

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 962**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012 PCT/EP2012/061497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172074**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12729514 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2721057**

54 Título: **Polipéptidos aislados de Brevibacterium aurantiacum y su utilización para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

**15.06.2011 EP 11305748
05.07.2011 US 201161504363 P**

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

15.04.2020

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cédex 13, FR;
INRA (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) (25.0%);
UNIVERSITÉ PARIS SUD-PARIS XI (25.0%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS (25.0%)**

72 Inventor/es:

**MACHOVER, DAVID y
BONNARME, PASCAL**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 753 962 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

Polipéptidos aislados de *Brevibacterium aurantiacum* y su utilización para el tratamiento de cáncer

5 CAMPO DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a polipéptidos aislados de *Brevibacterium aurantiacum* que muestran las actividades de metionina gamma-liasa y homocisteinasa y su uso para el tratamiento del cáncer.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

La citotoxicidad de las células cancerosas cultivadas bajo privación de metionina ha sido bien establecida. El agotamiento de la metionina induce la muerte de las células cancerosas, mientras que las células normales son mucho más resistentes. Las razones de esta selectividad relativa son desconocidas. Las células normales y tumorales pueden sintetizar metionina siempre que se proporcione suficiente ácido fólico, cobalamina y homocisteína. Sin embargo, la mayoría de las células tumorales requieren mayores cantidades de metionina que lo que pueden sintetizar y, en ausencia de un suministro exógeno, experimentan la inhibición del crecimiento o mueren.

El agotamiento de metionina in vitro e in vivo puede lograrse mediante la acción de metionina gamma-liasa (L-metionina- α -desamino- γ -mercaptoetano liasa; MGL) que cataliza irreversiblemente la α,γ -eliminación de L-metionina dando lugar a la producción de metanotiol, α -cetobutirato y amoníaco. Se han producido varias MGL mediante purificación a partir de varios microorganismos o por recombinación de genes que codifican la enzima procedente de diversas especies bacterianas y protozoos. La mayoría de los estudios sobre la acción antitumoral del agotamiento de la metionina han utilizado la MGL de la pseudomona potencialmente patógena, *Pseudomonas putida* (*Pp-MGL*).

El agotamiento de metionina obtenida con *Pp-MGL* mejora la acción citotóxica de la fluoropirimidina 5-fluorouracilo (FUra), un agente utilizado actualmente para el tratamiento de diversos tipos de cáncer humano (Machover et al, 2001;.. Machover et al, 2002). La potenciación es debida a modificaciones de los grupos intracelulares de folatos reducidos inducidos por el agotamiento de la metionina y, posiblemente, a través de cambios en la expresión de los mecanismos celulares que favorecen la muerte celular, que pueden estar relacionados con la desmetilación del ADN (Machover et al, 2001; Machover et al. 2002). Otros investigadores han demostrado la potenciación de FUra y cisplatino en ratones portadores de tumores mediante la administración simultánea de *Pp-MGL*.

Los experimentos con animales se han realizado con el objetivo de introducir *Pp-MGL* recombinante en el ámbito clínico. Sin embargo, se han observado síndromes de choque anafiláctico letales cuando los monos fueron reestimulados con la proteína, lo que ha impedido un mayor desarrollo de *Pp-MGL* nativa recombinante. Los intentos de reducción de la inmunogenicidad de la proteína a través de la pegilación no han tenido éxito hasta ahora.

Estos datos preclínicos creían que la inmunogenicidad prohibitiva de *P.p.MGL*, y posiblemente la de otros MGL posibles y bien caracterizadas descritas hasta ahora, que derivan todas de diversos microorganismos que son patógenos potenciales para los seres humanos (es decir, procedentes de las bacterias *Aeromonas sp.*, *Citrobacter freundii*, *Porphyromonas gingivalis*, y *Treponema denticola*, y los protozoos *Trichomonas vaginalis*, y *Entamoeba histolytica*), no podían permitir la administración intravenosa de la enzima necesaria para el agotamiento de metionina sostenido en plasma en condiciones seguras.

Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar nuevos fármacos contra el cáncer. De esta manera, se ha sugerido que la caracterización de nuevas dianas terapéuticas que inhiben el crecimiento de células tumorales puede ser muy deseable. Existe por tanto una necesidad en la técnica para la metionina gamma-liasa derivada de un microorganismo patógeno no abundantemente presentes en los alimentos, esta MGL se pueden beneficiar de la tolerancia inmune por vía oral que permite su administración en el torrente sanguíneo en un sujeto en necesidad del mismo para el tratamiento de cáncer.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION:

La presente solicitud describe procedimientos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer. Más específicamente, la solicitud describe metionina gamma-liasa de *Brevibacterium aurantiacum* y su uso para el tratamiento del cáncer.

La presente invención se define por las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere al desarrollo de metionina gamma-liasa de *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175, anteriormente *Brevibacterium linens*).

Los presentes inventores han estudiado la expresión de genes mediante análisis de transcriptoma en presencia de diversos aminoácidos que contienen azufre en *B. aurantiacum* (ATCC 9175 un microorganismo de maduración del queso caracterizado por el aroma y la producción de pigmento, y por su propiedad de inhibir el crecimiento de patógenos alimentarios. Sorprendentemente, estos estudios condujeron a la identificación de la secuencia de una nueva posible metionina gamma-liasa (MGL), muy diferente de la descrita previamente en el mismo microorganismo (Amarita et al., 2004 y Dias et al., 1998, que comprende 425 aminoácidos y es capaz de degradar L-cisteína).

Los inventores han transformado una cepa de producción de *E. coli* con un plásmido de expresión que contiene el gen optimizado de la posible MGL de *B. aurantiacum*. La enzima recombinante MGL-BL929 producida ha demostrado una actividad específica para la metionina entre 4,33 U/mg y 7,21 U/mg, es decir, los valores cercanos a los encontrados para la enzima derivada de *P. putida*. Los inventores han demostrado que la MGL-BL929 producida posee, además de la actividad de metionina gamma-liasa, la actividad de homocisteinasa. Los inventores también han demostrado que MGL-BL929

- agota la metionina y la homocisteína a partir de medios de cultivo de células tumorales durante largos períodos,
- es estable bajo las condiciones de cultivo de células tumorales, así como en suero humano *in vitro*,
- posee alta actividad citotóxica contra diversas células tumorales humanas que crecen en cultivo,
- no afecta al crecimiento de células normales a concentraciones que son altamente citotóxicas para células cancerosas,
- potencia (modula) la actividad citotóxica de agentes citostáticos, y
- elude la resistencia previa de las células a citostáticos

Definiciones

El término "metionina gamma-liasa" o "MGL" tiene su significado general en la técnica y se refiere a L-metionina- α -desamino- γ -mercaptoetano liasa, la enzima que cataliza irreversible la α,γ -eliminación de L-metionina que da lugar a la producción de metanotiol, α -cetobutirato y amoniaco.

El término "actividad de homocisteinasa" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la actividad de L homocisteína liasa.

El término "*Brevibacterium linens*" también abarca otras tres especies, a saber, *Brevibacterium aurantiacum*, *Brevibacterium antiquum* y *Brevibacterium permense*, tal como se describe por Gavrish et al. 2004. La cepa ATCC 9175 se depositó como *B. linens* ATCC9175 en la American Type Culture Collection y recientemente se renombró como *B. Aurantiacum* ATCC9175 según lo propuesto por Gavrish et al. (2004).

Una "secuencia de codificación" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia de codificación para una proteína puede incluir un codón de inicio (habitualmente ATG) y un codón de parada.

Por "purificado" y "aislado" se quiere decir, cuando se refiere a un polipéptido (es decir, la metionina gamma-liasa de la invención) o una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, significa preferiblemente al menos 75% en peso, más preferiblemente al menos 85% en peso, aún preferiblemente al menos 95% en peso, y lo más preferiblemente al menos 98% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo están presentes. Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido en cuestión; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan perjudicialmente a las características básicas de la composición.

El término "PEG" abarca cualquier molécula de polietilenglicol, sin tener en cuenta el tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y se puede representar por la fórmula $X-O(CH_2CH_2O)_n-OH$, donde n es un número entero entre 20 y 2300, y X es H o una modificación terminal, por ejemplo, alquilo.

Por "pegilación" se entiende el proceso por el que las cadenas de polietilenglicol (PEG) se unen a polipéptidos. El término "polipéptido pegilado" indica un polipéptido que comprende al menos un grupo PEG conjugado covalentemente a dicho polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un humano.

Polipéptidos de metionina gamma-liasa

La presente invención proporciona de este modo un polipéptido de metionina gamma-liasa aislado, sintético o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece por la SEQ ID NO: 1 o una variante conservadora de la función del mismo.

5 La presente invención, por lo tanto, abarca variantes conservadoras de la función de los polipéptidos de metionina gamma-liasa, tal como se establece por la SEQ ID NO: 1. Las variantes conservadoras de la función pueden resultar de modificaciones y cambios que se pueden realizar en la estructura de los polipéptidos de SEQ ID NO: 1 (y en las secuencias de ADN que lo codifican), y aún obtener una molécula funcional con características deseables (MGL y homocisteinasa).

10

Por consiguiente, "variantes conservadoras de la función" son aquellas en las que un residuo de aminoácido determinado en una proteína o enzima se ha cambiado sin alterar la conformación global y la función del polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, la sustitución de un aminoácido por uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de modo que el porcentaje de la similitud de la proteína o secuencia de aminoácidos entre cualquiera de dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de 70% a 99%, tal como se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento, tal como mediante el Procedimiento Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de la función" también incluye un polipéptido que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60%, determinada por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 85%, aún preferiblemente al menos 90%, e incluso más preferiblemente al menos 95%, y que tiene las mismas propiedades o funciones o sustancialmente similares que la proteína nativa o parental con la que se compara. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 80%, preferiblemente más del 85%, preferiblemente más del 90% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90%, preferiblemente más del 95%, son similares (funcionalmente idénticos). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineamiento usando, por ejemplo, el programa de compilación GCG (Genetics Computer Group, Manual de programa para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias, tales como BLAST, FASTA, etc.

25

Los cambios de aminoácidos pueden conseguirse cambiando los codones en la secuencia de ADN, según la Tabla 1.

Tabla 1

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA, GCC, GCG, GCU
Cisteína	Cys	C	UGC, UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC, GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA, GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC, UUU
Glicina	Gly	G	GGA, GGC, GGG, GGU
Histidina	His	H	CAC, CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA, AUC, AUU
Lisina	Lys	J	AAA, AAG
Leucina	Leu	K	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
Metionina	Met	L	AUG
Asparagina	Asn	M	AAC, AAU
Prolina	Pro	N	CCA, CCC, GCC, CCU
Glutamina	Gln	P	CAA, CAG
Arginina	Arg	Q	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
Serina	Ser	R	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
Treonina	Thr	S	ACA, ACC, ACG, ACU
Valina	Val	T	GUA, GUC, GUG, GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAU

35

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de metionina gamma-liasa o capacidad de homocisteinasa. Dado que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que definen esa actividad funcional biológica de la proteína, se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína, y, por supuesto, en su secuencia codificante de ADN, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que se pueden realizar diversos cambios en las secuencias de polipéptidos de la invención, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos polipéptidos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

40

Dicha actividad de metionina gamma-liasa y actividad de homocisteinasa pueden evaluarse mediante diferentes técnicas bien conocidas en la técnica, tal como se describen más adelante.

45

Al realizar los cambios en las secuencias de aminoácidos del polipéptido, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva en una proteína se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que, a su vez, define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus características de hidrofobicidad y carga que son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Es conocido en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o valor hidropático similar y todavía dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún obtienen una proteína biológica funcionalmente equivalente.

