

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 287**

51 Int. Cl.:

A61K 38/51 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C12N 9/88 (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/US2014/053374**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15031735**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014 E 14839001 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3039137**

54 Título: **Enzimas degradadoras de cistina/cisteína de primate genomanipuladas como agentes antineogénicos**

30 Prioridad:

29.08.2013 US 201361871727 P

05.03.2014 US 201461948106 P

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

28.02.2020

73 Titular/es:

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)

**201 W. 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**GEORGIU, GEORGE y
STONE, EVERETT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 745 287 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

Enzimas degradadoras de cistina/cisteína de primate genomanipuladas como agentes antineogénicos

5 Antecedentes de la invención

La presente solicitud reivindica el beneficio prioritario de la solicitud provisional de Estados Unidos número 61/871.727, presentada el jueves 29 de agosto de 2013 y 61/ 948.106, presentada el miércoles 5 de marzo de 2014.

10 La invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de la subvención N.º R01 CA154754 otorgada por los National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

1. Campo de la invención

15 La presente invención se refiere, en general, a los campos de la medicina y la biología. Más particularmente, se refiere a composiciones para el tratamiento del cáncer con enzimas que agotan tanto la L-cistina como la L-cisteína. Aún más particularmente, se refiere a la genomanipulación de una enzima de primate con alta actividad degradadora de cistina/cisteína y estabilidad adecuada para la terapia humana.

20 2. Descripción de la técnica anterior

Se ha demostrado que el agotamiento sistémico de varios aminoácidos es eficaz para destruir una amplia variedad de tipos de tumores con una toxicidad mínima para los tejidos no cancerosos. Este efecto terapéutico se puede lograr mediante el uso de enzimas farmacológicamente optimizadas introducidas en la circulación que degradan el aminoácido en el que se basa el tumor. Se ha demostrado que determinados cánceres, tal como de próstata, carcinomas de pulmón microcítico, glioblastomas y carcinomas hepatocelulares, dependen en gran medida de la cistina/cisteína extracelular para proliferar y sobrevivir. Muchos de estos tumores sobreexpresan de manera anormal el cotransportador bidireccional xCT(-) de cistina/glutamato para mantener los niveles suficientes de cisteína necesarios para la producción de proteínas y glutatión, lo que sugiere que han perdido o regulado negativamente su capacidad biosintética de cisteína nativa. En respaldo de esta idea, se ha demostrado que el uso de inhibidores de moléculas pequeñas de cotransportadores bidireccionales xCT(-) de cistina/glutamato, tal como sulfasalazina, retarda el crecimiento de los xenoinjertos tumorales de cáncer de próstata y pulmón microcítico (Doxsee *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2009). Aunque un bloqueo del transporte dependiente de xCT(-) de L-cistina es prometedor, no elimina el transporte de L-cisteína libre por el transportador ASC dependiente de Na⁺ y/o transportadores independientes de Na⁺ y, en algunos ejemplos, las células estromales procedentes de la médula ósea proporcionan a las células tumorales L-cisteína libre (Zhang *et al.*, 2012). Un agente terapéutico que agota tanto la cistina como la cisteína puede así privar completamente a los tumores de este metabolito esencial. Sin embargo, no se conocen enzimas degradadoras de cisteína/cistina irreversibles con propiedades o actividad adecuadas para ser aplicadas como agentes terapéuticos humanos y, en general, no existen con frecuencia enzimas que puedan lograr la degradación de aminoácidos específica, lo que requiere de genomanipulación de las actividades deseadas a partir de las existentes.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

45 La presente invención se refiere a la genomanipulación de enzimas de cistationina-gamma-liasa (CGL) de primate de modo que tanto la L-cistina como la L-cisteína (denominadas en el presente documento L-cist(e)ina) pueden degradarse de manera eficaz del suero, y proporciona las enzimas CGL modificadas en una formulación adecuada para la terapia contra el cáncer humano. Para desarrollar una enzima que muestre una baja K_M y una alta actividad catalítica, K_{cat} , en comparación con la enzima nativa, los inventores genomanipularon la enzima nativa mediante la modificación de aminoácidos seleccionados, cuyas modificaciones dan como resultado una enzima que tiene propiedades enzimáticas mejoradas drásticamente. Por tanto, las enzimas CGL modificadas como se describe en el presente documento superan una deficiencia importante en la materia al proporcionar nuevas enzimas que comprenden secuencias polipeptídicas humanas o de primate que tienen actividad catalítica degradadora de L-cist(e)ina en comparación con la enzima nativa. Por tanto, estas enzimas modificadas pueden ser adecuadas para la terapia contra el cáncer y tienen baja inmunogenicidad y una mejor estabilidad en suero. La presente invención se define por las reivindicaciones relativas a una enzima CLG específica modificada. Las otras composiciones y métodos desvelados o proporcionados en el presente documento sirven para comprender completamente los antecedentes y el campo de la invención reivindicada, y proporcionan orientación adicional para la persona experta en la materia, si es necesario.

65 En consecuencia, en una primera realización se proporciona una enzima de cistationina-γ-liasa (CGL) de primate modificada y aislada que tiene al menos dos sustituciones con respecto a una secuencia de aminoácidos de CGL de primate nativa de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 y 7-10, incluyendo dichas al menos dos sustituciones de una treonina en la posición 59 y una valina en la posición 339 de la secuencia de CGL de primate nativa, definiéndose además dicha enzima CGL modificada como una enzima degradadora de cistina/cisteína. En algunas realizaciones, el

polipéptido puede ser capaz de degradar L-cist(e)ina en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una eficacia catalítica para L-cist(e)ina (k_{cat}/K_M) de al menos o aproximadamente 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 $s^{-1}M^{-1}$ o cualquier intervalo derivable de la misma.

5 Un polipéptido no modificado puede ser una isoforma humana u otra isoforma de primate de una CGL de primate nativa. Por ejemplo, la CGL humana nativa puede tener la secuencia de SEQ ID NO: 1. Ejemplos no limitativos de otras CGL de primate nativas incluyen CGL de *Pongo abelii* (Genbank ID: NP_001124635.1; SEQ ID NO: 7), CGL de *Macaca fascicularis* (Genbank ID: AAW71993.1; SEQ ID NO: 8), CGL de *Pan troglodytes* (Genbank ID: XP_513486.2; SEQ ID NO: 9), y CGL de *Pan paniscus* (Genbank ID: XP_003830652.1; SEQ ID NO: 10).

15 El polipéptido modificado tiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en una posición de aminoácidos correspondiente a la posición de aminoácidos 59 y 339 de las SEQ ID NO: 1 o 7-10 como se especifica anteriormente. En estos ejemplos, la primera metionina de cada secuencia corresponde a la posición de aminoácido 1, y cada aminoácido se numera secuencialmente a partir de ella.

Las sustituciones en las posiciones de aminoácidos 59 y 339 son treonina (T) y valina (V), respectivamente.

20 En algunas realizaciones, la CGL nativa puede ser una CGL humana. En una realización particular, las sustituciones son una combinación de E59T y E339V de CGL humana (por ejemplo, el polipéptido modificado que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En realizaciones adicionales, el polipéptido modificado puede ser un mutante CGL-TV de *Pongo abelii* (SEQ ID NO: 3), mutante CGL-TV de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 4), mutante CGL-TV de *Pan troglodytes* (SEQ ID NO: 5), o mutante CGL-TV de *Pan paniscus* (SEQ ID NO: 6).

25 En algunos aspectos, la presente divulgación también considera 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 estar unida 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*.

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

35 En algunos aspectos, se considera un ácido nucleico que codifica dicha CGL modificada. En un aspecto, el ácido nucleico ha sido optimizado con codones para la expresión en bacterias. En realizaciones particulares, la bacteria es *E. coli*. En otros aspectos, el ácido nucleico ha sido optimizado con codones para la expresión en un hongo (por ejemplo, levadura), en células de insectos o en células de mamíferos. La presente invención considera además 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, que incluye, pero no se limita 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 haber sido modificados mediante tecnología de ADN recombinante para permitir la expresión del ácido nucleico que codifica la CGL modificada en la célula diana. Estos vectores pueden proceder de vectores de origen no vírico (por ejemplo, plásmidos) o vírico (por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus, virus del herpes o virus vaccinia). Los vectores no víricos forman complejos preferentemente con agentes para facilitar la entrada del ADN a través de la membrana celular. Ejemplos de dichos complejos de vectores no víricos incluyen la formulación con agentes policationicos que facilitan la condensación del ADN y los sistemas de suministro basados en lípidos. Un ejemplo de un sistema de suministro basado en lípidos incluiría el suministro de ácidos nucleicos basado en liposomas.

50 En otros aspectos adicionales, la presente invención considera además 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.

55 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 modo que la proteína está glucosilada. En otra realización, las proteínas se expresan en una célula hospedadora de modo que la proteína está aglucosilada.

60 En algunas realizaciones, los polipéptidos o ácidos nucleicos están en una formulación farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. El polipéptido puede ser un polipéptido de CGL nativa de primate o un polipéptido de CGL modificada. El ácido nucleico puede codificar un polipéptido de CGL nativa de primate o un polipéptido de CGL modificada.

65 Determinados aspectos de la presente invención también consideran el péptido de CGL modificada, el ácido nucleico

que codifica la CGL modificada para su uso en un método para el tratamiento de una célula tumoral en un sujeto o un sujeto con cáncer, por ejemplo, en forma de un vector de terapia génica. El sujeto puede ser cualquier animal, tal como un ratón. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero, particularmente un primate, y más particularmente a un paciente humano. En algunas realizaciones, el método puede comprender seleccionar un paciente con cáncer. En determinados aspectos, el sujeto o paciente puede mantenerse con una dieta restringida de L-cist(e)ina o una dieta normal.

En algunas realizaciones, el cáncer es cualquier cáncer que sea sensible al agotamiento de L-cist(e)ina. En una realización, la presente invención considera una formulación que comprende dicho polipéptido para su uso en un método de tratamiento de una célula tumoral o un paciente con cáncer. En algunas realizaciones, la administración se produce en condiciones tales que al menos una porción de las células del cáncer se destruyen. En otra realización, la formulación comprende una CGL modificada con actividad degradadora de L-cist(e)ina en condiciones fisiológicas y que además comprende una cadena de polietilenglicol unida. En alguna realización, la formulación es una formulación farmacéutica que comprende la CGL modificada 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 humana.

En una realización adicional, también se puede proporcionar una formulación que comprende una CGL modificada no bacteriana (mamífero, por ejemplo, primate o ratón) que tiene actividad degradadora de L-cist(e)ina o un ácido nucleico que la codifica para su uso en un método de tratamiento de una célula tumoral.

Debido a que las células tumorales dependen de su medio nutritivo para L-cist(e)ina, la administración o el tratamiento pueden dirigirse a la fuente de nutrientes para las células, y no necesariamente a las células mismas. Por lo tanto, en una aplicación *in vivo*, el tratamiento de una célula tumoral incluye poner en contacto el medio nutriente para una población de células tumorales con la CGL genomanipulada (es decir, modificada). En este caso, el medio puede ser sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y un líquido corporal similar donde se desea el agotamiento de L-cist(e)ina.

De acuerdo con determinados aspectos de la presente invención, dicha formulación para el uso anterior que contiene la CGL modificada, se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intrasinovial, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, por inhalación, infusión, infusión continua, perfusión localizada, a través de un catéter, a través de un lavado, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o mediante otro método o cualquier combinación de los anteriores, como sabría un experto en la materia.

En una realización adicional, la composición para su uso en un método para el tratamiento de una célula tumoral en un sujeto también puede comprender administrar al menos una segunda terapia contra el cáncer al sujeto. La segunda terapia contra el cáncer puede ser una terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o terapia con citocinas.

Las realizaciones discutidas en el contexto de los métodos y/o composiciones de la invención pueden emplearse con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento. Por lo tanto, una realización perteneciente a un método o composición puede aplicarse también a otros métodos y composiciones de la invención.

Como se usa en el presente documento los términos "codifica" o "que codifica", con respecto a un ácido nucleico, se usan para hacer que la invención sea fácilmente comprensible por el experto en la materia; sin embargo, estos términos pueden usarse indistintamente con "comprende" o "que comprende", respectivamente.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "un" o "uno/a" pueden significar uno o más. Como se usa en el presente documento en las reivindicaciones, cuando se usa junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "uno/a" pueden significar uno o más de uno.

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

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, el método que se está empleando para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración, ya que serán evidentes para los expertos en la materia varios cambios y modificaciones a partir de esta 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 se puede entender mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

FIG. 1 - Esquema de la catálisis de la enzima cist(e)inasa: hCGL y las variantes de hCGL genomanipuladas convierten la L-cistina en piruvato, amoníaco y tiocisteína. La tiocisteína se degrada no enzimáticamente a sulfuro de hidrógeno y L-cisteína. La L-cisteína se degrada además mediante hCGL y las variantes de hCGL genomanipuladas a piruvato, amoníaco y sulfuro de hidrógeno.

FIG. 2A-B: Cinética de Michaelis-Menten de la degradación catalizada por hCGL-TV de (A) L-cistina (círculo abierto) y (B) L-cisteína (círculo negro).

FIG. 3 - Actividad en el tiempo de hCGL-TV (círculo abierto) en suero humano combinado incubado a 37 °C, con un $T_{0,5}$ aparente de 228 ± 6 h.

FIG. 4A-B - Líneas de tumor de próstata (A) DU145 y (B) PC3 tratadas con concentraciones variables de hCGL-TV, con valores aparentes de CI_{50} de ~ 60 nM para cualquier línea celular.

FIG. 5 - Secuencia de aminoácidos de hCGL-TV (SEQ ID NO: 11). Contiene una etiqueta His₆ N-terminal y la secuencia de aminoácidos hCGL del resto 2-405 con las mutaciones E59T-E339V subrayadas en negrita.

FIG. 6A-B - (A) Una sola dosis i.p. de 50 mg/kg de PEG-hCGL-TV en ratones FVB (n = 5/grupo) eliminó los niveles de cistina durante más de 96 h, y (B) redujo los niveles de cisteína durante más de 48 h. (*** p < 0,001, **p < 0,01, * p < 0,05, y NS = No Significativo).

FIG. 7 - La farmacocinética de una sola dosis i.p. de 50 mg/kg de PEG-hCGL-TV en ratones FVB (n = 5/grupo) se siguió con el tiempo dando como resultado una absorción $T_{1/2}$ de ~ 23 h, y una eliminación $T_{1/2}$ de 40 ± 7 h.

FIG. 8 - Se trataron i.p. ratones FVB con aloinjertos de carcinoma de próstata HMVP2 (n = 8 cada grupo) con PEG-hCGL-TV a 50 mg/kg de peso corporal (cuadrado abierto), PEG-hCGL-TV a 100 mg/kg de peso corporal (triángulo negro), PBS (círculo abierto) o PEG-hCGL-TV inactivado por calor a 100 mg/kg de peso corporal (diamante negro) una vez cada 4 días.

