

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 360**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/04 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014** **PCT/US2014/026766**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14151982**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 14769340 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 2968482**

54 Título: **Arginina desiminasa con reactividad cruzada reducida hacia anticuerpos para ADI - PEG 20 para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361790833 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2021

73 Titular/es:

TDW GROUP (100.0%)
4F, No.631 Ruiguang Road, Neihu District
Taipei, 11492, TW

72 Inventor/es:

ALMASSY, ROBERT;
SHOWALTER, RICHARD E.;
THOMSON, JAMES A.;
SISSON, WES;
SHIA, WEI-JONG;
CHEN, LI-CHANG y
LEE, YANG

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 805 360 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

Arginina desiminasa con reactividad cruzada reducida hacia anticuerpos para ADI - PEG 20 para el tratamiento del cáncer

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad a tenor de 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos n.º 61/790.833, presentada el 15 de marzo de 2013.

DECLARACIÓN CON RESPECTO AL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias asociado con la presente solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia en papel. El nombre del archivo de texto que contiene el listado de secuencias es POLA_003_01WO_ST25.txt. El archivo de texto es de aproximadamente 117 KB, fue creado el 11 de marzo de 2014 y se presenta electrónicamente a través de EFS-Web.

Antecedentes

Campo técnico

La presente divulgación se refiere en general a proteínas de arginina desiminasa (ADI), incluyendo proteínas ADI que tienen reactividad cruzada reducida con anticuerpos de ADI-PEG 20. Dichas proteínas ADI son útiles para tratar enfermedades dependientes de arginina o relacionadas con arginina, tales como el cáncer.

Descripción de la técnica relacionada

La terapia de privación de aminoácidos puede ser un tratamiento eficaz de algunas formas de cáncer. Hasta ahora, existe un ejemplo clínico conocido relevante para este enfoque que utiliza asparaginasa para reducir los niveles en circulación de asparagina e inhibir la síntesis de proteínas. Este tratamiento es particularmente eficaz para la leucemia linfoblástica aguda (Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004). Las células de leucemia linfoblástica aguda requieren el aminoácido asparagina para crecimiento y proliferación. Por el contrario, la mayoría de las células humanas normales son capaces de sintetizar asparagina y no se ven afectadas por el agotamiento de asparagina. Por lo tanto, la disminución de asparagina sérica con asparaginasa puede destruir selectivamente las células cancerosas sin dañar las células normales, los tejidos y al hospedador. Una forma de asparaginasa procedente de *E. coli* ha sido aprobada para uso humano. Sin embargo, la asparaginasa se encuentra solo en microbios; lo que la hace muy inmunogénica en seres humanos y también tiene una semivida corta en suero después de la inyección (Avramis 2005). Para hacer que la asparaginasa sea un fármaco más eficaz, estos inconvenientes se minimizaron formulando la asparaginasa procedente de *E. coli* con polietilenglicol (PEG) para reducir la inmunogenicidad de esta enzima y las reacciones alérgicas asociadas. Además, el PEG prolonga en gran medida la semivida en circulación de la asparaginasa, lo que reduce tanto la frecuencia del tratamiento como el coste total de la terapia. La asparaginasa formulada con PEG está aprobada para su uso y se comercializa con el nombre comercial Oncaspar® (Oncaspar® 2011, Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004, Fu 2007, Zeidan 2008).

La arginina es otro aminoácido no esencial para seres humanos y ratones (para revisión, véase Rogers 1994). En seres humanos, se puede sintetizar arginina a partir de citrulina en dos etapas a través de las enzimas del ciclo de Krebs (urea) argininosuccinato sintetasa (ASS, L-citrulina: L-aspartato ligasa [formación de AMP], EC 6.3.4.5) y argininosuccinato liasa (ASL, L-argininosuccinato arginina-liasa, EC 4.3.2.) (Haines 2011, Wu 2009, Morris 2006, Husson 2003, Tapiero 2002, Rogers 1994). ASS cataliza la conversión de citrulina y ácido aspártico en argininosuccinato, que después se convierte en arginina y ácido fumárico por ASL. Una dieta deficiente en arginina en seres humanos no induce hiperamonemia, aciduria orótica, ni alterar la tasa de síntesis de óxido nítrico (NO) en todo el cuerpo en seres humanos adultos (Tapiero 2002, Castillo 1995, Rogers 1994, Carey 1987, Barbul 1986, Snyderman 1959, Rose 1949). Aunque los recién nacidos prematuros parecen necesitar arginina (Wu 2004), los niveles de arginina no se correlacionan con la edad entre los bebés, niños y adultos jóvenes (Lücke 2007). En 1992, Takaku y Sugimura informaron por separado de que las líneas celulares de melanomas humanos y carcinoma hepatocelular (CHC) parecen necesitar arginina para su crecimiento. Otros estudios mostraron que la ADI pegilada fue eficaz para el tratamiento de melanomas y hepatomas con pocos efectos adversos.

El tratamiento con ADI-PEG 20 requiere múltiples dosis durante un periodo de tiempo. Después de varios tratamientos, se pueden desarrollar anticuerpos anti-ADI-PEG 20 que pueden limitar su eficacia continua. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de ADI que haya reducido la reactividad cruzada con anticuerpos anti-ADI-PEG20 para su uso en el tratamiento con el fin de mejorar y extender la eficacia de la terapia de agotamiento de arginina. La presente invención proporciona esta y otras ventajas para el tratamiento de cánceres.

Bibliografía: Avramis VI, Panosyan EH. 2005. Clin Pharmacokinet 44: 367-393; Barbul A. 1986. J Parenteral Enteral Nutr 10: 227-238; Carey GP, et al. 1987. J Nutr 117: 1734-1739; Castillo L, et al. 1995. Am J Physiol 268 (Endocrinol

Metab 31): E360-367; Fu CH, Sakamoto KM. 2007. Expert Opin Pharmacother 8: 1977-1984; Haines RJ, *et al.* 2011. Int J Biochem Mol Biol 2: 8-23; Husson A, *et al.* 2003. Eur J Biochem 270: 1887-1899; Lücke T, *et al.* 2007. Clin Chem Lab Med 45: 1525-1530; Morris SM Jr. 2006. Am J Clin Nutr 83 (Supl): 598S-512S; Rogers QR. 1994. en Proceedings from a Symposium Honoring Willard J. Visek - from Ammonia to Cancer and Gene Expression. Publicación especial 86 - abril de 1994, Estación Experimental de Agricultura, Universidad de Illinois, 211 Mumford Hall, Urbana, IL 61801, págs. 9-21; Tapiero H, *et al.* 2002. Biomed Pharmacother 56: 439-445, 2002; Viera Pinheiro JP, Boos J. 2004. Br J Haematol 125: 117-127; Wu G, *et al.* 2009. Amino Acids 37: 153-168; Wu G, *et al.* 2004. J Nutr Biochem 15: 442-451; Zeidan A, *et al.* 2008. Expert Opin Biol Ther 9: 111-119).

10 El documento WO 01/83774 A2 analiza una arginina desiminasa que se ha indicado que está genéticamente modificada para fabricación y procesamiento más eficaces, así como métodos para tratar el cáncer y otras patologías usando la arginina desiminasa modificada.

15 El documento WO 98/51784 A1 analiza la arginina desiminasa modificada con polietilenglicol, métodos de tratamiento del cáncer y métodos de tratamiento y/o inhibición de la metástasis.

El documento US 2009/238813 A1 analiza la obtención por ingeniería genética de una enzima humana con actividad hidrolítica de arginina, que se ha indicado que es adecuada para terapia humana.

20 Breve resumen

En un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición terapéutica como se indica en la reivindicación 1.

25 La presente divulgación también proporciona una arginina desiminasa aislada, en donde la arginina desiminasa aislada tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente. También se incluyen composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden una arginina desiminasa aislada o un fragmento de la misma que tiene actividad ADI y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinados ejemplos, la composición es estéril y/o sustancialmente exenta de pirógenos tales como endotoxinas. En un ejemplo, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente no es de *M. hominis*. En otro ejemplo, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente es de un organismo enumerado en la tabla 1. En determinados ejemplos, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente tiene una o más propiedades similares o mejores que las de ADI-PEG 20. A este respecto, la o las propiedades incluyen, pero sin limitación, Kcat, Km, pH óptimo, estabilidad, estabilidad proteolítica *in vivo* o ninguna necesidad de iones o cofactores que no están ya presentes en la sangre, o cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, tiene al menos 20 cambios de restos de superficie en comparación con arginina desiminasa de *M. hominis*. En otro ejemplo, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente tiene entre 20 y 135 cambios de restos de superficie, entre 40 y 100 cambios de restos de superficie, entre 30 y 60 cambios de restos de superficie, entre 80 y 100 cambios de restos de superficie o entre 100 y 120 cambios de restos de superficie, en comparación con arginina desiminasa de *M. hominis*.

45 En otro ejemplo, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente es de *M. arginini*, *M. arthritidis*, *M. phocicerebrale*, *M. gateae*, *M. phocidae*, *M. columbinum*, *M. iowae*, *M. crocodyli*, *M. alligatoris*, *H. orenii* o *M. bovis*. La arginina desiminasa ilustrativa que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-32.

50 En otro ejemplo, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente se ha modificado para eliminar al menos un sitio de pegilación. En otro ejemplo de la arginina desiminasa que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, al menos un resto de lisina se ha modificado por una sustitución de aminoácidos. A este respecto, en determinados ejemplos, al menos 5 restos de lisina, al menos 10 restos de lisina o al menos 20 restos de lisina se han modificados por una sustitución de aminoácidos.

55 En otro ejemplo, la arginina desiminasa que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente se une covalentemente a través de un conector a una molécula de PEG. A este respecto, la arginina desiminasa que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente puede unirse covalentemente a una o más moléculas de PEG, tal como a aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o aproximadamente 2 a aproximadamente 8 moléculas de PEG. Las moléculas de PEG pueden ser moléculas de PEG de cadena lineal o cadena ramificada y pueden tener un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 40.000 o un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 30.000. En los ejemplos en los que el PEG está unido covalentemente a la ADI de la presente divulgación, a través de un conector, el conector puede comprender un grupo succinilo, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo éster, un grupo epoxi, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un hidrato de

carbono, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina, un grupo metileno o cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, la fuente del grupo succinilo es succinato de succinimidilo.

También se desvela un polinucleótido que codifica una arginina desiminasa aislada descrita en el presente documento, vectores que comprenden el polinucleótido y células hospedadoras aisladas que comprenden los vectores.

También se desvela una composición que comprende la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente como se describe en el presente documento y un vehículo fisiológicamente aceptable. En determinados ejemplos, las composiciones pueden comprender además un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, docetaxel, carboplatino, ciclofosfamida, gemcitabina, cisplatino, sorafenib, sunitinib y everolimus.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición terapéutica del primer aspecto, para su uso en un método terapéutico según lo indicado por la reivindicación 13.

La presente divulgación proporciona un método para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente como se describe en el presente documento y un vehículo fisiológicamente aceptable, de este modo tratando, aliviando los síntomas o inhibiendo la progresión del cáncer. En determinados ejemplos, se ha determinado que el paciente que lo necesita tiene anticuerpos anti-ADI-PEG 20. En otro ejemplo, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, melanoma, incluyendo melanoma metastásico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma, leucemia linfocítica, leucemia mielógena crónica, linfoma, hepatoma, sarcoma, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide aguda recidivante, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo y cáncer de estómago.

La presente divulgación proporciona un método para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende ADI-PEG 20 y, después de un periodo de tiempo, administrar al paciente una composición que comprende la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente como se describe en el presente documento y un vehículo fisiológicamente aceptable, de este modo tratando, aliviando los síntomas o inhibiendo la progresión del cáncer. A este respecto, el periodo de tiempo puede determinarse, por ejemplo, detectando un nivel predeterminado de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en el paciente y/o midiendo u observando de otro modo la actividad de ADI en el paciente, en donde la composición que comprende la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente se administra después de la detección del nivel predeterminado de dichos anticuerpos anti-ADI-PEG 20 y/o medición u observación de un nivel predeterminado de actividad de ADI en el paciente.

También se incluyen proteínas aisladas de arginina desiminasa descritas en el presente documento para su uso en la preparación o fabricación de un medicamento para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer.

Las realizaciones preferidas de la invención, en cualquiera de sus diversos aspectos, son como se describe a continuación o como se define en las reivindicaciones subordinadas.

Descripción detallada

Los ejemplos de la presente divulgación se refieren a enzimas ADI seleccionadas, que en algunos ejemplos se modifican por ingeniería genética para tener un pequeño número de restos de lisina de superficie y se conjugan con PEG a través de un conector estable. Las enzimas ADI seleccionadas se eligen entre una gran cantidad de enzimas ADI, de diferentes organismos, en función de sus propiedades beneficiosas. Estas propiedades incluyen la capacidad de la enzima para establecer y mantener bajas concentraciones de arginina en sangre humana a través de conversión por ADI de arginina a citrulina y amoníaco. Además, las moléculas de ADI seleccionadas tienen reactividad cruzada reducida frente a anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en comparación con ADI-PEG 20, resultando dichos anticuerpos posiblemente del tratamiento previo de un paciente con ADI-PEG 20.

En determinados ejemplos, las enzimas en esta divulgación están pegiladas para proporcionar protección contra el aclaramiento renal y la proteólisis, así como inmunogenicidad o antigenicidad reducida. Para aumentar la eficacia de la pegilación, pueden introducirse por ingeniería genética modificaciones en las enzimas para reducir el número de restos de lisina de superficie y, por lo tanto, limitar el número de sitios de unión a PEG disponibles. Esto proporciona pegilación más completa y uniforme en los restos de unión a lisina restantes.

El conector de PEG seleccionado para unir metoxi-PEG a ADI se elige para proporcionar un enlace químicamente estable. Se espera que esto aumente la vida bioactiva de la molécula. Un conector químicamente estable también eliminará la hidrólisis y reducirá una respuesta inmunitaria que podría producirse ante un conector despegilado unido

a la superficie de la enzima.

Estas especificaciones acumuladas dan lugar a una o más moléculas que eliminan eficazmente arginina de la sangre de un paciente y no se neutralizan o eliminan por anticuerpos anti-ADI-PEG 20 de la terapia de agotamiento de arginina previa. Las moléculas se pegilan para retardar la neutralización y eliminación debido a su propia inmunogenicidad. Estos factores permitirán su uso en lugar de ADI-PEG 20 o además de ADI-PEG 20 (p. ej., como fármaco de seguimiento) para extender la terapia de agotamiento de arginina y, por lo tanto, aumentar la eficacia del tratamiento de agotamiento de arginina como un producto terapéutico antineoplásico.

Las células normales no requieren arginina para crecer, ya que pueden sintetizar arginina a partir de citrulina en un proceso de dos etapas catalizado por ASS y ASL. Por el contrario, determinados cánceres no expresan ASS. Determinados cánceres no expresan ASL, y otros cánceres pueden tener expresión disminuida de o pueden no expresar ASS y/o ASL. Por lo tanto, estos cánceres son auxótrofos para arginina. Esta diferencia metabólica puede aprovecharse para desarrollar una terapia segura y eficaz para tratar estas formas de cáncer. La ADI cataliza la conversión de arginina a citrulina a través de la ruta de arginina dihidrolasa y, por tanto, puede usarse para eliminar arginina.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p. ej., *Current Protocols in Protein Science*, *Current Protocols in Molecular Biology* o *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (2009); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición, 2001); Maniatis *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames y S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames y S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984) y otras referencias similares.

Como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido indique claramente otra cosa.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprenden" o variantes, tales como "comprende" o "comprender", implica la inclusión de un elemento o integrante o grupo de elementos o integrantes citados, pero no la exclusión de ningún otro elemento o integrante o grupo de elementos o integrantes.

Por "aproximadamente" se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta en 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

Por "estadísticamente significativo", se entiende que era improbable que el resultado se produjera por casualidad. La significación estadística se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. Las medidas de significación utilizadas habitualmente incluyen el valor de p, que es la frecuencia o probabilidad con la que se produciría el acontecimiento observado, si la hipótesis nula fuera cierta. Si el valor de p obtenido es menor que el nivel de significación, entonces la hipótesis nula es rechazada. En casos sencillos, el nivel de significación se define en un valor de p de 0,05 o menos.