Como se indica anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan por lo tanto en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones de ejemplo que toman diversas de las características anteriores en consideración son bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

La actividad de metionina gamma-liasa y la actividad de homocisteinasa de las variantes conservadoras de la función pueden evaluarse según cualquier procedimiento de ensayo de la actividad de metionina gamma-liasa y la actividad de homocisteinasa conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, los ensayos a los que se hace referencia en la presente solicitud.

Los polipéptidos de la invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida per se en la técnica, tales como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica fácilmente puede producir dichos polipéptidos, mediante técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse utilizando un procedimiento de fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse mediante técnicas de ADN recombinante como es ahora bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli)péptido deseado en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en huéspedes eucariotas o procariontas adecuados que expresarán el polipéptido deseado, a partir de los cuales más tarde se pueden aislar usando técnicas bien conocidas.

Los polipéptidos de la invención se puede utilizar en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o contenida en un vector, tal como una vesícula de membrana o lípido (por ejemplo, un liposoma).

En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden ser modificados con el fin de mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de compuestos terapéuticos se puede usar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo de circulación o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de los compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede disminuir significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución.

Una estrategia para mejorar la viabilidad de fármacos es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican la velocidad de eliminación del cuerpo. Para lograr un efecto de reconocimiento o efecto de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte del esqueleto o como grupos colgantes en la cadena del polímero.

Por ejemplo, pegilación es un enfoque bien establecido y validado para la modificación de una gama de polipéptidos (Chapman, 2002). Los beneficios incluyen, entre otros: (a) semividas in vivo circulantes mejoradas de forma destacada debido a la evasión de la eliminación renal como resultado del aumento en el polímero del tamaño aparente de la molécula por encima del límite de filtración glomerular y/o a través de la evasión de los mecanismos de eliminación celular; (b) antigenicidad y inmunogenicidad reducidas de la molécula a la que se une el PEG; (c) farmacocinética mejorada; (d) resistencia proteolítica mejorada de la proteína conjugada (Cunningham-Rundles et al., 1992); y (e) una estabilidad térmica y mecánica mejoradas del polipéptido PEGilado.

Por lo tanto, de manera ventajosa, los polipéptidos de la invención pueden unirse covalentemente con uno o más grupos polietilenglicol (PEG).

- 5 Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona polipéptidos modificados, en los que la modificación comprende un único grupo polietilenglicol conjugado covalentemente al polipéptido. Otros aspectos proporcionan polipéptidos modificados conjugados covalentemente a uno, dos, tres, o más grupos polietilenglicol. El uno o más de PEG pueden tener un peso molecular que varía de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa, y tendrá preferiblemente un peso molecular que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 kDa o de
- 10 aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kDa. Un experto en la técnica puede seleccionar una masa molecular adecuada para PEG, basado en cómo se usará el polipéptido pegilado terapéuticamente considerando diferentes factores, incluyendo la dosificación deseada, tiempo de circulación, resistencia a la proteólisis, inmunogenicidad, etc.

En una realización, el PEG de la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, es decir, X es H o

15 CH₃ ("metoxi PEG"). Además, dicho PEG puede consistir en una o más cadenas laterales de PEG que están unidas entre sí. Los PEG con más de una cadena de PEG se denominan PEG ramificados. Los PEG ramificados se pueden preparar, por ejemplo, mediante la adición de óxido de polietileno a varios polioles, incluyendo glicerol, pentaeritriol, y sorbitol. Por ejemplo, un PEG ramificado de cuatro brazos puede prepararse a partir de pentaeritriol y óxido de etileno. Una forma de PEG incluye dos cadenas laterales de PEG (PEG2) unidas a través de los grupos amina

20 primaria de una lisina (Monfardini, et al., 1995).

Para efectuar la unión covalente de grupos PEG al polipéptido, los grupos terminales hidroxilo de la molécula de polímero se deben proporcionar en forma activada, es decir, con grupos funcionales reactivos (ejemplos de los cuales incluyen grupos amino primarios, hidrazida (HZ), tiol, succinato (SUC), succinato de succinimidilo (SS),

25 succinimidil succinamida (SSA), propionato de succinimidilo (SPA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), carbonato de benzotriazol (BTC), N-hidroxisuccinimida (NHS), aldehído, nitrofenilcarbonato (NPC) y tresilato (TRES)). Las moléculas de polímero activadas adecuadas están disponibles comercialmente, por ejemplo de Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, EE.UU., o de PolyMASC Pharmaceuticals plc, Reino Unido. Alternativamente, las moléculas de polímero pueden ser activadas mediante procedimientos convencionales

30 conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 90/13540. Los ejemplos específicos de moléculas de polímero lineales o ramificadas activadas para uso en la presente invención se describen en Shearwater Polymers, Inc. Catálogos de 1997 y 2000 (Functionalized Biocompatible Polymers for Reserch and pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives). Los ejemplos específicos de polímeros PEG activados incluyen los siguientes PEG lineales: NHS-PEG (por ejemplo, SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-

35 PEG, SC-PEG, SG-PEG, y SCM-PEG), y NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG y MAL-PEG, y PEG ramificados, tales como PEG2-NHS.

La conjugación del polipéptido y las moléculas poliméricas activadas se lleva a cabo mediante el uso de cualquier procedimiento convencional. Los procedimientos convencionales son conocidos por el experto en la materia. El

40 experto será consciente de que el procedimiento de activación y/o la química de conjugación que se utilizará dependen del grupo o grupos de unión de los polipéptidos, así como los grupos funcionales de la molécula de PEG (por ejemplo, amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído, cetona, sulfhidrilo, succinimidilo, maleimida, vinilsulfona o haloacetato).

- 45 En una realización, los polipéptidos están conjugados con PEG en el aminoácido D y E (por COOH), T, Y y S (por OH), K (por NH₂), C (por SH si al menos una cisteína está conservada) y/o Q y N (para la función de amida).

En una realización, se pueden introducir sitios adicionales para la PEGilación mediante mutagénesis dirigida al sitio mediante la introducción de uno o más residuos de lisina. Por ejemplo, uno o más residuos de arginina pueden

50 mutarse a un residuo de lisina. En otra realización, los sitios de PEGilación adicionales se introducen químicamente mediante la modificación de aminoácidos en los polipéptidos de la invención.

En una realización, los PEG se conjugan al polipéptido a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por el experto. Un ejemplo preferido es el cloruro cianúrico (Abuchowski et al, 1977; US 4,179,337).

55

Las técnicas de separación y purificación convencionales conocidas en la técnica se pueden usar para purificar polipéptidos pegilados de la invención, tales como cromatografía por exclusión de tamaño (por ejemplo, filtración en gel) y cromatografía de intercambio de iones. Los productos también se pueden separar usando SDS-PAGE.

- 60 En una realización, los polipéptidos pegilados proporcionados por la invención tienen una semivida en suero in vivo al menos 50%, 75%, 100%, 150% o 200% mayor que la de un polipéptido no modificado.

En otra realización, los polipéptidos de la invención están acoplados covalentemente a un agente de reconocimiento tumoral, como es bien conocido en la técnica.

65

Los ejemplos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos dirigidos contra el dominio EDB de fibronectina, anticuerpos o agentes que se unen al receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular, anticuerpos o moléculas que se unen a receptor 1 de factor de crecimiento de fibroblastos, anticuerpos o agentes que interactúan con CD31, anticuerpos o agentes que interactúan con el endotelio linfático de tumor 5 (Podoplanin, Lyve-1), o anticuerpos o agentes que se unen a integrina $\alpha V\beta 3$, tales como péptidos RGD, o anticuerpos o agentes que interactúan con dianas tumorales unidas a membrana e intracelulares.

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped recombinantes

10 Otro objeto de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que codifica un polipéptido de metionina gamma-liasa de acuerdo con la invención. En una realización particular, dicho ácido nucleico comprende una secuencia como se establece por la SEQ ID NO: 2. En otra realización particular, dicho ácido nucleico comprende una secuencia como se establece por la SEQ ID NO: 3.

15 Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral. Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula huésped, a fin de transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

20 Por lo tanto, otro objeto de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho polipéptido tras la administración a un sujeto. Los vectores 25 pueden comprender además uno o varios orígenes de replicación y/o marcadores seleccionables. La región de promotor puede ser homóloga o heteróloga con respecto a la secuencia codificante, y proporcionar la expresión ubicua, constitutiva, regulada y/o específica de tejido, en cualquier célula huésped apropiada, incluyendo para su uso *in vivo*. Ejemplos de promotores incluyen promotores bacterianos (promotor T7, pTAC, Trp, etc.), promotores virales (LTR, TK, CMV-IE, etc.), promotores de genes de mamíferos (albúmina, PGK, etc.), y similares.

30 Ejemplos de plásmidos incluyen los plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR, y similares. Ejemplos de vector viral incluyen adenoviral, retroviral, virus del herpes y vectores AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como mediante la transfección de células de empaquetamiento o mediante la 35 transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv +, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes de replicación defectuosa pueden encontrarse por ejemplo en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

40 Otro objeto de la presente invención se refiere a una célula que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la invención. El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "exterior" (es decir, extrínseco o extracelular) a una célula huésped, de modo que la célula huésped expresará el gen o secuencia introducidos para producir una sustancia deseada, típicamente una 45 ARN introducido ha sido "transformada".

Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden usar para producir un polipéptido recombinante de la presente invención en un sistema de expresión adecuado. El término "sistema de expresión" significa una célula huésped y vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada 50 por ADN extraño transportado por el vector e introducido en la célula huésped.

Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores plásmido, células huésped de insectos y vectores de baculovirus, y células huésped y vectores de mamíferos. Otros ejemplos de células huésped incluyen, sin limitación, células procariontas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de 55 levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras de *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos de células de mamíferos primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Más particularmente, la presente invención contempla células vasculares o endoteliales de las 60 mismas o derivados de las mismas, tales como células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) o células endoteliales progenitoras (PEC).

La presente solicitud describe un procedimiento para producir una célula huésped recombinante que expresa un polipéptido de metionina gamma-liasa de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas 65 que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* de un ácido nucleico recombinante o un vector, tal como se describe anteriormente en una célula huésped competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped recombinante

obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o segregan dicho polipéptido de metionina gamma-liasa. Tales células huésped recombinantes se pueden utilizar para la producción de polipéptidos de metionina gamma-liasa según la presente invención, tal como se ha descrito previamente.

- 5 La presente invención se refiere además a un procedimiento para producir un polipéptido de metionina gamma-liasa según la invención, cuyo procedimiento comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula huésped transformada según la invención en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido de metionina gamma-liasa; y (ii) recuperar el polipéptido expresado.

10 **Procedimientos y usos terapéuticos**

En una realización, la solicitud describe un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración de un sujeto en necesidad del mismo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o ácido nucleico de la invención.

15

En el contexto de la presente invención, el término "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

- 20 Según la presente invención, el término "sujeto" o "sujeto en necesidad del mismo", está destinado a un mamífero humano o no humano afectado o susceptible de ser afectado con un cáncer.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del polipéptido de la invención se entiende una cantidad suficiente del polipéptido para el tratamiento de un cáncer, (por ejemplo, para limitar el crecimiento tumoral o para ralentizar o
25 bloquear la metástasis tumoral) a una relación razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los polipéptidos y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen el trastorno a
30 tratar y la gravedad del trastorno; actividad del polipéptido específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; el tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción del polipéptido específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la
35 dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

En un aspecto particular descrito en este documento, el polipéptido o ácido nucleico de la presente invención pueden administrarse de forma concomitante con uno o más agentes necesarios para la función del polipéptido, tales como cofactores enzimáticos. Por ejemplo, dicho cofactor enzimático es fosfato de piridoxal.

40

En un aspecto particular, el polipéptido o ácido nucleico de la presente invención pueden administrarse secuencialmente o de forma concomitante con uno o más agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos.