FIG. 9 - Se trataron i.p. ratones desnudos machos con xenoinjertos de carcinoma de próstata humano (PC3) (n = 7 cada grupo) con PEG-hCGL-TV a 50 mg/kg de peso corporal (triángulo negro), PEG-hCGL-TV a 100 mg/kg de peso corporal (círculo negro), PBS (diamante negro) o PEG-hCGL-TV inactivado por calor a 100 mg/kg de peso corporal (cuadrado negro) una vez cada 4 días.

Descripción de realizaciones ilustrativas

La cisteína se considera un aminoácido no esencial, ya que se puede sintetizar a partir de la homocisteína procedente del aminoácido esencial L-metionina a través de la ruta de transulfuración, que comprende las enzimas cistationina- β -sintasa (CBS) y cistationina- γ -liasa (CGL). Por lo tanto, se espera que el agotamiento de la cisteína sea relativamente no tóxico para los tejidos normales con una ruta de transulfuración intacta. Determinados cánceres pueden tener una expresión anormalmente baja o ausente de las enzimas CBS y/o CGL de la ruta de transulfuración, lo que requiere que importen L-cisteína/L-cistina desde el compartimento extracelular. En carcinomas hepatocelulares, la regulación negativa de CBS se correlacionó aún más con un mal pronóstico (Kim *et al.*, 2009), y también se ha observado que los cánceres gastrointestinales tienen un silenciamiento epigenético frecuente de CBS (Zhao *et al.*, 2012). En otros ejemplos, la ausencia de expresión de CGL se ha observado con frecuencia en líneas celulares de leucemia linfoblástica (Glode *et al.*, 1981; Link *et al.*, 1983). Los niveles de expresión de CBS y CGL, así como el transportador de cisteína xCT(-), constituyen importantes biomarcadores tumorales para la selección de pacientes para el tratamiento con un régimen de agotamiento de cistina/cisteína.

La presente invención proporciona enzimas terapéuticas genomanipuladas que degradan L-cist(e)ina. Dichas enzimas se pueden usar en un método para tratar enfermedades, tales como cáncer, enfermedad de almacenamiento lisosómico (es decir, cistinosis), y para anular los efectos inmunitarios adversos en una variedad de afecciones autoinmunitarias. Por lo tanto, una enzima terapéutica que puede agotar estos aminoácidos puede tener utilidad como agente inmunomodulador.

I. Definiciones

Como se usa en el presente documento, los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que

comprenden aminoácidos unidos *a través de* enlaces peptídicos y se usan 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 proteínas unidos operativamente 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 necesitaría para que la concentración de un polipéptido del mismo se reduzca a la mitad *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, después de la inyección en un mamífero.

Las expresiones "en combinación operativa", "en orden operativa", y "unido operativamente" se refieren a un enlace en el que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista, por ejemplo, un enlace de secuencias de ácido nucleico de tal 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 un enlace de secuencias de aminoácidos de tal manera que se produzca una proteína de fusión.

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

El término "PEGilado" se refiere a la conjugación con polietilenglicol (PEG), que ha sido ampliamente utilizado como vehículo de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. El PEG puede acoplarse (por ejemplo, unirse covalentemente) a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en el extremo de la cadena de PEG *a través de* métodos químicos; sin embargo, el PEG en sí está limitado a como máximo dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, los copolímeros de PEG y aminoácidos se han explorado como biomateriales novedosos que retendrían la biocompatibilidad de PEG, pero que tendrían la ventaja adicional de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando así una mayor carga de fármacos), y eso se puede diseñar sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

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

El término "nativo" se refiere a la forma normal 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 lo tanto, se designa arbitrariamente como la forma normal o de tipo silvestre. En cambio, el término "modificado", "variante", o "mutante" se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en la secuencia y las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen o producto genético nativo.

El término "vector" se usa para referirse a una molécula portadora de ácido nucleico en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula donde se puede replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en 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 animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YACs). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994, ambos incorporados en el presente documento como referencia).

La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen posteriormente en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", que se refieren a 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 las secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones y se describen más adelante.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de una composición terapéutica (tal como un polinucleótido terapéutico y/o polipéptido terapéutico) que se emplea en métodos para lograr un efecto terapéutico. La expresión "beneficio terapéutico" o "terapéuticamente eficaz" tal como se usa en toda esta solicitud se refiere a cualquier cosa que promueva o mejore el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de esta afección. Esto incluye, pero sin limitación, 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, reducción en la tasa de crecimiento del cáncer o la prevención de 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 enzima. El término " k_{cat} ", como se usa en el presente documento, se refiere al número de renovación o al número de moléculas de sustrato que cada sitio de enzima convierte en producto por unidad de tiempo, y en el que la enzima está trabajando con la máxima eficacia. La expresión " k_{cat}/K_M ", como se usa en el presente documento, es la constante de especificidad, que es una medida de la eficacia con que una enzima convierte un sustrato en producto.

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

"Tratamiento" y "que trata" se refieren a la administración o aplicación de un agente terapéutico a un sujeto o 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 cist(e)inasa.

"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. Cistationina- γ -liasa

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

Varias 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, designadas como enzimas dependientes de PLP del metabolismo de Cys/Met. Estas enzimas son proteínas de aproximadamente 400 aminoácidos y el grupo PLP está unido a un resto de lisina ubicado en la ubicación central del polipéptido. Los miembros de esta familia incluyen cistationina- γ -liasa (CGL), cistationina- γ -sintasa (CGS), cistationina- β -liasa (CBL), metionina- γ -liasa (MGL), 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 adicional de la reacción está determinado por la especificidad del sustrato de la enzima particular.

Por ejemplo, los inventores introdujeron mutaciones específicas en un miembro de la familia de la liasa dependiente de PLP, la cistationina- γ -liasa, para cambiar su especificidad de sustrato como se especifica en las reivindicaciones. De esta manera, los inventores produjeron nuevas variantes con la capacidad de novo de degradar tanto L-cistina como L-cisteína. También se puede considerar una modificación de otras enzimas dependientes de PLP para producir nueva actividad degradadora de L-cist(e)ina.

La cistationina- γ -liasa (CGL o cistationasa) es una enzima que descompone la cistationina en cisteína y α -cetobutirato. El fosfato de piridoxal es un grupo prostético de esta enzima. Como se muestra en los ejemplos, la genomanipulación de proteínas se usó para convertir la cistationasa, que solo tiene una actividad débil para la degradación de L-cisteína y L-cistina, en una enzima que puede degradar estos aminoácidos a una velocidad alta.

III. Genomanipulación de cist(e)inasa

Una realización se refiere a una enzima CGL modificada con una actividad degradadora de L-cist(e)ina de acuerdo con las reivindicaciones. En aspectos adicionales, la enzima CGL modificada puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad en suero. Por lo 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 no modificado, aquí la actividad degradadora de L-cist(e)ina. En determinadas realizaciones, la proteína o polipéptido no modificado es una CGL nativa, preferentemente una CGL humana. Se considera específicamente que las realizaciones relativas a una "proteína modificada" pueden implementarse con respecto a un "polipéptido modificado", y viceversa.

La determinación de la actividad puede lograrse usando ensayos familiares para los expertos en la materia, particularmente con respecto a la actividad de la proteína, y puede incluir para fines de comparación, por ejemplo, el uso de versiones nativas y/o recombinantes de la proteína o polipéptido modificado o no modificado. Por ejemplo, la actividad degradadora de L-cist(e)ina puede determinarse mediante cualquier ensayo para detectar la producción de cualquier sustrato resultante de la degradación de L-cistina y/o L-cisteína, como la detección de piruvato usando 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) (Takakura et al., 2004).

En determinadas realizaciones, se puede identificar una CGL modificada en base a su aumento en la actividad degradadora de L-cist(e)ina. Por ejemplo, se pueden identificar sitios de reconocimiento de sustrato del polipéptido no modificado. Esta identificación puede basarse en análisis estructural o análisis de homología. Se puede generar una población de mutantes que implican modificaciones de dichos sitios de reconocimiento de sustrato. En una realización adicional, los mutantes con aumento de la actividad degradadora de L-cist(e)ina pueden seleccionarse de la población mutante. La selección de mutantes deseados puede incluir métodos para la detección de subproductos o productos de la degradación de L-cist(e)ina.

En algunas realizaciones, estas proteínas modificadas pueden incluir además inserciones o aminoácidos añadidos, tales como proteínas de fusión o proteínas con enlazadores, por ejemplo. También se desvela una "proteína modificada eliminada" que carece de uno o más restos de la proteína nativa, pero puede poseer la especificidad y/o actividad de la proteína nativa. Una "proteína modificada eliminada" también puede tener inmunogenicidad o antigenicidad reducida. Un ejemplo de una proteína modificada eliminada es aquella que tiene un resto de aminoácido eliminado de al menos una región antigénica, es decir, una región de la proteína determinada como antigénica en un organismo particular, como el tipo de organismo al que se le puede administrar proteína modificada.

En general, 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, particularmente 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 materia 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.

En general, además de una eliminación o sustitución, una proteína modificada puede poseer una inserción de restos, lo que normalmente implica la adición de al menos un resto en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un péptido o polipéptido dirigido o simplemente un solo resto. Las adiciones terminales, llamadas proteínas de fusión, se analizan a continuación.

La expresión "equivalente biológicamente funcional" se entiende bien en la materia y se define adicionalmente en detalle en el presente documento. En consecuencia, se incluyen secuencias que tienen entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 80 %, o entre aproximadamente un 81 % y aproximadamente un 90 %, o incluso entre aproximadamente un 91 % y aproximadamente un 99 % de aminoácidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a los aminoácidos de un polipéptido de control, siempre que se mantenga la actividad biológica de la proteína. Una proteína modificada puede ser biológicamente y funcionalmente equivalente a su homóloga nativa en determinados aspectos.

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

IV. Degradación enzimática de L-cist(e)ina para terapia

En determinados aspectos, la CGL modificada puede usarse para el tratamiento de enfermedades, incluidos los cánceres que son sensibles al agotamiento de L-cist(e)ina, como el carcinoma hepatocelular, el melanoma y el carcinoma de células renales, con nuevas enzimas que agotan la L-cistina y/o L-cisteína. La invención desvela específicamente métodos de tratamiento que usan CGL modificada con actividad degradadora de L-cist(e)ina. Determinadas realizaciones de la presente invención proporcionan enzimas novedosas con actividad degradadora de L-cist(e)ina para aumentar la eficacia terapéutica.

Determinados aspectos de la presente divulgación proporcionan una CGL modificada con actividad degradadora de L-cist(e)ina para tratar enfermedades, tales como tumores. En un ejemplo, el polipéptido modificado puede tener secuencias polipeptídicas humanas y, por lo tanto, puede prevenir reacciones alérgicas en pacientes humanos, permitir dosis repetidas y aumentar la eficacia terapéutica.

Los tumores para los cuales los métodos de tratamiento actuales son útiles incluyen cualquier tipo de célula maligna, como las que se encuentran en un tumor sólido o un tumor hematológico. Los ejemplos de tumores sólidos pueden incluir, pero sin limitación, un tumor de un órgano seleccionado del grupo que consiste en páncreas, colon, ciego,

estómago, cerebro, cabeza, cuello, ovario, riñón, laringe, sarcoma, pulmón, vejiga, melanoma, próstata y mama. Los ejemplos de tumores hematológicos incluyen tumores de la médula ósea, tumores malignos de linfocitos T o B, leucemias, linfomas, blastomas, mielomas y similares. Otros ejemplos de cánceres que pueden tratarse utilizando los métodos proporcionados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal (incluido cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las 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 diseminación superficial, melanoma maligno lentigo, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, así como el linfoma de linfocitos B (incluido el linfoma no Hodgkin (LNH) de bajo grado/folicular; NHL linfocítico pequeño (LP); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado; NHL enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia de células pilosas, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloblástica crónica.

El cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligno; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoideo quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis familiar intestinal; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma acidófilo; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometroide; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistoadenocarcinoma; cistoadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma papilar seroso; cistoadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células de anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecomoma, maligno; tumor de células granulosa, maligno; androblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leidig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma maligno amelanótico; melanoma de diseminación superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomyosarcoma; rhabdomyosarcoma embrionario; rhabdomyosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto Muleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de 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; de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, pequeño linfocítico; 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 mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas.

La cist(e)inasa de primate genomanipulada procedente de CGL se puede usar en el presente documento como un agente antitumoral en una variedad de modalidades para agotar la L-cistina y/o L-cisteína de una célula tumoral, tejido tumoral o la circulación de un mamífero con cáncer, o por agotamiento de L-cistina y/o L-cisteína donde su agotamiento se considera deseable.

El agotamiento se puede llevar a cabo *in vivo* en la circulación de un mamífero, *in vitro* en los casos en que se desee el agotamiento de la L-cistina y/o la L-cisteína en el cultivo de tejidos u otros medios biológicos, y en los procedimientos *ex vivo* donde los fluidos biológicos, células o tejidos se manipulan fuera del cuerpo y posteriormente se devuelven al cuerpo del paciente mamífero. El agotamiento de L-cistina y/o L-cisteína de la circulación, medios de cultivo, fluidos

biológicos o células se lleva a cabo para reducir la cantidad de L-cistina y/o L-cisteína accesible para el material que se está tratando y, por lo tanto, comprende poner en contacto el material que se va a agotar con una cantidad de cist(e)inasa de primate genomanipulada que degrada L-cistina y/o L-cisteína en condiciones degradadoras de L-cistina y/o L-cisteína para degradar la L-cistina y/o L-cisteína ambiental en el material en contacto.

5 Debido a que las células tumorales pueden depender de su medio nutritivo para L-cistina y/o L-cisteína, el agotamiento puede dirigirse a la fuente de nutrientes para las células, y no necesariamente a las células mismas. Por lo tanto, en una aplicación *in vivo*, el tratamiento de una célula tumoral incluye poner en contacto el medio nutriente para una población de células tumorales con la cist(e)inasa genomanipulada. En esta realización, el medio puede ser sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y un líquido corporal similar donde se desea el agotamiento de L-cistina y/o L-cisteína.

15 La eficacia degradadora de L-cistina y/o L-cisteína puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación y, normalmente, depende de la cantidad de L-cistina y/o L-cisteína presente en el material, la velocidad de agotamiento deseada y la tolerancia del material a la exposición a la cist(e)inasa. Los niveles de L-cistina y/o L-cisteína en un material y, por lo tanto, las tasas de agotamiento de L-cistina y/o L-cisteína del material, se pueden controlar fácilmente mediante una variedad de métodos químicos y bioquímicos bien conocidos en la materia. Ejemplos de cantidades degradadoras de L-cistina y/o L-cisteína se describen adicionalmente en el presente documento, y pueden variar de 0,001 a 100 unidades (U) de cist(e)inasa genomanipulada, preferentemente de aproximadamente 0,01 a 10 U, y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 5 U de cist(e)inasa genomanipulada por mililitro (ml) de material a tratar.

