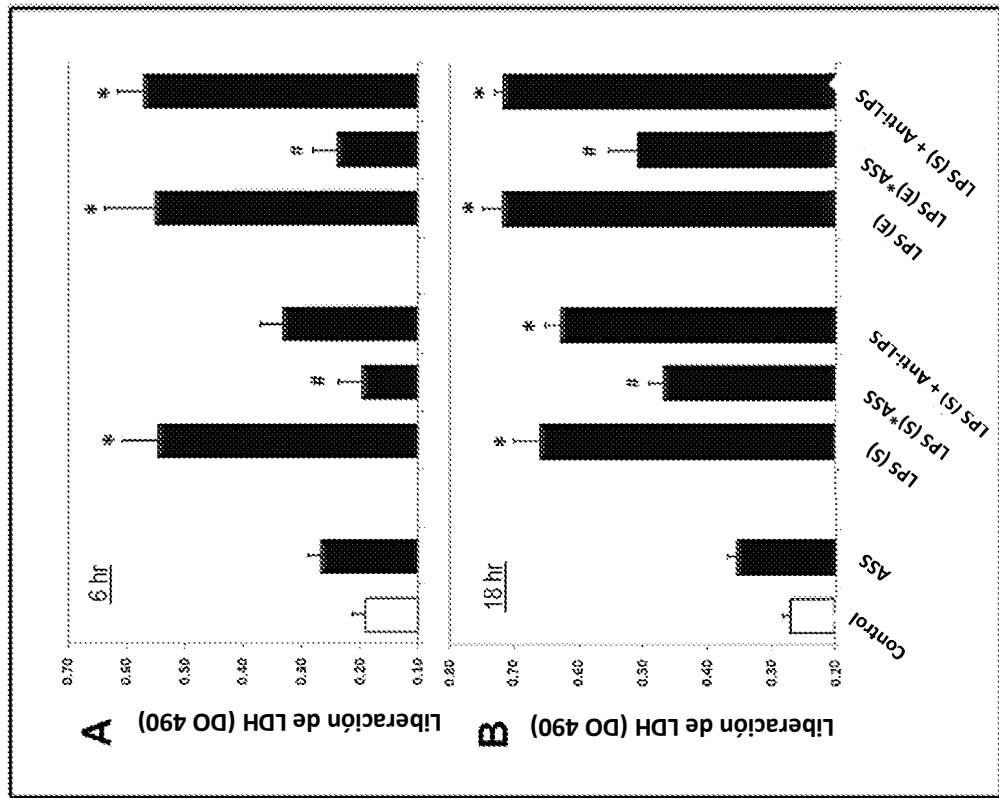


Figura 5

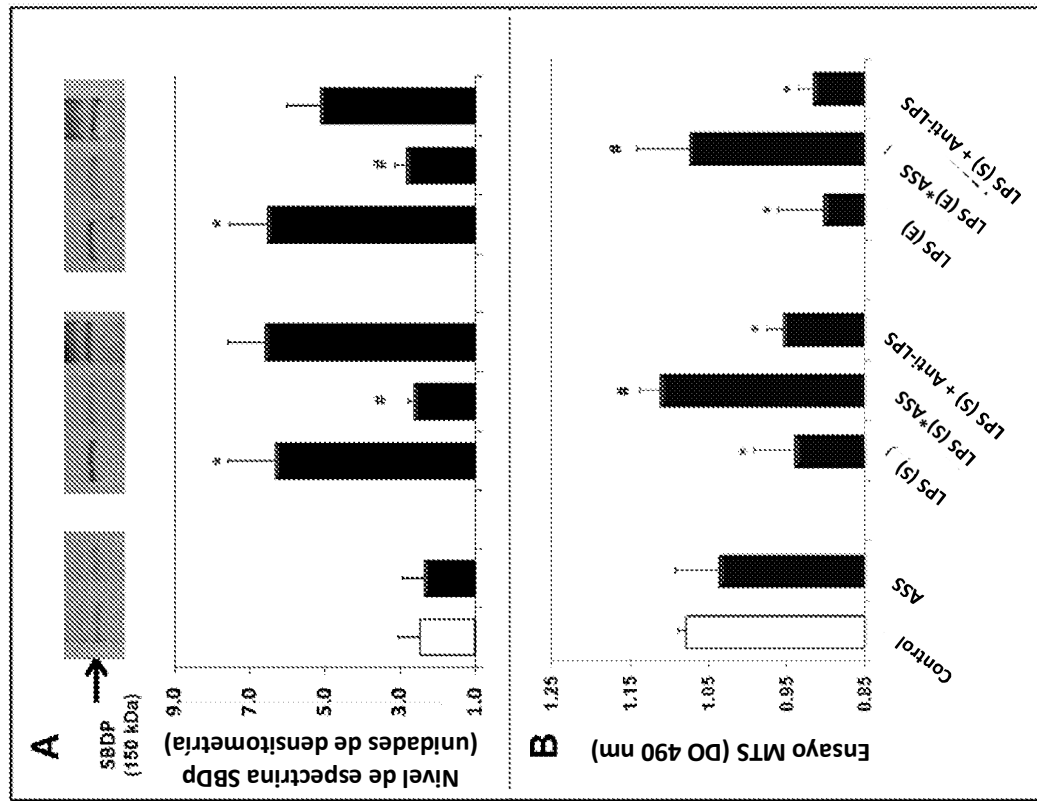