En un aspecto, dichos agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos son un agente activo terapéutico utilizado
45 como agente contra el cáncer. Por ejemplo, dichos agentes contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a, fludarabina, gemcitabina, capecitabina, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiaurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, complejos de platino, tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, epipodofilotoxinas, tales como etopósido y tenipósido, camptotecinas, tales como irinotecan y topotecan, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina,
50 mitoxantrona, L-asparaginasa, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo y 5-fluorouracilo combinado con leucovorina, taxanos, tales como docetaxel y paclitaxel, levamisol, estramustina, mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, tales como carmustina y lomustina, alcaloides de vinca, tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, mesilato de imatinib, hexametilmelamina, inhibidores de quinasa, inhibidores de fosfatasa, inhibidores de la ATPasa, tirfostinas, inhibidores de proteasa, inhibidores de herbimicina A, genisteína, erbstatina y lavendustina A. En una realización, los
55 agentes contra el cáncer adicionales pueden seleccionarse de, pero no se limitan a, uno o una combinación de la siguiente clase de agentes: agentes alquilantes, alcaloides de plantas, inhibidores de la ADN topoisomerasa, antifolatos, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos de ADN, taxanos, podofilotoxinas, terapias hormonales, retinoides, fotosensibilizadores o terapias fotodinámica, inhibidores de la angiogénesis, agentes antimitóticos, inhibidores de isoprenilación, inhibidores del ciclo celular, actinomicina, bleomicina, antraciclinas,
60 inhibidores de MDR e inhibidores de Ca²⁺ ATPasa.

Los agentes contra el cáncer adicionales se pueden seleccionar de, pero no se limitan a, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores inhibidores de crecimiento, hormonas, receptores solubles, receptores señuelo, anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos mono-específicos, biespecíficos o multispecíficos,
65 monocuerpos, policuerpos.

Un agente activo terapéutico adicional puede ser un agente antiemético. Agentes antieméticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, metoclopramida, domperidona, proclorperazina, prometazina, clorpromazina, trimetobenzamida, ondansetrón, granisetron, hidroxicina, acetilleucina, alizaprida, azasetron, benzquinamida, bietanautina, bromoprida, buclizina, cleboprida, ciclizina, dimenhidrinato, difenidol, dolasetron, meclizina, metalatal, metopimazina, nabilona, 5 pipamazina, escopolamina, sulpirida, tetrahidrocannabinoles, tietilperacina, tioproperacina y tropisetron. En un aspecto preferido, el agente antiemético es granisetron u ondansetrón.

En otro aspecto descrito en el presente documento, el agente activo terapéutico adicional puede ser un factor estimulante de colonias hematopoyéticas. Los factores estimulantes de colonias hematopoyéticas adecuados 10 incluyen, pero no se limitan a, filgrastim, sargramostim, molgramostim y epoyetina alfa.

En un aspecto todavía, el otro agente activo terapéutico puede ser un opioide o un agente analgésico no opioide. Los agentes analgésicos opioides adecuados incluyen, pero no están limitados a, morfina, heroína, hidromorfona, hidrocodona, oximorfona, oxicodeona, metopón, apomorfina, buprenorfina, meperidina, loperamida, 15 etoheptazina, betaprodina, difenoxilato, fentanilo, sufentanilo, alfentanilo, remifentanilo, levorfanol, dextrometorfano, fenazona, pemazocina, ciclazocina, metadona, isometadona y propoxifeno. Agentes analgésicos no opioides adecuados incluyen, pero no se limitan a, aspirina, celecoxib, rofecoxib, diclofenaco, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, indometacina, ketorolac, meclofenamato, ácido mefenámico, nabumetona, naproxeno, piroxicam y sulindac .

20 En aún otro aspecto, el agente activo terapéutico adicional puede ser un agente ansiolítico. Agentes ansiolíticos adecuados incluyen, pero no están limitados a, buspirona, y benzodiazepinas, tales como diazepam, lorazepam, oxazepam, clorazepato, clonazepam, clordiazepóxido y alprazolam.

25 El término "agente radioterapéutico", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a cualquier agente radioterapéutico conocido para un experto en la técnica para ser eficaz para tratar o mejorar el cáncer, sin limitación. Por ejemplo, el agente radioterapéutico puede ser un agente tal como los administrados en braquiterapia o terapia con radionucleidos. Tales procedimientos pueden comprender además opcionalmente la administración de uno o más terapias contra el cáncer, tales como, pero sin limitación, quimioterapias y/u otro radioterapia.

30

Composición farmacéutica

Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o ácido nucleico de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

35

Típicamente, polipéptido o ácido nucleico de acuerdo con la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

40 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un sólido no tóxico, semi-sólido o carga líquida, diluyente, material de encapsulación o agente auxiliar de formulación de cualquier tipo.

45 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria apropiadas comprenden las formas de vía oral, tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, 50 formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para 55 una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, soluciones isotónicas, estériles, saines (fosfato monosódico o de disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo de la caso, de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de soluciones inyectables.

60 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de 65 microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las soluciones que comprenden compuestos de la presente invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un
5 conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

La metionina gamma-liasa se puede formular en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos
10 orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol
15 (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En
20 muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el
25 disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes indicados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que
30 producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

También se contempla la preparación de soluciones más o altamente concentradas para la inyección directa, en donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida,
35 la liberación de altas concentraciones de los agentes activos a una pequeña área del tumor.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se
40 pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada, si es necesario, y el diluyente líquido debe hacerse primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa,
45 intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

50 La metionina gamma-liasa se puede formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente de 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente de 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente de 0,1 a 1,0 miligramos, o aproximadamente de 1 a 10 miligramos o incluso aproximadamente de 10 a 100 miligramos por dosis o similar. Pueden administrarse también dosis múltiples.

55 Además de los compuestos de la invención formulados para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma actualmente en uso.

60 Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende uno o más cofactores enzimáticos. Por ejemplo, dicho cofactor enzimático es un fosfato de piridoxal.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica de acuerdo con la invención que comprende uno o más agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos.

65

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

FIGURAS:

- 5 **Figura 1: Curva de citotoxicidad de dosis-efecto de la MGL-BL929 recombinante en la línea celular de carcinoma de colon humano HT29 expuesta a la enzima durante 48 horas y 72 horas.**
Figura 2: Curva de citotoxicidad de dosis-efecto de la MGL-BL929 recombinante en fibroblastos de piel normal expuestos 48 horas y 72 horas a la enzima.
 10 **Figura 3: Concentración (expresada en porcentaje de control) de L-metionina en el sobrenadante de cultivos celulares de tumores humanos HT29, SKOV3, Jurkat y Reh expuestos a diversas concentraciones de MGL-BL929.**
Figura 4: Concentración (expresado en porcentaje de control) de L-homocisteína en el sobrenadante de cultivos celulares de tumores humanos HT29, SKOV3, Jurkat y Reh expuestos a diversas concentraciones
 15 **de MGL-BL929.**

EJEMPLOS:

Materiales y procedimientos:

- 20 **Procedimientos:**

Caracterización de la metionina gamma-liasas (MGL-BL929) de Brevibacterium aurantiacum (B. aurantiacum; ATCC 9175, anteriormente B. linens)

- 25 Se estudiaron varios aspectos del metabolismo y la expresión génica mediante análisis de transcriptoma de *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175) cultivada en ausencia y en presencia de diversos aminoácidos que contienen azufre. Los estudios condujeron a la identificación dentro del genoma de *B. aurantiacum* de un gen (BL929) que codifica una posible MGL.
 30

Producción de la metionina gamma-liasas de *Brevibacterium aurantiacum* (MGL-BL929)

Cepa bacteriana y producción de crecimiento

- 35 Se cultivó la cepa de producción *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Agilent technologies, Santa Clara, CA) en un Erlenmeyer a 30 °C con agitación a 200-250 rpm en caldo de Luria Bertani (LB) reconstituido: 1% de triptona, 5% extracto de levadura (Fluka, St Louis MO), 1% de NaCl resuspendido en agua pura, suplementado con 50 µg/ml de kanamicina cuando sea necesario. Los medios sólidos se prepararon mediante la adición de agar técnico (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) a una concentración final de 1,5% p/v.
 40

Producción y purificación de la metionina gamma-liasas de *Brevibacterium aurantiacum* MGL-BL929

- El marco de lectura abierto (ORF) que codifica MGL-BL929 de *B. aurantiacum* se optimizó con el fin de adaptar el uso de codones de *B. aurantiacum* al sistema de expresión de *E. coli* (SEQ ID NO: 3). El gen optimizado se sintetizó
 45 y se subclonó en un vector de subclonación de *E. coli* dado PMA-BL929, de acuerdo con procedimientos estándar GeneART. El ORF de BL929 fue digerido por las enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI* de PMA-BL929 y se ligó en los vectores de expresión de *E. coli* pGTPc608a (derivado pET9d que contiene el promotor Ptac, operador Lac, un sitio de clonación múltiple, *LacIq* y terminador T1T2) previamente digeridos por las mismas enzimas. La mezcla de ligación se transformó en células electro-competentes de las cepas de *E. coli* DH5α. Los plásmidos resultantes
 50 pGTPc608-BL929 se verificaron mediante digestión y secuenciación. Las enzimas de restricción, T4 ADN ligasa y fosfatasa Antártica (New England Biolabs, Ipswich, MA), ADN polimerasa Phusion™ de alta fidelidad (Finnzymes, Espoo, Finlandia) se utilizaron de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Los kits de purificación de ADN se adquirieron de Macherey-Nagel (Düren, Alemania). La secuenciación se realizó mediante Genoma Express (Meylan, Francia).
 55

- La cepa de producción de *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con el plásmido de expresión pGTPc608-BL929. Una sola colonia que contenía pGTPc608-BL929 se cultivó a 37 °C en un biorreactor Applikon de 70 litros que contenía 35 litros de medio de GYP (extracto de levadura 24 g/litro, peptona de soja 12 g/litro, KH₂PO₄ 4,8 g/litro, K₂HPO₄ 2,2 g/litro y glicerol y 5 g/litro) suplementado con piridoxal 5'-fosfato al 0,02%. La expresión se indujo mediante IPTG 0,1
 60 mM cuando el cultivo alcanzó una DO_{600 nm} de 2. Cuando el glicerol inicial se agotó totalmente, la solución de alimentación concentrada (30% p/v de glicerol y 30% p/v de extracto de levadura) se añadió mediante una bomba de control remoto. El caudal de la bomba se reguló en base al punto de ajuste del pH. Las células se recogieron cuando la DO_{600 nm} del cultivo alcanzó 40-50.

- 65 Las células se suspendieron en tampón de lisis (Tris 20 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, piridoxal 5'-fosfato 0,1 mM, pH 7,5) y se lisaron mediante homogeneización a alta presión. El extracto celular se aclaró mediante

centrifugación durante 30 min a 15.900 g a 4 °C, a continuación se filtró a través de un filtro desechable de unión a proteína de nivel bajo de 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Alemania). Se añadió sulfato de amonio sólido (AS) al extracto celular para alcanzar una concentración final de 0,75 M y se agitó a 4 °C durante 16 horas. La muestra se centrifugó a 15.900 g durante 30 min a 4 °C, después se filtró con un filtro desechable de unión a proteína de nivel bajo de 0,45 μm para eliminar todas las proteínas precipitadas antes de inyectarse en una columna de resina de Fenil Sepharose (High Sub) 6 Fast Flow (GE Healthcare). La columna se equilibró con Tris 20 mM, AS 0,75 M, PLP 0,1 mM, pH 7,5. Las proteínas se eluyeron mediante la disminución de la concentración de AS en varias etapas desde el 100% al 0%. Se agruparon las fracciones de elución que contenían MGL-BL929, se concentraron 5 veces usando un casete de ultrafiltración con un corte de 10 kDa, a continuación, se sometieron a diafiltración frente a 7 volúmenes de Bis Tris 20 mM, PLP 0,1 mM, pH 6,0 (Pall, Port Washington, Nueva York).