25 Las condiciones degradadoras de L-cistina y/o L-cisteína son condiciones de tampón y temperatura compatibles con la actividad biológica de una enzima CGL, e incluyen condiciones moderadas de temperatura, sal y pH compatibles con la enzima, por ejemplo, condiciones fisiológicas. Las condiciones ejemplares incluyen aproximadamente 4-40 °C, una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 0,05 a 0,2 M de NaCl y un pH de aproximadamente 5 a 9, mientras se incluyen las condiciones fisiológicas.

30 En una realización particular, la divulgación considera métodos de uso de cist(e)inasa genomanipulada como agente antitumoral y, por lo tanto, comprende poner en contacto una población de células tumorales con una cantidad terapéuticamente eficaz de cist(e)inasa genomanipulada por un período de tiempo suficiente para inhibir el crecimiento de células tumorales.

35 En una realización, el contacto *in vivo* se logra mediante la administración, por inyección intravenosa o intraperitoneal, de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que comprende una cist(e)inasa genomanipulada de esta invención a un paciente, agotando así la fuente de L-cistina y/o L-cisteína circulante de las células tumorales presentes en el paciente. El contacto de la cist(e)inasa genomanipulada también se puede lograr mediante la administración de la cist(e)inasa genomanipulada en el tejido que contiene las células tumorales.

40 Una cantidad terapéuticamente eficaz de una cist(e)inasa genomanipulada es una cantidad predeterminada calculada para lograr el efecto deseado, es decir, para agotar la L-cistina y/o la L-cisteína en el tejido tumoral o en la circulación de un paciente y, de ese modo, hacer que las células tumorales dejen de dividirse. Por lo tanto, los intervalos de dosificación para la administración de cist(e)inasa genomanipulada de la invención son los suficientemente grandes como para producir el efecto deseado en el que se reducen los síntomas de división celular tumoral y ciclo celular. La dosis no ha de ser lo suficientemente grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. En general, la dosificación variará con la edad, la condición, el sexo y el alcance de la enfermedad en el paciente y puede determinarse por un experto en la materia. La dosificación puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.

50 Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una cist(e)inasa genomanipulada puede ser una cantidad tal que cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente para lograr una concentración intravascular (plasma) o local de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 unidades (U) por ml, preferentemente por encima de aproximadamente 0,1 U, y más preferentemente por encima de 1 U de cist(e)inasa genomanipulada por ml. Las dosis normales se pueden administrar en función del 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 20-40 U/kg/día.

60 La cist(e)inasa genomanipulada se puede administrar por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual a lo largo del tiempo. La cist(e)inasa genomanipulada se puede administrar por vía intravenosa, intraperitoneal, oral, intramuscular, subcutánea, intracavidad, transdérmica, dérmica, se puede suministrar por medios peristálticos, se puede inyectar directamente en el tejido que contiene las células tumorales, o se puede administrar mediante una bomba conectada a un catéter que puede contener un posible biosensor de L-cist(e)ina.

65 Las composiciones terapéuticas que contienen cist(e)inasa genomanipulada se administran convencionalmente por vía intravenosa, tal 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 concretas 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, es decir, excipiente o vehículo requerido.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrarse depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto de utilizar el principio activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de principio activo que se necesitan administrar pueden depender del criterio del médico a cargo del tratamiento y pueden ser específicas para cada sujeto. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para aplicación sistémica se divulgan en este documento y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las inyecciones de refuerzo también se consideran y se caracterizan por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas por una inyección posterior u otra administración. Ejemplos de administraciones múltiples se describen en el presente documento y se prefieren particularmente para mantener niveles séricos y tisulares de cist(e)inasa genomanipulada continuamente altos y, por el contrario, niveles séricos y tisulares bajos de L-cist(e)ina. Como alternativa, se considera la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para tratamientos *in vivo*.

V. Conjugados

Las composiciones de la presente divulgación implican cist(e)inasas genomanipuladas, tales como formando conjugados con segmentos de péptidos heterólogos o polímeros, tales como polietilenglicol. En aspectos adicionales, las cist(e)inasas genomanipuladas pueden estar unidas a PEG para aumentar el radio hidrodinámico de la enzima y, por lo tanto, aumentar la persistencia en suero. En determinados aspectos, el polipéptido desvelado puede conjugarse con cualquier agente dirigido, tal como un ligando que tiene la capacidad de unirse específica y establemente a un receptor externo o sitio de unión en una célula tumoral (publicación de patente de EE.UU. 2009/0304666).

A. Proteínas de fusión

Determinadas realizaciones se refieren a proteínas de fusión. Estas moléculas pueden tener la cistationasa modificada unida en el extremo 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, como un marcador de afinidad de albúmina sérica o seis restos de histidina, o un dominio inmunológicamente activo, 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, de sus siglas en inglés), proteína de unión a maltosa (MBP, de sus siglas en inglés) y glutatión-S-transferasa (GST).

En una realización particular, la cist(e)inasa puede estar unida a un péptido que aumenta la semivida *in vivo*, como un polipéptido XTEN (Schellenberger *et al.*, 2009), dominio Fc de IgG, albúmina o péptido de unión a albúmina.

Los expertos en la materia conocen bien los métodos para generar proteínas de fusión. Dichas proteínas se pueden producir, 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, seguido de la expresión de la proteína de fusión intacta.

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

B. Enlazadores

En determinadas realizaciones, la cist(e)inasa genomanipulada se puede conjugar químicamente usando reactivos de reticulación bifuncionales o fusionarse a nivel de proteína con enlaces peptídicos.

Los reactivos de reticulación bifuncionales se han utilizado ampliamente para una variedad de propósitos, incluida la preparación de matrices de afinidad, modificación y estabilización de diversas estructuras, identificación de sitios de unión a ligandos y receptores, y estudios estructurales. Los enlazadores de péptidos adecuados también se pueden usar para unir la cist(e)inasa genomanipulada, tal como los enlazadores Gly-Ser.

Los reactivos homobifuncionales que llevan dos grupos funcionales idénticos demostraron ser altamente eficaces para inducir la reticulación entre macromoléculas o subunidades de una macromolécula idénticas y diferentes, y la unión de ligandos de polipéptidos a sus sitios de unión específicos. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Aprovechando las reactividades diferenciales de los dos grupos funcionales diferentes, la reticulación puede controlarse tanto selectiva como secuencialmente. Los reactivos de reticulación bifuncionales se pueden dividir 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 leves

bajo las cuales pueden aplicarse.

La mayoría de los reactivos de reticulación heterobifuncionales contienen un grupo primario reactivo con amins y un grupo reactivo con tiol. En otro ejemplo, se describen reactivos de reticulación heterobifuncionales y métodos para usar los reactivos de reticulación (Patente de EE.UU. N.º 5.889.155, específicamente incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad). Los reactivos de reticulación combinan un resto de hidrazida nucleófilo con un resto de maleimida electrófilo, permitiendo el acoplamiento, en un ejemplo, de aldehídos para liberar tioles. El reactivo de reticulación se puede modificar para reticular varios grupos funcionales.

Además, cualquier otro agente y/o mecanismos de unión/acoplamiento conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para combinar cist(e)inasa de primate genomanipulada, como, por ejemplo, interacción anticuerpo-antígeno, enlaces de avidina biotina, enlaces amida, enlaces éster, enlaces tioéster, enlaces éter, enlaces tioéter, enlaces fosfoéster, enlaces de fosforamida, enlaces de anhídrido, enlaces disulfuro, interacciones iónicas e hidrófobas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos biespecíficos, o combinaciones de los mismos.

Se prefiere que se emplee un agente de reticulación que tenga una estabilidad razonable en sangre. Se conocen numerosos tipos de enlazadores que contienen enlaces disulfuro que pueden emplearse con éxito para conjugar agentes de direccionamiento y terapéuticos/preventivos. Los enlazadores que contienen un enlace disulfuro que está impedido estéricamente pueden dar una mayor estabilidad *in vivo*. Estos enlazadores son, por lo tanto, un grupo de agentes de unión.

Además de los reticuladores impedidos, los enlazadores no impedidos también se pueden emplear de acuerdo con esto. Otros reticuladores útiles, que no se consideran que contienen o generan un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano (Wawrzynczak y Thorpe, 1987). El uso de dichos reticuladores se entiende bien en la materia. Otra realización implica el uso de enlazadores flexibles.

Una vez conjugado químicamente, el péptido generalmente se purificará para separar el conjugado de los agentes no conjugados y de otros contaminantes. Se encuentra disponible una gran cantidad de técnicas de purificación para proporcionar conjugados de un grado de pureza suficiente para hacerlos clínicamente útiles.

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

C PEGilación

En determinados aspectos de la invención, se desvelan composiciones relacionadas con la PEGilación de la cist(e)inasa genomanipulada. Por ejemplo, la cist(e)inasa genomanipulada 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 proteína terapéutica. La PEGilación se logra de manera rutinaria mediante la incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula diana. La unión covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede "enmascarar" al agente del sistema inmunitario del hospedador (inmunogenicidad y antigenicidad reducidas) o aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente, lo que prolonga su tiempo de circulación al reducir el aclaramiento renal. La PEGilación también puede proporcionar solubilidad en agua a fármacos y proteínas hidrófobas.

El primer paso de la PEGilación es la funcionalización adecuada del polímero PEG en uno o ambos extremos. Los PEG que se activan en cada extremo con la misma fracción reactiva 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 PEG se preparan para unir el PEG a la molécula deseada.

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

Las técnicas utilizadas para formar derivados de PEG de primera generación generalmente hacen reaccionar el polímero PEG con un grupo que es reactivo con grupos hidroxilo, normalmente anhídridos, cloruros ácidos, cloroformatos y carbonatos. En la química de PEGilación de segunda generación, grupos funcionales más eficaces, tales como aldehído, ésteres, amidas, etc., están disponibles para la conjugación.

A medida que las aplicaciones de PEGilación se han vuelto cada vez más avanzadas y sofisticadas, ha aumentado la necesidad de PEG heterobifuncionales para la conjugación. Estos PEG heterobifuncionales son muy útiles en la unión de dos entidades, donde se necesita un espaciador hidrófilo, flexible y biocompatible. Los grupos finales preferidos para PEG heterobifuncionales son maleimida, vinilsulfonas, 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 agregar un grupo modificador de proteínas al extremo alcohol. En algunos casos, se usa polietilenglicol (PEG diol) como molécula precursora. El diol se modifica posteriormente en ambos extremos para formar una molécula unida a PEG hetero u homodimérica.

Las proteínas están generalmente PEGiladas en sitios nucleófilos, tales como tioles no protonados (restos de cisteinilo) o 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 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 de carbamato formado con yodo de PEG es más estable, pero el yodo libre puede modificar los restos de tirosina en algunas condiciones. Los tioles de PEG forman enlaces disulfuro con proteínas-tioles, pero este enlace también puede ser inestable en condiciones alcalinas. La reactividad de vinilsulfona de PEG es relativamente lenta en comparación con maleimida y yodo de PEG; sin embargo, el enlace tioéter formado es bastante estable. Su velocidad de reacción más lenta también puede hacer que la reacción de vinilsulfona de PEG sea más fácil de controlar.

La PEGilación específica del sitio en los restos de cisteinilo nativos rara vez se lleva a cabo, ya que estos restos generalmente están en forma de enlaces disulfuro o son necesarios para la actividad biológica. Por otro lado, la mutagénesis dirigida al sitio se puede usar 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 NHS de PEG, 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 NHS de PEG 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 luego 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, particularmente a pH más bajo cuando se vuelve volátil.

Debido a los múltiples restos de lisina en la mayoría de las proteínas, la PEGilación específica de sitio puede ser un desafío. Afortunadamente, debido a que estos reactivos reaccionan con grupos amino no protonados, es posible dirigir la PEGilación a grupos amino de pK más bajo 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 grupo épsilon-amino de los restos de lisina. Mediante la PEGilación de la molécula a pH 7 o inferior, con frecuencia se puede lograr una alta selectividad para el extremo N. 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 la PEGilación.

Hay varios parámetros a considerar cuando se desarrolla un procedimiento de PEGilación. Afortunadamente, en 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 a 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 parte de 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 la amina, excepto que el pH puede ser aún más crítico, particularmente cuando se dirige al grupo amino N-terminal.

Para las modificaciones específicas de amina y tiol, las condiciones de reacción pueden afectar 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 es solo 70 por ciento activo, la cantidad de PEG utilizada debería asegurar que solo las moléculas de PEG activas se cuenten en la estequiometría de reacción de proteína a PEG.

VI. Proteínas y péptidos

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones novedosas que comprenden al

menos una proteína o péptido, tal como una cist(e)inasa genomanipulada. Estos péptidos pueden estar comprendidos en una proteína de fusión o conjugarse con un agente como se describe anteriormente.

5 Como se usa en el presente documento, una proteína o péptido generalmente se refiere a, pero sin limitación, una proteína de más de aproximadamente 200 aminoácidos, hasta una secuencia de longitud completa traducida de un gen; un polipéptido de más de aproximadamente 100 aminoácidos; y/o un péptido de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos. Por conveniencia, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento.

10 Como se usa en el presente documento, un "resto de aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido de origen natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier imitador de aminoácidos conocido en la materia. En determinadas realizaciones, los restos de la proteína o péptido son secuenciales, sin que ningún aminoácido interrumpa la secuencia de restos de aminoácidos. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender una o más fracciones de no aminoácidos. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la proteína o péptido puede ser interrumpida por una o más fracciones de no aminoácidos.

15 En consecuencia, el término "proteína o péptido" abarca secuencias de aminoácidos que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes encontrados en proteínas de origen natural, o al menos un aminoácido modificado o inusual.

20 Las proteínas o péptidos pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluida la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas estándar de biología molecular, 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 previamente, y se pueden encontrar en bases de datos informatizadas conocidas por los expertos en la materia. Una de esas bases de datos son las bases de datos Genbank y GenPept del Centro Nacional de Información Biotecnológica (disponibles en la red mundial en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones de codificación para genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas desveladas en el presente documento o como serían conocidas por los expertos en la materia. Como alternativa, los expertos en la técnica conocen diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos.