Figura 6

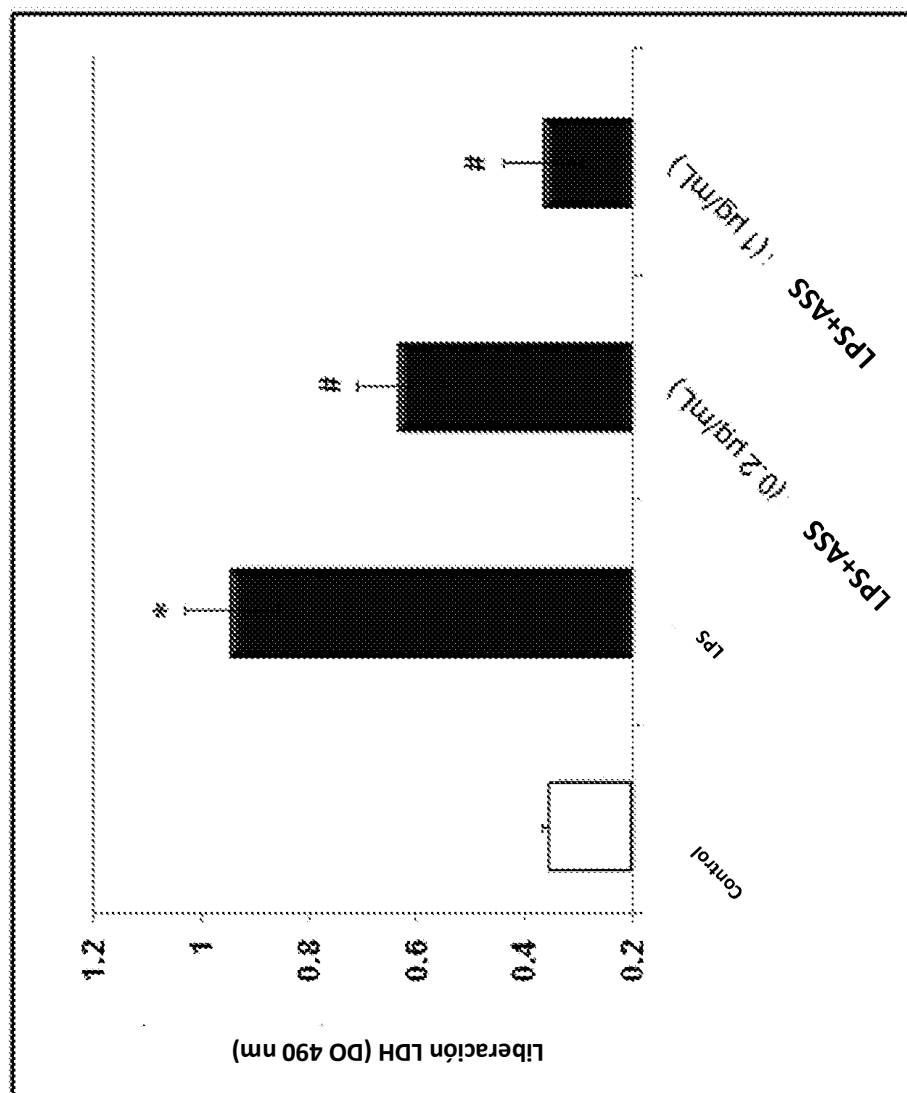