En la presente memoria descriptiva, cada realización debe aplicarse realizando los cambios necesarios a todas las demás realizaciones, salvo que se indique expresamente otra cosa.

Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (p. ej., electroporación, lipofección). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o como se realiza habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Estas técnicas y procedimientos y otros relacionados pueden realizarse en general según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la terminología utilizada en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, biología molecular, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son los bien conocidos y habitualmente usados en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para tecnología recombinante, síntesis biológicas moleculares, microbiológicas, químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica y tratamiento de pacientes.

"Paciente" o "sujeto" se refiere a un animal, en determinadas realizaciones, un mamífero y, en una realización específica, un ser humano.

"Biocompatible" se refiere a materiales o compuestos que en general no son perjudiciales para las funciones biológicas

y que no darán lugar a ningún grado de toxicidad inaceptable, incluyendo estados alérgenos y patológicos.

La expresión "secuencia de referencia" se refiere en general a una secuencia codificante de ácido nucleico, o secuencia de aminoácidos, con la que se compara otra secuencia. Todas las secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas descritas en el presente documento se incluyen como secuencias de referencia, incluyendo las descritas por nombre y las descritas en las tablas y el listado de secuencias.

A lo largo de la presente divulgación, se pueden usar las siguientes abreviaturas: PEG, polietilenglicol; ADI, arginina desiminasa; SS, succinato de succinimidilo; SSA, succinimidil succinimida; SPA, propionato de succinimidilo; NHS, N-hidroxi-succinimida; ASS1 o ASS, argininosuccinato sintetasa; ASL, argininosuccinato liasa.

En la presente divulgación, un polinucleótido que codifica ADI se puede obtener, clonar, aislar, sintetizar o producir a partir de cualquier fuente, incluyendo, por ejemplo, microorganismos, biotecnología recombinante o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, puede clonarse arginina desiminasa de microorganismos de los géneros *Mycoplasma*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Borrelia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y/o *Giardia*. En determinados ejemplos, se clona arginina desiminasa a partir de *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma arginini*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Giardia intestinalis*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus sake* o cualquier combinación de los mismos. En otros ejemplos, la arginina desiminasa se clona a partir de una especie enumerada en la tabla 1. En particular, la ADI utilizada en la presente divulgación puede comprender la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32, o una variante o fragmento o extensión de la misma que tiene actividad ADI (p. ej., capaz de metabolizar arginina en citrulina y amoníaco). Algunas de las secuencias proporcionadas en el listado de secuencias no representan secuencias de proteínas ADI de longitud completa. Por tanto, en determinados ejemplos, se pueden añadir restos de aminoácidos adicionales a uno de los extremos de las secuencias proporcionadas en el presente documento para preparar una proteína de longitud completa que tenga actividad ADI. El experto en la materia puede determinar los aminoácidos específicos para añadir en función de alineamientos de secuencias de ADI conocidas. Dichas moléculas de ADI pueden sintetizarse usando técnicas conocidas. Se proporcionan ADI(r) "extendidas" ilustrativas, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 26-32.

En determinados ejemplos, las enzimas ADI como se describen en el presente documento se comparan con la molécula de referencia ADI-PEG 20 procedente de *M. hominis*. Como se usa en el presente documento, "ADI-PEG 20" se refiere a la molécula de ADI conocida en la técnica y descrita, por ejemplo, en el documento US6183738; el documento US6635462; Ascierto PA, *et al.* (2005) Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. *J Clin Oncol* 23 (30): 7660-7668; Izzo F, *et al.* (2004) Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol* 22 (10): 1815-1822; Holtsberg FW, *et al.* (2002), Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. *J Control Release* 80 (1-3): 259-271; Kelly *et al.*, (2012) *British Journal of Cancer* 106, 324 - 332. Como reconocería el experto en la materia, esta molécula es una enzima ADI pegilada (PEG 20.000) procedente de *M. hominis* y tiene dos sustituciones (K112E; P210S) en relación con la enzima ADI de *M. hominis* de tipo silvestre.

Las enzimas arginina desiminasa como se describen en el presente documento se cribaron a partir de una gran cantidad de enzimas ADI y tienen un nivel reducido de reactividad con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 de pacientes. Los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 pueden aparecer en sujetos tratados con ADI-PEG 20 y pueden medirse usando metodologías conocidas. La reactividad frente a anticuerpos anti-ADI-PEG 20 se puede determinar, por ejemplo, usando ELISA u otros ensayos similares conocidos por el experto en la materia.

A este respecto, se puede utilizar ADI-PEG 20 como una comparación para evaluar el nivel de reactividad cruzada con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente. Un nivel de reactividad cruzada que es de manera estadísticamente significativa menor que el de ADI-PEG 20 con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente puede ser útil en el presente documento. En determinados ejemplos, las enzimas arginina desiminasa como se describe en el presente documento tienen baja o ninguna reactividad cruzada con anticuerpos anti-ADI-PEG 20. En otro ejemplo, cualquier reducción de la reactividad con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en comparación con la reactividad con ADI-PEG 20 puede ser beneficiosa ya que una enzima ADI de este tipo mejoraría las opciones de tratamiento para pacientes que necesiten terapia de agotamiento de arginina. Por tanto, las enzimas arginina desiminasa como se describe en el presente documento tienen reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente en comparación con la reactividad de ADI-PEG 20 con dichos anticuerpos.

Se usa "ADIr" en el presente documento para hacer referencia a una enzima ADI de la presente divulgación que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en comparación con la reactividad de ADI-PEG 20 con dichos anticuerpos. La nomenclatura "ADIr" se usa para distinguir las moléculas identificadas en el presente documento de ADI y ADI-PEG 20 como se conoce en la técnica.

Las enzimas ADIr de la presente divulgación tienen características o propiedades similares o mejores que las de ADI-PEG 20, para reducir y mantener bajos niveles de arginina en sangre para tratamiento eficaz contra el cáncer. Dichas propiedades incluyen Kcat, Km, pH óptimo, estabilidad, estabilidad proteolítica *in vivo* y falta de necesidad de iones o

cofactores que no estén ya presentes en la sangre, o cualquier combinación de los mismos. En determinados ejemplos, una ADIr como se describe en el presente documento tiene propiedades que son aproximadamente o al menos 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayores, que propiedades similares de ADI-PEG 20. En otros ejemplos, una ADIr descrita en el presente documento tiene propiedades que son aproximadamente o al menos aproximadamente 100 %, 105 %, 110 %, 120 %, 140 %, 150 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 250 %, 260 %, 280 %, 300 %, 320 %, 340 %, 350 %, 360 %, 400 %, 420 %, 450 %, 460 %, 500 %, 520 %, 550 % o mayor que la propiedad específica de ADI-PEG 20 que se compara.

Por tanto, en determinados ejemplos, una ADIr tiene una Kcat que es aproximadamente o al menos aproximadamente 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de la Kcat de ADI-PEG 20, o mejor. En determinados ejemplos, una ADIr tiene una Kcat que es aproximadamente o al menos aproximadamente 100 %, 105 %, 110 %, 120 %, 125 %, 140 %, 150 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 250 %, 260 %, 280 %, 300 %, 320 %, 340 %, 350 %, 360 %, 400 %, 420 %, 450 %, 460 %, 500 %, 520 %, 550 % o más, veces la Kcat de ADI-PEG 20. En determinados ejemplos, la Kcat de las enzimas ADIr descritas en el presente documento, o composiciones que las comprenden, es de aproximadamente $0,5 \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente 15 s^{-1} y, en un ejemplo adicional, es de aproximadamente 1 s^{-1} a aproximadamente 12 s^{-1} , de aproximadamente 1 s^{-1} a aproximadamente 10 s^{-1} , de aproximadamente $1,5 \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente 9 s^{-1} , de aproximadamente 2 s^{-1} a aproximadamente 8 s^{-1} o de aproximadamente $2,5 \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente 7 s^{-1} . En determinados ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Kcat de aproximadamente $2,5 \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $7,5 \text{ s}^{-1}$. En algunos ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Kcat de aproximadamente $2,5 \text{ s}^{-1}$, aproximadamente 3 s^{-1} , aproximadamente $3,5 \text{ s}^{-1}$, aproximadamente 4 s^{-1} , aproximadamente $4,5 \text{ s}^{-1}$, aproximadamente 5 s^{-1} , aproximadamente $5,5 \text{ s}^{-1}$, aproximadamente 6 s^{-1} , aproximadamente $6,5 \text{ s}^{-1}$, aproximadamente 7 s^{-1} , aproximadamente $7,2 \text{ s}^{-1}$, aproximadamente $7,5 \text{ s}^{-1}$, aproximadamente 8 s^{-1} , aproximadamente 10 s^{-1} , aproximadamente 15 s^{-1} , aproximadamente 20 s^{-1} , aproximadamente 25 s^{-1} , aproximadamente 30 s^{-1} , aproximadamente 35 s^{-1} , aproximadamente 40 s^{-1} , aproximadamente 45 s^{-1} , aproximadamente 50 s^{-1} , aproximadamente 55 s^{-1} , aproximadamente 60 s^{-1} , aproximadamente 65 s^{-1} , aproximadamente 70 s^{-1} , aproximadamente 75 s^{-1} , aproximadamente 80 s^{-1} , aproximadamente 85 s^{-1} , aproximadamente 90 s^{-1} , aproximadamente 95 s^{-1} o aproximadamente 100 s^{-1} .

Por tanto, en determinados ejemplos, una ADIr tiene una Km que es aproximadamente o al menos aproximadamente 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de la Km de ADI-PEG 20, o mejor. Por tanto, en determinados ejemplos, una ADIr tiene una Km que es aproximadamente o al menos aproximadamente 100 %, 105 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 % o 250 % de la Km de ADI-PEG 20. En un ejemplo, una ADIr, o una formulación pegilada de la misma, tiene una Km de aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $50 \mu\text{M}$, o de aproximadamente $1,6 \mu\text{M}$ a aproximadamente $48 \mu\text{M}$, o de aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $15 \mu\text{M}$ y, en un ejemplo adicional, es de aproximadamente $1 \mu\text{M}$ a aproximadamente $12 \mu\text{M}$, de aproximadamente $1 \mu\text{M}$ a aproximadamente $10 \mu\text{M}$, de aproximadamente $1,5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $9 \mu\text{M}$, de aproximadamente $1,5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $8 \mu\text{M}$ o de aproximadamente $1,5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $7 \mu\text{M}$. En determinados ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Km de aproximadamente $1,5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $6,5 \mu\text{M}$. En algunos ejemplos, la ADIr o la formulación pegilada de la misma tiene una Km de aproximadamente $1,5 \mu\text{M}$, aproximadamente $1,6 \mu\text{M}$, aproximadamente $2 \mu\text{M}$, aproximadamente $2,5 \mu\text{M}$, aproximadamente $3 \mu\text{M}$, aproximadamente $3,5 \mu\text{M}$, aproximadamente $4 \mu\text{M}$, aproximadamente $4,5 \mu\text{M}$, aproximadamente $5 \mu\text{M}$, aproximadamente $5,5 \mu\text{M}$, aproximadamente $6 \mu\text{M}$, aproximadamente $6,5 \mu\text{M}$, aproximadamente $7 \mu\text{M}$, aproximadamente $8 \mu\text{M}$, aproximadamente $9 \mu\text{M}$, aproximadamente $10 \mu\text{M}$, aproximadamente $12 \mu\text{M}$, aproximadamente $14 \mu\text{M}$, aproximadamente $15 \mu\text{M}$, aproximadamente $16 \mu\text{M}$, aproximadamente $18 \mu\text{M}$, aproximadamente $20 \mu\text{M}$, aproximadamente $22 \mu\text{M}$, aproximadamente $24 \mu\text{M}$, aproximadamente $25 \mu\text{M}$, aproximadamente $26 \mu\text{M}$, aproximadamente $28 \mu\text{M}$, aproximadamente $30 \mu\text{M}$, aproximadamente $32 \mu\text{M}$, aproximadamente $34 \mu\text{M}$, aproximadamente $35 \mu\text{M}$, aproximadamente $36 \mu\text{M}$, aproximadamente $38 \mu\text{M}$, aproximadamente $40 \mu\text{M}$, aproximadamente $42 \mu\text{M}$, aproximadamente $44 \mu\text{M}$, aproximadamente $45 \mu\text{M}$, aproximadamente $46 \mu\text{M}$, aproximadamente $48 \mu\text{M}$ o aproximadamente $50 \mu\text{M}$.

En determinados ejemplos, una ADIr actúa a un pH cercano al pH fisiológico de la sangre humana. Por tanto, en un ejemplo, una ADIr actúa a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10,8, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. En un ejemplo, una ADIr tiene buena actividad enzimática a aproximadamente pH 7,4.

En determinados ejemplos, una ADIr tiene estabilidad durante almacenamiento a largo plazo y estabilidad frente a temperatura y proteolítica durante el tratamiento en el cuerpo humano. En ejemplos adicionales, una ADIr no necesita iones o cofactores para su actividad que no estén ya presentes en la sangre.

En determinados ejemplos, una ADIr descrita en el presente documento tiene en general una secuencia de aminoácidos suficientemente diferente de *M. hominis* para que haya cambios de restos de superficie que reduzcan o

eliminen sitios antigénicos para anticuerpos anti-ADI-PEG 20. En un ejemplo, no habrá reactividad cruzada entre la molécula de ADIr seleccionada y los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 existentes en un sujeto, y se generará una respuesta inmunitaria completamente nueva en un sujeto en lugar de una maduración de la respuesta existente a ADI de *M. hominis*. Por tanto, en un ejemplo, una ADIr como se describe en el presente documento tiene una identidad de secuencia de 20 % a 85 % para ADI de *M. hominis* como se expone en la SEQ ID NO: 1. En determinados ejemplos, una ADIr como se describe en el presente documento tiene un porcentaje de identidad de secuencia aún menor con ADI de *M. hominis*, tal como 10 % o 15 % de identidad. En otro ejemplo, una ADIr como se describe en el presente documento tiene 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 % o incluso 83 % de identidad con ADI de *M. hominis* y todavía tiene reactividad cruzada reducida hacia anticuerpos anti-ADI-PEG 20.

En un ejemplo, una ADIr como se describe en el presente documento tiene de aproximadamente 25 a 140 cambios de restos de superficie en comparación con ADI de *M. hominis*. Se pueden identificar restos de superficie a partir de la estructura cristalina de ADI de *M. hominis* y se pueden determinar restos de superficie para ADI de otros organismos mediante homología de secuencia. Una ADIr como se describe en el presente documento puede tener aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 o aproximadamente 140 cambios de restos de superficie en comparación con ADI de *M. hominis* (véase SEQ ID NO: 1).

En otro ejemplo, una ADIr como se describe en el presente documento tiene de aproximadamente 25 a 140 cambios de restos en comparación con ADI de *M. hominis*. No es necesario que dichos cambios de restos sean solo de restos de aminoácidos de superficie. Dichos cambios (o adiciones o supresiones) de restos pueden estar en cualquier extremo de la molécula o en cualquier resto de la ADI, de modo que la ADI modificada tenga la actividad de ADI deseada como se describe en el presente documento. Se pueden identificar restos para cambiar a partir de la estructura cristalina de ADI de *M. hominis* y se pueden determinar restos para ADI de otros organismos mediante homología de secuencia. Una ADIr como se describe en el presente documento puede tener aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 o aproximadamente 140 cambios de restos de aminoácidos en comparación con ADI de *M. hominis* (véase SEQ ID NO: 1).

De una gran cantidad de enzimas ADI, la tabla 1 enumera 24 enzimas ADIr con su porcentaje de identidad de secuencia en relación con ADI de *M. hominis*. Según la bibliografía, las secuencias de aminoácidos de ADI de *M. hominis*, *M. arginini* y *M. arthritidis* están estrechamente relacionadas y estas enzimas tienen buenas propiedades catalíticas. Más recientemente, se han descubierto enzimas ADI adicionales que tienen secuencias estrechamente relacionadas con estas tres. Se han identificado enzimas de ADI de *Mycoplasma* con relaciones más distantes, aunque se sabe menos acerca de ellas. Y existen enzimas ADI con relaciones aún más distantes de fuentes bacterianas y de otro tipo.