25 VII. Ácidos nucleicos y vectores

En determinados aspectos, se pueden desvelar secuencias de ácido nucleico que codifican una cist(e)inasa genomanipulada o una proteína de fusión que contiene una cist(e)inasa genomanipulada. Dependiendo de qué sistema de expresión se use, las secuencias de ácido nucleico se pueden seleccionar en base a métodos convencionales. Por ejemplo, si la cist(e)inasa genomanipulada procede de CGL de primate y contiene múltiples codones que rara vez se utilizan en *E. coli*, entonces eso puede interferir con la expresión. Por lo tanto, los genes respectivos o variantes de los mismos pueden ser optimizados con codones para la expresión de *E. coli*. También se pueden usar varios vectores para expresar la proteína de interés, tal como la cist(e)inasa genomanipulada. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores plasmídicos, vectores virales, transposones o vectores basados en liposomas.

30 VIII. Células hospedadoras

35 Las células hospedadoras pueden ser cualquiera que se pueda transformar para permitir la expresión y secreción de cist(e)inasa genomanipulada y conjugados de la misma. Las células hospedadoras pueden ser bacterias, células de mamífero, levaduras u hongos filamentosos. Varias bacterias incluyen *Escherichia* y *Bacillus*. Las levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia* encontrarían uso como una célula hospedadora apropiada. Se pueden usar varias especies de hongos filamentosos como hospedadores de expresión, incluidos los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochliobolus*, y *Pyricularia*.

40 Ejemplos de organismos hospedadores utilizables incluyen bacterias, por ejemplo, MC1061 de *Escherichia coli*, derivados de BRB1 de *Bacillus subtilis* (Sibakov *et al.*, 1984), SAI123 de *Staphylococcus aureus* (Lordanescu, 1975) o *Streptococcus lividans* (Hopwood *et al.*, 1985); levaduras, por ejemplo, AH 22 de *Saccharomyces cerevisiae* (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).

45 Ejemplos de células hospedadoras de mamíferos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61), células de hipófisis de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658). Lo anterior es ilustrativo pero no limitativo de los muchos organismos hospedadores posibles conocidos en la materia. En principio, En principio, todos los hospedadores capaces de secretar pueden usarse, ya sea procariontes o eucariontes.

5 Las células hospedadoras de mamífero que expresan *cist(e)inasa* genomanipulada y/o sus proteínas de fusión se cultivan en condiciones normalmente empleadas para cultivar la línea celular parental. En general, las células se cultivan en un medio estándar que contiene sales y nutrientes fisiológicos, tal como RPMI, MEM, IMEM o DMEM estándar, normalmente complementado con suero al 5 % -10 %, tal como suero bovino fetal. Las condiciones de cultivo también son estándar, por ejemplo, los cultivos se incuban a 37 °C en cultivos estacionarios o de rodillos hasta alcanzar los niveles deseados de proteínas.

IX. Purificación de proteínas

10 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 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 lograr una purificación parcial o completa (o purificación hasta homogeneidad) a menos que se especifique lo contrario. Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de
15 un péptido puro son la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel de poli(acrilamida), cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad y el enfoque isoeléctrico. Un método particularmente eficaz para purificar péptidos es la cromatografía líquida de rápido rendimiento (FPLC, de sus siglas en inglés) o incluso la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, de sus siglas en inglés).

20 Una proteína o péptido purificado está destinado a referirse a una composición, aislable de otros componentes, en la que la proteína o péptido se purifica en cualquier grado en relación con su estado obtenible naturalmente. Una proteína o péptido aislado o purificado, por lo tanto, también se refiere a una proteína o péptido libre del entorno en el que puede ocurrir naturalmente. En general, "purificado" se referirá a una composición de proteína o péptido que ha sido sometida a fraccionamiento para eliminar otros componentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad
25 biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificado", esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o más de las proteínas en la composición.

30 Los expertos en la materia conocen bien diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o por desnaturalización por calor, seguido por centrifugación; etapas de cromatografía, tales como de intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxiapatita y cromatografía de afinidad; isoelectroenfoque; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Como es generalmente conocido en la materia, se cree que el orden de llevar a cabo las diversas
35 etapas de purificación se puede cambiar, o que se pueden omitir determinadas etapas, y todavía dar como resultado un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

Los expertos en la materia conocen varios métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o 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 SDS/PAGE. Un método preferido para
40 evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, compararla con la actividad específica del extracto inicial y así calcular el grado de pureza en la misma, evaluado por un "número de veces de purificación". 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 de si la proteína o péptido expresado exhibe o no una actividad detectable.
45

No existe un requisito general de que siempre se proporcione la proteína o péptido en su estado más purificado. De hecho, se considera que los productos sustancialmente menos purificados pueden tener utilidad en determinadas realizaciones. La purificación parcial se puede lograr utilizando menos etapas de purificación en combinación, o
50 utilizando diferentes formas del mismo esquema general de purificación. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC generalmente dará como resultado una purificación "x veces" mayor que la misma técnica que utiliza un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que muestran un grado más bajo de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto proteico, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.
55

En determinadas realizaciones, una proteína o péptido puede aislarse o purificarse, por ejemplo, una *cist(e)inasa* genomanipulada, una proteína de fusión que contiene el AAD genomanipulado o una *cist(e)inasa* genomanipulada después de la PEGilación. Por ejemplo, un marcador His o un epitopo de afinidad puede estar comprendido en dicha *cist(e)inasa* genomanipulada para facilitar la purificación. La cromatografía de afinidad es un procedimiento
60 cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre una sustancia a aislar y una molécula a la que se puede unir específicamente. Este es un tipo de interacción receptor-ligando. El material de la columna se sintetiza mediante el acoplamiento covalente de uno de los socios de unión a una matriz insoluble. Luego, el material de la columna es capaz de adsorber específicamente la sustancia de la solución. La elución ocurre cambiando las condiciones a aquellas en las que no se producirá la unión (por ejemplo, pH, fuerza iónica, temperatura, etc., alterado). La matriz debe ser una sustancia que no adsorba moléculas de manera significativa y que tenga una amplia gama de estabilidad química, física y térmica. El ligando debe estar acoplado de tal manera que no afecte sus propiedades de unión. El
65

ligando también debe proporcionar una unión relativamente apretada. Debería ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, de sus siglas en inglés) es un método cromatográfico en el que las moléculas en solución se separan en función de su tamaño, o en términos más técnicos, su volumen hidrodinámico. Por lo general, se aplica a moléculas grandes o complejos macromoleculares, 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 comparación con el nombre de cromatografía de permeación en gel, que se usa cuando se usa un disolvente orgánico como fase móvil.

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 en función del tamaño. Siempre que todas las partículas se carguen simultáneamente o casi simultáneamente, las partículas del mismo tamaño deben eluirse juntas. Cada columna de exclusión de tamaño tiene un intervalo de pesos moleculares que se pueden separar. El límite de exclusión define el peso molecular en el extremo superior de este intervalo y es donde las moléculas son demasiado grandes para quedar 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 suficientemente pequeño pueden penetrar completamente en los poros de la fase estacionaria y todas las moléculas por debajo de esta masa molecular son tan pequeñas que se eluyen como una banda única.

La cromatografía líquida de alto rendimiento (o cromatografía líquida de alta presión, HPLC) es una forma de cromatografía en columna que se usa con frecuencia en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos. La HPLC utiliza una columna que contiene material de empaquetamiento cromatográfico (fase estacionaria), una bomba que mueve las fases móviles a través de la columna y un detector que muestra los tiempos de retención de las moléculas. El tiempo de retención varía según las interacciones entre la fase estacionaria, las moléculas que se analizan y los disolventes utilizados.

X. Composiciones farmacéuticas

Se considera que la nueva cist(e)inasa se puede administrar sistémicamente o localmente para inhibir el crecimiento de células tumorales y, lo más preferentemente, para destruir células cancerosas en pacientes con cáncer con cánceres localmente avanzados o metastásicos. Se pueden administrar por vía intravenosa, intratecal y/o intraperitoneal. Se pueden administrar solos o en combinación con fármacos antiproliferativos. En una realización, se administran para reducir la carga de cáncer en el paciente antes de la cirugía u otros procedimientos. Como alternativa, se pueden administrar después de la cirugía para garantizar que el cáncer restante (por ejemplo, el cáncer que la cirugía no pudo eliminar) no sobreviva.

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

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

Cuando se consideran aplicaciones clínicas, puede ser necesario preparar composiciones farmacéuticas que comprenden 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 variantes de CGL o agentes adicionales disueltos o dispersados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptables" se refieren a composiciones y entidades moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se administra a un animal, como, por ejemplo, un ser humano, según sea adecuado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una variante de CGL aislada por el método divulgado en el presente documento, o un principio activo adicional será conocido por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., 1990, incorporada por referencia en el presente documento. Además, para la administración en animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo exige la Oficina de Patrones Biológicos 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 de retardo de la absorción, sales, conservantes,

fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sabría un experto 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 la que un vehículo convencional cualquiera sea incompatible con el principio activo, se considera su uso en composiciones farmacéuticas.

Determinadas realizaciones de la presente invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si tienen que administrarse en forma sólida, líquida o de aerosol, y si tienen que ser estériles para las vías de administración, tal como inyección. Las composiciones se pueden administrar por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intramuscular, subcutánea, mucosa, oral, tópica, local, mediante inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), mediante inyección, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada bañando células diana directamente, 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 un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., 1990, incorporado en el presente documento por referencia).

Los polipéptidos modificados pueden formularse en una composición en forma de base libre, neutra o en forma 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, como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico o ácido mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas, como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, como formuladas para administraciones parenterales, como soluciones inyectables o aerosoles para la administración a los pulmones, o formuladas para administraciones alimentarias, como cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Además, 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 efectividad terapéutica de una composición contenida en el mismo, su uso en la composición administrada para su uso en la práctica de los métodos es apropiado. 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. Además, puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante conservantes, como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, pero no se limitan 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, mediante solución, suspensión, emulsión, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Dichos procedimientos son rutinarios para los expertos en la materia.

En una realización específica de la presente invención, la composición se combina o mezcla a fondo con un vehículo semisólido o sólido. La mezcla puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, tal como triturando. También se pueden añadir agentes estabilizantes en el proceso de mezcla para proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, es decir, desnaturalización en el estómago. Ejemplos de estabilizadores para su uso en una composición incluyen tampones, aminoácidos, tales como glicina y lisina, hidratos de carbono, tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

En realizaciones adicionales, la presente invención puede referirse al uso de una composición farmacéutica de vehículo lipídico que incluye variantes de CGL, uno o más lípidos y un disolvente acuoso. Como se usa en el presente documento, el término "lípido" se definirá para incluir cualquiera de una amplia gama de sustancias que son característicamente insolubles en agua y extraíbles con un disolvente orgánico. Los expertos en la materia conocen bien esta amplia clase de compuestos, y como el término "lípido" se usa en el presente documento, no se limita a ninguna estructura particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede 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 materia e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfingolípidos, glucolípidos, sulfatos, lípidos con ácidos grasos unidos a éter y éster, lípidos polimerizables y combinaciones de los mismos. Por supuesto, los compuestos, además de los específicamente descritos en el presente documento, que los expertos en la técnica entienden como lípidos también están abarcados por las composiciones y los métodos.

Un experto habitual en la materia estaría familiarizado con la gama de técnicas que se pueden emplear para dispersar

una composición en un vehículo lipídico. Por ejemplo, la cist(e)inasa genomanipulada o una proteína de fusión de la misma se puede dispersar en una solución que contiene un lípido, disolver con un lípido, emulsionar con un lípido, mezclar con un lípido, combinar con un lípido, unir covalentemente a un lípido, contener como una suspensión en un lípido, contener o formar un complejo con una micela o liposoma, o asociarse de otra manera con un lípido o una estructura lipídica mediante 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 se puede determinar por factores físicos y fisiológicos, como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, las intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, la idiopatía del paciente y la vía de administración. Dependiendo de la dosis y la ruta de administración, el número de administraciones de una dosis preferida y/o una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la respuesta del sujeto. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración de principio activo (o principios activos) en una composición y la dosis adecuada para el sujeto individual.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 % de un principio activo. En otras realizaciones, un principio activo puede comprender entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente un 25 % y aproximadamente un 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivado en el mismo. Naturalmente, la cantidad de principio activo (o principios activos) en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores, tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, ruta de administración, la vida media del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, serán considerados por un experto en la materia para preparar dichas formulaciones farmacéuticas, y como tales, pueden ser deseables una variedad de dosificaciones y regímenes 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 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 miligramos/kg/peso corporal o más por administración y cualquier intervalo que pueda derivarse a partir de los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números listados en el presente documento, un intervalo de aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal a aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, *etc.*, se puede administrar, basándose en los números descritos anteriormente.

XI. Tratamientos Combinados

En determinadas realizaciones, las composiciones de las presentes realizaciones implican la administración de una cist(e)inasa en combinación con una segunda terapia o terapia adicional. Dicha terapia se puede aplicar en el tratamiento de cualquier enfermedad asociada con la dependencia de cist(e)ina. Por ejemplo, la enfermedad puede ser cáncer.

Las composiciones, que incluyen terapias combinadas, potencian el efecto terapéutico o protector y/o aumentan el efecto terapéutico de otra terapia contra el cáncer o anti-hiperproliferativa. Los métodos y composiciones terapéuticos y profilácticos se pueden proporcionar en una cantidad combinada eficaz para lograr el efecto deseado, tal como la destrucción de una célula cancerosa y/o la inhibición de la hiperproliferación celular. Este proceso puede implicar la administración a las células tanto de una cist(e)inasa como de una segunda terapia. Un tejido, tumor o célula se puede exponer a una o más composiciones o formulaciones farmacológicas que comprenden uno o más de los agentes (es decir, una cist(e)inasa o un agente contra el cáncer), o poniendo en contacto el tejido, tumor y/o célula con dos o más composiciones o formulaciones distintas, en donde una composición proporciona 1) una cist(e)inasa, 2) un agente contra el cáncer, o 3) tanto una cist(e)inasa como un agente contra el cáncer. Además, se considera que dicha terapia combinada se pueda usar junto con quimioterapia, radioterapia, terapia quirúrgica o inmunoterapia.

Los términos "contraído" y "expuesto", 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 quimioterapéutico o radioterapéutico se administran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para lograr la destrucción celular, por ejemplo, ambos agentes se administran a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o evitar que se divida.