Figura 7

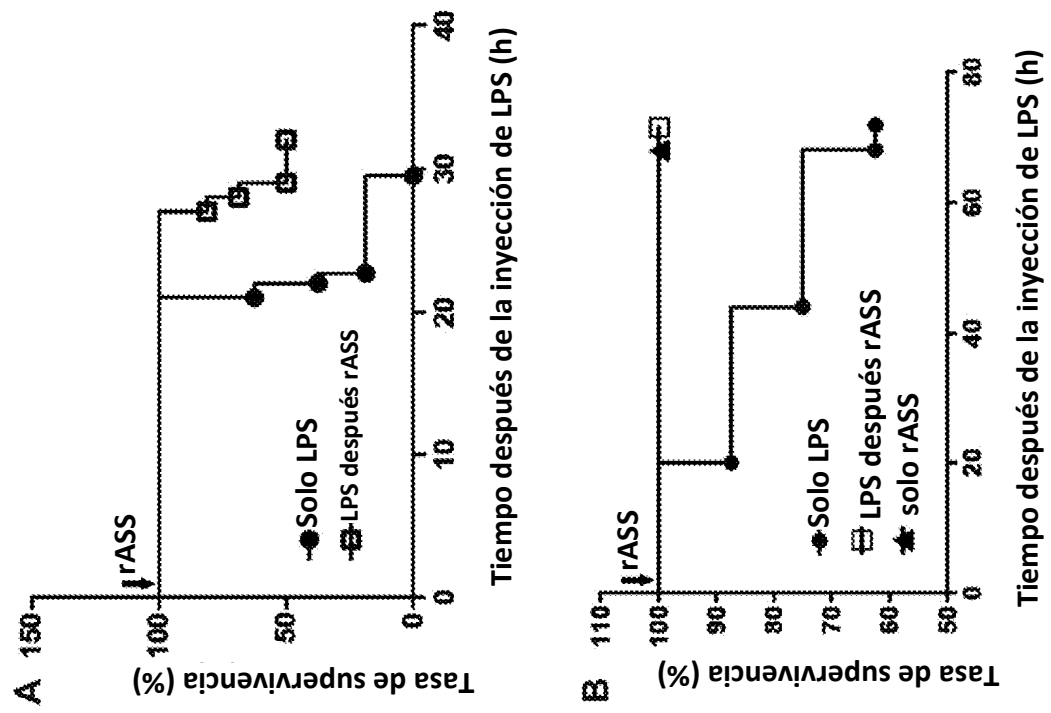


Figura 8