La elución de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se pasó a través de una columna rellena con resina de DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) preequilibrada en 20 mM de Bis Tris, 0,1 mM de PLP, pH 6,0. Las proteínas se eluyeron mediante el aumento de la concentración de NaCl en varias etapas de 0 a 1 M. Las fracciones de elución que contenían MGL-BL929 se recogieron, se concentraron 3 veces utilizando un casete de ultrafiltración (Pall, Port Washington, NY) y a continuación se diafiltró frente a 7 volúmenes de 40 mM de Na^*PO_4 , 20 μM de PLP, pH 7,5.

La elución de DEAE se aclaró por filtración a través de un filtro desechable de unión a proteína de nivel bajo de 0,2 μm (Corning, Union City, CA). Las endotoxinas se eliminaron por filtración a través de una cápsula Mustang E (Pall, Port Washington, Nueva York). La concentración de MGL-BL929 se consiguió usando una celda agitada que contenía una membrana con un corte de 10 kDa con el fin de alcanzar un intervalo de concentración final entre 20 y 30 mg/ml (Millipore, Billerica, MA). La proteína purificada se almacenó a -80 °C. La concentración de la enzima y la pureza se determinaron mediante electroforesis capilar, SDS PAGE y ensayo de Bradford. El estado de oligomerización de la enzima purificada se investigó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando una columna Superdex 200 5/150 GL (GE Healthcare). La concentración de endotoxinas del producto final se ensayó por Lonza (servicios de ensayos).

Ensayos enzimáticos

La capacidad de la enzima purificada para catalizar reacciones de α,γ -eliminación contra los aminoácidos y los aminoácidos sustituidos se ensayó por separado con L-metionina, L-homocisteína, L-cisteína, L-cistationina, S-adenosil L-metionina, S-adenosil L-homocisteína y D-metionina. La actividad se midió mediante la incubación de la enzima en 100 mM de K^*PO_4 , 0,01 mM de PLP, pH 7,5 con 25 mM de sustrato en un volumen final de 1 ml. La mezcla se incubó a 25 °C durante 10 min y la reacción se detuvo mediante la adición de ácido tricloroacético hasta una concentración final del 5%. El α -cetobutirato formado en la solución sobrenadante se midió con 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona usando espectrofotometría a 320 nm (Soda et al., 1967).

Estudios de citotoxicidad y líneas celulares

Se utilizaron siete líneas celulares tumorales humanas para determinar los efectos celulares de MGL-BL929. Éstas comprenden cinco líneas de células adherentes derivadas de tumores sólidos (incluyendo la línea celular de carcinoma colorrectal HT29, dos variantes estables de HT29 seleccionados por sus altos niveles de resistencia a metotrexato (HT29_{MTX}) y a fluorouracilo (HT29_{FUR}), la línea celular de carcinoma de ovario SKOV3 y la línea celular derivada de hepatoblastoma (HepG2) y 2 líneas de células tumorales no adherentes (incluyendo la línea celular de linfoma de células T Jurkat y la línea celular de leucemia linfocítica aguda Reh). De manera similar, se expusieron fibroblastos de piel no tumoral humana (CDGII) a MGL-BL929 a diversas concentraciones con el fin de explorar la selectividad de MGL-BL929 hacia las células cancerosas.

Las líneas de células se descongelaron a partir de existencias congeladas libres de micoplasmas y se controlaron por la contaminación. Las células se mantuvieron en medio de cultivo celular (RPMI 1640 o DMEM de acuerdo con los requisitos de crecimiento de cada línea celular), suplementado con FBS al 10% y antibióticos (estreptomina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y penicilina, 50 U/ml) a 37 °C en una atmósfera que contenía 5% de CO_2 . Las células se expusieron en placas celulares de 12 pocillos a la MGL-BL929 recombinante purificada a un intervalo de concentración de 0,05 U/ml a 5 U/ml, y se recogieron 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas desde el inicio de la exposición. La viabilidad celular se midió con el ensayo de exclusión de colorante azul de tripano en cámaras de Malassez.

Medición de la L-metionina y L-homocisteína en cultivo celular

Las concentraciones de L-metionina y L-homocisteína se midieron en el sobrenadante de cultivos celulares de HT29, SKOV3, Jurkat y Reh que crecían exponencialmente en medio de cultivo celular suplementado con FBS al 10%, se expusieron en t_0 a diversas concentraciones de MGL-BL929 durante 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas. Se cultivó HT29 en DMEM y las otras tres líneas celulares estaban en medio de cultivo celular RPMI 1640. Las mediciones se realizaron mediante cromatografía de intercambio iónico. (N.B., las concentraciones de L-homocisteína en medios de cultivo celular RPMI 1640 y DMEM son 101 $\mu\text{mol}/\text{l}$ y 201 $\mu\text{mol}/\text{l}$, respectivamente).

Estudios de estabilidad de la proteína mediante transferencia Western

Las fracciones de los sobrenadantes de células HT29 en cultivo expuestas a diversas concentraciones de la MGL-BL929 recombinante se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones de desnaturalización, y a continuación se revelaron mediante transferencia Western (WB) con suero policlonal de conejo anti MGL-BL929 que fue generado contra la enzima purificada.

También se realizó un análisis de transferencia Western en suero humano incubado con MGL-BL929 recombinante purificada durante 72 horas.

Resultados:

Caracterización de la metionina gamma-liasa (MGL-BL929) de *Brevibacterium aurantiacum* (*B. aurantiacum*; ATCC 9175, anteriormente *B. linens*)

Las comparaciones de los perfiles de expresión génica de *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175) en presencia de L-cistina y L-cistina más L-metionina mostraron la regulación por incremento de dos genes adyacentes en presencia de metionina, incluyendo el gen de BL929 que codifica una posible MGL. La regulación por incremento de BL929 fue acompañada por la producción de grandes cantidades de compuestos volátiles de azufre que resultan de la degradación de la metionina (Forquin et al., 2010).

La secuencia del posible gen de BL929 fue identificada en el genoma de *B. linens* (*Brevibacterium linens* BL2 NZ_AAGP01000007, secuencia "shotgun" del genoma competo). El genoma comprende 115535 pares de bases (pb). La posible secuencia de nucleótidos de MGL BL929 está en la posición 34415 y se compone de 1.182 pb (34415-35596) (SEQ ID NO: 2). La referencia de la secuencia de la proteína traducida es ZP_05913004.1 (SEQ ID NO: 1).

Purificación

La purificación de MGL-BL929 se logró hasta homogeneidad a partir de un sedimento de células a escala 5 litros después de cuatro etapas de cromatografía sucesivas (Tabla 1). El esquema de purificación permitió la purificación de 1,2 g de MGL-BL929 con un grado de pureza de proteína del 94% que contenía niveles muy bajos de endotoxina, correspondiente a una tasa de recuperación del 23%.

Tabla 1: Purificación de MGL-BL929 de *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175)

Etapa de purificación	Conc. total (mg/ml)	[MGL-BL929] (mg/ml)	MGL-BL929 % pureza	Cantidad (g)	Recuperación del proceso (%)	Recuperación de etapa (%)
Extracto celular	5,7	1,4	24	5,1		
Precipitación de (NH ₄) ₂ SO ₄	3,4	1,1	32	3,9	76	76
HIC con Fenil sefarosa	0,2	0,1	64	2,5	49	64
Concentración por diafiltración FF	4,0	1,4	70	2,1	41	85
DEAE Sefarosa AEC	1,1	0,9	81	1,3	25	60
Concentración por diafiltración UF	2,2	2,2	98	1,0	20	80
Mustang E	1,6	1,6	100	0,9	17	86
Concentración	23,7	22,3	94	1,2	23	100

Tamaño de la enzima

El peso molecular de la enzima nativa se investigó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El volumen hidrodinámico de la MGL-BL929 purificada corresponde a una proteína globular de 171,5 kDa. Dado que el peso molecular de MGL-BL929 determinado mediante electroforesis capilar en condiciones de desnaturalización es de 46,5 kDa, los resultados sugieren que la MGL-BL929 es una especie homotetramérica monodispersa.

Especificidad de sustrato

La actividad enzimática de la MGL-BL929 purificada sobre diversos sustratos se determinó mediante medición de α -cetoácidos producidos (Soda et al., 1967). La enzima purificada catalizó la α,γ -eliminación de L-metionina y L-homocisteína (tabla 2). La enzima no tenía ninguna actividad hacia L-cisteína, L-cistationina, S-adenosil-L-homocisteína y D-metionina. La afinidad y la actividad específica de la MGL-BL929 purificada para L-homocisteína fueron 7,3 veces y 4,8 veces mayor que las medidas para L-metionina, respectivamente.

10 **Tabla 2: Especificidad de sustrato y actividad enzimática de la MGL-BL929 purificada de *Brevibacterium aurantiacum*.**

Sustrato	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
L-homocisteína	0,94 \pm 0,8	27,7 \pm 5,7
L-metionina	6,83 \pm 2,4	5,77 \pm 1,4
L-cisteína	0	0
L-cistationina	0	0
S-adenosil L-homocisteína	0	0
D-metionina	0	0

Una unidad de enzima es la cantidad que cataliza la formación de 1 μmol de α -cetobutirato por minuto

15 La MGL-BL929 purificada ejerce una fuerte actividad citotóxica contra líneas celulares tumorales humanas que crecen en cultivo.

La citotoxicidad de MGL-BL929 apareció en la mayoría de las líneas celulares a niveles mayores de 0,5 U/ml de MGL-BL929 y aumentó con concentraciones crecientes de la enzima. La tabla 3 resume la IC50 para cada línea celular a las 72 horas de exposición, que representa la concentración de la MGL-BL929 recombinante (en 20 unidades/ml) que consiguen una inhibición del crecimiento del 50% en las células tumorales y normales.

Las CI50 difieren en las diversas líneas de células tumorales; son las más bajas en células derivadas de linfoma y leucemia y las células HT29 de carcinoma de colon estándar. En las otras células derivadas de tumores, las IC50 están comprendidas entre 1 y 1,5 U/ml. Curiosamente, la IC50 para MGL-BL929 en HT29_{MTX} fue baja (0,3 U/ml) 25 cuando las células fueron expuestas simultáneamente a la enzima y a 1 μM de metotrexato (MTX) al que que son totalmente resistentes, lo que sugiere que MGL-BL929 puede superar la resistencia anterior de agentes citostáticos. Se han obtenido resultados que sugieren altamente la potenciación de 5-fluorouracilo (FUra) por MGL-BL929 en la línea celular de carcinoma de colon humano HT29. A partir de estos resultados, los inventores concluyen que MGL-BL929 es capaz de potenciar la citotoxicidad de agentes citostáticos y puede superar la 30 resistencia anterior a estos compuestos.

Tabla 3: Inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas *in vitro* expuestas a la MGL-BL929 recombinante de *Brevibacterium aurantiacum* (ATCC 9175)

Tipo de células	IC50 ² de MGL-BL929 en líneas celulares tumorales y fibroblastos normales expuestos durante 72 horas a la enzima (en unidades/ml) ¹
HT29	0,9
HT29 _{MTX}	1,5 (0,3) ³
HT29 _{5-FU}	1,2
SKOV3	1
HepG2	1,2
Jurkat	0,6
Reh	0,9
Fibroblastos de piel normal	> 4

¹Una unidad de MGL-BL929 es la cantidad que cataliza la formación de 1 μmol de α -cetobutirato por minuto
²IC50 para cada tipo de célula se extrapolan a partir de la curva de concentración-respuesta
³IC50 de MGL-BL929 en HT29_{MTX} expuesta simultáneamente a metotrexato (MTX) 1 μM al que las células son totalmente resistentes.