Una cist(e)inasa puede administrarse antes, durante, después o en varias combinaciones en relación con un tratamiento contra el cáncer. Las administraciones pueden estar en intervalos que van de simultáneo, a minutos, a

- días, a semanas. En las realizaciones en las que la cist(e)inasa se proporciona a un paciente por separado de un agente contra el cáncer, en general, se aseguraría de que no pase un período de tiempo significativo entre el momento de administración, de tal forma que los dos compuestos sigan siendo capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado en el paciente. En dichos casos, se considera que uno pueda proporcionar a un paciente la cist(e)inasa y la terapia contra el cáncer dentro de aproximadamente 12 a 24 o 72 h entre sí y, más particularmente, dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser conveniente extender el período de tiempo para el tratamiento de manera significativa, donde transcurren varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.
- En determinadas realizaciones, un curso de tratamiento durará de 1 a 90 días o más (este intervalo incluye días intermedios). Se considera que se puede administrar un agente en cualquier día del día 1 al día 90 (este intervalo incluye 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 intermedios) o cualquier combinación de los mismos. Dentro de un solo día (período de 24 horas), el paciente puede recibir una o múltiples administraciones de los agentes. Además, después de un curso de tratamiento, se considera que hay un período de tiempo en el que no se administra ningún tratamiento contra el cáncer. Este período de tiempo puede durar 1-7 días, y/o 1-5 semanas, y/o 1-12 meses o más (este intervalo incluye días intermedios), dependiendo de la condición del paciente, tal como su pronóstico, resistencia, salud, etc. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario.
- Se pueden emplear diversas combinaciones. Para el siguiente ejemplo, una cist(e)inasa es "A" y una terapia contra el cáncer 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
- La administración de cualquier compuesto o terapia de las presentes realizaciones a un paciente seguirá protocolos generales para la administración de dichos compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, caso de haberla, de los agentes. Por lo tanto, en algunas realizaciones hay una etapa de monitorizar la toxicidad que es atribuible a la terapia de combinación.
- A. Quimioterapia
- Se puede usar una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las presentes realizaciones. El término "quimioterapia" se refiere al uso de fármacos para tratar el cáncer. Se utiliza un "agente quimioterapéutico" para connotar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento contra el cáncer. Estos agentes o fármacos se clasifican por su modo de actividad dentro de una célula, por ejemplo, si afectan, y en qué etapa afectan, el ciclo celular. Como alternativa, un agente puede caracterizarse en función de su capacidad de reticular directamente el ADN, intercalarse en el ADN o inducir anomalías cromosómicas y mitóticas al afectar la síntesis de ácido nucleico.
- ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquil sulfonatos, tales como busulfán, improsulfán, y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuoona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clorofazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente calicamicina gamma 1I y calicamicina omega 1I); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autrarnicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalarnicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de 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, epitostanol, mepitostana, y testolactona; antiadrenales, tales como mitotano y trilostano; reforzador de ácido fólico, tal como ácido fronílico; aceglatona; glucósido de adelfosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; democolcina; 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 de polisacárido PSK; razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel
 5 gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; complejos de coordinación de platino, tal 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 la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; carboplatino, procarbazona, plicomicina, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa,
 10 transplatino y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

B. Radioterapia

Otros factores que causan daño en el ADN y se han utilizado ampliamente incluyen lo que comúnmente se conoce
 15 como rayos γ , rayos X y/o la administración directa de radioisótopos a las células tumorales. También se consideran otras formas de factores que dañan el ADN, como las microondas, la irradiación con haz de protones (patentes de EE.UU. 5.760.395 y 4.870.287) y la 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 rayos X van desde dosis diarias de 50 a 200
 20 roentgens durante períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, la fuerza y el tipo de radiación emitida y la absorción por las células neoplásicas.

C. Inmunoterapia

El experto en la materia entenderá que las inmunoterapias pueden usarse en combinación o junto con los métodos de
 25 las realizaciones. En el contexto del tratamiento del cáncer, los inmunoterapéuticos, en general, se basan en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para atacar y destruir las células cancerosas. El rituximab (RITUXAN®) es un ejemplo de ello. 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
 30 células para afectar realmente la destrucción celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, la cadena A de ricina, toxina colérica, toxina Pertussis, etc.) y 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 diana de células tumorales. Varias células efectoras
 35 incluyen linfocitos T citotóxicos y células NK.

En un aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral debe tener algún marcador que pueda ser dirigido, *es decir*, no
 40 está presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para dirigir en el contexto de las presentes realizaciones. Los marcadores tumorales comunes incluyen CD20, antígeno carcinoembrionario, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de laminina, erb B, y p155. Un aspecto alternativo de la inmunoterapia es combinar los efectos antineoplásicos con los efectos inmunoestimuladores. También existen moléculas inmunoestimulantes que incluyen:
 45 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, tales como el ligando FLT3.

Ejemplos de inmunoterapias actualmente bajo investigación o en uso son adyuvantes inmunitarios, por ejemplo,
 50 *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos (patentes de EE.UU. 5.801.005 y 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998); terapia de 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 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 EE.UU. 5.824.311). Se considera que una o más terapias contra el cáncer pueden emplearse con las terapias de anticuerpos descritas en el presente documento.

D. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a algún tipo de cirugía, que incluye cirugía
 60 preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa incluye la resección en la que todo o parte del tejido canceroso se extrae físicamente, se extirpa y/o destruye y se puede usar 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 tumoral se refiere a la extirpación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento mediante cirugía incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs).

Tras la escisión de parte o la totalidad de las células cancerosas, tejidos o tumores, se puede formar una cavidad en
 65 el cuerpo. El tratamiento se puede lograr mediante perfusión, inyección directa o aplicación local en el área con una

terapia contra el cáncer adicional. 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 diferentes dosis también.

5 E. Otros agentes

Se considera que se pueden usar otros agentes en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes que afectan la regulación positiva de los receptores de la superficie celular y las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos u otros agentes biológicos. Los aumentos en la señalización intercelular mediante el aumento del número de uniones GAP aumentarían los efectos antihiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas vecinas. En otras realizaciones, los agentes citostáticos o de diferenciación se pueden usar en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Los inhibidores de la adhesión celular se consideran para mejorar la eficacia de las presentes realizaciones. Ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son los inhibidores de la cinasa de adhesión focal (FAK, de sus siglas en inglés) y la lovastatina. Se considera además que otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, como el anticuerpo c225, podrían usarse en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones para mejorar la eficacia del tratamiento.

20 XII. Kits

Determinados aspectos se refieren a kits, 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 lograr la administración de dichas composiciones. Por ejemplo, un kit objeto puede comprender una composición farmacéutica y un catéter para lograr la inyección intravenosa directa de la composición en un tumor canceroso. En otras realizaciones, un kit objeto puede comprender ampollas precargadas de una cist(e)inasa genomanipulada, formulada opcionalmente como un producto farmacéutico, o liofilizada, para su uso con un dispositivo de administración.

Los kits pueden comprender un envase con una etiqueta. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los envases pueden estar formados a partir de una diversidad de materiales, tal como vidrio o plástico. El envase puede contener una composición que incluye una cist(e)inasa genomanipulada, que es eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tal y como se ha descrito con anterioridad. La etiqueta en el envase puede indicar que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y también puede indicar instrucciones para su uso *in vivo* o *in vitro*, tal como las descritas anteriormente. El kit de la invención comprenderá normalmente el envase descrito anteriormente y uno o más envases que comprenden materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones de uso.

40 XIII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor para que funcionen bien en la práctica de la invención, y por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplo 1 - Cistationina- γ -liasa como armazón para una enzima cist(e)inasa humana

Debido a los efectos no deseados de la inmunogenicidad observados clínicamente con el uso de agentes terapéuticos de proteínas no humanas, los inventores buscaron genomanipular la actividad degradadora de cistina/cisteína terapéuticamente relevante en una enzima humana (es decir, genomanipular una enzima con altos valores de k_{cat} y bajos de K_M para cistina/cisteína y que muestre también una especificidad favorable). Los seres humanos tienen una enzima llamada cistationina- γ -liasa (hCGL) cuya función es catalizar la última etapa en la vía de transulfuración de mamíferos (Rao *et al.*, 1990), a saber, la conversión de L-cistationina en L-cisteína, alfa-cetobutirato y amoniaco. La CGL humana también puede degradar débilmente la L-cisteína y su forma disulfuro, la L-cistina, lo que la convierte en un candidato ideal para la genomanipulación. Usando mutagénesis guiada estructural y filogenéticamente, las variantes de hCGL fueron genomanipuladas para hidrolizar eficazmente *tanto* L-cisteína como L-cistina.

60 Ejemplo 2 - Síntesis génica y expresión de cistationina- γ -liasa humana y cist(e)inasa humana

El gen hCGL contiene múltiples codones que rara vez se utilizan en *E. coli* y pueden interferir con la expresión. Por lo tanto, para optimizar la expresión de proteínas en *E. coli*, los genes respectivos se ensamblaron con oligonucleótidos optimizados con codones diseñados usando el programa informático DNA-Works (Hoover *et al.*, 2002). Cada construcción contiene un sitio de restricción *NcoI* N-terminal, un marcador His₆ N-terminal en marco y un sitio EcoRI C-terminal para simplificar la clonación. Después de la clonación en un vector pET28a (Novagen), *E. coli* (BL21) que

5 contenía un vector de expresión de hCGL apropiado se cultivó a 37 °C usando medio de caldo de cultivo Terrific (TB) que contenía kanamicina 50 µg/ml en matraces con 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 y se indujeron con IPTG 0,5 mM y se les permitió expresar proteínas durante 12 h adicionales. Los sedimentos celulares se recogieron luego mediante centrifugación y se resuspendieron en un tampón IMAC (NaPO₄ 10 mM/imidazol 10 mM/NaCl 300 mM, pH 8). Después de la lisis mediante una celda de presión francesa, los lisados se centrifugaron a 20.000 xg durante 20 min 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 luego se eluyó con un tampón de elución IMAC (NaPO₄ 50 mM/imidazol 250 mM/NaCl 300 mM, pH 8). Las fracciones que contenían enzima se incubaron luego con fosfato de piridoxal (PLP, de sus siglas en inglés) 10 mM durante una hora a 25 °C. Usando un dispositivo de filtro centrífugo de 10.000 MWCO (AMICON™), se intercambiaron las proteínas con tampón varias veces en una solución de PBS 100 mM, glicerol al 10 %, pH 7,3. Se congelaron alícuotas de la enzima hCGL o la enzima variante de hCGL rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. La enzima hCGL o variante de hCGL purificada de esta manera fue > 95 % homogénea según se evaluó mediante SDS-PAGE y tinción con coomassie. Se calculó que el rendimiento era ~ 200-300 mg/l de cultivo en función del coeficiente de extinción calculado, $\epsilon_{280} = 29.870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en una concentración de tampón final de clorhidrato de guanidinio 6 M, tampón de fosfato 20 mM, pH 6,5 (Gill y von Hippel, 1989).

Ejemplo 3 - Cribado en placa de 96 pocillos para actividad de cist(e)inasa y clasificación de clones

20 La CGL humana degrada lentamente la L-cisteína en piruvato, amoníaco y H₂S, y convierte la L-cistina en piruvato, amoníaco y tiocisteína ($k_{cat}/K_M \sim 0,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ y $0,5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, respectivamente) (FIG. 1). La tiocisteína se degrada además de forma no enzimática a L-cisteína y H₂S. Un ensayo colorimétrico para la detección de piruvato usando 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) (Takakura *et al.*, 2004) se ajustó a un formato de placa de 96 pocillos para cribar bibliotecas pequeñas y clasificar clones con la mayor actividad de cistina y/o cisteína liasa. Este cribado en placa proporciona un método fácil para elegir los clones más activos de las bibliotecas mutagénicas. Los clones que muestran una mayor actividad que los controles parentales se seleccionaron para una caracterización adicional.

30 Se recogieron colonias individuales que contenían hCGL mutagenizada, o controles de hCGL, en placas de cultivo de 96 pocillos que contenían 75 µl de medio TB/pocillo que contenía kanamicina 50 µg/ml. Estos cultivos se hacen crecer a 37 °C en un agitador de placas hasta alcanzar un DO₆₀₀ de ~ 0,8-1. Después de enfriar a 25 °C, se añadieron 75 µl adicionales de medio/pocillo que contenía kanamicina 50 µg/ml y IPTG 2 mM. La expresión se realizó a 25 °C con agitación durante al menos 2 h, después de lo cual se transfirieron 100 µl de cultivo/pocillo a una placa de ensayo de 96 pocillos. Luego se centrifugaron las placas de ensayo para sedimentar las células, se eliminaron los medios y se lisaron las células mediante la adición de 50 µl/pocillo de reactivo de extracción de proteína B-PER (Pierce). Después de purificar mediante centrifugación, el lisado se dividió entre dos placas para la incubación con L-cistina 0,8 mM en una placa y L-cisteína 1,2 mM en la otra y se incubó a 37 °C durante 10-12 h. Luego, se derivatizó la reacción mediante la adición de 3 partes de solución MBTH al 0,03 % en acetato de sodio 1 M pH 5. Las placas se calentaron a 50 °C durante 40 minutos y después del enfriamiento se leyeron a $\lambda = 320 \text{ nm}$ en un lector de placas de microtitulación.

40 Ejemplo 4 - Efecto de la mutagénesis sobre los restos E59, R119 y E339 de hCGL

El análisis estructural indicó que los restos E59, R119 y E339 probablemente estaban implicados en el reconocimiento de hCGL para su sustrato L-cistionina. Las bibliotecas de saturación de codones NNS (N puede ser A, T, G o C; S puede ser G o C) se construyeron en estos sitios y se cribaron utilizando los siguientes cebadores mutagénicos: (E59) directo 5'-GGCCAGCATAGCGGTTTTNNSTATAGCCGTAGCGGC (SEQ ID NO: 12), inverso 5'-GCCGCTACGGCTATASNNAAAACCGCTATGCTGGCC (SEQ ID NO: 13), (R119) directo 5'-GTATGGTGGGACCAATNNSTATTTCGTCAGGTGGCG (SEQ ID NO: 14), inverso 5'-CGCCACCTGACGGAATASNNATTGGTCCCACCATAC (SEQ ID NO: 15), (E339) directo 5'-CTGAAACTGTTTACCCTGGCANNAGCTTGGCGGCTTTG (SEQ ID NO: 16), e inverso 5'-CAAAGCCGCCAAGCTSNNTGCCAGGGTAAACAGTTTCAG (SEQ ID NO: 17), usando el gen hCGL como plantilla de ADN y cebadores finales específicos; inverso 5'-GATATACCATGGGAGGCCATCACCACCATCATCATGGCGGGCAGGAAAAGGATG CG (Seq ID NO: 18) e inverso 5'-CTCGAATTCTCAACTGTGGCTTCCCGATGGGGATGGGCCGCTTTCAGCGCCTGA TCC (SEQ ID NO: 19). El producto de PCR se digirió con *Nco*I y *Eco*RI y se ligó en el vector pET28a con ADN ligasa T4. Las uniones resultantes se transformaron directamente en *E. coli* (BL21) y se colocaron en placas sobre placas de LB-kanamicina para el cribado posterior como se describe en el Ejemplo 3. Todas las bibliotecas se cribaron en exceso dos veces de su tamaño teórico. Se aislaron los clones que mostraban actividad y se determinaron las secuencias de las variantes del gen hCGL para identificar las mutaciones.