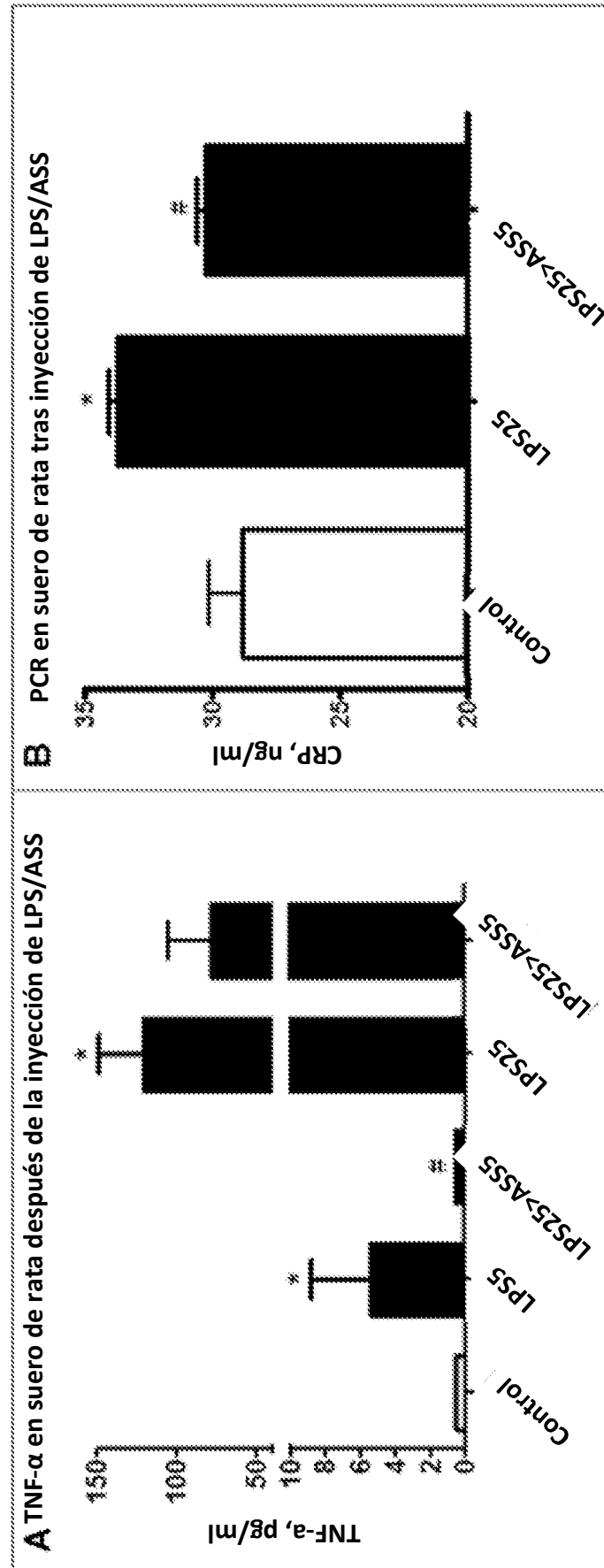


Figura 9

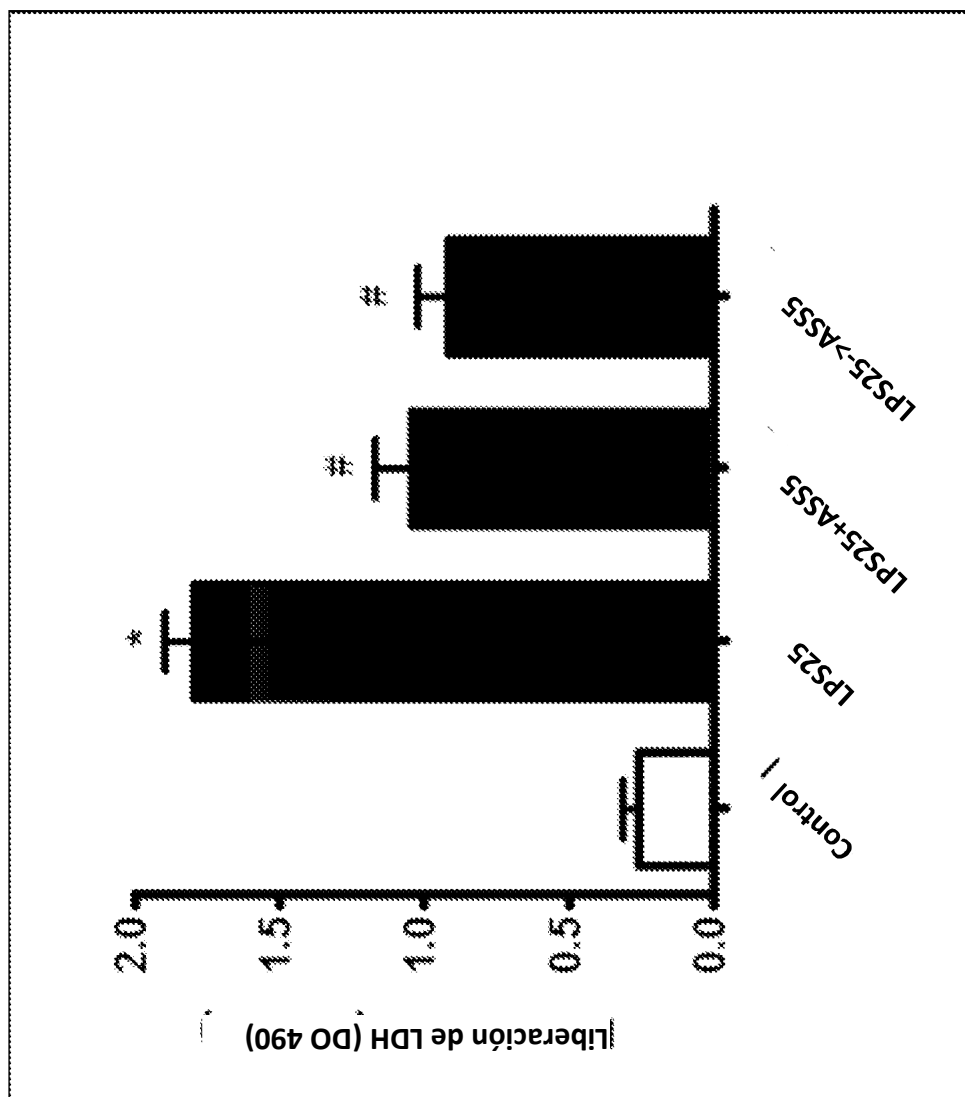