En determinados ejemplos, las enzimas ADIr identificadas en el presente documento a partir de varias especies seleccionadas, tienen restos de lisina de superficie (en determinados ejemplos, hasta 30 o más). Sin embargo, en determinados ejemplos, una enzima ADIr puede tener muchos menos restos de lisina de superficie, tales como solo 2 restos de lisina como en el caso de ADI de *Mycobacterium bovis*, o incluso no tener restos de lisina (véase, p. ej., ADI de *Mycobacterium* sp. MCS; n.º de GenBank ABG10381). Por lo tanto, las enzimas ADIr identificadas en el presente documento que tienen reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20, tienen aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 o más restos de lisina superficial.

Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido" se usan indistintamente y significan un polímero de aminoácidos no limitado a ninguna longitud particular. Los términos no excluyen modificaciones tales como miristoilación, sulfatación, glucosilación, fosforilación y adición o supresión de secuencias señal. Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una o más cadenas de aminoácidos, en donde cada cadena comprende aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos y en donde dicho polipéptido o proteína puede comprender múltiples cadenas unidas de manera no covalente y/o de manera covalente mediante enlaces peptídicos, que tienen la secuencia de proteínas nativas, es decir, proteínas producidas por células de origen natural y específicamente no recombinantes o células modificadas por ingeniería genética o recombinantes, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen supresiones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente las proteínas ADIr de la presente divulgación o secuencias que tienen supresiones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de las proteínas ADIr. En determinados ejemplos, el polipéptido es un polipéptido "recombinante", producido por una célula recombinante que comprende una o más moléculas de ADN recombinante, que normalmente están formadas por secuencias polinucleotídicas heterólogas o combinaciones de secuencias polinucleotídicas que de otro modo no se encontrarían en la célula.

La expresión "proteína aislada" a la que se hace referencia en el presente documento significa que una proteína objeto (1) está exenta de al menos algunas otras proteínas con las que se encontraría normalmente en la naturaleza, (2) está esencialmente exenta de otras proteínas de la misma fuente, p. ej., de la misma especie, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono y otros materiales con los que está asociada en la naturaleza, (5) no está asociada (por interacción covalente o no covalente) con partes de una proteína con la que la "proteína aislada" está asociada en la naturaleza, (6) está asociada operativamente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociada en la naturaleza o (7) no aparece en la naturaleza. Dicha proteína aislada puede estar codificada por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, puede ser de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos. En determinados ejemplos, la proteína aislada está sustancialmente exenta de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su ambiente natural que interferirían con su uso (terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación u otros).

El término "variante" incluye un polipéptido que difiere de un polipéptido de referencia desvelado de manera específica en el presente documento (p. ej., SEQ ID NO: 1-32) en una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones. Los polipéptidos variantes son biológicamente activos, es decir, continúan poseyendo la actividad enzimática o de unión de un polipéptido de referencia. Dichas variantes pueden ser el resultado de, por ejemplo, el polimorfismo genético y/o de la manipulación humana.

En muchos casos, una variante biológicamente activa contendrá una o más sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la materia de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no cambien sustancialmente. Como se ha descrito anteriormente, se pueden realizar modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente divulgación y aún obtener una molécula funcional que codifica un polipéptido variante o derivado con características deseables.

Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Ya que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, se pueden realizar determinadas sustituciones de secuencia de aminoácidos en una secuencia proteica, y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que se pueden realizar diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones desveladas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos, sin pérdida apreciable de su utilidad.

Al realizar dichos cambios, puede tenerse en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. Se entiende en general en la técnica la importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo 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 basándose en sus características de hidrofobia y de carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+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). Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan un índice o una puntuación hidropática similar y aún dar lugar a una proteína con actividad biológica similar, es decir, obtener aún una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén en un intervalo de ± 2 , se prefieren en particular los que estén en un intervalo de ± 1 y se prefieren más en particular los que estén en un intervalo de $\pm 0,5$.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente basándose en la hidrofilia. La patente de los Estados Unidos n.º 4.554.101, indica que la mayor hidrofilia promedio local de una proteína, regida por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de los Estados Unidos n.º 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y obtener aún una proteína biológicamente equivalente y, en particular, una inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia estén en un intervalo de ± 2 , se prefieren en particular los que estén en un intervalo de ± 1 y se prefieren más en particular los que estén en un intervalo de $\pm 0,5$.

Como se ha destacado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan, por lo tanto, en general en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilia,

carga, tamaño y similares. Los expertos en la materia conocen bien sustituciones ilustrativas que toman en consideración varias de las características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

- 5 Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos basándose en la similitud de la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos de grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos
- 10 de aminoácidos que pueden representar cambios conservadores incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his.

- Una variante puede también, o como alternativa, contener cambios no conservadores. En un ejemplo preferido, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, supresión o adición de menos de
- 15 aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 aminoácidos o incluso 1 aminoácido. Las variantes pueden también (o como alternativa) modificarse mediante, por ejemplo, la supresión o adición de aminoácidos que tienen influencia mínima sobre la inmunogenicidad, estructura secundaria, actividad enzimática y/o naturaleza hidropática del polipéptido.

- En general, las variantes presentarán aproximadamente o al menos aproximadamente 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de similitud o identidad de secuencia u homología de secuencia con una secuencia polipeptídica de referencia (p. ej., SEQ ID NO: 1-32). Por otra parte, se contemplan secuencias que difieren de las secuencias nativas u originales por la adición (p. ej., adición C-terminal, adición N-terminal, ambas), supresión, truncamiento, inserción o sustitución de aproximadamente 1, 2, 3,
- 20 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos pero que conservan las propiedades o actividades de una secuencia polipeptídica original o de referencia.

- En algunos ejemplos, los polipéptidos variantes difieren de la secuencia de referencia en al menos uno pero en menos de 50, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3 o 2 restos de aminoácidos. En otros ejemplos, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia de referencia en aproximadamente o al menos 0,5 % o 1 % pero menos de 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de los restos. (Si esta comparación requiere alineación, las secuencias deben alinearse para máxima similitud. Las secuencias "en bucle" por eliminaciones o inserciones, o emparejamientos erróneos, se consideran diferencias).
- 30

- La expresión "fragmento polipeptídico" se refiere a un polipéptido que tiene una supresión aminoterminal, una supresión carboxiterminal y/o una supresión o sustitución interna de un polipéptido de origen natural o producido de manera recombinante. En determinados ejemplos, un fragmento polipeptídico puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 400 aminoácidos de longitud. Se apreciará que, en determinados ejemplos, los fragmentos son de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350 o 400 aminoácidos de longitud. Los fragmentos polipeptídicos particularmente útiles incluyen dominios funcionales, incluyendo los dominios ADI catalíticos de la ADIr descrita en el presente documento. En el caso de una ADIr, los fragmentos útiles incluyen, pero sin limitación, el dominio catalítico y el dominio α -helicoidal.
- 35 40

- Muchos PEG activados utilizados para conjugación con ADI se unen covalentemente a restos de lisina. Habitualmente, hay muchas menos moléculas de PEG unidas a ADI que restos de lisina. Tanto el número como la distribución de las uniones pueden ser heterogéneos entre moléculas. Cualquier resto de lisina particular se modificará solo en una pequeña fracción de las moléculas de ADI. Esta heterogeneidad de modificación de sitio y baja ocupación de PEG puede dar lugar a problemas tanto con la caracterización del fármaco como con la eficacia del blindaje de PEG en sitios antigénicos. Por lo tanto, en determinados ejemplos, las enzimas ADIr seleccionadas, como se describen en el presente documento, se modifican mediante reemplazo de lisina con otros tipos de restos para reducir la cantidad de restos de lisina. Esto produce una proteína pegilada de manera más uniforme y aumenta la ocupación de PEG en los restos de lisina restantes. Los restos de lisina específicos que se han elegido cambiar a otros restos se seleccionarán para conservar la actividad enzimática. Se espera que esta pegilación más uniforme proporcione mayor protección contra la proteólisis en sangre y mayor blindaje de sitios antigénicos frente a anticuerpos del paciente.
- 45 50 55

- En determinados ejemplos, la ADIr de la presente divulgación puede modificarse como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.635.462. En particular, las modificaciones de uno o más de los restos de aminoácidos de origen natural de una ADIr pueden proporcionar una enzima que se renaturaliza y formula más fácilmente, mejorando de este modo la fabricación de ADIr y composiciones terapéuticas que la comprendan. En un ejemplo, la ADIr de la presente divulgación se modifica para eliminar uno o más restos de lisina (p. ej., la lisina puede sustituirse con otro aminoácido o análogos del mismo, o un aminoácido no natural). En particular, en un ejemplo, la ADIr se modifica para que esté exenta de lisina en una posición equivalente a 112, 374, 405 o 408 de la SEQ ID NO: 1 (ADI de *M. hominis*) o una combinación de una o más de estas posiciones. En un ejemplo adicional, la ADIr se modifica para que esté exenta de una o más lisinas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más restos de lisina, si estuvieran presentes, pueden sustituirse con otro aminoácido o análogos del mismo, o un aminoácido no natural. En un ejemplo, una ADIr tiene 5 lisinas sustituidas, por ejemplo, en una posición equivalente a
- 60 65

la posición 7, 88, 137, 209 y 380 de la SEQ ID NO: 1. En otro ejemplo, una ADIr tiene 10 lisinas sustituidas, por ejemplo, en posiciones equivalentes a las posiciones 7, 9, 59, 88, 115, 116, 137, 178, 209 y 380 de la SEQ ID NO: 1. En otro ejemplo más, una ADIr tiene 15 lisinas sustituidas, por ejemplo, en posiciones equivalentes a las posiciones 7, 9, 59, 66, 88, 91, 93, 115, 116, 137, 141, 178, 209, 279 y en la posición 380 de la SEQ ID NO: 1. En un ejemplo, una ADIr comprende 21 lisinas sustituidas, por ejemplo, en posiciones equivalentes a las posiciones 7, 9, 56, 59, 66, 88, 91, 93, 96, 115, 116, 137, 141, 178, 209, 254, 279, 325, 326, 380 y 406 de la SEQ ID NO: 1.

Se puede encontrar una ADIr nativa en microorganismos y esta es inmunogénica y se elimina rápidamente de la circulación en un paciente. Estos problemas pueden superarse modificando una ADIr. Por tanto, la presente divulgación proporciona ADIr modificada por un agente modificador, incluyendo, pero sin limitación, polímeros de macromoléculas, proteínas, péptidos, polisacáridos u otros compuestos. La arginina desiminasa como se describe en el presente documento y el agente modificador pueden unirse mediante enlaces covalentes o interacción no covalente para formar un conjugado estable o una composición estable para lograr un efecto deseado. En determinados ejemplos, la ADIr modificada conserva la actividad biológica de una ADIr sin modificar y tiene una semivida más larga *in vivo* y menor antigenicidad que la ADIr sin modificar. En determinados ejemplos, la ADIr modificada conserva al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de la actividad biológica de ADIr sin modificar. En general, la ADIr modificada conserva suficiente actividad biológica para uso terapéutico.

En un ejemplo, un agente modificador puede ser un polímero o una proteína o un fragmento de los mismos que es biocompatible y puede aumentar la semivida de ADIr en la sangre. El agente modificador puede acoplarse químicamente a ADIr o, cuando corresponda, unirse a ADIr a través de expresión de proteína de fusión.

Los polímeros de macromoléculas pueden incluir un polímero de macromoléculas no peptídicas, que en determinados ejemplos, puede tener su propia bioactividad. Los polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, compuestos de polienol, compuestos de poliéter, polivinilpirrolidona, poliaminoácidos, copolímero de éter divinílico y anhídrido maleico, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, polisacárido, polioliol polioxietilado, heparina o su fragmento, poli-alquil-etilenglicol y sus derivados, copolímeros de poli-alquil-etilenglicol y sus derivados, poli(éter vinilético), a,P-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida], policarboxilatos, polioxietilen-oximetilenos, poliacriloil morfollinas, copolímero de compuestos amino y oxiolefina, ácido polihialurónico, polioxiranos, copolímero de ácido etanodioico y ácido malónico, poli(1,3-dioxolano), copolímero de etileno e hidracida maleica, ácido polisialico, ciclodextrina, etc. En determinados ejemplos, el polímero es polietilenglicol.

Los compuestos de polienol como se usan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (incluyendo monometoxi polietilenglicol, monohidroxil polietilenglicol), alcohol polivinílico, alcohol polialílico, polibutenol y similares, y sus derivados, tales como lípidos.

Los compuestos de poliéter incluyen, pero sin limitación, polialquilenglicol ($\text{HO}((\text{CH}_2)_x\text{O})_n\text{H}$), polipropilenglicol, polioxirehilenol ($\text{HO}((\text{CH}_2)_2\text{O})_n\text{H}$), alcohol polivinílico ($(\text{CH}_2\text{CHOH})_n$).

Los poliaminoácidos incluyen, pero sin limitación, polímeros de un tipo de aminoácido o copolímeros de dos o más tipos de aminoácidos, por ejemplo, polialanina o polilisina, o copolímeros de bloque de los mismos.

Los polisacáridos incluyen, pero sin limitación, glucosano y sus derivados, por ejemplo, sulfato de dextrano, celulosa y sus derivados (incluyendo metilcelulosa y carboximetilcelulosa), almidón y sus derivados, polisacarosa, etc.

En un ejemplo específico, ADIr se modifica mediante acoplamiento con proteínas o péptidos, en donde una o más proteínas o péptidos están directa o indirectamente unidos a ADIr. Las proteínas pueden ser proteínas existentes en la naturaleza o sus fragmentos, incluyendo, pero sin limitación, proteínas séricas humanas existentes en la naturaleza o sus fragmentos, tales como proteína de unión a tiroxina, transtiretina, α 1-glucoproteína ácida, transferrina, fibrinógeno, inmunoglobulina, regiones Fc de Ig, albúmina y fragmentos de los mismos. Por "fragmento" se entiende cualquier parte de una proteína que es más pequeña que la proteína completa pero que conserva la función deseada de la proteína. La ADIr como se describe en el presente documento puede estar unida directa o indirectamente a una proteína a través de un enlace covalente. La unión directa significa que un aminoácido de ADIr está unido directamente con un aminoácido de la proteína modificadora, a través de un enlace peptídico o un enlace disulfuro. La unión indirecta se refiere a los enlaces entre una ADIr y una proteína modificadora, a través de grupos químicos originalmente existentes entre ellas o grupos químicos específicos añadidos por medios biológicos o químicos, o la combinación de los enlaces mencionados anteriormente.

En un ejemplo en particular, la ADIr se modifica mediante unión covalente con PEG. La ADIr modificada de manera covalente con PEG (con o sin un conector) puede denominarse en lo sucesivo en el presente documento "ADIr-PEG". Cuando se compara con ADIr sin modificar, ADIr-PEG conserva la mayor parte de su actividad enzimática, es mucho menos inmunogénica o antigénica, tiene una semivida en circulación muy extendida y es mucho más eficaz en el tratamiento de tumores.

"Polietilenglicol" o "PEG" se refiere a mezclas de polímeros de condensación de óxido de etileno y agua, en una

cadena ramificada o lineal, representados por la fórmula general $H(OCH_2CH_2)_nOH$, en donde n es al menos 4. "Polietilenglicol" o "PEG" se usa en combinación con un sufijo numérico para indicar el peso molecular promedio en peso aproximado del mismo. Por ejemplo, PEG5.000 se refiere a PEG que tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 5.000; PEG12.000 se refiere a PEG que tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 12.000; y PEG20.000 se refiere a PEG que tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 20.000.

En un ejemplo, el PEG tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000; en un ejemplo de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 40.000 y en otro ejemplo de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 30.000; en determinados ejemplos de aproximadamente 8.000 a aproximadamente 30.000; en otros ejemplos de aproximadamente 11.000 a aproximadamente 30.000; en ejemplos adicionales, de aproximadamente 12.000 a aproximadamente 28.000; en otros ejemplos más, de aproximadamente 16.000 a aproximadamente 24.000; y en otros ejemplos, de aproximadamente 18.000 a aproximadamente 22.000; en otro ejemplo, de 19.000 a aproximadamente 21.000 y en un ejemplo, el PEG tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 20.000. En general, el PEG con un peso molecular de 30.000 o más es difícil de disolver y los rendimientos del producto formulado pueden reducirse. El PEG puede ser una cadena ramificada o lineal. En general, el aumento del peso molecular del PEG disminuye la inmunogenicidad de la ADI_r. El PEG que tiene un peso molecular descrito en este ejemplo puede usarse junto con ADI_r y, opcionalmente, un conector biocompatible, para tratar el cáncer, incluyendo, por ejemplo, leucemia mieloide aguda, tal como leucemia mieloide aguda recidivante, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, cáncer de estómago y cáncer de esófago.