60 Las variantes de la enzima se purificaron a más del 95 % de homogeneidad según lo evaluado mediante SDS-PAGE. Se demostró que la incubación con PLP mejora la actividad específica presumiblemente porque las células de *E. coli* utilizadas para la expresión no producen PLP suficiente para la cantidad de enzima producida. Una vez que la enzima se había cargado con PLP, era estable y no había pérdida del cofactor y, por lo tanto, no se pudo detectar una disminución de la actividad después de varios días de almacenamiento.

65 Ejemplo 5 - Caracterización de la variante de cist(e)inasa humana hCGL-TV

Se encontró que una variante particular identificada en el cribado como que tiene la actividad catalítica más alta para degradar tanto L-cistina como L-cisteína tiene las siguientes mutaciones: E59T, un cambio de codón sinónimo de R119R y E339V. Esta variante se denominó hCGL-TV (FIG. 5) y se caracterizó por su capacidad para degradar L-cist(e)ina en un tampón PBS 100 mM a pH 7,3 y 37 °C utilizando un ensayo MBTH a escala de 1 ml similar al descrito en el Ejemplo 3. En estas condiciones, se encontró que la variante hCGL-TV degrada L-cistina con una k_{cat} de $1,0 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $0,16 \pm 0,02 \text{ mM}$, y una k_{cat}/K_M de $6,3 \pm 1,0 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (FIG. 2A). Se encontró además que la variante hCGL-TV tenía una k_{cat} de $0,8 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$, una K_M de $0,25 \pm 0,04 \text{ mM}$, y una k_{cat}/K_M de $3,2 \pm 0,6 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ para la degradación de L-cisteína (FIG. 2B).

La estabilidad en suero de hCGL-TV se probó mediante incubación en suero humano combinado a 37 °C. En los puntos temporales, se extrajeron alícuotas y se analizó la actividad restante usando L-cistina como sustrato. Después de representar los datos, se encontró que la variante hCGL-TV era muy estable con un $T_{0.5}$ aparente de $228 \pm 6 \text{ h}$ (FIG. 3).

Ejemplo 6 - Citotoxicidad *in vitro* de hCGL-TV contra líneas celulares de tumor de próstata

La citotoxicidad *in vitro* de hCGL-TV se evaluó utilizando líneas celulares de tumor de próstata DU145 y PC3. Se sembraron células a -3000 células/pocillo en medio RPMI-1640 y se dejaron crecer durante 24 h antes de que se agregaran a cada pocillo titulaciones de hCGL-TV que oscilaban entre 0-10 μM . Después de la incubación durante 3 días, el número relativo de células supervivientes se evaluó colorimétricamente utilizando el ensayo (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS). El análisis de los datos resultantes produjo un valor de CI_{50} aparente de -60 nM tanto para la línea celular DU145 como para la línea celular PC3 (FIG. 4A y 4B, respectivamente).

Ejemplo 7 - Preparación farmacológica de la cist(e)inasa humana

La enzima hCGL-TV se purificó como se describe en el Ejemplo 2 con una excepción: después de unirse a la columna IMAC, la proteína se lava abundantemente (90-100 volúmenes de columna) con un tampón IMAC que contiene TRITON™ 114 al 0,1 % en la muestra. La muestra se lavó nuevamente con 10-20 volúmenes de columna de tampón IMAC, y luego se eluyó con un tampón de elución IMAC (NaPO_4 50 mM/imidazol 250 mM/ NaCl 300 mM, pH 8). El lavado con TRITON™ 114 se empleó para la eliminación de 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 10.000 MWCO (AMICON®). Posteriormente, se añadió PLP a una concentración de 10 mM y la proteína se incubó durante 1 hora a 25 °C. Luego se añadió Methoxy PEG Succinimidyl Carboxymethyl Ester 5000 MW (JenKem Technology) a hCGL-TV a una relación molar de 80:1 y se dejó reaccionar durante 1 hora a 25 °C bajo agitación constante. La mezcla resultante se intercambió ampliamente con tampón (PBS con glicerol al 10 %) usando un dispositivo de filtración de 100.000 MWCO (AMICON®), y se esterilizó con un filtro de jeringa de 0,2 micras (VWR). Se analizó el contenido de lipopolisacárido (LPS) en todas las enzimas PEGiladas usando un kit de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (Cape Cod Incorporated).

Ejemplo 8 - Genomanipulación de cist(e)inasa de primate

Las secuencias de CGL de especies de primate, tales como chimpancés (*Pan troglodytes*; SEQ ID NO: 9), bonobos (*Pan paniscus*; SEQ ID NO: 10), orangutanes (*Pongo abelii*; SEQ ID NO: 7), y macacos (*Macaca fascicularis*; SEQ ID NO: 8) son, respectivamente, aproximadamente un 99,3 %, 98,8 %, 96 % y 95,3 % idénticas en composición de aminoácidos a CGL humana (SEQ ID NO: 1). Debido a la similitud de secuencia, es probable que las CGL genomanipuladas de estos organismos no causen respuestas inmunitarias significativas si se introducen en seres humanos como agente terapéutico. Las enzimas CGL de primate con mutaciones que confieren una actividad mejorada de cist(e)inasa se construirán usando técnicas de mutagénesis estándar como se describe en el Ejemplo 4. Los genes resultantes se clonarán en pET28a y la secuencia se verificará para asegurar que no se incorporan mutaciones no deseadas. Las construcciones utilizadas para expresar y purificar las enzimas resultantes se describen anteriormente. Se espera que las CGL de primate genomanipuladas con posiciones de aminoácidos correspondientes a 59T y 339V (SEQ ID NO: 3-6) tengan una actividad mejorada tanto para L-cistina como para L-cisteína con valores de k_{cat}/K_M de al menos $1 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ o superior. La estabilidad en suero a 37 °C de las CGL de primate genomanipuladas con actividad mejorada de cist(e)inasa se determinará como se describió anteriormente.

Ejemplo 9 - Análisis farmacodinámicos (PD, de sus siglas en inglés) de PEG-hCGL-TV en ratones

Se inyectaron i.p. ratones FVB machos con 50 mg/kg de PEG-hCGL-TV y se sacrificaron en los días 0, 1, 2, 4 y 6 (n = 5 por grupo) para la recolección de sangre y suero. Las muestras de suero se mezclaron con una mezcla estándar interna de cistina y cisteína deuteradas 10 picomoles y se ultrafiltraron usando dispositivos centrífugos NANOSEP® OMEGA™, corte de 3 kDa (Pall Life Biosciences) (Tiziani *et al.*, 2008; Tiziani *et al.*, 2013). Las fracciones polares filtradas se cromatografiaron usando una columna BEH C18 de fase inversa, 1,7 μm , 2,1 x 150 mm (THERMO SCIENTIFIC™ ACCELA® 1250 UPLC, Waters Corporation, EE.UU.) y se introdujeron en un espectrómetro de masas EXACTIVE™ Plus ORBITRAP™ junto con ionización por electropulverización (Thermo Fisher Scientific, San Jose,

CA). Los datos se adquirieron en el modo centroide MS desde un intervalo de masa de 50 a 700 m/z con el programa informático XCALIBUR™ provisto con el instrumento. Las concentraciones relativas de cistina y cisteína se informan como valores medios \pm EEM. Como puede observarse en la FIG. 6A, PEG-hCGL-TV reduce drásticamente los niveles de cistina sérica ($> 95\%$) durante más de 96 horas, y una reducción del 80 % en los niveles de cisteína durante más de 48 horas (FIG. 6B).

Ejemplo 10 - Análisis farmacocinéticos (PK, de sus siglas en inglés) de PEG-hCGL-TV en ratones

La persistencia circulatoria de PEG-hCGL-TV se evaluó utilizando las mismas muestras de suero que se describen en el Ejemplo 9. Usando una técnica de densitometría de transferencia de puntos, las muestras se sondaron con un anticuerpo anti-hCGL (anti-CTH de conejo Sigma n.º C8248) seguido de la adición de anti-IgG-FITC de conejo (Santa Cruz Biotechnology n.º sc-2012) para visualización por excitación a 488 nm en un escáner TYPHOON™ (GE Healthcare). Usando el programa informático ImageJ (Schneider *et al.*, 2012), las bandas de densitometría de las muestras se compararon con las valoraciones de cantidades conocidas de PEG-hCGL-TV dentro de la misma transferencia para construir una curva estándar y calcular los niveles relativos de PEG-hCGL-TV en suero. Ajustar estos datos a un modelo extravascular de administración (Foye *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2012) demostró una absorción $T_{1/2}$ de aproximadamente 23 horas, y una eliminación $T_{1/2}$ de 40 ± 7 horas para PEG-hCGL-TV (FIG. 7).

Ejemplo 11 - Efecto de PEG-hCGL-TV sobre el crecimiento de células tumorales HMVP2 en un modelo de aloinjerto

La capacidad de PEG-hCGL-TV para inhibir el desarrollo tumoral se evaluó en un modelo de aloinjerto de carcinoma de próstata de ratón (HMVP2). Para este experimento, las células HMVP2 se cultivaron como esferoides y se usaron para iniciar tumores en los flancos de cuatro grupos (ocho ratones/grupo) de ratones FVB/N machos después de inyección s.c. Las células se cultivaron durante aproximadamente dos semanas, momento en el cual se hicieron palpables los tumores pequeños en el sitio de inyección. A cada uno de los cuatro grupos se les administró luego PEG-hCGL-TV a 50 o 100 mg/kg, PBS (control), o PEG-hCGL-TV inactivado por calor (control adicional) a 100 mg/kg mediante inyección i.p. cada 4 días. Como se muestra en la FIG. 8, el tratamiento con PEG-hCGL-TV produjo una inhibición dramática del crecimiento tumoral, que fue de manera estadística altamente significativa en ambas dosis (50 y 100 mg/kg) en comparación con ambos grupos de control (es decir, grupos de control de inyección de PBS sola y de inyección de enzima inactivada). Es importante destacar que la dosificación repetida fue muy bien tolerada durante todo el período de tratamiento. A este respecto, no hubo diferencias en el peso corporal o el consumo de alimentos entre los grupos de ratones tratados y de control en el transcurso del experimento. Finalmente, al finalizar este experimento, se realizó una autopsia a los ratones y no se observaron anomalías en ningún órgano principal tras la evaluación macroscópica.

Ejemplo 12 - Efecto de PEG-hCGL-TV sobre el crecimiento de células tumorales de próstata PC3 en un modelo de xenoinjerto

La capacidad de PEG-hCGL-TV para inhibir el desarrollo tumoral se evaluó en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de próstata humano (PC3). Para este experimento, se usaron células PC3 para iniciar tumores en los flancos de cuatro grupos (siete ratones/grupo) de ratones FVB/N machos después de inyección s.c. Las células se cultivaron durante 10 días, momento en el que se hicieron palpables los tumores en el sitio de inyección. A cada uno de los cuatro grupos se les administró luego PEG-hCGL-TV a 50 o 100 mg/kg, PBS (control), o PEG-hCGL-TV inactivado por calor (control adicional) a 100 mg/kg mediante inyección i.p. cada 4 días. Como puede observarse en la FIG. 9, el tratamiento con PEG-hCGL-TV causó un pronunciado retraso del crecimiento tumoral, en ambas dosis (50 y 100 mg/kg) en comparación con ambos grupos de control (es decir, grupos de control de inyección de PBS sola y de inyección de enzima inactivada). La dosificación repetida también se toleró muy bien en esta cepa de ratón durante todo el período de tratamiento sin diferencias en el peso corporal o el consumo de alimentos entre los grupos de ratones tratados y de control en el transcurso del experimento. Al finalizar este experimento, se realizó una autopsia a los ratones y no se observaron anomalías en ningún órgano principal tras la evaluación macroscópica.

Referencias

- Patente de EE.UU. N.º 4.870.287
- Patente de EE.UU. N.º 5.739.169
- Patente de EE.UU. N.º 5.760.395
- Patente de EE.UU. N.º 5.801.005
- Patente de EE.UU. N.º 5.824.311
- Patente de EE.UU. N.º 5.830.880
- Patente de EE.UU. N.º 5.846.945
- Patente de EE.UU. N.º 5.889.155
- Publicación de patente de EE.UU. 2009/0304666
- Austin-Ward y Villaseca, Revista Medica de Chile, 126(7):838-845, 1998.
- Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1994.
- Bukowski *et al.*, Clinical Cancer Res., 4(10):2337-2347, 1998.

Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
 Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
 Doxsee et al., Sulfasalazine-induced cystine starvation: Potential use for prostate cancer therapy. *The Prostate*, 67(2): 162-171,2007.
 5 Foye et al., *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
 Gill y von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182(2):319-326, 1989.
 Glode et al., Cysteine auxotrophy of human leukemic lymphoblasts is associated with decreased amounts of intracellular cystathionase protein. *Biochemistry*, 20(5): 1306-1311, 1981.
 10 Guan et al., The x c-cystine/glutamate antiporter as a potential therapeutic target for small-cell lung cancer: use of sulfasalazine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(3):463-472, 2009.
 Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
 Harkki et al., *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.
 Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
 15 Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
 Hopwood et al., *En: Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.
 Hoover et al., The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J Bio Chem*, 277(40):37647-37654, 2002.
 20 Kim et al., Expression of cystathionine β -synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Oncology Reports*, 21(6):1449-1454, 2009.
 Hui y Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
 Ito et al., *J. Biochem.*, 79:1263, 1976.
 Link et al., Cystathionase: a potential cytoplasmic marker of hematopoietic differentiation. *Blut*, 47(1):31-39, 1983.
 25 Lordanescu, *J. Bacteriol*, 12:597 601, 1975.
 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.
 Penttila et al., *Gene*, 61:155-164, 1987.
 Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
 30 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*, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
 Schneider et al., 671 nih image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9:2012.
 35 Sibakov et al., *Eur. J. Biochem.*, 145:567 572, 1984.
 Stone et al., Strategies for optimizing the serum persistence of engineered human arginase I for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 158:171-179, 2012.
 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.
 40 Tiziani et al., Optimized metabolite extraction from blood serum for 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 377:16-23, 2008.
 Tiziani et al., Metabolomics of the tumor microenvironment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*, 8:e82859, 2013.
 Ward, *Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi*, Helsinki, 119-128, 1989.
 45 Wawrzynczak y Thorpe, *En: Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.
 Zhang et al., Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Cell Biology*, 14(3):276-286, 2012.
 Zhao et al., Frequent Epigenetic Silencing of the Folate-Metabolising Gene Cystathionine-Beta-Synthase in Gastrointestinal Cancer. *PLoS One*, 7(11):e49683, 2012.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Board of Regents, The University of Texas System
 55 <120> Enzimas degradadoras de cistina/cisteína de primate genomanipuladas como agentes antineogénicos
 <130> UTFB.P1017WO
 <150> Documento US 61/871.727
 60 <151> 29/08/2013
 <150> Documento US 61/948.106
 <151> 05/03/2014
 65 <160> 19