35 La exposición a MGL-BL929 de fibroblastos no tumorales humanos CDGII afectan a su crecimiento únicamente a niveles de concentración considerablemente mayores que el requerido para la citotoxicidad de las células cancerosas. Los inventores no observaron ninguna disminución medible en el número de células expuestas a MGL-BL929 a concentraciones de hasta 4 U/ml. A 5 U/ml se observó una ligera inhibición del crecimiento a las 72 40 horas desde el inicio de la exposición a la enzima, tal como se muestra en la Figura 2.

MGL-BL929 produce el agotamiento de larga duración de L-metionina y L-homocisteína en el sobrenadante de cultivos de células tumorales humanas.

La exposición a MGL-BL929 disminuyó rápidamente los niveles de metionina en el sobrenadante de las cuatro líneas celulares estudiadas y el efecto aumentó con concentraciones crecientes de la enzima. El grado de agotamiento de la metionina logrado con una concentración dada de MGL-BL929 se mantuvo durante toda la duración del experimento, tal como se muestra en las figuras 3 y 4.

Las figuras son similares con L-homocisteína, el precursor endógeno de la metionina, que se origina a partir de células durante su crecimiento. En cuanto a la L-metionina, la concentración de L-homocisteína en el sobrenadante de cultivos celulares disminuye fuertemente bajo la exposición a MGL-BL929, y el efecto aumentó con concentraciones crecientes de la enzima.

La MGL-BL929 recombinante es estable bajo las condiciones de cultivo de células tumorales durante largos períodos de tiempo.

La estabilidad de la MGL-BL929 recombinante se estudió en el sobrenadante de cultivo de células HT29. El control es la MGL-BL929 recombinante purificada a 1 U/ml en medio DMEM fresco. El sobrenadante de las células HT29 expuestas a MGL-BL929 a 1 U/ml en el instante t0 se recogieron a las 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas desde el inicio del experimento.

El análisis de transferencia Western realizado con un suero de MGL-BL929 purificado anti conejo policlonal no pudo mostrar ninguna alteración de proteína detectable durante 4 días en condiciones de cultivo celular. Este hallazgo, junto con el agotamiento persistente de L-metionina durante la misma duración después de una sola exposición a la enzima, indica que MGL-BL929 es estable durante largos períodos de tiempo en estas condiciones.

La MGL-BL929 recombinante es estable en suero humano *in vitro* durante largos períodos de tiempo.

La estabilidad de la MGL-BL929 recombinante también se estudió en suero humano *in vitro* mediante incubación del suero con diversas cantidades de la enzima. En cuanto al sobrenadante de cultivos de células tumorales, el análisis de transferencia Western no reveló ningún cambio de proteínas durante 72 horas desde el inicio de la incubación con la enzima.

Los inventores produjeron y purificaron un lote de 1,2 g de MGL-BL929 recombinante con una pureza de proteína del 94% y niveles de endotoxina bajos (31 UE/ml). La MGL-BL929 producida posee altos niveles de L-metionina γ -liasa y actividad de L-homocisteinasa. La enzima (a) agota la metionina y la homocisteína de los medios de cultivo de células tumorales durante largos períodos, (b) es estable en condiciones de cultivo de células tumorales y en suero humano *in vitro*, (c) posee alta actividad citotóxica contra diversas células tumorales humanas en crecimiento en cultivo, (d) no afecta al crecimiento de las células normales a concentraciones que son altamente citotóxicas para las células cancerosas, (d) potencia (modula) la actividad citotóxica de agentes citostáticos, y (d) eludir la resistencia celular anterior a citostáticos. Por lo tanto, el uso de MGL-BL929 que presenta actividad de metionina γ -liasa y homocisteinasa es un enfoque original selectivo para disminuir el crecimiento de células tumorales, potenciar la actividad citotóxica de agentes citostáticos y eludir la resistencia celular anterior a citostáticos en el tratamiento del cáncer.

SEQ ID NO: 1

	MTSLHPETLM	VHGGMKGLTE	AGVHVPAIDL	STTNPVNDVA	TGGDSYEWLA	TGHTLKDGD	60
50	AVYQRLWQPG	VARFETALAG	LEHAEAEVAF	ATGMAAMTAA	LLAAVSAGTP	HIVAVRPLYG	120
	GSDHLLETGL	LGTTVTWAKE	ADIASAIQDD	TGLVIVETPA	NPSLDLVDLD	SVVSAAGNVP	180
	VLVDNTFCTP	VLQQPI SHGA	ALVLHSATKY	LGGHGDAMGG	I IATNADWAM	RLRQVRAITG	240
	ALLHPMGAYL	LHRGLRTLAV	RMRAAQTTAG	ELAERLDAH	AISVVHYPGL	KGQDPRGLLG	300
55	RQMSGGGAMI	AMELAGGFDA	ARSFVEHCNL	VVHAVSLGGA	DTLIQHPSL	THRPVAATAK	360
	PGDGLIRLSV	GLEHVDDLAD	DLIAALDASR	AAA			393

SEQ ID NO: 2

65

ES 2 753 962 T3

	atgacctcac	tgcacccaga	aacgctcatg	gtccacggcg	gaatgaaagg	cctcaccgag	60
	gcaggagtcc	acgtaccggc	catcgacctc	tcgaccacca	accagtcaa	cgatgtcgcc	120
	accggcggtg	actcctacga	atggctcgcc	accggccata	cgctcaagga	cggcgactcg	180
5	gccgtctacc	agcgcctctg	gcagcccggg	gtcgcacgct	tcgagaccgc	gctggccggg	240
	ctcgaacacg	ctgaggaagc	agtgccttc	gccacgggca	tggcgcgaat	gactgccgca	300
	cttctcggcg	ccgtcagcgc	aggaacaccc	cacatcgctc	cagtgcgtcc	cctctatggc	360
	ggaagcgacc	acctcctcga	aaccggactg	ctggggacaa	cagtcacatg	ggcaaaggaa	420
10	gccgacatcg	cctcggcgat	ccaagatgac	accggactcg	tcattgtcga	gaccccggca	480
	aaccccagcc	tggaccttgt	tgatctcgac	agtgtcgtct	cagccgcggg	caacgtgcct	540
	gtgctggtgg	acaacacatt	ctgcacacct	gttctccage	agcccatctc	ccacggagcg	600
	gccctcgtac	tgacacgcgc	gacaaaatac	ctcggcggtc	atggcgatgc	catgggcggc	660
	atcatcgcca	ccaacgccga	ctgggcgatg	cgctgcgac	aggtccgagc	catcacagga	720
15	gccctgctcc	accccatggg	cgcgatctc	cttcatcggg	gcttgcgcac	tctggccgtg	780
	cgcatgcgcg	cggtcagac	caccgcccgt	gagctcgctg	agcgcctgga	cgcgaccctt	840
	gccatctccg	tcgtccacta	cccgggactg	aaaggccagg	accacgcggg	actgctcgga	900
	cgccaaatgt	ccggtggtgg	tgcatgatc	gcgatggagc	tcgcgggtgg	attcgacgcc	960
20	gcccgcagct	tcgtcgaaca	ctgcaacctc	gtcgtccacg	cggtgtccct	gggcggcgct	1020
	gacactctca	tccagcatcc	ggcgtcactg	actcacaggc	cagttgcggc	cacggcgaag	1080
	cccggcgatg	gtctcatccg	actctctgtg	ggactcgaac	acgtcgatga	cctggcagac	1140

SEQ ID NO: 3

	atgacctcgc	tgcattcccga	gacgctgatg	gttcatgggtg	gaatgaaggg	tctgaccgaa	60
	gctggagttc	atgtcccggc	aattgatctg	agcaccacca	atcccgtcaa	tgatgtcgca	120
	accggtggag	attcctatga	gtggctggcc	accggtcata	cgctgaaaga	tggatgatagc	180
30	gcagtttata	agcgtctgtg	gcagcctggg	gttgcctcgtt	ttgaaaccgc	tctggcaggg	240
	ctggagcatg	ctgaagaggc	tgttgcatth	gcaacgggta	tggcagctat	gactgcagct	300
	ctactggctg	cagtttcagc	tggaacaccc	cacattggtg	ctgtaagacc	tctgtaccgt	360
	ggaagcgacc	atctgctgga	gaccggactg	ctgggaacta	cggttacttg	ggctaaagag	420
35	gcagatattg	caagcgctat	tcaagacgat	accggactgg	ttatagttga	aaccccggct	480
	aatccttcac	tggatctagt	cgacctggat	tcggttggtt	cggcagcagg	taatgtacct	540
	gtcctggctg	ataatacttt	ttgtactccc	gtcctgcagc	agcctatthc	ccatggagct	600
	gcaactggcc	tgcaattctgc	tactaagtat	ctgggtgggc	acggtgacgc	aatgggtggg	660
	attattgcaa	ccaatgcaga	ttgggctatg	cgctctgagac	aggttagagc	aattaccgga	720
40	gcaactgctg	atcctatggg	tgcttacctg	ctacatcggg	gtctccgtac	tctggcagta	780
	cgatagcgtg	ctgctcagac	caccgcaggg	gaactggctg	aacgtctgga	tgctcatccc	840
	gcaatttccg	ttgttcatta	tccgggactg	aagggtcagg	atcccctggg	actgctggga	900
	cgtaaatgt	ccgggggggg	ggcagtgatt	gctatggaac	tggcaggggg	ctttgatgca	960
	gcacgtagtt	ttgttgagca	ttgtaactctg	gttgttcatg	ctgtatccct	gggtggtgct	1020
45	gatactctga	ttcagcacc	ggcttcgctg	actcataggc	ccgtcgcggc	cacggcgaaa	1080
	cctggtgacg	ggctgattag	actgtcggta	ggactggagc	atggtgacga	tctggctgat	1140

REFERENCIAS:

50 A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

1. Abuchowski A, van Es T, Palczuk NC, Davis FF. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin
55 by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem.* 10 junio 1977; 252 (11):3578-81.
2. Amarita F, Yvon M, Nardi M, Chambellon E, Delettre J, Bonnarne P. Identification and Functional Analysis of the Gene Encoding Methionine-γ-Lyase in *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 7348-7354.
3. Chapman AP. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliv Rev.*
60 2002 Jun 17; 54 (4):531-45.
4. Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. *J Immunol Methods.* 1992 Aug 10; 152(2): 177-90.
5. Forquin-Gomez M.P., Hébert A, Roux A, Aubert J., Proux C., Heilier J.F., Landaud S., Junot C., Bonnarne P.,
65 Martin-Verstraete I. Global regulation of the response to sulfur availability in the cheese-related bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77: 1449-1459.