En otro ejemplo, el PEG tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000; en determinados ejemplos de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 30.000; en otros ejemplos de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 20.000; en un ejemplo de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 12.000; en otros ejemplos de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 10.000; en ejemplos adicionales de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 8.000; más ejemplos adicionales de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 6.000; y aproximadamente 5.000 en otro ejemplo. El PEG puede ser una cadena lineal o ramificada y en determinados ejemplos es una cadena lineal. El PEG que tiene un peso molecular descrito en este ejemplo puede usarse junto con ADI_r y, opcionalmente, un conector biocompatible, para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) o cáncer.

Aunque ADI_r-PEG es la ADI_r modificada ilustrativa descrita en el presente documento, como reconocería el experto en la materia, ADI_r puede modificarse con otros polímeros o moléculas adecuadas para el efecto deseado, en particular reducir la antigenicidad y aumentar la semivida en suero.

ADI_r puede unirse covalentemente a un agente modificador, tal como PEG, con o sin un conector, aunque un ejemplo preferido utiliza un conector.

El conector utilizado para unir covalentemente ADI_r a un agente modificador, p. ej., PEG, puede ser cualquier conector biocompatible. Como se ha analizado anteriormente, "biocompatible" indica que el compuesto o grupo no es tóxico y puede utilizarse *in vitro* o *in vivo* sin provocar lesiones, malestar, enfermedad o muerte. Un agente modificador, tal como PEG, puede estar unido al conector, por ejemplo, a través de un enlace de éter, un enlace de tiol o un enlace de amida. El grupo conector incluye, por ejemplo, un grupo succinilo, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo éster, un grupo epoxi, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un hidrato de carbono, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina, un grupo metileno y combinaciones de los mismos. En un ejemplo, la fuente del conector biocompatible es succinato de succinimidilo (SS). Otras fuentes adecuadas de conector pueden incluir un grupo oxicarbonilimidazol (incluyendo, por ejemplo, carbonilimidazol (CDI)), un grupo nitrofenilo (incluyendo, por ejemplo, carbonato de nitrofenilo (NCP) o carbonato de triclorofenilo (TCP)), un grupo trisilato, un grupo aldehído, un grupo isocianato, un grupo vinilsulfona o una amina primaria. En otro ejemplo, el conector se obtiene de SS, SPA, SCM o NHS; en determinados ejemplos, se utilizan SS, SPA o NHS y, en otros ejemplos, se utilizan SS o SPA. Por tanto, en determinados ejemplos, pueden formarse conectores potenciales a partir de metoxi-PEG succinimidil succinato (SS), metoxi-PEG succinimidil glutarato (SG), metoxi-PEG succinimidil carbonato (SC), metoxi-PEG succinimidil carboximetil éster (SCM), metoxi-PEG2 N-hidroxi succinimida (NHS), metoxi-PEG succinimidil butanoato (SBA), metoxi-PEG succinimidil propionato (SPA), metoxi-PEG succinimidil glutaramida y metoxi-PEG succinimidil succinamida.

Como alternativa, ADI_r puede acoplarse directamente a un agente modificador, tal como PEG (es decir, sin un conector) a través de un grupo amino, un grupo sulfhidrilo, un grupo hidroxilo o un grupo carboxilo.

ADI_r puede unirse covalentemente a PEG, a través de un conector biocompatible, usando métodos conocidos en la técnica, como se ha descrito, por ejemplo, en Park *et al.*, *Anticancer Res.*, 1: 373-376 (1981); y Zaplinsky y Lee, *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris, ed., Plenum Press, NY, Capítulo 21 (1992).

La unión de PEG a ADIr aumenta la semivida en circulación de ADIr. En general, el PEG se une a una amina primaria de ADIr. La selección del sitio de unión de PEG u otro agente modificador, en la ADIr está determinada por la función de cada uno de los sitios dentro del dominio activo de la proteína, como conocería un experto en la materia. El PEG puede unirse a las aminas primarias de ADIr sin pérdida sustancial de actividad enzimática. Por ejemplo, los restos de lisina presentes en ADIr son todos posibles puntos en los que la ADIr como se describe en el presente documento se puede unir a PEG a través de un conector biocompatible, tal como SS, SPA, SCM, SSA y/o NHS. PEG también puede unirse a otros sitios en ADIr, como resultaría evidente para un experto en la materia a la vista de la presente divulgación.

De 1 a aproximadamente 30 moléculas de PEG pueden unirse covalentemente a ADIr. En determinados ejemplos, la ADIr se modifica con una molécula de PEG. En otros ejemplos, la ADIr se modifica con más de una molécula de PEG. En un ejemplo, la ADIr se modifica con aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 moléculas de PEG, y en un ejemplo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 o aproximadamente 9 a aproximadamente 12 moléculas de PEG. En otro ejemplo, la ADIr se modifica con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 moléculas de PEG. En un ejemplo específico, la ADIr se modifica con 4,5 - 5,5 moléculas de PEG por cada ADIr. En otro ejemplo, la ADIr se modifica con $5 \pm 1,5$ moléculas de PEG.

En otro ejemplo, aproximadamente 15 % a aproximadamente 70 % de los grupos amino primarios en ADIr se modifican con PEG, en un ejemplo aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %, aproximadamente 25 % a aproximadamente 60 % o en determinado ejemplo aproximadamente 30 % a aproximadamente 55 % o 45 % a aproximadamente 50 %, y en otro ejemplo aproximadamente 50 % de los grupos amino primarios en arginina desiminasa se modifican con PEG. Cuando el PEG está unido covalentemente al extremo terminal de ADIr, puede ser deseable tener solo 1 molécula de PEG utilizada. Aumentar el número de unidades de PEG en ADIr aumenta la semivida en circulación de la enzima. Sin embargo, aumentar el número de unidades de PEG en ADIr disminuye la actividad específica de la enzima. Por tanto, es necesario lograr un equilibrio entre los dos, como resultaría evidente para un experto en la materia a la vista de la presente divulgación.

En la presente divulgación, una característica común de los conectores biocompatibles es que se unen a una amina primaria de arginina desiminasa a través de un grupo succinimida. Una vez acoplado con ADIr, SS-PEG tiene un enlace éster al lado del PEG, que puede hacer que este sitio sea sensible a la esterasa sérica, que puede liberar PEG de ADIr en el cuerpo. SPA-PEG y PEG2-NHS no tienen un enlace éster, por lo que no son sensibles a la esterasa sérica.

En determinados ejemplos, se utiliza un conector biocompatible. El PEG que se une a la proteína puede ser una cadena lineal, como con SS-PEG, SPA-PEG y SC-PEG, o se puede usar una cadena ramificada de PEG, como con PEG2-NHS.

En determinados ejemplos, se modifican sitios de pegilación asociados con ADIr ubicados en o adyacentes a la región catalítica de la enzima. A efectos de la presente divulgación, la expresión "sitio de pegilación" puede definirse como cualquier sitio o posición de ADI o una ADIr que puede modificarse covalentemente con polietilenglicol. Un "sitio de pegilación" se puede considerar ubicado en o adyacente a la región catalítica de la enzima donde la pegilación del sitio da lugar a una reducción significativa de la actividad catalítica de la enzima. La pegilación de dichos sitios ha dado lugar tradicionalmente a la inactivación de la enzima. Por ejemplo, la ADI de *Mycoplasma hominis* tiene una lisina en la posición 112 que puede considerarse que está en o adyacente a la región catalítica de la enzima. La unión de PEG a esta lisina en la posición 112 puede inactivar la enzima. Además, la ADI de *Mycoplasma hominis* tiene una cisteína en la posición 397 que puede considerarse que está en o adyacente a la región catalítica de la enzima. Las sustituciones de aminoácidos para cisteína en la posición 397 pueden inactivar la enzima. En particular, la sustitución con alanina, histidina, arginina, serina, lisina o tirosina de cisteína en la posición 397 puede dar lugar a una pérdida de toda la actividad enzimática detectable. La ADI de *Mycoplasma hominis* también tiene tres lisinas ubicadas cerca de esta cisteína conservada, en particular, Lys374, Lys405 y Lys408. La unión de PEG a Lys374, Lys405, Lys408 o combinaciones de las mismas puede inactivar la enzima.

Debe entenderse que ADIr procedente de otros organismos también puede tener sitios de pegilación correspondientes a la posición 112 de ADI de *Mycoplasma hominis*. Además, la ADI de algunos organismos puede tener lisinas correspondientes a la misma ubicación general que la posición 112 de la ADI de *Mycoplasma hominis*. La ubicación de lisina en la ADI de dichos organismos es conocida por la persona experta y se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.635.462.

Por tanto, la presente divulgación proporciona determinadas sustituciones de aminoácidos en la cadena polipeptídica de ADIr. Estas sustituciones de aminoácidos proporcionan ADIr modificada que pierde menos actividad cuando es modificada por un agente modificador, p. ej., tras la pegilación. Al eliminar sitios de pegilación, u otros sitios de modificación conocidos, en o adyacentes a la región catalítica de la enzima, se puede lograr modificación óptima, p. ej., pegilación, sin pérdida de actividad.

Debe entenderse que otros ejemplos de la presente divulgación se basan en el entendimiento de que determinadas

características estructurales de arginina desiminasa pueden prevenir o interferir con la renaturalización adecuada y rápida cuando se produce mediante tecnología recombinante. En particular, estas características estructurales obstaculizan o impiden que la enzima asuma una conformación activa durante la producción recombinante. A efectos de la presente divulgación, la expresión "conformación activa" puede definirse como una estructura tridimensional que posibilita la actividad enzimática por arginina desiminasa sin modificar o modificada. La conformación activa puede, en particular, ser necesaria para catalizar la conversión de arginina en citrulina. La expresión "característica estructural" puede definirse como cualquier rasgo, cualidad o propiedad de la cadena polipeptídica resultante de un aminoácido o combinación de aminoácidos en particular. Por ejemplo, la arginina desiminasa puede contener un aminoácido que da lugar a un doblez o pliegue en la cadena peptídica normal y, por tanto, obstaculiza que la enzima asuma una conformación activa durante la renaturalización de la enzima. En particular, la arginina desiminasa de *Mycoplasma hominis* tiene una prolina en la posición 210 que puede dar lugar a un doblez o pliegue en la cadena peptídica, haciendo más difícil renaturalizar la enzima durante la producción recombinante. Debe entenderse que la arginina desiminasa procedente de otros organismos también puede tener sitios correspondientes a la posición 210 de la arginina desiminasa de *Mycoplasma hominis*.

La presente divulgación proporciona de nuevo, por tanto, determinadas sustituciones de aminoácidos en la cadena polipeptídica de arginina desiminasa de tipo silvestre. Dichas sustituciones de aminoácidos pueden eliminar las características estructurales problemáticas en la cadena peptídica de la arginina desiminasa. Dichas sustituciones de aminoácidos proporcionan mejor renaturalización de la arginina desiminasa modificada. Estas sustituciones de aminoácidos hacen posible la renaturalización rápida de arginina desiminasa modificadas utilizando cantidades reducidas de tampón. Estas sustituciones de aminoácidos también pueden proporcionar mayores rendimientos de arginina desiminasa modificada renaturalizada. En un ejemplo, la arginina desiminasa modificada tiene una sustitución de aminoácidos en P210 o el resto equivalente. Como se ha mencionado anteriormente, la arginina desiminasa procedente de *Mycoplasma hominis* tiene el aminoácido prolina ubicado en la posición 210. Actualmente se cree que la presencia del aminoácido prolina en la posición 210 da lugar a un doblez o pliegue en la cadena polipeptídica normal que aumenta la dificultad de renaturalizar (es decir, replegar) la arginina desiminasa. Las sustituciones de prolina en la posición 210 hacen posible la renaturalización rápida de arginina desiminasa modificada utilizando cantidades reducidas de tampón. Las sustituciones de prolina en la posición 210 también pueden proporcionar mayores rendimientos de arginina desiminasa modificada renaturalizada. En un ejemplo, la prolina en la posición 210 se sustituye con serina. Debe entenderse que de acuerdo con este aspecto de la divulgación, se pueden realizar otras sustituciones en la posición 210. Los ejemplos de otras sustituciones incluyen Pro210 a Thr210, Pro210 a Arg210, Pro210 a Asn210, Pro210 a Gln210 o Pro210 a Met210. Al eliminar esas características estructurales asociadas con el aminoácido de la posición 210 de la arginina desiminasa de tipo silvestre, se puede lograr el replegamiento adecuado de la enzima.

Los métodos de la presente divulgación pueden implicar *in vitro* o *in vivo* aplicaciones. En el caso de aplicaciones *in vitro*, incluyendo aplicaciones de cultivo celular, los compuestos descritos en el presente documento pueden añadirse a las células en cultivos y después incubarse. Los compuestos de la presente divulgación también se pueden usar para facilitar la producción de anticuerpos monoclonales y/o policlonales, usando técnicas de producción de anticuerpos bien conocidas en este campo. Los anticuerpos monoclonales y/o policlonales se pueden usar después en una amplia variedad de aplicaciones de diagnóstico, como resultaría evidente para un experto en la materia.

Los medios de administración *in vivo* de los compuestos de la presente divulgación variarán dependiendo de la aplicación prevista. La administración de las composiciones de ADIr descritas en el presente documento, en forma pura o en una composición farmacéutica adecuada, puede realizarse mediante cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes que sirven para utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar combinando ADIr, p. ej., ADIr-PEG, ADIr-PEG 20, con un vehículo, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable adecuado, y pueden formularse en preparaciones en formas sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Además, otros principios farmacéuticamente activos (incluyendo otros agentes antineoplásicos como se describen en otra parte del presente documento) y/o excipientes adecuados tales como sales, tampones y estabilizadores pueden estar presentes, pero no necesariamente lo están, dentro de la composición. La administración puede realizarse mediante diversas vías diferentes, incluyendo la oral, parenteral, nasal, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica. Los modos de administración dependen de la naturaleza de la afección que se va a tratar o prevenir. Por tanto, ADIr-PEG, p. ej., ADIr-PEG 20, puede administrarse por vía oral, por vía intranasal, por vía intraperitoneal, por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intralinfática, por vía intratumoral, por vía intramuscular, por vía intersticial, por vía intraarterial, por vía subcutánea, por vía intraocular, intrasinal, transepitelial y por vía transdérmica. Una cantidad que, después de la administración, reduzca, inhiba, prevenga o retrase la progresión y/o metástasis de un cáncer se considera eficaz. En determinado ejemplo, las composiciones de ADIr en el presente documento aumentan la mediana del tiempo de supervivencia de los pacientes en una cantidad estadísticamente significativa. En un ejemplo, los tratamientos con ADIr descritos en el presente documento aumentan la mediana del tiempo de supervivencia de un paciente en 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 15 semanas, 20 semanas, 25 semanas, 30 semanas, 40 semanas o más. En determinados ejemplos, los tratamientos con ADIr aumentan la mediana del tiempo de supervivencia de un paciente en 1 año, 2 años, 3 años o más. En un ejemplo, los tratamientos con ADIr descritos en el presente documento aumentan la supervivencia sin progresión en 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas,

10 semanas o más. En determinados ejemplos, los tratamientos con ADIr descritos en el presente documento aumentan la supervivencia sin progresión en 1 año, 2 años, 3 años o más.

En determinados ejemplos, la cantidad administrada es suficiente para dar lugar a regresión tumoral, según lo indicado por una disminución estadísticamente significativa de la cantidad de tumor viable, por ejemplo, al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más de disminución de la masa tumoral, o por alteración (p. ej., disminución con significación estadística) de las dimensiones de exploración. En determinados ejemplos, la cantidad administrada es suficiente para dar lugar a enfermedad estable. En otros ejemplos, la cantidad administrada es suficiente para dar lugar a reducción clínicamente relevante de los síntomas de una indicación de enfermedad en particular conocida por el médico experto.