ES 2 745 287 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 405

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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 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

10

ES 2 745 287 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 Thr 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
 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

ES 2 745 287 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 Thr 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
 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

ES 2 745 287 T3

Gln Ala Ala Pro Gly Gln His Ser Gly Phe Thr 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

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

ES 2 745 287 T3

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 Val 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

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

10 <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 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 Thr 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

ES 2 745 287 T3

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

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala

ES 2 745 287 T3

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

5 <210> 6
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <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 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 Thr 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

ES 2 745 287 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 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

ES 2 745 287 T3

385 390 395 400

Ser Gly Ser His Ser
405

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

<400> 7

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

ES 2 745 287 T3

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 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

10

ES 2 745 287 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 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

ES 2 745 287 T3

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

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

5

<400> 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 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

10

ES 2 745 287 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 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

ES 2 745 287 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 Ser
 405

- 5 <210> 11
- <211> 415
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Polipéptido sintético
- 10 <400> 11

Met Gly Gly His His His His His His Gly Gly Gln Glu Lys Asp Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Gln Gly Phe Leu Pro His Phe Gln His Phe Ala Thr Gln Ala
 20 25 30

Ile His Val Gly Gln Asp Pro Glu Gln Trp Thr Ser Arg Ala Val Val
 35 40 45

Pro Pro Ile Ser Leu Ser Thr Thr Phe Lys Gln Gly Ala Pro Gly Gln
 50 55 60

His Ser Gly Phe Thr Tyr Ser Arg Ser Gly Asn Pro Thr Arg Asn Cys
 65 70 75 80

Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Asp Gly Ala Lys Tyr Cys Leu Ala
 85 90 95

Phe Ala Ser Gly Leu Ala Ala Thr Val Thr Ile Thr His Leu Leu Lys
 100 105 110

Ala Gly Asp Gln Ile Ile Cys Met Asp Asp Val Tyr Gly Gly Thr Asn
 115 120 125

Arg Tyr Phe Arg Gln Val Ala Ser Glu Phe Gly Leu Lys Ile Ser Phe
 130 135 140

Val Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Leu Glu Ala Ala Ile Thr Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Lys Leu Val Trp Ile Glu Thr Pro Thr Asn Pro Thr Gln Lys Val
 165 170 175

ES 2 745 287 T3

Ile Asp Ile Glu Gly Cys Ala His Ile Val His Lys His Gly Asp Ile
 180 185 190

Ile Leu Val Val Asp Asn Thr Phe Met Ser Pro Tyr Phe Gln Arg Pro
 195 200 205

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

Asn Gly His Ser Asp Val Val Met Gly Leu Val Ser Val Asn Cys Glu
 225 230 235 240

Ser Leu His Asn Arg Leu Arg Phe Leu Gln Asn Ser Leu Gly Ala Val
 245 250 255

Pro Ser Pro Ile Asp Cys Tyr Leu Cys Asn Arg Gly Leu Lys Thr Leu
 260 265 270

His Val Arg Met Glu Lys His Phe Lys Asn Gly Met Ala Val Ala Gln
 275 280 285

Phe Leu Glu Ser Asn Pro Trp Val Glu Lys Val Ile Tyr Pro Gly Leu
 290 295 300

Pro Ser His Pro Gln His Glu Leu Val Lys Arg Gln Cys Thr Gly Cys
 305 310 315 320

Thr Gly Met Val Thr Phe Tyr Ile Lys Gly Thr Leu Gln His Ala Glu
 325 330 335

Ile Phe Leu Lys Asn Leu Lys Leu Phe Thr Leu Ala Val Ser Leu Gly
 340 345 350

Gly Phe Glu Ser Leu Ala Glu Leu Pro Ala Ile Met Thr His Ala Ser
 355 360 365

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

Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Glu Glu Asp Leu Leu Glu Asp Leu
 385 390 395 400

Asp Gln Ala Leu Lys Ala Ala His Pro Pro Ser Gly Ser His Ser
 405 410 415

<210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g o t

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (21)
 <223> s es c o g

15 <400> 12
 ggccagcata gcggttttnn statagccgt agcggc 36

20 <210> 13
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Polinucleótido sintético

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16) .. (16)
 <223> s es c o g

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

40 <400> 13
 gccgctacgg ctatasnaa aaccgctatg ctggcc 36

45 <210> 14
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Polinucleótido sintético

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (19)
 <223> s es c o g

65 <400> 14
 gtatggtggg accaatnnst attccgtca ggtggcg 37

70 <210> 15
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Polinucleótido sintético

ES 2 745 287 T3

5	<p><220> <221> misc_feature <222> (19).. (19) <223> s e s c o g</p>	
10	<p><220> <221> misc_feature <222> (20).. (21) <223> n e s a, c, g o t</p>	
	<p><400> 15 cgccacctga cggaaatasn nattggtccc accatac</p>	37
15	<p><210> 16 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
20	<p><220> <223> Polinucleótido sintético</p>	
25	<p><220> <221> misc_feature <222> (22).. (23) <223> n e s a, c, g o t</p>	
30	<p><220> <221> misc_feature <222> (24).. (24) <223> s e s c o g</p>	
	<p><400> 16 ctgaaactgt ttaccctggc annsagcttg ggcggctttg</p>	40
35	<p><210> 17 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
40	<p><220> <223> Polinucleótido sintético</p>	
45	<p><220> <221> misc_feature <222> (17)..(17) <223> s e s c o g</p>	
50	<p><220> <221> misc_feature <222> (18)..(19) <223> n e s a, c, g o t</p>	
	<p><400> 17 caaagccgcc caagctsnnt gccagggtaa acagtttcag</p>	40
55	<p><210> 18 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
60	<p><220> <223> Polinucleótido sintético</p>	
65	<p><400> 18 gatataccat gggaggccat caccacatc atcatggcgg gcaggaaaag gatgcg</p>	56

ES 2 745 287 T3

<210> 19
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Polinucleótido sintético
10 <400> 19
ctcgaattct caactgtggc ttcccgatgg gggatgggcc gcttcagcg cctgatcc 58

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una enzima cistationina-γ-liasa (CGL) de primate modificada aislada que tiene al menos dos sustituciones con respecto a una secuencia de aminoácidos de CGL de primate nativa de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 y 7-10, incluyendo dichas al menos dos sustituciones una treonina en la posición 59 y una valina en la posición 339 de la secuencia de CGL de primate nativa, definiéndose además dicha enzima CGL modificada como una enzima degradadora de cistina/cisteína.
- 10 2. La enzima de la reivindicación 1, en donde la enzima está acoplada a polietilenglicol (PEG).
3. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la reivindicación 1.
- 15 4. El ácido nucleico de la reivindicación 3, en donde el ácido nucleico está optimizado con codones para la expresión en bacterias, hongos, insectos o mamíferos.
- 20 5. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4.
6. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, siendo dicha célula hospedadora una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de insecto o una célula de mamífero.
- 25 7. Una formulación farmacéutica que comprende la enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición que comprende la enzima de acuerdo con la reivindicación 1 o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en un método para el tratamiento de una célula tumoral en un sujeto.
- 30 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enzima está acoplada a polietilenglicol (PEG).
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el ácido nucleico está optimizado con codones para la expresión en bacterias, hongos, insectos o mamíferos.
- 35 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición está formulada para administración intratumoral, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intraocular, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical u oral.
- 40 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición está formulada para la administración a un medio nutriente de la célula tumoral.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el medio nutriente es sangre, líquido linfático o líquido cefalorraquídeo.
- 45 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, que además comprende al menos una segunda terapia contra el cáncer.
15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la segunda terapia contra el cáncer es quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o terapia con citocinas.