6. Monfardini C, Schiavon O, Caliceti P, Morpurgo M, Harris JM, Veronese FM. A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification. *Bioconjug Chem.* Enero-febrero 1995; 6(1): 62-9.
7. Machover D, Zittoun J, Broët P, Metzger G, Orrico M, Goldschmidt E, Schilf A, Tonetti C, Tan Y, Delmas-Marsalet B, Luccioni C, Falissard B, Hoffman R. Cytotoxic synergism of methioninase in combination with 5-fluorouracil and 5 folinic acid. *Biochemical Pharmacology* 2001, 61: 867-876.
8. Machover D, Zittoun J, Saffroy R, Broët P, Giraudier S, Magnaldo T, Goldschmidt E, Debuire B, Orrico M, Tan Y, Mishal Z, Chevallier O, Tonetti C, Jouault H, Ulusakarya A, Tanguy M-L, Metzger G, Hoffman RM. Treatment of cancer cells with methioninase produces DNA hypomethylation and increases DNA synthesis. *Cancer Research* 2002, 62: 4685-4689.
- 10 9. Soda, K. A spectrophotometric micro-determination of keto acids with 3-methyl 2-benzothiazolone hydrazone. *Agric Biol Chem.* 1967, 31: 1054-1060.
10. Gavrish E.Yu., V. I. Krauzova, N. V. Potekhina, S. G. Karasev, E. G. Plotnikova, O. V. Altyntseva, L. A. Korosteleva, L. I. Evtushenko. 2004. Three New Species of Brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov., and *Brevibacterium permense* sp. nov. *Microbiology* 73(no2): 176-183.
- 15 11. Dias B, Weimer B. Purification and Characterization of L-Methionine γ -Lyase from *Brevibacterium Linens* BL2. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(9): 3327-3331.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> INSERM

<120> POLIPÉPTIDOS AISLADOS DE BREVIBACTERIUM AURANTIACUM Y SU UTILIZACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

25 <130> BIO11038 MACHOVER/AN

<160> 3

30 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

35 <213> *Brevibacterium linens*

<400> 1

Met Thr Ser Leu His Pro Glu Thr Leu Met Val His Gly Gly Met Lys
40 1 5 10 15

Gly Leu Thr Glu Ala Gly Val His Val Pro Ala Ile Asp Leu Ser Thr
45 20 25 30

Thr Asn Pro Val Asn Asp Val Ala Thr Gly Gly Asp Ser Tyr Glu Trp
50 35 40 45

Leu Ala Thr Gly His Thr Leu Lys Asp Gly Asp Ser Ala Val Tyr Gln
55 50 55 60

Arg Leu Trp Gln Pro Gly Val Ala Arg Phe Glu Thr Ala Leu Ala Gly
65 65 70 75 80

Leu Glu His Ala Glu Glu Ala Val Ala Phe Ala Thr Gly Met Ala Ala
60 85 90 95

Met Thr Ala Ala Leu Leu Ala Ala Val Ser Ala Gly Thr Pro His Ile
65 100 105 110

Val Ala Val Arg Pro Leu Tyr Gly Gly Ser Asp His Leu Leu Glu Thr

ES 2 753 962 T3

	115		120		125														
5	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Glu	Ala	Asp	Ile	Ala			
	130						135					140							
10	Ser	Ala	Ile	Gln	Asp	Asp	Thr	Gly	Leu	Val	Ile	Val	Glu	Thr	Pro	Ala			
	145					150					155					160			
15	Asn	Pro	Ser	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Val	Ser	Ala	Ala			
					165					170					175				
20	Gly	Asn	Val	Pro	Val	Leu	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Cys	Thr	Pro	Val	Leu			
				180					185					190					
25	Lys	Tyr	Leu	Gly	Gly	His	Gly	Asp	Ala	Met	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Thr			
		210					215					220							
30	Asn	Ala	Asp	Trp	Ala	Met	Arg	Leu	Arg	Gln	Val	Arg	Ala	Ile	Thr	Gly			
	225					230					235					240			
35	Ala	Leu	Leu	His	Pro	Met	Gly	Ala	Tyr	Leu	Leu	His	Arg	Gly	Leu	Arg			
				245						250					255				
40	Thr	Leu	Ala	Val	Arg	Met	Arg	Ala	Ala	Gln	Thr	Thr	Ala	Gly	Glu	Leu			
				260					265					270					
45	Gly	Leu	Lys	Gly	Gln	Asp	Pro	Arg	Gly	Leu	Leu	Gly	Arg	Gln	Met	Ser			
	290						295					300							
50	Gly	Gly	Gly	Ala	Met	Ile	Ala	Met	Glu	Leu	Ala	Gly	Gly	Phe	Asp	Ala			
	305					310					315					320			
55	Ala	Arg	Ser	Phe	Val	Glu	His	Cys	Asn	Leu	Val	Val	His	Ala	Val	Ser			
				325						330					335				
60	Leu	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Gln	His	Pro	Ala	Ser	Leu	Thr	His			
				340					345					350					
65	Arg	Pro	Val	Ala	Ala	Thr	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Gly	Leu	Ile	Arg	Leu			
			355					360					365						
70	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	His	Val	Asp	Asp	Leu	Ala	Asp	Asp	Leu	Ile	Ala			
	370						375					380							
75	Ala	Leu	Asp	Ala	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala										

ES 2 753 962 T3

385

390

<210> 2
 5 <211> 1182
 <212> ADN
 <213> Brevibacterium linens

 <400> 2
 10 atgacctcac tgcacccaga aacgctcatg gtccacggcg gaatgaaagg cctcaccgag 60
 gcaggagtcc acgtaccggc catcgacctc tcgaccacca acccagtcaa cgatgtcgcc 120
 accggcgggtg actcctacga atggctcgcc accggccata cgctcaagga cggcgactcg 180
 15 gccgtctacc agcgcctctg gcagcccggg gtcgcacgct tcgagaccgc gctggccggg 240
 ctcgaacacg ctgaggaagc agtcgccttc gccacgggca tggccgcaat gactgccgca 300
 20 cttctcgcgg ccgtcagcgc aggaacaccc cacatcgtcg cagtgcgtcc cctctatggc 360
 ggaagcgacc acctcctcga aaccggactg ctggggacaa cagtcacatg ggcaaaggaa 420
 gccgacatcg cctcggcgat ccaagatgac accggactcg tcattgtcga gaccccggca 480
 25 aaccccagcc tggaccttgt tgatctcgac agtgtcgtct cagccgccgg caacgtgcct 540
 gtgctggtgg acaacacatt ctgcacacct gttctccagc agcccatctc ccacggagcg 600
 30 gccctcgtac tgcacagcgc gacaaaatac ctcggcggtc atggcgatgc catgggcggc 660
 atcatcgcca ccaacgccga ctgggcgatg cgcctgcgac aggtccgagc catcacagga 720
 gccctgctcc accccatggg cgcgtatctc cttcatcggg gcttgcgcac tctggccgtg 780
 35 cgcattgcgcg cggctcagac caccgccggg gagctcgtg agcgcctgga cgcgcaccct 840
 gccatctccg tcgtccacta cccgggactg aaaggccagg acccacgcgg actgctcgga 900
 40 cgccaaatgt ccggtggtgg tgcgatgatc gcgatggagc tcgccggtgg attcgacgcc 960
 gcccgagct tcgtcgaaca ctgcaacctc gtcgtccacg cgggtgtccct gggcggcgct 1020
 gacactctca tccagcatcc ggcgtcactg actcacaggc cagttgcggc cacggcgaag 1080
 45 cccggcgatg gtctcatccg actctctgtg ggactcgaac acgtcgatga cctggcagac 1140
 gatctcatcg ctgccctcga cgcgagtcgg gccgctgcct ga 1182

50

<210> 3
 <211> 1182
 <212> ADN
 <213> Brevibacterium linens

55

<400> 3
 atgacctcgc tgcattcccga gacgctgatg gttcatggtg gaatgaaggg tctgaccgaa 60
 gctggagttc atgtcccggc aattgatctg agcaccacca atcccgtcaa tgatgtcgca 120
 60 accggtggag attcctatga gtggctggcc accggtcata cgctgaaaga tggatgatagc 180
 gcagtttatc agcgtctgtg gcagcctggg gttgctcggt ttgaaaccgc tctggcaggg 240
 65 ctggagcatg ctgaagaggc tgttgcatctt gcaacgggta tggcagctat gactgcagct 300
 ctactggctg cagtttcagc tggaacaccc cacattggtg ctgtaagacc tctgtacggg 360

ES 2 753 962 T3

	ggaagcgacc atctgctgga gaccggactg ctgggaacta cggttacttg ggctaaagag	420
	gcagatattg caagcgctat tcaagacgat accggactgg ttatagttga aaccccggct	480
5	aatccttcac tggatctagt cgacctgat tcggttgttt cggcagcagg taatgtaccc	540
	gtcctggctg ataatacttt ttgtactccc gtcctgcagc agcctatttc ccatggagct	600
	gcactggctc tgcattctgc tactaagtat ctgggtgggc acggtgacgc aatgggtggt	660
10	attattgcaa ccaatgcaga ttgggctatg cgtctgagac aggttagagc aattaccgga	720
	gcactgctgc atcctatggg tgcttacctg ctacatcggg gtctccgtac tctggcagta	780
15	cgtatgcgtg ctgctcagac caccgcaggg gaactggctg aacgtctgga tgctcatccc	840
	gcaatttccg ttgttcatta tccgggactg aagggtcagg atccccgtgg actgctggga	900
	cgtcaaagt ccgggggggg ggcgatgatt gctatggaac tggcaggggg ctttgatgca	960
20	gcacgtagtt ttgttgagca ttgtaatctg gttgttcatg ctgtatccct gggtggtgct	1020
	gatactctga ttcagcacc ggcttcgctg actcataggc ccgtcgcggc cacggcgaaa	1080
25	cctgggtgacg ggctgattag actgtcggta ggactggagc atgttgacga tctggctgat	1140
	gacctgattg ctgcactgga tgcttcgcgg gcagctgcat aa	1182

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que tiene actividades de metionina gamma-liasa y homocisteinasa que comprende una secuencia de aminoácidos, tal como se establece por la SEQ ID NO: 1, o una variante conservadora de la función del mismo, en el
5 que dicha variante conservadora de la función tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 90% con la SEQ ID NO: 1 y tiene las mismas propiedades o sustancialmente similares que dicho polipéptido.
2. Polipéptido, según la reivindicación 1, que está conjugado covalentemente con al menos un grupo polietilenglicol.
- 10 3. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que está acoplado covalentemente a un agente de reconocimiento de tumor.
4. Vector que comprende un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Ácido nucleico que codifica un polipéptido, según la reivindicación 1.
6. Ácido nucleico, según la reivindicación 5, que comprende una secuencia, tal como se establece por la SEQ ID NO: 2.
- 20 7. Ácido nucleico, según la reivindicación 5, que comprende una secuencia, tal como se establece por la SEQ ID NO: 3.
8. Vector que comprende un ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
- 25 9. Célula huésped, que comprende un vector, según la reivindicación 8.
10. Procedimiento para producir un polipéptido, según la reivindicación 1, cuyo procedimiento comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula huésped transformada, según la reivindicación 9, bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido; y (ii) recuperar el polipéptido expresado.
- 30 11. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar en el tratamiento de cáncer en un sujeto en necesidad del mismo.
12. Ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para usar en el tratamiento de cáncer en un
35 sujeto en necesidad del mismo.
13. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en combinación con uno o más cofactores enzimáticos para usar en el tratamiento de cáncer en un sujeto en necesidad del mismo.
- 40 14. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos para usar en el tratamiento de cáncer en un sujeto en necesidad del mismo.
- 45 15. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, y un portador farmacéuticamente aceptable.
16. Composición farmacéutica, según la reivindicación 15, que comprende uno o más cofactores enzimáticos.
- 50 17. Composición farmacéutica, según las reivindicaciones 15 o 16, que comprende uno o más agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos.
18. Composición farmacéutica, según la reivindicación 15, en la que el portador farmacéuticamente aceptable es un material de encapsulación.
- 55