En determinados ejemplos, la cantidad administrada es suficiente para inhibir la síntesis de NO, inhibir la angiogénesis y/o es suficiente para inducir apoptosis en células tumorales o cualquier combinación de las mismas. La síntesis de NO, la angiogénesis y la apoptosis pueden medirse utilizando métodos conocidos en la técnica, véase, p. ej., *Current Protocols in Immunology* or *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (2009 y actualizaciones de la misma); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995; y otras referencias similares. En un ejemplo en particular, la cantidad administrada inhibe la síntesis de NO e inhibe el crecimiento de melanoma y complementa, se añade a o actúa de forma sinérgica con otras quimioterapias como se describe en el presente documento, tales como cisplatino. Por consiguiente, un ejemplo de la presente divulgación proporciona un método para tratar el melanoma mediante la administración de ADIr-PEG 20 en combinación con cisplatino, en donde el tratamiento agota el óxido nítrico (NO) endógeno.

La dosificación y duración precisas del tratamiento está en función de la enfermedad que se trate y puede determinarse empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o probando las composiciones en sistemas modelo conocidos en la técnica y extrapolando a partir de ellos. También se pueden realizar ensayos clínicos controlados. Las dosis también pueden variar según la gravedad de la afección que se va a aliviar. Una composición farmacéutica generalmente se formula y administra para ejercer un efecto terapéuticamente útil mientras se minimizan los efectos secundarios indeseables. La composición puede administrarse de una vez o puede dividirse en varias dosis menores para administrar en intervalos de tiempo. Para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual.

Las composiciones de ADIr pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer conocidos, tales como radioterapia, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también se pueden administrar en combinación con antibióticos.

Las composiciones de ADIr también se pueden administrar solas o en combinación con terapia de ADI-PEG 20. En determinados ejemplos, la ADIr como se describe en el presente documento se usa en pacientes que han sido tratados con ADI-PEG 20 y que han desarrollado anticuerpos anti-ADI-PEG 20. Dichos pacientes ya no se benefician del tratamiento con ADI-PEG 20 ya que la enzima es neutralizada por los anticuerpos. Por tanto, la presente divulgación proporciona un método para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende ADI-PEG 20 y, después de un periodo de tiempo, administrar al paciente una composición que comprende una ADIr como se describe en el presente documento, de este modo tratando, aliviando los síntomas o inhibiendo la progresión del cáncer.

En un ejemplo del método, el periodo de tiempo se determina detectando un nivel predeterminado de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en el paciente, en donde la composición que comprende una ADIr se administra después de la detección del nivel predeterminado de dichos anticuerpos anti-ADI-PEG 20. En determinados ejemplos, se pueden establecer un nivel o niveles umbral o niveles predeterminados de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en pacientes que se van a tratar con ADI-PEG 20 y la ADIr de la presente divulgación. Un "nivel umbral predeterminado" (también denominado "nivel predeterminado" o "valor de corte predeterminado"), o en ocasiones denominado punto de corte predeterminado, de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 puede establecerse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando curvas de características operativas del receptor o curvas "ROC". En un ejemplo, incluso niveles muy bajos de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 se consideran suficientes para garantizar el cambio de tratamiento de ADI-PEG 20 a una ADIr-PEG de la presente divulgación. En determinados ejemplos, un médico experto puede determinar un nivel adecuado de anti-ADI-PEG 20 que determinará cuándo finalizar el tratamiento con ADI-PEG 20 y comenzar el tratamiento con una ADIr-PEG de la presente divulgación.

En algunos ejemplos, el periodo de tiempo se determina detectando u observando de otro modo la actividad de ADI en el paciente, en donde la composición se administra después de la detección u observación de un nivel predeterminado de actividad de ADI. En ejemplos particulares, la composición se administra después de la detección u observación de un nivel reducido de actividad de ADI en el paciente. La actividad de ADI se puede medir directamente, por ejemplo, ensayando una muestra biológica para determinar al menos un indicador de actividad de ADI, o indirectamente, por ejemplo, observando el efecto deseado o previsto del tratamiento con ADI-PEG 20. En determinados ejemplos, el médico experto puede determinar un nivel adecuado de ADI actividad que determinará cuándo finalizar el tratamiento con ADI-PEG 20 y comenzar el tratamiento con una ADIr-PEG de la presente divulgación.

Las vías típicas para administrar estas y otras composiciones farmacéuticas relacionadas incluyen, por tanto, sin limitación, oral, tópica, transdérmica, inhalación, parenteral, sublingual, bucal, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión.

Las composiciones farmacéuticas según determinados ejemplos se formulan de modo que permitan que los principios activos contenidos en las mismas estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación individual y un recipiente de una composición de ADI_r descrita en el presente documento en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación. Procedimientos reales de preparación de dichas formas farmacéuticas son conocidos, o resultarán evidentes, para los expertos en esta materia; por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición para administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad terapéuticamente eficaz de una ADI_r-PEG de la presente divulgación, tal como ADI_r-PEG 20, para el tratamiento de una enfermedad o afección de interés de acuerdo con las enseñanzas del presente documento. En determinados ejemplos, las composiciones farmacéuticas o terapéuticas son estériles y/o exentas de pirógenos.

Una composición farmacéutica puede estar en forma de un sólido o líquido. En un ejemplo, el vehículo o los vehículos están en partículas, de modo que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvo. El vehículo o los vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, aceite anoral, líquido inyectable o un aerosol, que es útil en, por ejemplo, administración por inhalación. Cuando está destinada a administración oral, la composición farmacéutica generalmente está en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas semilíquidas, en suspensión y en gel se incluyen en las formas consideradas en el presente documento ya sea como sólido o como líquido.

Como una composición sólida para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en un polvo, gránulo, comprimido formado por compresión, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o similar. Dicha composición sólida contendrá normalmente uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido alginico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; emolientes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja; y un agente colorante. Cuando la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol o aceite.

La composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para suministro por inyección, a modo de dos ejemplos. Cuando está destinada a administración oral, la composición preferente contiene, además de los presentes compuestos, uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y un potenciador del aroma. En una composición destinada a administrarse mediante inyección, se pueden incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, en determinados ejemplos, solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden actuar como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminetetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferente. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

Una composición farmacéutica líquida destinada a administración parenteral u oral debe contener una cantidad de ADI_r como se desvela en el presente documento, tal como ADI_r-PEG 20, de modo que se obtenga una dosis adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos 0,01 % de ADI_r en la composición. Cuando está destinada a administración oral, esta cantidad puede variar entre 0,1 y aproximadamente 70 % del peso de la composición. Determinadas composiciones farmacéuticas orales contienen entre aproximadamente 4 % y aproximadamente 75 % de ADI_r-PEG. En determinados ejemplos, las composiciones farmacéuticas y preparaciones según la presente invención se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga entre 0,01 y 10 % en peso de ADI_r-PEG antes de la dilución.

La composición farmacéutica puede estar destinada a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede

- comprender convenientemente una solución, emulsión, pomada o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizantes. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si está destinada a administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o dispositivo de iontoforesis. La composición farmacéutica puede estar destinada a administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio, que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginoso como excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.
- La composición farmacéutica puede incluir diversos materiales, que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una capa de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la capa de revestimiento son normalmente inertes y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entérico. Como alternativa, los principios activos se pueden encerrar en una cápsula de gelatina. La composición farmacéutica en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une a ADIr-PEG y, de este modo, ayuda en la administración del compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar con esta función incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales, una o más proteínas o un liposoma. La composición farmacéutica puede consistir esencialmente en unidades de dosificación que pueden administrarse como un aerosol. El término aerosol se utiliza para indicar diversos sistemas que varían desde los de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases presurizados. El suministro puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que distribuye los principios activos. Los aerosoles pueden administrarse en sistemas de una sola fase, bifásicos o trifásicos para administrar el principio o los principios activos. El suministro del aerosol incluye el recipiente necesario, activadores, válvulas, recipientes secundarios y similares, que juntos pueden formar un equipo. Un experto habitual en la materia, puede determinar sin experimentación indebida aerosoles preferentes.
- Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica destinada a su administración mediante inyección puede prepararse combinando una composición que comprende ADIr-PEG como se describe en el presente documento y, opcionalmente, una o más de sales, tampones y/o estabilizadores, con agua destilada estéril para formar una solución. Se puede añadir un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interaccionan de manera no covalente con la composición de ADIr-PEG para facilitar la disolución o suspensión homogénea de la ADIr-PEG en el sistema de suministro acuoso.
- Las composiciones pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará dependiendo de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico (p. ej., ADIr-PEG) empleado; la estabilidad metabólica y duración de acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el momento de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la afección particular; y el sujeto que se somete a terapia.
- Una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los compuestos de la presente divulgación es una cantidad que es eficaz para inhibir el crecimiento tumoral. En general, el tratamiento se inicia con pequeñas dosis que pueden aumentarse en pequeños incrementos hasta que se logre el efecto óptimo según las circunstancias. En general, una dosis terapéutica de los compuestos de la presente divulgación puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg dos veces a la semana a aproximadamente una vez cada dos semanas. Por ejemplo, la dosis puede ser de aproximadamente 1 mg/kg una vez a la semana como una inyección intravenosa de 2 ml a aproximadamente 20 mg/kg una vez cada 3 días. En un ejemplo adicional, la dosis puede ser de aproximadamente 50 UI/m² a aproximadamente 700 UI/m², administrada aproximadamente una vez cada 3 días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente dos veces a la semana o aproximadamente una vez cada 2 semanas. En determinados ejemplos, la dosis puede ser de aproximadamente 50 UI/m², 60 UI/m², 70 UI/m², 80 UI/m², 90 UI/m², 100 UI/m², 110 UI/m², 120 UI/m², 130 UI/m², 140 UI/m², 150 UI/m², 160 UI/m², 170 UI/m², 180 UI/m², 190 UI/m², 200 UI/m², 210 UI/m², 220 UI/m², 230 UI/m², 240 UI/m², 250 UI/m², 260 UI/m², 270 UI/m², 280 UI/m², 290 UI/m², 300 UI/m², 310 UI/m², aproximadamente 320 UI/m², aproximadamente 330 UI/m², 340 UI/m², aproximadamente 350 UI/m², 360 UI/m², 370 UI/m², 380 UI/m², 390 UI/m², 400 UI/m², 410 UI/m², 420 UI/m², 430 UI/m², 440 UI/m², 450 UI/m², 500 UI/m², 550 UI/m², 600 UI/m², 620 UI/m², 630 UI/m², 640 UI/m², 650 UI/m², 660 UI/m², 670 UI/m², 680 UI/m², 690 UI/m², o aproximadamente 700 UI/m² administrada aproximadamente una vez cada 3 días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente dos veces a la semana o aproximadamente una vez cada 2 semanas. En determinados ejemplos, la dosis puede modificarse según lo desee el médico experto.
- La dosis óptima con ADIr-SS-PEG5.000 puede ser aproximadamente dos veces a la semana, mientras que la dosis óptima con ADIr-SS-PEG20.000 puede ser de aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente una vez cada dos semanas. En determinados ejemplos, la dosis óptima con ADIr-SS-PEG20.000 puede ser aproximadamente dos veces a la semana.
- ADIr-PEG puede mezclarse con una solución salina tamponada con fosfato, o cualquier otra solución adecuada conocida por los expertos en la materia, antes de la inyección. En un ejemplo, una composición líquida que comprende ADIr-PEG comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 12 mg de ADIr, aproximadamente 20 a

- aproximadamente 40 mg de polietilenglicol, 1,27 mg + fosfato de sodio monobásico al 5 %, USP; aproximadamente 3 mg + fosfato de sodio dibásico 5 %, USP; 7,6 mg + cloruro de sodio 5 %, USP; a un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7; en una cantidad adecuada de agua para inyección (p. ej., aproximadamente 1 ml o aproximadamente 2 ml). En un ejemplo, una composición líquida que comprende una ADIr-PEG comprende histidina - HCl y, en determinados ejemplos, el tampón de composición es de histidina-HCl aproximadamente 0,0035 M a histidina-HCl aproximadamente 0,35 M. En un ejemplo en particular, la composición se formula en un tampón que comprende histidina-HCl 0,035 M a pH 6,8 con cloruro de sodio 0,13 M. En otro ejemplo, la composición se formula en un tampón que comprende tampón de fosfato de sodio 0,02 M a pH 6,8 con cloruro de sodio 0,13 M.
- 10 En un ejemplo, una composición que comprende ADIr o ADIr-PEG tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, aproximadamente 6 a aproximadamente 8 o aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. En algunos ejemplos, la composición que comprende ADIr tiene un pH de aproximadamente $6,8 \pm 1,0$.
- 15 En un ejemplo, el PEG libre en una composición que comprende ADIr-PEG está entre 1-10 % y, en un ejemplo adicional, es menos del 7 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % del PEG total. En determinados ejemplos, la ADIr no modificada en una composición que comprende ADIr-PEG es menos de aproximadamente 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o menos de 0,1 %. En general, las composiciones que comprenden ADIr-PEG tienen impurezas totales menores o iguales a aproximadamente 4 %, 3 %, 2 %, 1,5 %, 1 % o 0,5 %. En un ejemplo, el límite de endotoxina cumple los requisitos establecidos en la USP, es decir, ≤ 50 UE/ml.
- 20 En un ejemplo, el sulfhidrilo libre en una composición que comprende ADIr o ADIr-PEG es mayor de aproximadamente 90 %. En algunos ejemplos, el sulfhidrilo libre en una composición que comprende ADIr o ADIr-PEG es aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 % o aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o más.
- 25 En un ejemplo, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Km de aproximadamente 0,1 μM o 0,5 μM a aproximadamente 15 μM y, en un ejemplo adicional, es de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 12 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM , de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 9 μM , de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 8 μM o de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 7 μM . En determinados ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Km de aproximadamente 1,0 μM a aproximadamente 10 μM o aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 6,5 μM . En algunos ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Km de aproximadamente, al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 0,5 μM , aproximadamente 1,0 μM , aproximadamente 1,5 μM , aproximadamente 2 μM , aproximadamente 2,5 μM , aproximadamente 3 μM , aproximadamente 3,5 μM , aproximadamente 4 μM , aproximadamente 4,5 μM , aproximadamente 5 μM , aproximadamente 5,5 μM , aproximadamente 6 μM , aproximadamente 6,5 μM , o aproximadamente 7 μM , o aproximadamente 8 μM , o aproximadamente 9 μM o aproximadamente 10 μM .
- 30 En un ejemplo, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Kcat de aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 70 s^{-1} , o aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 60 s^{-1} , o aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 50 s^{-1} , o aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 40 s^{-1} , o aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 30 s^{-1} , o aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 20 s^{-1} , o aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 15 s^{-1} y, en un ejemplo adicional, es de aproximadamente 0,5 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 1 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 5 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 10 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 20 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 30 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 40 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 50 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 60 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 70 s^{-1} a aproximadamente 80 s^{-1} , o aproximadamente 1 s^{-1} a aproximadamente 12 s^{-1} , de aproximadamente 1 s^{-1} a aproximadamente 10 s^{-1} , de aproximadamente 1,5 s^{-1} a aproximadamente 9 s^{-1} , de aproximadamente 2 s^{-1} a aproximadamente 8 s^{-1} o de aproximadamente 2,5 s^{-1} a aproximadamente 7 s^{-1} . En determinados ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Kcat de aproximadamente 2,5 s^{-1} a aproximadamente 7,5 s^{-1} . En algunos ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Kcat de aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 s^{-1} , aproximadamente 3 s^{-1} , aproximadamente 3,5 s^{-1} , aproximadamente 4 s^{-1} , aproximadamente 4,5 s^{-1} , aproximadamente 5 s^{-1} , aproximadamente 5,5 s^{-1} , aproximadamente 6 s^{-1} , aproximadamente 6,5 s^{-1} , aproximadamente 7 s^{-1} , aproximadamente 7,5 s^{-1} o aproximadamente 8 s^{-1} , aproximadamente 10 s^{-1} , aproximadamente 15 s^{-1} , aproximadamente 20 s^{-1} , aproximadamente 25 s^{-1} , aproximadamente 30 s^{-1} , aproximadamente 35 s^{-1} , aproximadamente 40 s^{-1} , aproximadamente 45 s^{-1} , aproximadamente 50 s^{-1} , aproximadamente 55 s^{-1} , aproximadamente 60 s^{-1} , aproximadamente 65 s^{-1} , aproximadamente 70 s^{-1} , aproximadamente 75 s^{-1} , aproximadamente 80 s^{-1} , aproximadamente 85 s^{-1} , aproximadamente 90 s^{-1} , aproximadamente 95 s^{-1} o aproximadamente 100 s^{-1} .
- 60 En un ejemplo, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una conductividad (también conocida en la técnica como conductancia específica) de aproximadamente 5 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm y, en ejemplos adicionales, de
- 65

aproximadamente 5 mS/cm a aproximadamente 15 mS/cm, aproximadamente 7 mS/cm a aproximadamente 15 mS/cm, aproximadamente 9 mS/cm a aproximadamente 15 mS/cm o aproximadamente 10 mS/cm a aproximadamente 15 mS/cm. En algunos ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una conductividad de aproximadamente 9 mS/cm, aproximadamente 10 mS/cm, aproximadamente 11 mS/cm, aproximadamente 12 mS/cm o aproximadamente 13 mS/cm, aproximadamente 14 mS/cm o aproximadamente 15 mS/cm. En determinados ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una conductividad de aproximadamente 13 mS/cm $\pm$ 1,0 mS/cm.