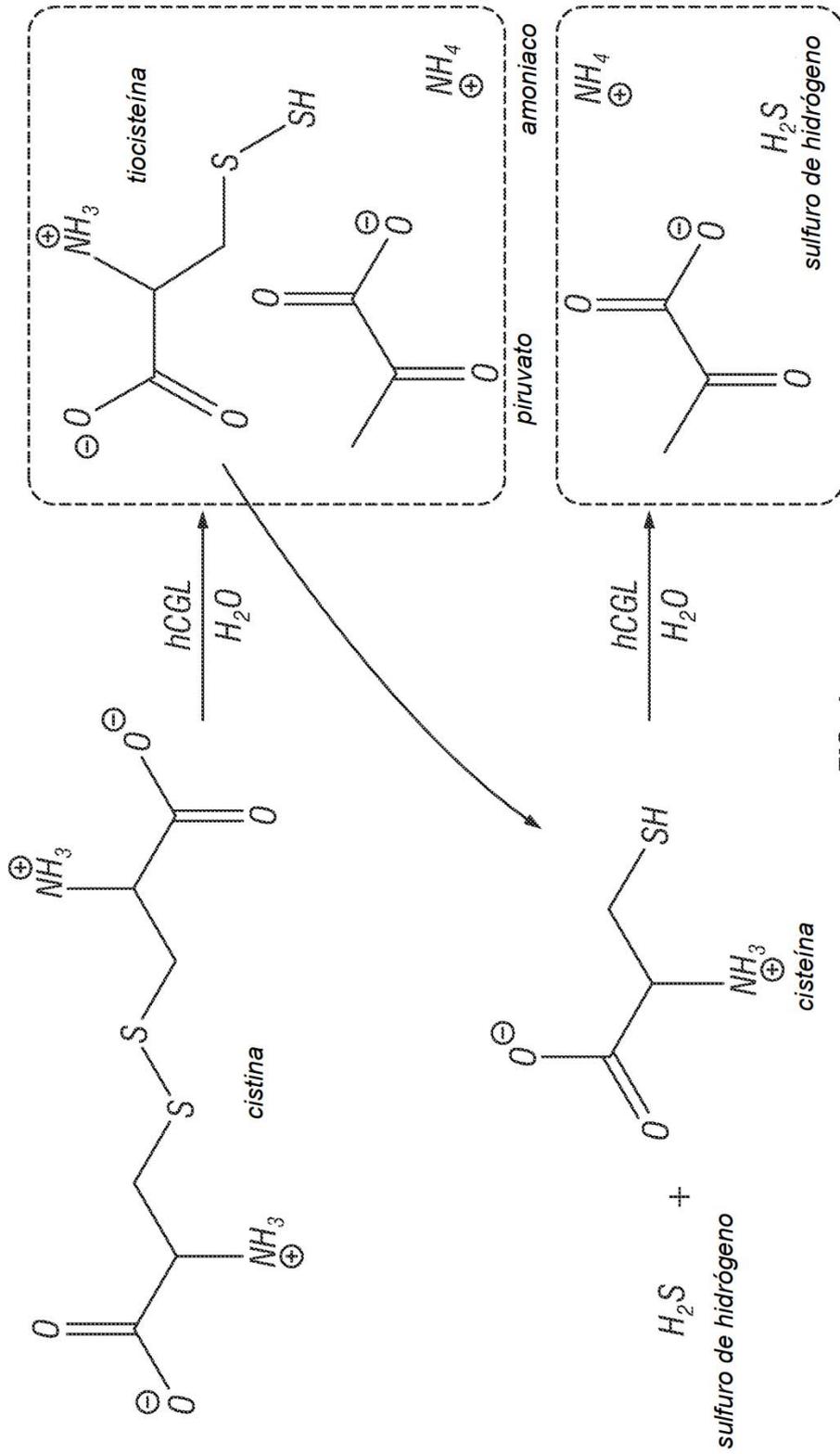


FIG. 1

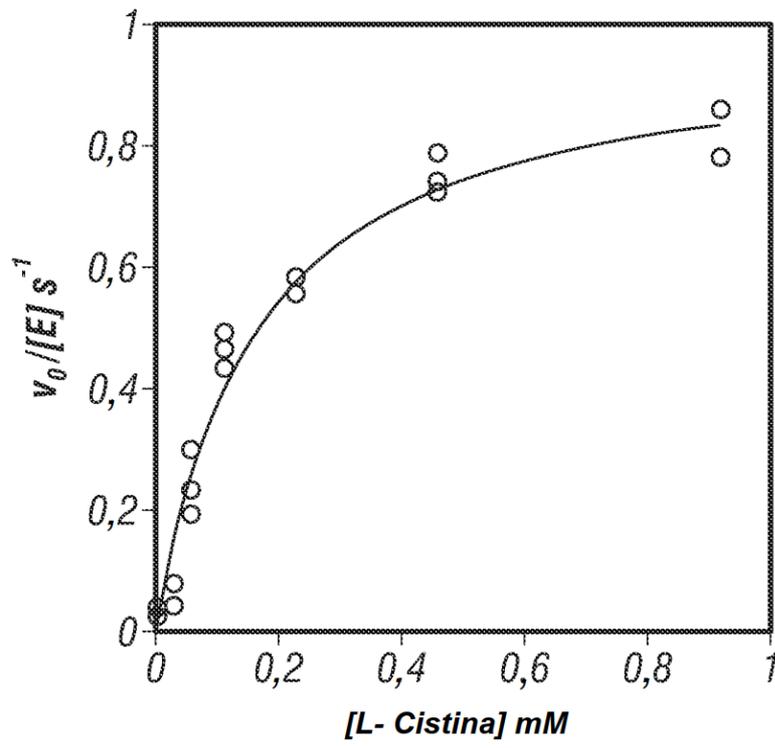


FIG. 2A

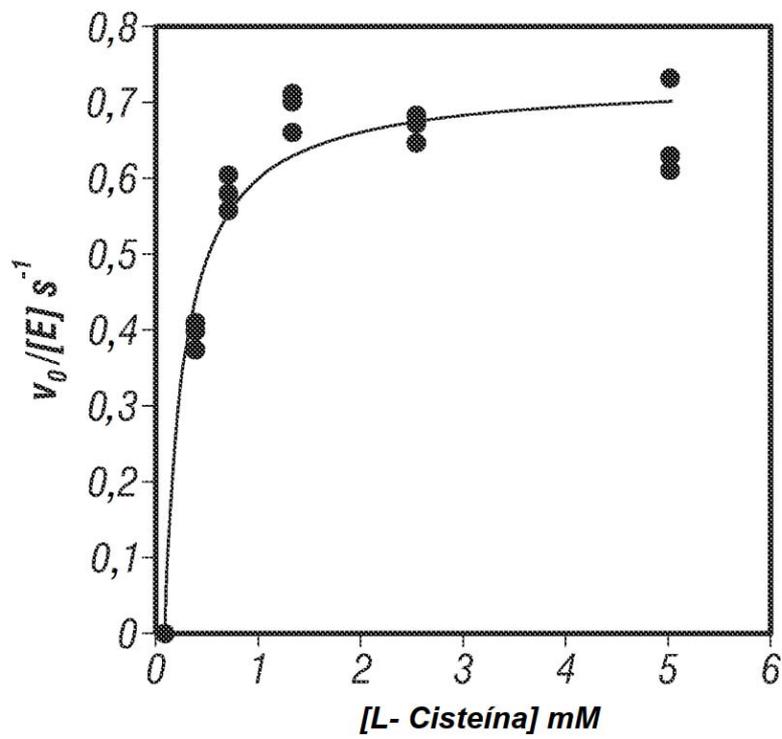


FIG. 2B

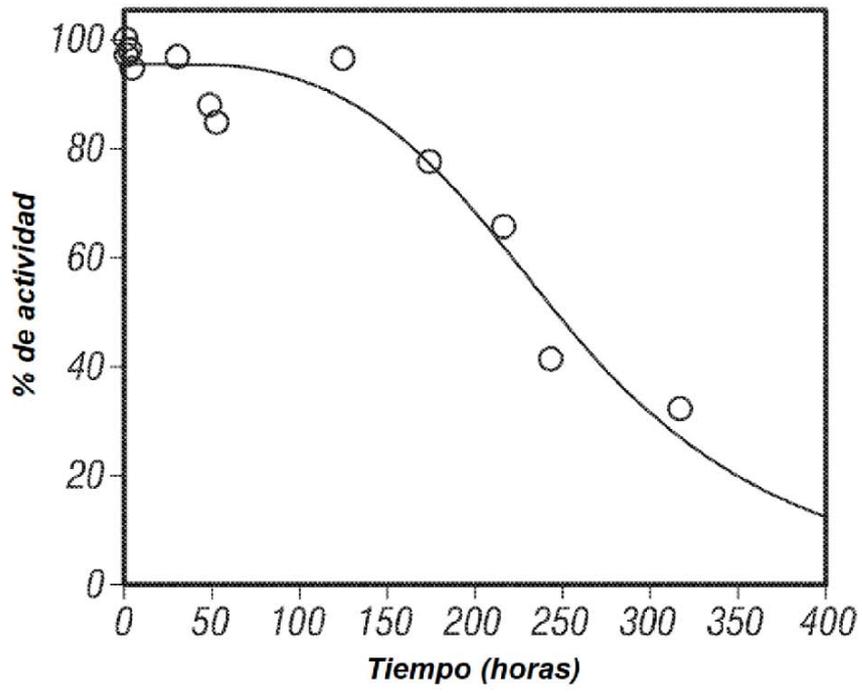


FIG. 3

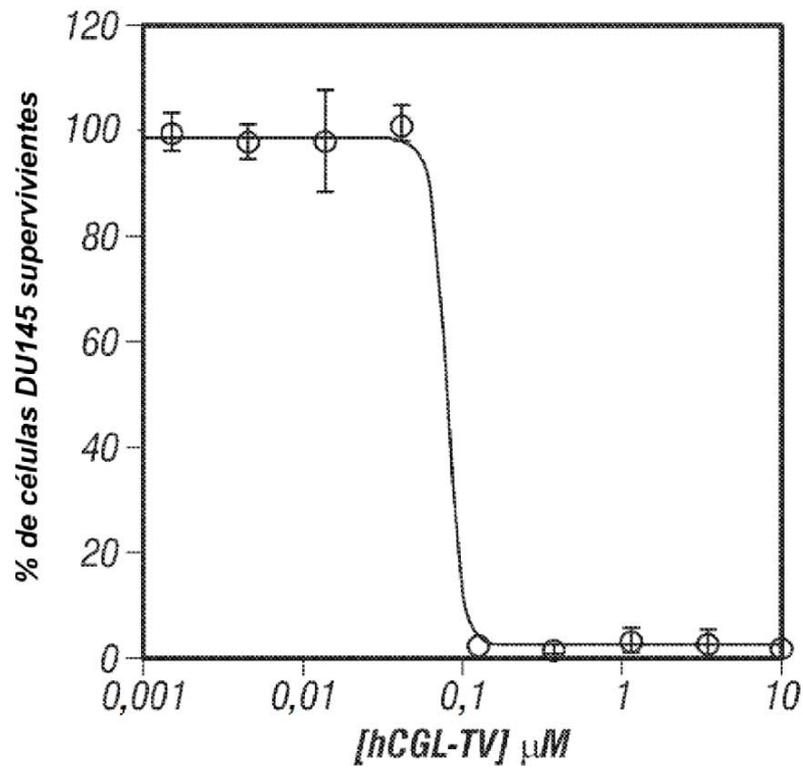


FIG. 4A

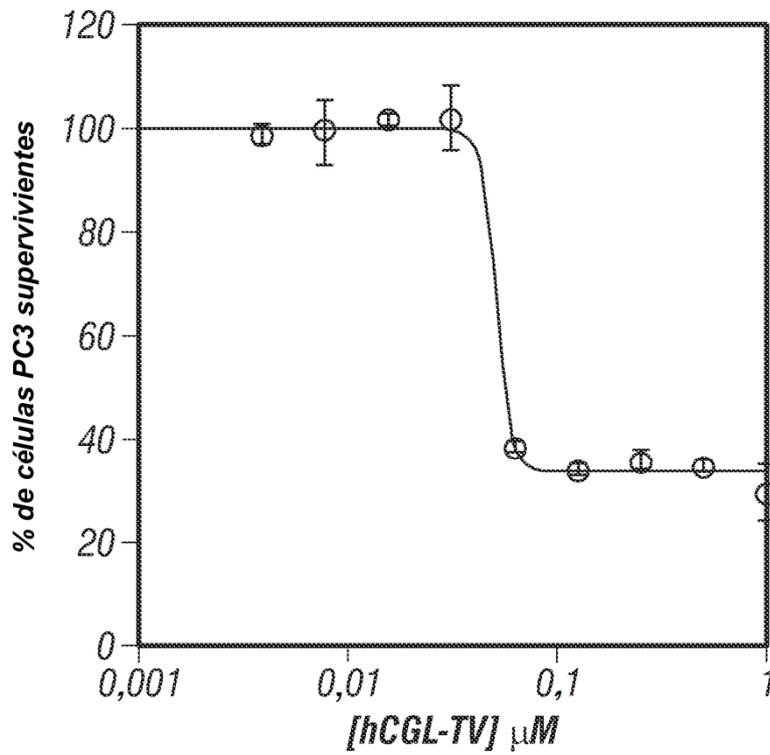


FIG. 4B

MGGHHHHHHGGQEKDASSQGFLPHFQHFATQAIHVGQDPEQWTSRAVVPPI SLSTTFKQG
 APGQHSGFTYSRSGNPTRNCLEKAVAALDGAKYCLAFASGLAATVTITHL
 LKAGDQIICMDDVYGGTNRNRYFRQVASEFGLKISFVDCSKIKLLEAAITPE
 TKLVWIETPTNPTQKVIDIEGCAHIVHKHGDII LVVDNTEFMSPIYFQRPLA
 LGADISMYATKYMNGHSDVVMGLVSVNCESLHNRLRFLQNSLGAVPSPI
 DCYLCNRGLKTLHVRMEKHFKNMVAQAQFLESNPWVEKVIYPGLPSHPQH
 ELVKRQCTGCTGMVTFYIKGTLQHAEIFLKNLKLFTLAVSLGGFESLAEL
 PAIMTHASVLKNDRDVLGISDTLIRLSVGLLEDEEDLLEDLDQALKAHPP
 SGSHS

FIG. 5

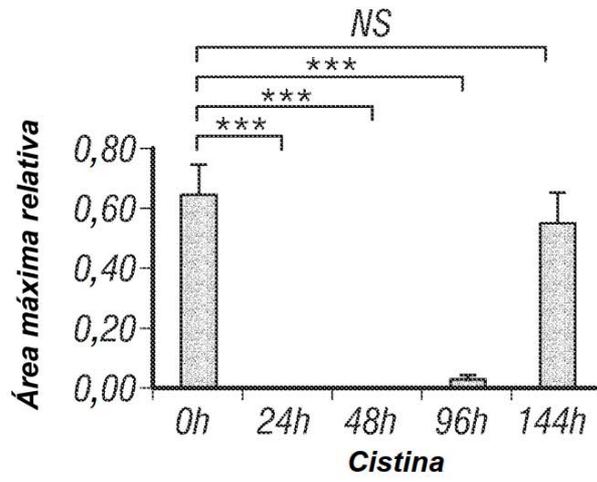


FIG. 6A

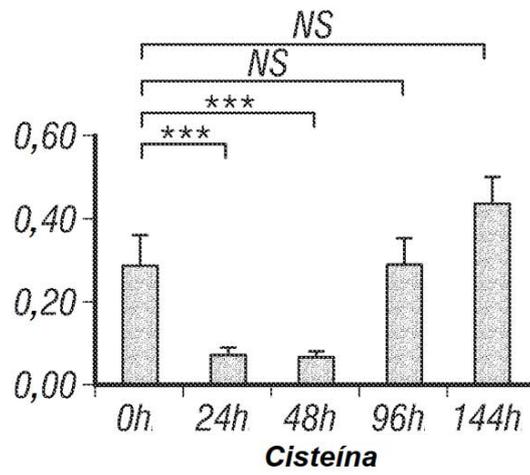


FIG. 6B

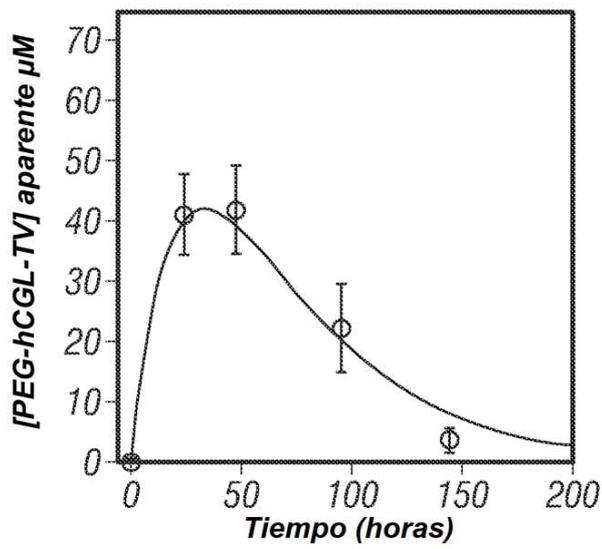


FIG. 7

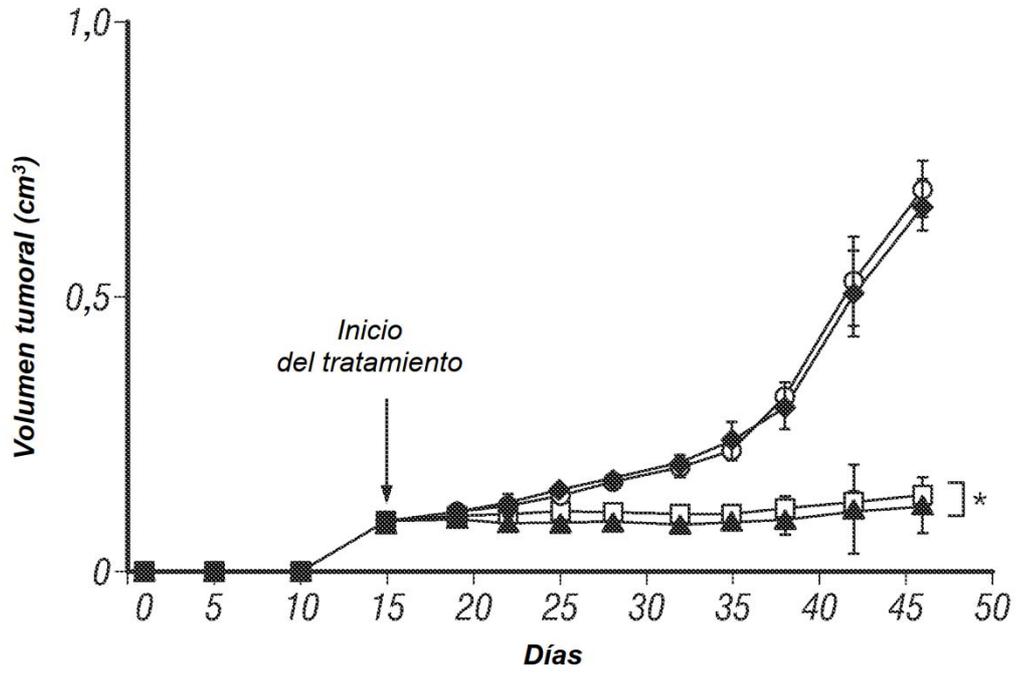


FIG. 8

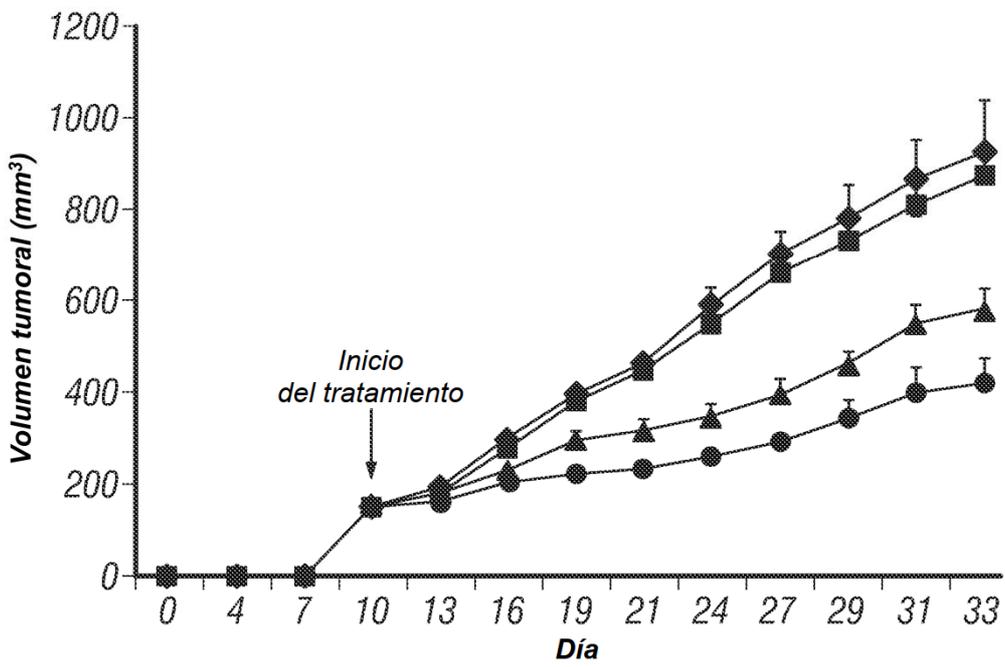


FIG. 9