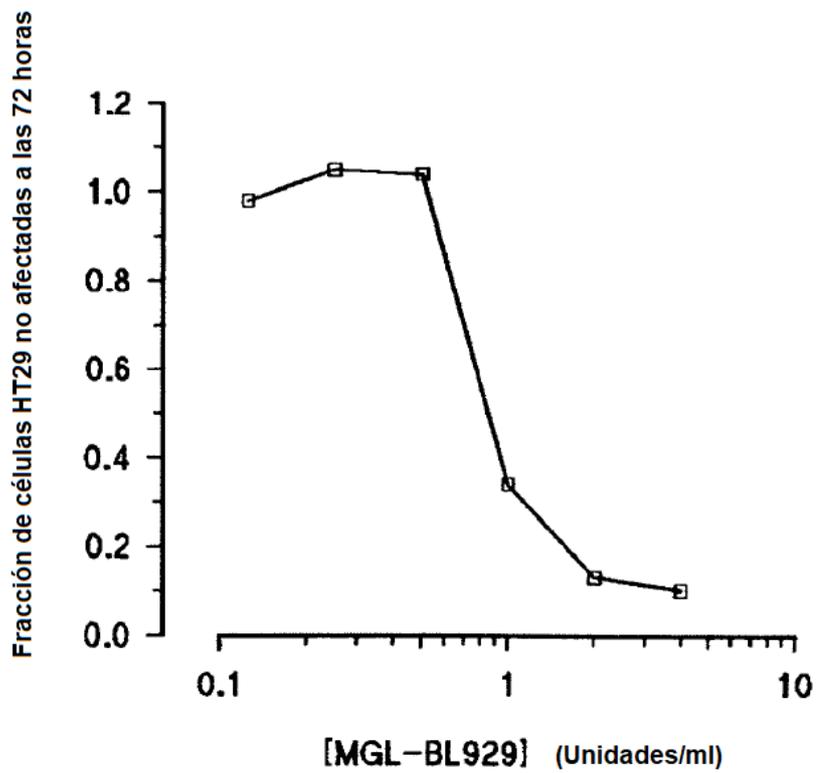
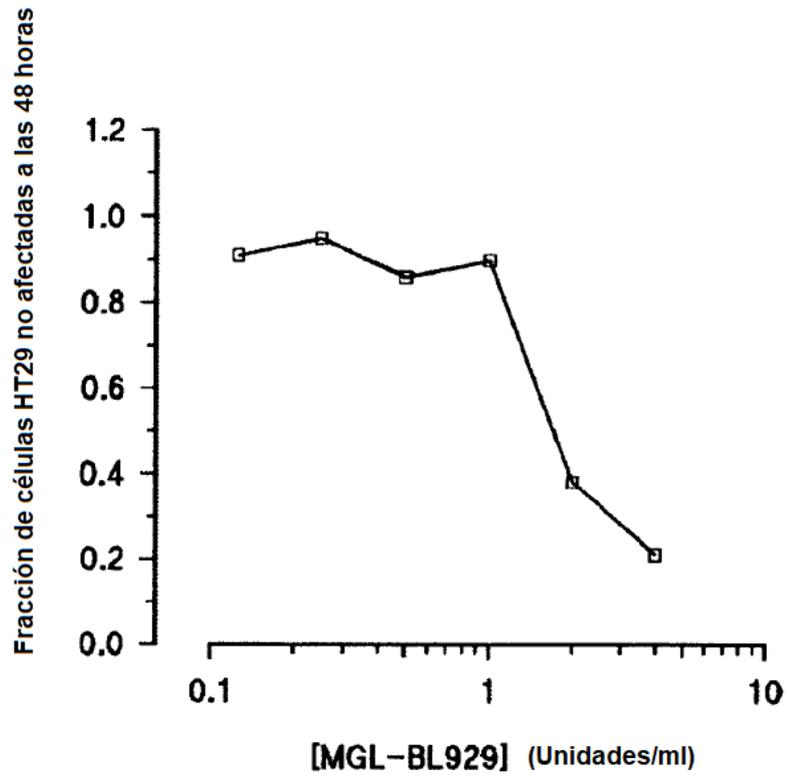


Figura 1

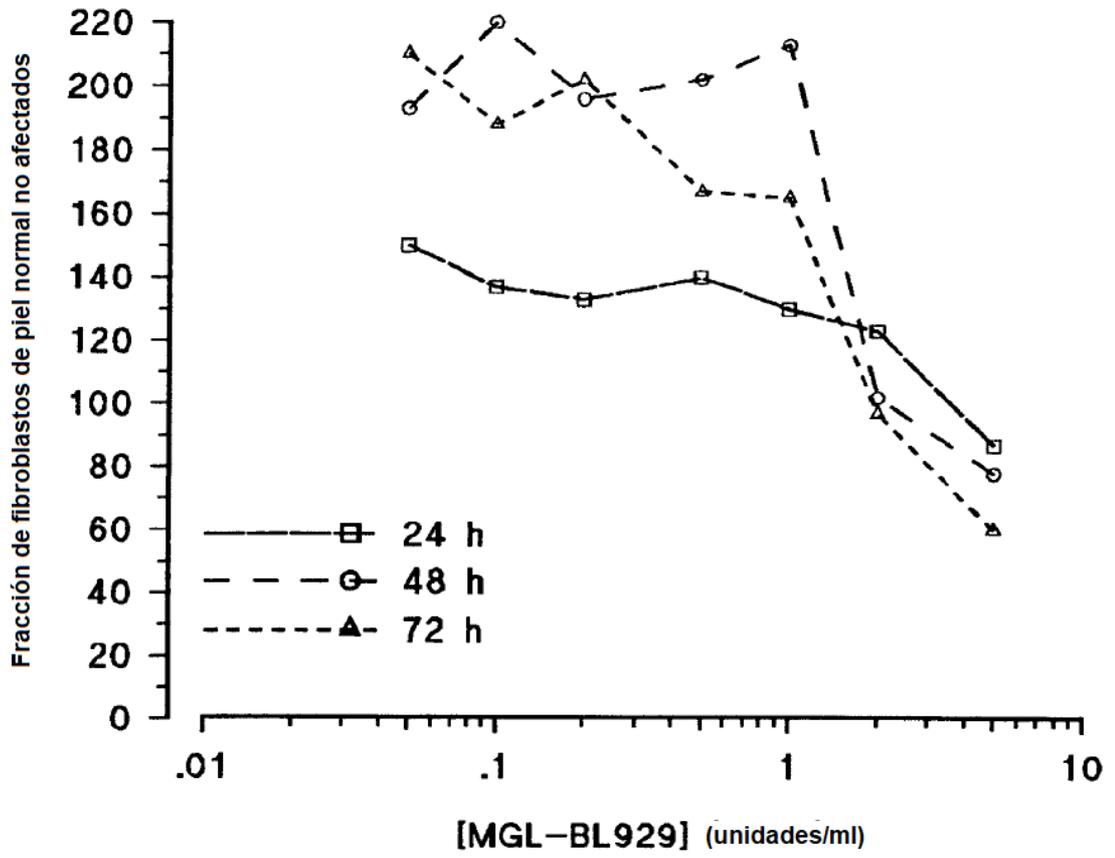


Figura 2

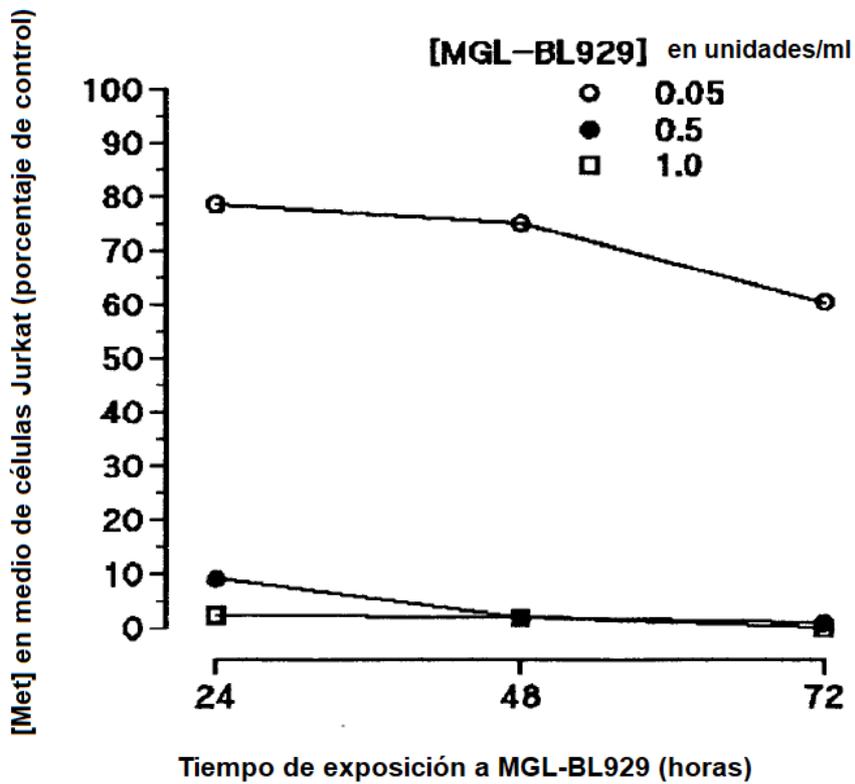
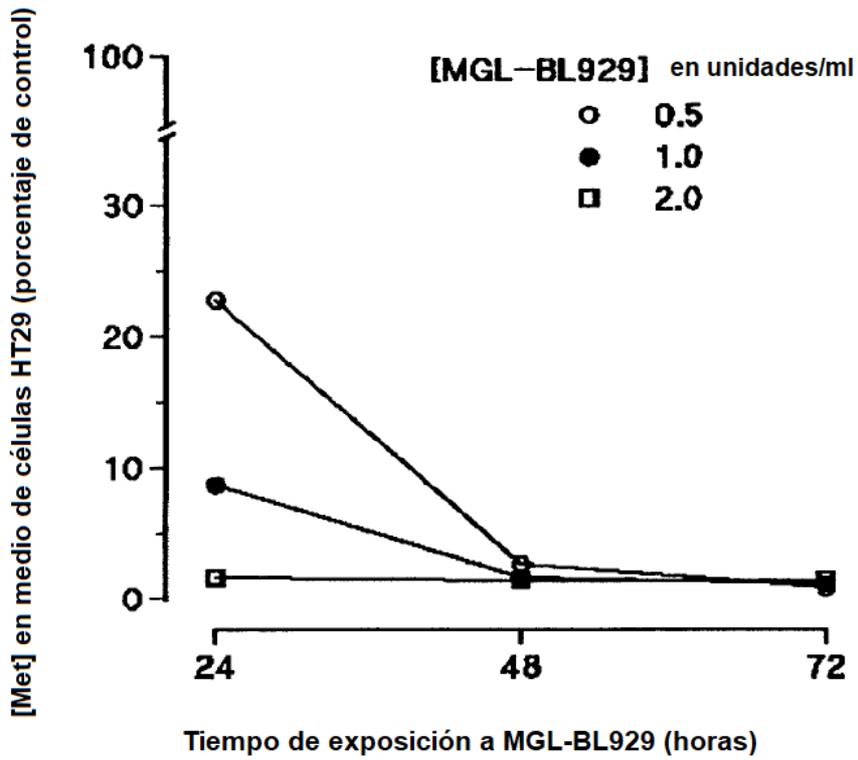