En un ejemplo, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una osmolalidad de aproximadamente 50 mOsm/kg a aproximadamente 500 mOsm/kg, aproximadamente 100 mOsm/kg a aproximadamente 400 mOsm/kg, aproximadamente 150 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, aproximadamente 200 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg o aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. En determinados ejemplos, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una osmolalidad de aproximadamente 300 $\pm$ 30 mOsm/kg.

En un ejemplo, la concentración de proteína es de aproximadamente 11,0 $\pm$ 1,0 mg/ml. En determinados ejemplos, la concentración de proteína está entre aproximadamente 8 y aproximadamente 15 mg/ml. En otro ejemplo, la concentración de proteína es de aproximadamente 8, 9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14 o 15 mg/ml.

En un ejemplo, la actividad enzimática específica está entre aproximadamente 5,0 y 90 UI/mg o entre aproximadamente 5 y 55 UI/mg, donde 1 UI se define como la cantidad de enzima que convierte un μ mol de arginina en un μ mol de citrulina y 1 μ mol de amoníaco en un minuto a 37 °C y la potencia es de 100 $\pm$ 20 UI/ml. En otro ejemplo, la actividad enzimática específica es de aproximadamente 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 30,5, 35, 40, 45, 50, 55, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 $\pm$ 2,0 UI/mg. En un ejemplo en particular, la actividad enzimática específica es 9 $\pm$ 2,0 UI/mg.

Las composiciones que comprenden ADIr-PEG de la presente divulgación también se pueden administrar simultáneamente con, antes de o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo ADI-PEG 20. Dicha terapia de combinación puede incluir la administración de una formulación de dosificación farmacéutica individual que contiene un compuesto de la presente divulgación y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración de composiciones que comprenden ADIr-PEG (p. ej., ADIr-PEG 20) de la presente divulgación y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, ADIr-PEG como se describe en el presente documento y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una única composición de dosificación oral tal como un comprimido o una cápsula o cada agente puede administrarse en formulaciones de dosificación oral separadas. De manera similar, ADIr-PEG como se describe en el presente documento y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una única composición de dosificación parenteral individual tal como en una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable o cada agente puede administrarse en formulaciones de dosificación parenteral separadas, por las mismas o diferentes vías (p. ej., uno por inyección, uno por vía oral). Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, las composiciones que comprenden ADIr-PEG y uno o más agentes activos adicionales se pueden administrar esencialmente al mismo tiempo, es decir, de manera simultánea o en momentos escalonados por separado, es decir, de manera secuencial y en cualquier orden; se entiende que una terapia de combinación incluye todos estos regímenes.

Por tanto, en determinados ejemplos, también se contempla la administración de las composiciones de ADIr de la presente divulgación en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Dichos agentes terapéuticos pueden estar aceptados en la técnica como un tratamiento convencional para una patología en particular como se describe en el presente documento, tal como un cáncer en particular o EICH. Los agentes terapéuticos ilustrativos contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, FARME, antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos, radioterapia, inhibidores de la autofagia u otros agentes activos y auxiliares.

En determinados ejemplos, las composiciones de ADIr desveladas en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier cantidad de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina,

metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antisuiprarrenales tales como aminoglutetimid, mitotano, 5 trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamid; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiciurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK.RTM.; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; 10 vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamid; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamid; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; 15 daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados de ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina difitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos incluyendo, 20 por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina. Los agentes quimioterapéuticos adicionales incluyen sorafenib y otros inhibidores de proteína cinasa, tales como afatinib, axitinib, bevacizumab, cetuximab, crizotinib, dasatinib, erlotinib, fostamatinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, mubritinib, nilotinib, panitumumab, pazopanib, pegaptanib, 25 ranibizumab, ruxolitinib, trastuzumab, vandetanib, vemurafenib y sunitinib; sirolimus (rapamicina), everolimus y otros inhibidores de mTOR. También se contemplan para su uso en el presente documento sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En determinados ejemplos, las composiciones de ADIr desveladas en el presente documento pueden administrarse 30 junto con cualquier cantidad de inhibidores de la autofagia. En algunos ejemplos preferidos, el inhibidor de la autofagia se selecciona del grupo que consiste en: cloroquina, 3-metiladenina, hidroxicloloroquina (Plaquenil.TM.), bafilomicina A1, 5-amino-4-imidazol carboxamida ribósido (AICAR), ácido okadaico, toxinas de algas supresoras de la autofagia que inhiben proteína fosfatasa de tipo 2A o tipo 1, análogos de AMPc y fármacos que elevan los niveles de AMPc, adenosina, N6-mercaptopurina ribósido, wortmanina y vinblastina. Además, también se pueden utilizar antisentido o 35 ARNip que inhibe la expresión de proteínas esenciales para autofagia, tales como, por ejemplo, ATG5.

En un ejemplo, la combinación de ADIr-PEG con uno o más agentes terapéuticos actúa de manera complementaria, aditiva o sinérgica. A este respecto, se describen en el presente documento agentes complementarios o sinérgicos, 40 que incluyen un agente terapéutico (p. ej., agente quimioterapéutico, inhibidor de la autofagia, inhibidor de mTOR o cualquier otro agente terapéutico utilizado para el tratamiento del cáncer, EICH o enfermedad inflamatoria intestinal como se describe en el presente documento) que es capaz de actuar de manera complementaria o sinérgica con ADIr-PEG como se proporciona en el presente documento, donde dicha complementariedad o sinergia se manifiesta como un efecto detectable que es mayor (es decir, de manera estadísticamente significativa en relación con una condición de control adecuada) en magnitud que el efecto que puede detectarse cuando el agente quimioterapéutico está 45 presente pero la composición de ADIr-PEG está ausente y/o cuando la ADIr-PEG está presente pero el agente quimioterapéutico está ausente. Se conocen en la técnica métodos para medir la sinergia y la complementariedad (véase, p. ej., Cancer Res 15 de enero de 2010, 70; 440).

Las composiciones que comprenden ADIr, y opcionalmente otros agentes terapéuticos, como se describe en el 50 presente documento puede usarse en métodos terapéuticos para tratar el cáncer y métodos para prevenir la metástasis de un cáncer. Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión o para prevención de diversos cánceres diferentes. En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona métodos para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de la EICH. En particular, la presente divulgación proporciona métodos para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer o EICH en un paciente que 55 comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de composición de ADIr como se describe en el presente documento, opcionalmente, después del tratamiento con ADI-PEG 20, en particular donde un paciente desarrolla anticuerpos anti-ADI-PEG 20, de este modo tratando, aliviando los síntomas o inhibiendo la progresión del cáncer o EICH. Por tanto, las composiciones de ADIr descritas en el presente documento pueden administrarse a un individuo aquejado de enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa), EICH o un 60 cáncer, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular, leucemia (p. ej., leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide aguda recidivante), melanoma, incluyendo melanoma metastásico, sarcomas (incluyendo, pero sin limitación, sarcomas metastásicos, leiomiomasarcoma uterino), cáncer de páncreas, cáncer de próstata (tal como, pero sin limitación, cáncer de próstata resistente a hormonas), mesotelioma, leucemia linfática, leucemia mielógena crónica, linfoma, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico 65 (incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma gástrico), glioma, glioblastoma multiforme, retinoblastoma, neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón (incluyendo, pero sin limitación, carcinoma

de células renales), cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello (incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cáncer de lengua), cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, de vesícula biliar, colangiocarcinoma y cáncer de estómago.

- 5 En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona un método para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende ADIr, y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, como se describe en el presente documento, en donde el cáncer es deficiente en ASS, ASL o ambos. A este respecto, la deficiencia de ASS o ASL puede ser una reducción de la expresión medida por la expresión de ARNm o expresión de proteína, o puede ser una reducción de la actividad de la proteína, y en general comprende una reducción estadísticamente significativa de la expresión o actividad según lo determinado por el experto en la materia. La expresión o actividad reducida de ASS o ASL puede ser una reducción de la expresión o actividad de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o más, en comparación con la expresión o actividad en una muestra de control adecuada que se sabe que no tiene cáncer. En determinados ejemplos, la expresión o actividad de ASS o ASL se reduce al menos dos veces en comparación con la expresión o actividad en una muestra de control sin cáncer.

En determinados ejemplos, la expresión o actividad reducida de ASS o ASL resulta de la metilación del promotor de ASS o ASL o la inhibición del promotor de ASS o ASL. En otro ejemplo, la reducción de la expresión o actividad de ASS o ASL resulta de una mutación de ADN (p. ej., una o más mutaciones puntuales, pequeñas supresiones, inserciones y similares) o una anomalía cromosómica que da lugar a supresión del gen. En un ejemplo, el cáncer es negativo para ASS o ASL, lo que significa que no se observa expresión ni actividad.

La reducción de la expresión o actividad de ASS o ASL se puede medir usando cualquier método conocido en la técnica, tal como, pero sin limitación, PCR cuantitativa, inmunohistoquímica, ensayos de actividad enzimática (p. ej., ensayo para medir la conversión de citrulina en argininosuccinato o la conversión de argininosuccinato en arginina y fumarato) y similares.

Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende ADIr como se describe en el presente documento, en donde el cáncer presenta expresión o actividad reducida de ASS o ASL, o ambas, en donde el cáncer incluye, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular, leucemia (p. ej., leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide aguda recidivante), melanoma, incluyendo melanoma metastásico, sarcomas (incluyendo, pero sin limitación, sarcomas metastásicos, leiomiomas uterino), cáncer de páncreas, cáncer de próstata (tal como, pero sin limitación, cáncer de próstata resistente a hormonas), mesotelioma, leucemia linfática, leucemia mielógena crónica, linfoma, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico (incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma gástrico), glioma, glioblastoma multiforme, retinoblastoma, neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón (incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células renales), cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello (incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cáncer de lengua), cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, de vesícula biliar, colangiocarcinoma y cáncer de estómago.

Diversos estudios en la bibliografía han demostrado que ASS es deficiente en los siguientes tumores: leucemia mielógena aguda (LMA), vejiga, mama, colorrectal, gástrico, glioblastoma, HCC, linfoma, melanoma, mesotelioma, pulmón no microcítico, ovárico, pancreático, próstata, renal, sarcoma y pulmón microcítico. Por consiguiente, el tratamiento de estos cánceres deficientes en ASS se contempla específicamente en el presente documento, con ADIr-PEG solo o en combinación con otros tratamientos, incluyendo el tratamiento primero con ADI-PEG 20.

La presente divulgación proporciona además métodos para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión del cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende ADIr como se describe en el presente documento (p. ej., ADIr-PEG y en particular ADIr-PEG 20), en combinación con un inhibidor de la autofagia. En un ejemplo, la presente divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer en un paciente que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende ADIr como se describe en el presente documento en combinación con un inhibidor de la autofagia en donde el cáncer es cáncer de páncreas o de pulmón microcítico.

En determinados ejemplos, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento donde la administración de las composiciones que comprenden ADIr descritas en el presente documento agota la arginina en el plasma durante al menos un mes, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más. En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento donde la administración de las composiciones que comprenden ADIr descritas en el presente documento agota la arginina en el plasma durante al menos un mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más después de finalizar el tratamiento con ADI-PEG 20 después de la detección de anticuerpos anti-ADI-PEG 20.

Ejemplos

Ejemplo 1

EXPLORACIÓN Y SELECCIÓN DE ENZIMAS ADI QUE TIENEN BAJA REACTIVIDAD CRUZADA CON ANTICUERPOS ANTI-ADI-PEG 20 DEL PACIENTE

- 5 Este ejemplo describe la exploración y selección de enzimas ADI que tienen baja reactividad cruzada con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente.

10 De una gran cantidad de enzimas ADI, la tabla 1 enumera 24 enzimas ADI seleccionadas con respecto a su porcentaje de identidad de secuencia en relación con ADI de *M. hominis*. Según la bibliografía, las secuencias de aminoácidos de ADI de *M. hominis*, *M. arginini* y *M. arthritidis* están estrechamente relacionadas y estas enzimas tienen buenas propiedades catalíticas. Más recientemente, se han descubierto enzimas ADI adicionales que tienen secuencias estrechamente relacionadas con estas tres. Se han identificado enzimas de ADI de *Mycoplasma* con relaciones más distantes, aunque se sabe menos acerca de ellas. Existen enzimas ADI con relaciones aún más distantes de fuentes bacterianas y de otro tipo.

15

Tabla 1. Secuencias de ADI seleccionadas con diversos grados de similitud con ADI de <i>M. hominis</i>			
ORGANISMO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD	NÚMERO DE REFERENCIA DE LA SECUENCIA	SEQ ID NO:
<i>Mycoplasma hominis</i>	100,0 %	gi 728876	1
<i>Mycoplasma phocicerebrale</i>	82,1 %	gi 154184333	2
<i>Mycoplasma arginini</i>	82,1 %	gi 728875	3
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	80,4 %	gi 238692486	4
<i>Mycoplasma orale</i>	77,8 %	gi 2170494	5
<i>Mycoplasma gateae</i>	76,8 %	gi 148361415	6
<i>Mycoplasma phocidae</i>	75,3 %	gi 154184335	7
<i>Mycoplasma columbinum</i>	58,2 %	gi 343491689	8
<i>Mycoplasma iowae</i>	55,2 %	gi 350546321	9
<i>Mycoplasma crocodyli</i>	52,3 %	gi 291600396	10
<i>Mycoplasma fermentans</i>	52,0 %	gi 238809916	11
<i>Mycoplasma penetrans</i>	51,7 %	gi 26554060	12
<i>Mycoplasma pallisepticum</i>	51,5 %	gi 31544533	13
<i>Mycoplasma alligatoris</i>	50,8 %	gi 292552899	14
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	50,7 %	gi 440453687	15
<i>Mycoplasma mobile</i>	47,3 %	gi 47458387	16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	37,7 %	gi 15675444	17
<i>Enterococcus faecalis</i>	37,1 %	gi 60389809	18
<i>Mycoplasma capricolum</i>	36,6 %	gi 83319656	19
<i>Halothermothrix orenii</i>	34,8 %	gi 254803235	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	33,8 %	gi 123549453	21
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	28,7 %	gi 154183755	22
<i>Pseudomonas putida</i>	27,5 %	gi 431801013	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27,0 %	gi 452183609	24
<i>Mycobacterium bovis</i>	26,8 %	gi 378770764	25

20 Es posible que varias de las secuencias proteicas disponibles en las bases de datos públicas no hayan sido secuencias de ADI de longitud completa. En esos casos, las secuencias disponibles públicamente se ampliaron donde fue necesario para preparar una ADI de longitud completa basada en secuencias de ADI conocidas. En determinados casos, las proteínas ADI se modificaron en otra parte (p. ej., sustitución C251S). Estas secuencias de ADI sintetizadas se proporcionan en las SEQ ID NO: 26-32 y corresponden a las secuencias de ADI extendidas y/o modificadas de *Mycoplasma arginini* (C251S), *Mycoplasma arthritidis* (C251S), *Mycoplasma phocicerebrale*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma phocidae*, *H. orenii* y *Mycobacterium bovis*.

- 25 Se caracterizaron varias enzimas ADI de diversos organismos para determinar qué enzimas se esperaba que eliminen y mantengan bajas concentraciones de arginina en la sangre del paciente, incluso en presencia de anticuerpos anti-ADI-PEG 20. La tabla 2 (a continuación) enumera un subconjunto seleccionado de enzimas ADI de la tabla 1 que se estudiaron. Como se detalla a continuación, los datos de estos estudios muestran que la ADI de varias especies que están estrechamente relacionadas con *M. hominis*, en función de la identidad de secuencia, tienen propiedades catalíticas enzimáticas suficientemente buenas y reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20.