Figura 10

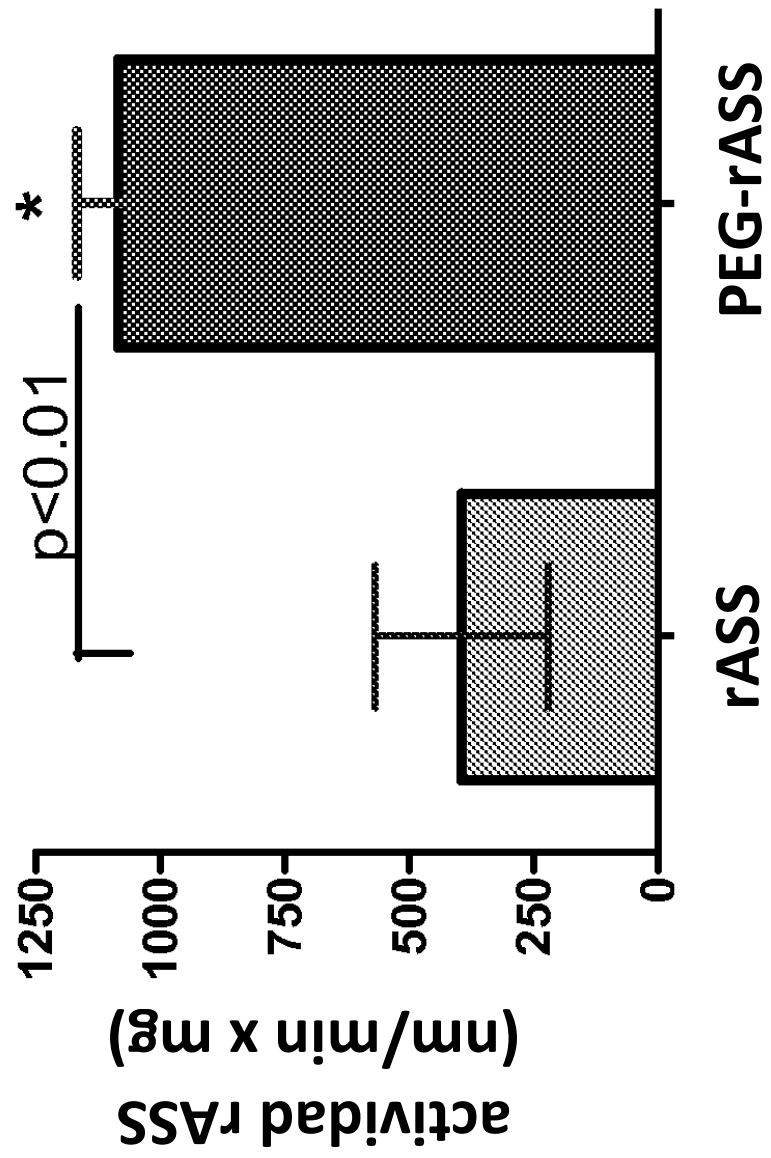


Figura 11