Figura 3A

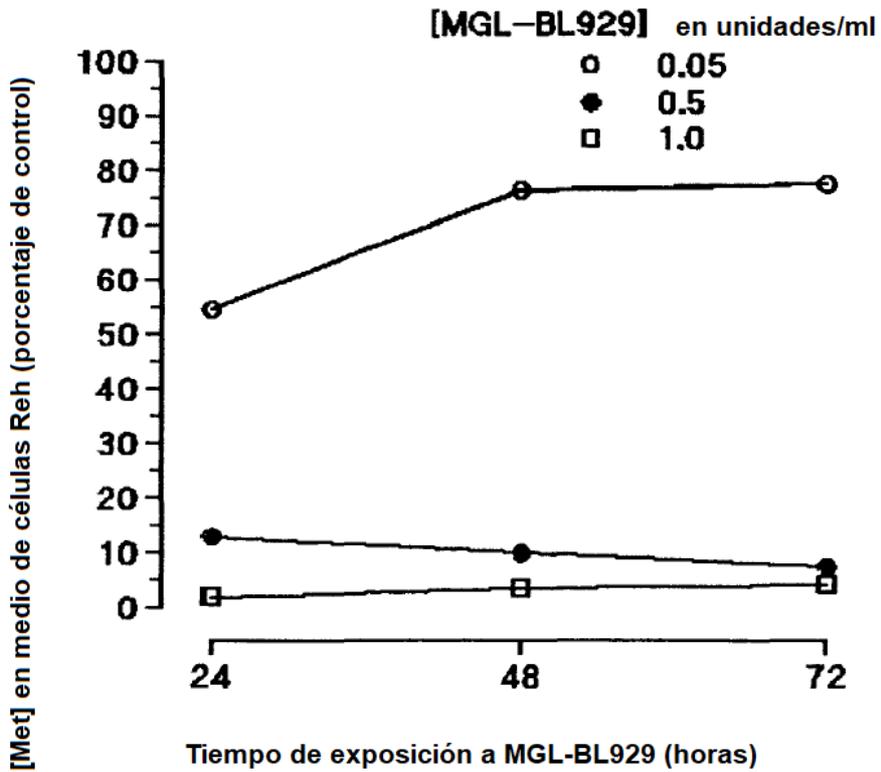
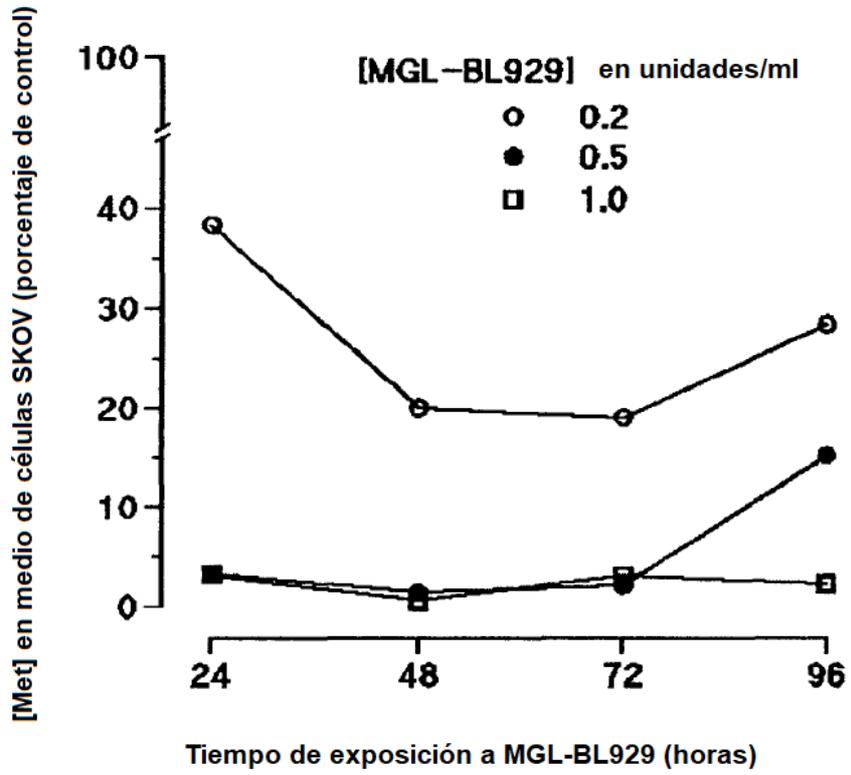


Figura 3B

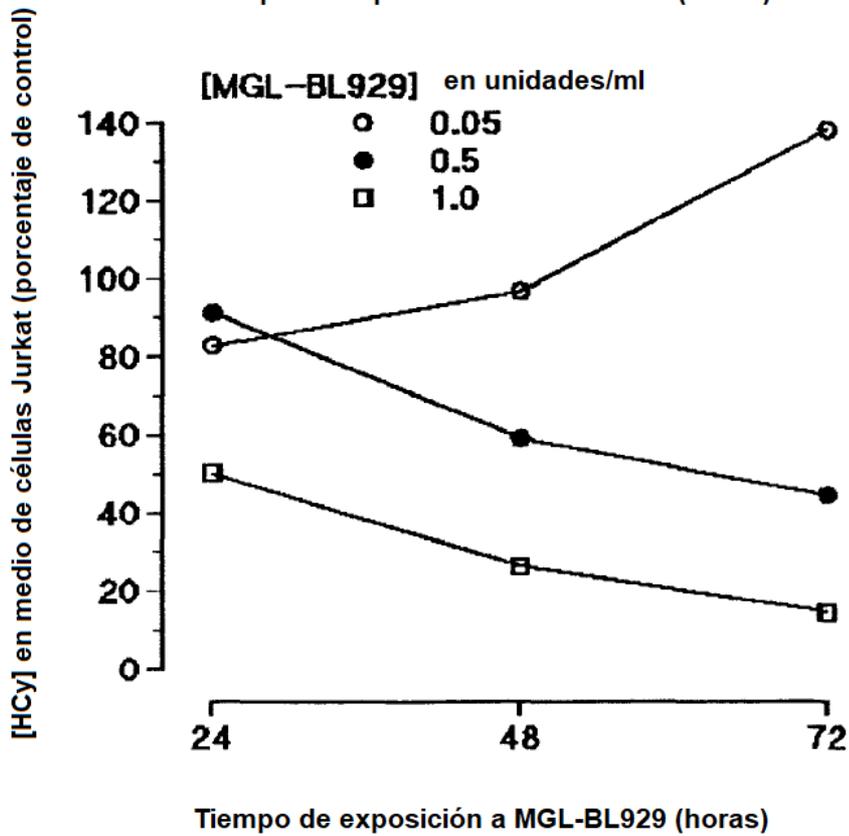
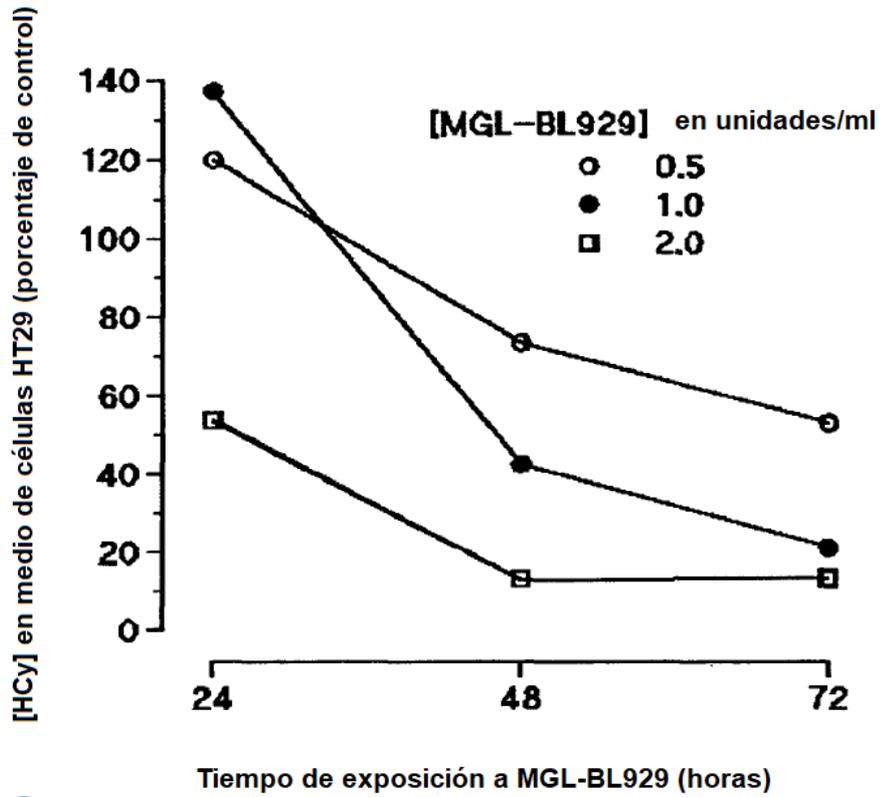


Figura 4A

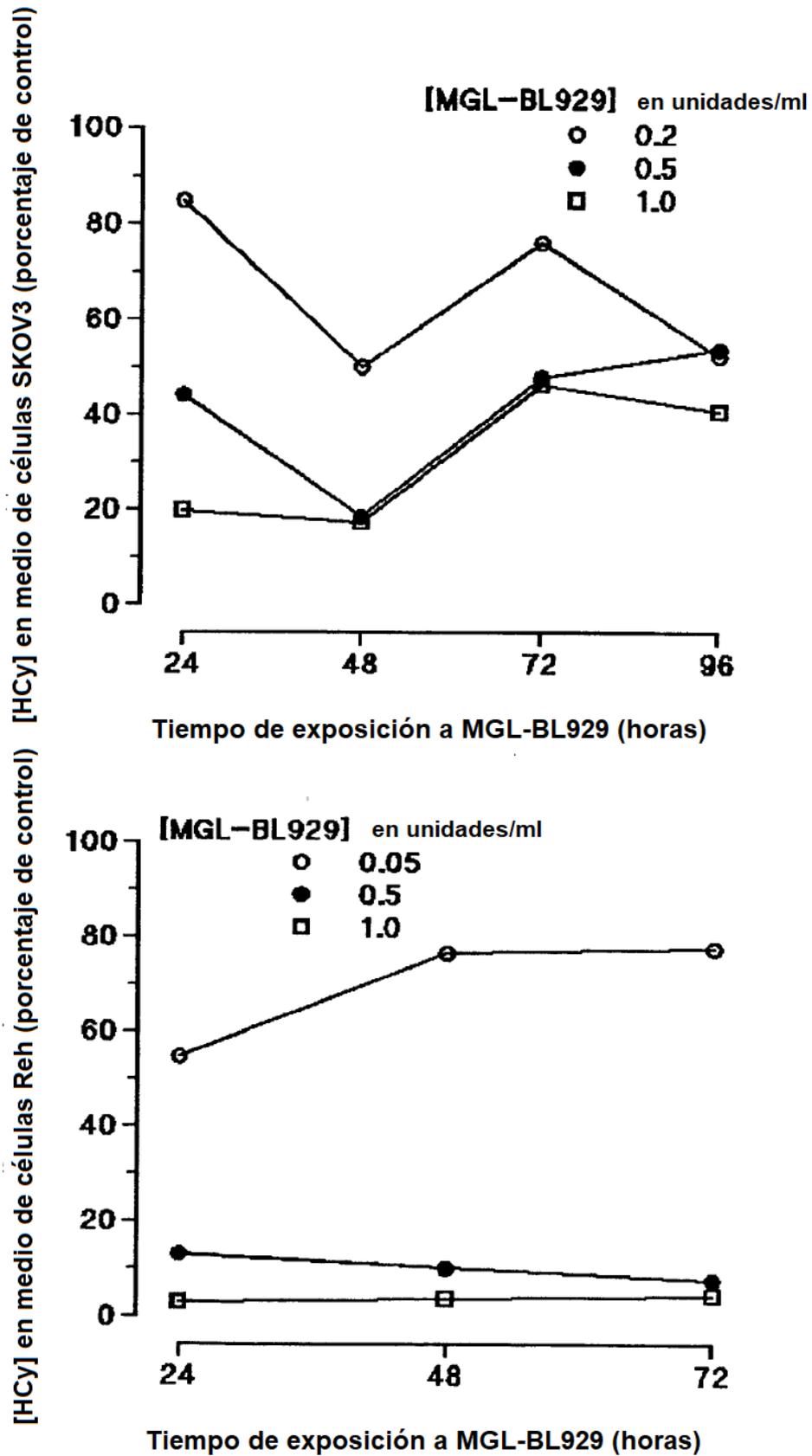


Figura 4B