30

Preparación de ADI. Las enzimas ADI recombinantes se clonaron, expresaron y purificaron para análisis según

protocolos convencionales, como se ha descrito, por ejemplo, en Gallego *et al.*, PLOS One, 7 (10): e47886, 2012; Monstadt y Holldorf, Biochem. J. 273: 739-745, 1990; Joo Noh *et al.*, Molecules and Cells. 13: 137-143, 2002; y Sugimura *et al.*, Infection and Immunity. 58: 2510-2515, 1990.

Purificación de anticuerpos humanos anti-ADI-PEG20. El anticuerpo anti-ADI-PEG20 se purificó de muestras de plasma de pacientes que habían recibido ADI-PEG20 durante un estudio clínico. Se agrupó un total de 60 ml de plasma de 8 pacientes diferentes que habían alcanzado un título alto (título ≥ 4) contra ADI-PEG20 según lo determinado por un ensayo ELISA. Se usó una purificación de dos etapas, una cromatografía de proteína "A" (GE Healthcare) seguida de una cromatografía de afinidad de ADI. Se obtuvieron ~20 mg de anticuerpo purificado y se almacenaron a -80 °C en alícuotas hasta que se necesitó.

Ensayos de enzimas ADI. La arginina desiminasa (ADI) cataliza la conversión de L-arginina en L-citrulina y amoníaco. La cantidad de L-citrulina se puede detectar mediante un ensayo de puntos finales colorimétrico (véase, por ejemplo, Knipp y Vasak, Analytical Biochem. 286: 257-264, 2000) y se pueden comparar con una curva patrón de cantidades conocidas de L-citrulina para calcular la actividad específica de ADI expresada como UI/mg de proteína. Una UI de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de citrulina por minuto al pH y la temperatura que se prueba. Las condiciones de ensayo convencionales se realizaron a 37 °C en tampón HEPES fisiológico (PHB) HEPES 50 mM, NaCl 160 mM, pH 7,4 (Lang y Zander, Clin Chem Lab Med. 37: 563-571, 1999) más BSA al 0,1 %. Todas las muestras y patrones se procesaron por duplicado o por triplicado cuando las condiciones lo permitieron.

Los valores de Km y Kcat se determinaron usando una variación del ensayo de actividad descrito anteriormente. Al igual que con el ensayo de actividad, todas las reacciones se realizaron a 37 °C en PHB más BSA al 0,1 %. La concentración de enzima, el tiempo de reacción y el intervalo de concentración del sustrato se ajustaron para cada una de las construcciones de ADI o ADIr para compensar sus diferencias de actividad. En general, se utilizó enzima 2 nM, tiempo de reacción de 5 minutos y una arginina 0 - 160 μ M como condiciones de partida. Al optimizar las condiciones, se prestó especial atención a la cantidad de sustrato consumido como un porcentaje del sustrato total añadido a la reacción. El límite inferior de detección es 1 μ M de citrulina, siendo el límite inferior de cuantificación 2 μ M. Se procesó una curva patrón de citrulina en cada placa y se usó para cuantificar la citrulina producida por la reacción enzimática.

También se realizaron ensayos de actividad para evaluar la actividad enzimática en presencia de anti-ADI-PEG20 (perfiles de neutralización de anticuerpos). Estos ensayos se realizaron como se ha descrito anteriormente y en presencia de 800 nM, 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM y 0 nM de anticuerpos anti-ADI-PEG20.

Cálculos. La concentración de citrulina (μ M) producida en cada pocillo de reacción se calculó y se promedió utilizando la curva patrón de citrulina. La velocidad de cada reacción se calculó después en μ M/min/ADI 50 nM. La actividad específica (UI/mg o μ moles de producto/min/mg de ADI) se calculó multiplicando este valor por el factor "UI" (el factor UI se calculó a partir del peso molecular de la ADI y el volumen de reacción). Los resultados se resumen en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Secuencias y propiedades de ADI seleccionadas

ORGANISMO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD DE SECUENCIA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UI/MG)***	NÚMERO DE CAMBIOS DE RESTOS DE SUPERFICIE*	REDUCCIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA AB****
<i>Mycoplasma hominis</i>	100,0	+	0	-
<i>Mycoplasma phocicerebrale</i>	82,1	+	33	Y
<i>Mycoplasma arginini</i>	82,1	+	50	Y
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	80,4	+	53	Y
<i>Mycoplasma gateae</i>	76,8	+	48	Y
<i>Mycoplasma phocidae</i>	75,3	+	51	Y
<i>Mycoplasma columbinum</i>	58,2	+	93	Y
<i>Mycoplasma iowae</i>	55,2		107	ND

(continuación)

Tabla 2. Secuencias y propiedades de ADI seleccionadas				
ORGANISMO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD DE SECUENCIA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UI/MG)***	NÚMERO DE CAMBIOS DE RESTOS DE SUPERFICIE*	REDUCCIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA AB****
<i>Mycoplasma crocodyli</i>	52,3		107	ND
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	51,5		108	ND
<i>Mycoplasma alligatoris</i>	50,8	+	111	Y
<i>Mycoplasma mobile</i>	47,3	ND	111	ND
<i>Halothermothrix orenii</i>	34,8		122	ND
<i>Mycobacterium bovis</i>	26,8		132	ND
* Se identificaron restos de superficie a partir de la estructura cristalina de ADI de <i>M. hominis</i> y se determinaron restos de superficie para * ADI de otros organismos mediante homología de secuencia. ** ND: no determinado. "+" indica actividad enzimática específica de ≥ 8 UI/mg en condiciones fisiológicas y en ausencia *** de anticuerpos anti-ADI-PEG20. "Y" indica reactividad cruzada anti-ADI-PEG20 reducida en relación con ADI de <i>M. hominis</i>, según lo medido por la actividad enzimática **** específica en presencia de anticuerpos anti-ADI-PEG20.				

Estos datos muestran que enzimas ADI que son muy homólogas de ADI de *M. hominis* (aproximadamente 50-100 por ciento de identidad) mantuvieron una excelente actividad catalítica. También mostraron afinidad reducida hacia los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, según lo medido por la actividad enzimática en presencia de anticuerpos anti-ADI-PEG 20, por ejemplo, en relación con la de *Mycoplasma hominis*. Por consiguiente, estas enzimas ADI pueden tener utilidad terapéutica para su uso en terapia para el tratamiento del cáncer, ya sean solas o después de tratamiento con ADI-PEG 20, para extender y/o aumentar la eficacia de la terapia de agotamiento de arginina.

Las diversas realizaciones descritas anteriormente se pueden combinar para proporcionar realizaciones adicionales. Los aspectos de las realizaciones pueden modificarse, si es necesario emplear conceptos de las diversas patentes, solicitud y publicaciones para proporcionar más realizaciones adicionales.

Estos y otros cambios pueden realizarse en las realizaciones a la luz de la descripción detallada anteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Grupo Polaris

<120> ARGININA DESIMINASA CON REACTIVIDAD CRUZADA REDUCIDA HACIA ANTICUERPOS PARA ADI-PEG 20 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> POLA-003/01WO

<150> US 61/790.833

<151> 15/03/2013

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 409

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hominis*

<400> 1

ES 2 805 360 T3

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile
50 55 60

Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Glu
85 90 95

Thr Phe Leu Glu Glu Thr Val Pro Val Leu Thr Glu Ala Asn Lys Lys
100 105 110

Ala Val Arg Ala Phe Leu Leu Ser Lys Pro Thr His Glu Met Val Glu
115 120 125

Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu
130 135 140

Asn Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp
145 150 155 160

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

<211> 392
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma phocicerebrale*

5 <400> 2

Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His
 1 5 10 15

Glu Pro Gly Arg Glu Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu
 20 25 30

Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His
 35 40 45

Gln Ser Phe Val Lys Gln Leu Lys Asp Asn Gly Ile Asn Val Val Glu
 50 55 60

Leu Thr Asp Leu Val Ala Glu Thr Phe Asp Leu Ala Ser Lys Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Glu Lys Leu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu
 85 90 95

Ser Glu Ala His Lys Thr Ala Val Arg Lys Phe Leu Thr Ser Arg Lys
 100 105 110

Ser Thr Arg Glu Met Val Glu Phe Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr
 115 120 125

Asp Leu Gly Ile Glu Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro
 130 135 140

Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val
 145 150 155 160

Thr Ile His Tyr Met Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe
 165 170 175

Ser Arg Phe Val Phe Ser Asn His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp
 180 185 190

Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys Met Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe
 195 200 205

Ile Tyr Asn Asn Asp Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp
 210 215 220

ES 2 805 360 T3

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

<210> 3
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma arginini*
 <400> 3

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

ES 2 805 360 T3

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
 50 55 60

Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
 85 90 95

Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val
 100 105 110

Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val
 115 120 125

Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
 130 135 140

Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
 145 150 155 160

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
 165 170 175

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser
 180 185 190

Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu
 195 200 205

Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr
 210 215 220

Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu
 225 230 235 240

Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile
 245 250 255

Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
 260 265 270

Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
 275 280 285

Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala

ES 2 805 360 T3

290		295		300
Glu Pro Gln Pro Val	Glu Asn Gly Leu Pro	Leu Glu Gly Leu Leu Gln		
305	310	315		320
Ser Ile Ile Asn Lys Lys	Pro Val Leu Ile Pro	Ile Ala Gly Glu Gly		
	325	330		335
Ala Ser Gln Met Glu Ile	Glu Arg Glu Thr His	Phe Asp Gly Thr Asn		
	340	345		350
Tyr Leu Ala Ile Arg Pro	Gly Val Val Ile Gly	Tyr Ser Arg Asn Glu		
	355	360		365
Lys Thr Asn Ala Ala Leu	Glu Ala Ala Gly Ile	Lys Val Leu Pro Phe		
	370	375		380
His Gly Asn Gln Leu Ser	Leu Gly Met Gly Asn	Ala Arg Cys Met Ser		
385	390	395		400
Met Pro Leu Ser Arg Lys	Asp Val Lys Trp			
	405	410		

<210> 4
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma arthritidis*
 <400> 4

ES 2 805 360 T3

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Lys Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Ala Glu
50 55 60

Leu Lys Lys Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Val Asp Leu Ile Val
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Lys Glu Lys Leu Leu Glu
85 90 95

Glu Phe Leu Asp Asp Ser Val Pro Val Leu Ser Asp Glu His Arg Ala

ES 2 805 360 T3

100					105					110					
Ala	Val	Lys	Lys	Phe	Leu	Gln	Ser	Gln	Lys	Ser	Thr	Arg	Ser	Leu	Val
		115					120					125			
Glu	Tyr	Met	Ile	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	His	Asp	Leu	Lys	Ile	Glu	Ser
		130					135					140			
Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg
		145					150					155			
Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	His	Tyr	Met	Arg
				165					170					175	
Tyr	Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Phe	Val	Phe	Ser
			180					185					190		
Asn	His	Pro	Lys	Leu	Val	Asn	Thr	Pro	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ala	Glu
		195					200					205			
Gly	Leu	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Tyr	Asn	Asn	Asp	Thr
		210					215					220			
Leu	Val	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	Leu	Gln	Thr	Ile	Thr	Leu
				230								235			
Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Cys	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile
				245					250					255	
Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Trp	Thr	Asn	Leu	Met	His	Leu	Asp	Thr
			260					265					270		
Trp	Leu	Thr	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ala
			275				280					285			
Asn	Asp	Val	Phe	Lys	Phe	Trp	Asp	Tyr	Asp	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Asp
		290					295					300			
Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Asp	Asn	Gly	Leu	Pro	Leu	Glu	Asp	Leu	Leu	Lys
				310								315			
Ser	Ile	Ile	Gly	Lys	Lys	Pro	Thr	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly
				325					330					335	
Ala	Ser	Gln	Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	Glu	Thr	His	Phe	Asp	Gly	Thr	Asn
			340					345					350		

ES 2 805 360 T3

Tyr Leu Ala Val Ala Pro Gly Ile Val Ile Gly Tyr Ala Arg Asn Glu
355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe
370 375 380

Arg Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys
405

<210> 5
<211> 408
<212> PRT
<213> *Mycoplasma orale*

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)..(201)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (263)..(263)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (272)..(272)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (294)..(294)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 5

Ser Val Phe Ser Asp Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Gly Asp Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Lys Glu Ile Asp
20 25 30

Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu
35 40 45

Glu Ser Thr Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Glu Ile Leu
50 55 60

Lys Lys Gln Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Val Asp Leu Val Val Glu
65 70 75 80

30

ES 2 805 360 T3

Thr	Tyr	Asn	Leu	Val	Asp	Lys	Lys	Thr	Gln	Glu	Lys	Leu	Leu	Lys	Asp	85	90	95	
Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Arg	Lys	Ala	100	105	110	
Val	Glu	Lys	Phe	Leu	Lys	Ser	Leu	Lys	Ser	Thr	Lys	Glu	Leu	Ile	Gln	115	120	125	
Tyr	Met	Met	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	Tyr	Asp	Leu	Gly	Ile	Lys	Ala	Asp	130	135	140	
Lys	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Asp	145	150	155	160
Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	His	Tyr	Met	Arg	Tyr	165	170	175	
Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Phe	Ser	Lys	Phe	Ile	Phe	Thr	Asn	180	185	190	
His	Pro	Lys	Leu	Val	Lys	Thr	Pro	Xaa	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ala	Met	Lys	195	200	205	
Leu	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Tyr	Asn	Asn	Asp	Thr	Leu	210	215	220	
Val	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	Leu	Glu	Thr	Ile	Thr	Leu	Leu	225	230	235	240
Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Cys	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile	Val	245	250	255	
Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Xaa	Thr	Asn	Leu	Met	His	Leu	Asp	Thr	Xaa	260	265	270	
Leu	Thr	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ala	Asn	275	280	285	
Asp	Val	Phe	Lys	Phe	Xaa	Asp	Tyr	Asp	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Asn	290	295	300	
Pro	Glu	Pro	Val	Val	Asn	Gly	Leu	Pro	Leu	Asp	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	305	310	315	320
Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Gly	Lys	Gly	Ala	325	330	335	

ES 2 805 360 T3

Thr Glu Ile Glu Thr Ala Val Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
340 345 350

Leu Ala Ile Lys Pro Gly Val Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Val Lys
355 360 365

Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Asn Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe Lys
370 375 380

Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
385 390 395 400

Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys
405

<210> 6
<211> 391
<212> PRT
<213> *Mycoplasma gateae*
<400> 6

Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His
1 5 10 15

Glu Pro Gly Arg Glu Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu
20 25 30

Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His
35 40 45

Lys Leu Phe Val Ser Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu
50 55 60

Leu Thr Asp Leu Val Thr Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala
65 70 75 80

Lys Asp Asn Leu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu
85 90 95

Thr Glu Glu Leu Lys Ser Val Val Arg Thr Tyr Leu Lys Ser Ile Lys
100 105 110

Ser Thr Arg Glu Leu Ile Gln Met Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr
115 120 125

Asp Leu Gly Ile Glu Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro
130 135 140

ES 2 805 360 T3

Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Val	
145					150					155					160	
Thr	Ile	His	Tyr	Met	Arg	Tyr	Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Phe	
				165					170					175		
Ser	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Asn	His	Pro	Lys	Leu	Val	Asn	Thr	Pro	Trp	
			180					185					190			
Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	
		195					200					205				
Ile	Tyr	Asn	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	
	210					215					220					
Leu	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	Asn	Lys	Glu	
225					230					235					240	
Cys	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Trp	Thr	Asn	
				245					250					255		
Leu	Met	His	Leu	Asp	Thr	Trp	Leu	Thr	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	
			260					265					270			
Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ala	Asn	Asp	Val	Phe	Lys	Phe	Trp	Asp	Tyr	Asp	
		275					280					285				
Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Glu	Pro	Gln	Pro	Val	Glu	Asn	Gly	Leu	Pro	
	290					295					300					
Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Pro	Ile	Leu	Ile	
305					310					315				320		
Pro	Ile	Ala	Gly	Glu	Gly	Ala	Ser	Gln	Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	Glu	Thr	
				325					330					335		
His	Phe	Asp	Gly	Thr	Asn	Tyr	Leu	Ala	Ile	Arg	Pro	Gly	Val	Val	Ile	
			340					345					350			
Gly	Tyr	Ser	Arg	Asn	Glu	Lys	Thr	Asn	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Gly	
		355					360					365				
Ile	Lys	Val	Leu	Pro	Phe	His	Gly	Asn	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Met	Gly	
	370					375					380					
Asn	Ala	Arg	Cys	Met	Ser	Met										

ES 2 805 360 T3

385

390

5
<210> 7
<211> 392
<212> PRT
<213> *Mycoplasma phocidae*
<400> 7

```

Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Gln Thr Val Leu Val His
1          5          10          15

Glu Pro Gly Arg Glu Ile Glu Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu
          20          25          30

Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His
          35          40          45

Gln Glu Phe Val Ala Glu Leu Lys Lys Asn Asn Ile Asn Val Val Glu
50          55          60

Leu Thr Asp Leu Val Ser Glu Thr Tyr Asp Met Val Ser Lys Glu Lys
65          70          75          80

Gln Glu Lys Leu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu
          85          90          95

Ser Glu Glu His Lys Gly Leu Val Arg Lys Phe Leu Lys Ser Leu Lys
          100          105          110

Ser Ser Lys Glu Leu Ile Gln Tyr Met Met Ala Gly Ile Thr Lys His
          115          120          125

Asp Leu Asn Ile Glu Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro
130          135          140

Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val
145          150          155          160

Thr Ile His Tyr Met Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe
          165          170          175

Ser Arg Phe Ile Phe Ala Asn His Pro Lys Leu Met Asn Thr Pro Leu
          180          185          190

Tyr Tyr Asn Pro Asp Met Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe
          195          200          205

Val Tyr Asn Asn Glu Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp

```

ES 2 805 360 T3

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

<210> 8
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma columbinum*

<400> 8

Met Ser Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Lys Glu Val 1 5 10 15
Leu Val His Thr Pro Gly Asp Glu Ile Arg Arg Ile Ser Pro Ser Arg 20 25 30
Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Pro Asn Glu Ala Ile

ES 2 805 360 T3

35	40	45
Lys Glu His Lys Gly Phe Leu Lys Ile Leu Gln Asp Lys Gly Ile Lys		
50	55	60
Val Ile Gln Leu Ser Asp Leu Val Ala Glu Thr Tyr Thr Tyr His Ala		
65	70	75
Thr Gln Lys Glu Arg Glu Ala Phe Ile Glu Lys Trp Leu Asp Glu Ala		
	85	90
Glu Pro Ala Leu Thr Lys Asp Leu Arg Ala Lys Val Lys Ser Tyr Val		
	100	105
Leu Ser Lys Glu Gly Thr Pro Val Ala Met Val Arg Thr Met Met Ala		
	115	120
Gly Val Ser Lys Gln Glu Leu Asn Val Glu Ser Glu Thr Glu Leu Val		
	130	135
Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser		
	145	150
Ala Gly Asn Gly Ile Ser Leu Asn Asn Met Lys Tyr Val Thr Arg Lys		
	165	170
Arg Glu Thr Ile Phe Ala Glu Phe Ile Phe Ala Thr His Pro Asp Tyr		
	180	185
Lys Thr Thr Pro His Trp Phe Asp Arg Leu Asp Glu Gly Asn Ile Glu		
	195	200
Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Lys Asp Thr Leu Val Ile Gly Val		
	210	215
Ser Glu Arg Thr Asn Lys Glu Ala Ile Leu Thr Ile Ala Lys Lys Ile		
	225	230
Lys Asn Asn Lys Glu Ala Lys Phe Lys Lys Ile Val Ala Ile Asn Val		
	245	250
Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Val		
	260	265
Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys		
	275	280
		285

ES 2 805 360 T3

Val Trp Glu Ile Asp Leu Ser Lys Glu Ile Glu Met Val Glu Thr Asn
290 295 300

Lys Pro Leu Ala Asp Val Leu Glu Ser Ile Ile Gly Val Lys Pro Val
305 310 315 320

Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Gly Ala Thr Gln Leu Asp Ile Asp Ile
325 330 335

Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val
340 345 350

Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Ile Lys Thr Glu Ala Ala Leu Arg Ala
355 360 365

Ala Gly Val Thr Val Leu Ser Phe Glu Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly
370 375 380

Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Asp Val
385 390 395 400

Lys

<210> 9
<211> 407
<212> PRT
<213> *Mycoplasma iowae*

<400> 9

Met Gly Asn Asn Ile Pro Lys Lys Ile Asn Val Phe Ser Glu Ile Gly
1 5 10 15

Asn Leu Lys Arg Val Leu Val His Thr Pro Gly Lys Glu Ile Glu Tyr
20 25 30

Val Thr Pro Gln Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Asp
35 40 45

Pro Val Arg Ala Arg Glu Glu His Lys Glu Phe Ile Lys Ile Leu Glu
50 55 60

Ser Gln Gly Val Glu Val Val Gln Leu Val Asp Leu Thr Ala Glu Thr
65 70 75 80

Tyr Asp Val Ala Glu Ser Gln Ala Lys Glu Asn Phe Ile Gln Lys Trp
85 90 95

5

10

ES 2 805 360 T3

Leu Asp Glu Ser Leu Pro Lys Leu Thr Asp Glu Asn Arg Asn Lys Val
 100 105 110
 Tyr Ser Leu Leu Lys Ser Leu Glu Lys Asp Pro Lys Glu Met Ile Arg
 115 120 125
 Lys Met Met Ser Gly Val Leu Ala Ser Glu Ile Gly Val Lys Ser Asp
 130 135 140
 Val Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp
 145 150 155 160
 Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Ile Thr Leu His Arg Met Phe Arg
 165 170 175
 Pro Thr Arg Arg Arg Glu Thr Ile Phe Ala Asp Phe Ile Phe Ser Asn
 180 185 190
 His Pro Glu Tyr Lys Ser Thr Gln Lys Tyr Tyr Glu Arg Glu Asp Lys
 195 200 205
 Phe Ser Leu Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Lys Thr Leu
 210 215 220
 Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Glu Lys Gly Ala Ile Lys Ala Leu
 225 230 235 240
 Ala Lys Ala Val Gln Asn Asn Ser Asn Met Ser Phe Glu Lys Ile Tyr
 245 250 255
 Ala Ile Asn Val Pro Lys Met Ser Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp
 260 265 270
 Leu Thr Met Leu Asp Thr Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Met
 275 280 285
 Gly Val Leu Lys Ile Trp Glu Ile Asp Leu Ser Asp Lys Ser Leu Lys
 290 295 300
 Trp Lys Glu Ile Arg Asp Ser Leu Asp His Phe Leu Ser Thr Ile Ile
 305 310 315 320
 Gly Lys Lys Ala Ile Thr Val Pro Val Ala Gly Lys Asp Ala Met Gln
 325 330 335
 Phe Glu Ile Asp Ile Glu Thr His Phe Asp Ala Thr Asn Phe Ile Ala
 340 345 350

ES 2 805 360 T3

Val Ala Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Lys Lys Thr Asn
355 360 365

Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ile Lys Val Leu Ser Trp Asn Gly Asp
370 375 380

Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Thr Met Pro Leu
385 390 395 400

Tyr Arg Glu Glu Leu Lys Lys
405

<210> 10

<211> 402

<212> PRT

<213> *Mycoplasma crocodyli*

<400> 10

Met Asn Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Val Gly Lys Leu Lys Glu Val
1 5 10 15

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

Leu Glu Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Pro Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu His Lys Arg Phe Leu Lys Ile Leu Glu Asp Asn Asn Ile Lys
50 55 60

Val Ile Gln Leu Asp Gln Leu Val Ala Asp Thr Tyr Glu Leu Val Asn
65 70 75 80

Pro Ser Val Arg Asp Ala Phe Ile Glu Lys Trp Leu Asn Glu Ser Glu
85 90 95

Pro Lys Leu Asp Lys Lys Leu Arg Glu Lys Val Lys Glu Tyr Leu Leu
100 105 110

His Thr Gln Lys Thr Val Gly Thr Lys Arg Met Val Arg Ile Met Met
115 120 125

Ala Gly Val Asp Arg Val Glu Leu Gly Val Glu Leu Asp Arg Gln Leu
130 135 140

Val Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala
145 150 155 160

5

10

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

<211> 430
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma fermentans*

5 <400> 11

```

Met Gln Ile Ile Ala Lys Ile Asp Leu Leu Thr Asn Met Leu Ile Phe
1          5          10          15

Met Lys Ile Tyr Phe Ile Gly Arg Leu Ile Met Lys Lys Ile Asn Val
20          25          30

Tyr Ser Glu Tyr Gly Lys Leu Lys Glu Val Leu Val His Thr Pro Gly
35          40          45

Asp Glu Ile Arg Arg Ile Ala Pro Ser Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe
50          55          60

Ser Ala Ile Leu Glu Pro Asp Ser Ala Ile Ala Glu His Lys Arg Phe
65          70          75          80

Val Gln Leu Leu Lys Asp Asn Gly Ile Lys Val Ile Gln Leu Asp Glu
85          90          95

Leu Phe Ala Lys Thr Phe Asp Leu Val Ser Glu Ser Val Lys Gln Ser
100         105         110

Leu Ile Glu Arg Trp Leu Asp Glu Cys Glu Pro Lys Leu Asp Ala Thr
115         120         125

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

Ser Lys Lys Met Val Arg Val Met Met Ala Gly Ile Asp Lys Lys Glu
145         150         155         160

Leu Gly Ile Glu Leu Asp Arg Asp Leu Val Val Asp Pro Met Pro Asn
165         170         175

Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Ile Ser
180         185         190

Leu His His Met Lys Tyr Val Thr Arg Gln Arg Glu Thr Ile Phe Ser
195         200         205

Glu Phe Ile Phe Asp Asn Asn Leu Asp Tyr Asn Thr Val Pro Arg Trp
210         215         220

```

ES 2 805 360 T3

Phe Asp Arg Lys Asp Glu Gly Arg Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile
225 230 235 240

Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asn Lys
245 250 255

Glu Ala Ile Asn Val Met Ala Arg Lys Ile Ala Ala Asp Lys Glu Val
260 265 270

Lys Phe Lys Arg Ile Tyr Ala Ile Asn Val Pro Pro Met Pro Asn Leu
275 280 285

Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu
290 295 300

Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys Val Trp Arg Ile Asp Leu
305 310 315 320

Asn Asp Pro Asp Phe Val Trp His Glu Ile Glu Gly Ser Leu Glu Glu
325 330 335

Ile Leu Glu Gln Ile Ile Gly Met Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala
340 345 350

Gly Lys Gly Ala Ser Gln Leu Asp Ile Asp Ile Glu Thr His Phe Asp
355 360 365

Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Ser Val Val Val Gly Tyr Ser
370 375 380

Arg Asn Glu Lys Thr Glu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Lys Val Lys Val
385 390 395 400

Leu Ser Phe Glu Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg
405 410 415

Cys Met Ser Met Pro Leu Ile Arg Glu Asp Ile Lys Lys Lys
420 425 430

<210> 12
<211> 452
<212> PRT
<213> *Mycoplasma penetrans*

<400> 12

Met Val Ile Thr Ile Ala Leu Asn Ile Leu Asn Lys Ile Tyr Phe Lys
1 5 10 15

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

260	265	270
Asn Ser Glu Arg Thr Asn Phe Ala Ala Ile Glu Ser Val Ala Lys Asn		
275	280	285
Ile Gln Ala Asn Lys Asp Cys Thr Phe Glu Arg Ile Val Val Ile Asn		
290	295	300
Val Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met		
305	310	315
Leu Asp Tyr Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Met Asn Val Leu		
325	330	335
Lys Ile Trp Glu Ile Asp Leu Asn Val Lys Pro Val Lys Phe Val Glu		
340	345	350
Lys Lys Gly Thr Leu Glu Glu Val Leu Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Lys		
355	360	365
Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Gly Ala Asn Gln Leu Asp Ile		
370	375	380
Asp Ile Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro		
385	390	395
Gly Val Val Val Gly Tyr Glu Arg Asn Glu Lys Thr Gln Lys Ala Leu		
405	410	415
Val Glu Ala Gly Ile Lys Val Leu Ser Phe Asn Gly Ser Gln Leu Ser		
420	425	430
Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ile Arg Glu		
435	440	445
Asn Leu Lys Lys		
450		

<210> 13
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma gallisepticum*

<400> 13

ES 2 805 360 T3

Met Arg Arg Lys Phe Met Phe Asn Lys Ile Arg Val Tyr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Gly Lys Leu Arg Lys Val Leu Val His Thr Pro Gly Lys Glu Leu Asp

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

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

<210> 14
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma alligatoris*
 <400> 14

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

ES 2 805 360 T3

Gln Lys Ile Lys Asp Glu Phe Ile Asp Gln Trp Leu Gln Glu Ala Lys
 85 90 95
 Pro Val Leu Asn Asp Gln Leu Lys Lys Leu Val Lys Asn Tyr Leu Leu
 100 105 110
 Lys Ser Gln Lys Glu Phe Ser Thr Lys Lys Met Val Arg Ile Met Met
 115 120 125
 Ala Gly Ile Asp Lys Lys Glu Ile Asn Ile Asp Leu Asp Arg Asp Leu
 130 135 140
 Val Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Asn Gly Ile Ser Leu His Asn Met Lys Tyr Gln Thr Arg
 165 170 175
 Lys Arg Glu Thr Ile Phe Ala Gln Phe Ile Phe Lys Tyr Asn Lys Asp
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro His Trp Phe Asp Arg Phe Asp His Gly Ser Ile
 195 200 205
 Glu Gly Gly Asp Val Phe Val Tyr Thr Lys Asp Thr Leu Val Ile Gly
 210 215 220
 Ile Ser Glu Arg Thr Thr Lys Glu Ala Val Leu Asn Ile Ala Lys Lys
 225 230 235 240
 Ile Lys Ala Asn Thr Asp Ser Lys Phe Lys Lys Ile Val Ala Ile Asn
 245 250 255
 Val Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Ile Thr Met
 260 265 270
 Val Asp His Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Met Lys Ser Leu
 275 280 285
 Lys Phe Trp Leu Ile Asp Leu Ser Lys Glu Ile Lys Met Val Glu Leu
 290 295 300
 Glu Glu Ser Leu Ser Asn Met Leu Glu Ala Ile Ile Gly Lys Lys Pro
 305 310 315 320
 Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Asn Ala Ser Gln Leu Asp Ile Asp
 325 330 335

ES 2 805 360 T3

Ile Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Gly
340 345 350

Val Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Lys Leu Thr Gln Lys Ala Leu Glu
355 360 365

Asp Ala Gly Val Lys Val Leu Ser Phe Asp Gly Asn Gln Leu Ser Leu
370 375 380

Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Asp
385 390 395 400

Ile Lys

<210> 15

<211> 438

5 <212> PRT

<213> *Mycoplasma pneumoniae*

<400> 15

Met Ser Lys Lys Gln Leu Val Lys Thr Asp Gly His Asn Gln Leu Asp
1 5 10 15

Gln Pro Asn Thr Lys Ala Leu Gln Leu Lys Lys Lys Gln Phe Asn Ser
20 25 30

Gly Val Arg Val Thr Ser Glu Ile Ser Phe Leu Arg Glu Val Ile Ala
35 40 45

His His Pro Gly Ile Glu Thr Glu Arg Val Ile Asp Asn Gln Thr Phe
50 55 60

Gly Ser Ala Met Tyr Leu Glu Arg Ala Gln Lys Glu His Gln Leu Phe
65 70 75 80

Ile Lys Ile Leu Arg Gln His Gly Thr Lys Val His Tyr Leu Gln Asp
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Ala Leu Ser Ala Ala Asp Pro Asn Val Arg Gln Asp
100 105 110

Phe Ile Lys Asn Phe Leu Leu Glu Ser Gly Ile Lys Ser Val Ser Thr
115 120 125

Phe Glu Ala Cys Leu Asn Phe Phe Arg Ser Leu Asp Ser Leu Val Asp
130 135 140

ES 2 805 360 T3

Val	Ile	Lys	Val	Met	Phe	Gly	Gly	Ile	Lys	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Pro	145	150	155			160
Ile	Thr	Pro	Gln	Arg	Phe	Ala	Asp	Ile	His	Val	Ser	Asn	Ser	Pro	Phe		165	170			175
Leu	Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Phe	Ser	Leu	Tyr	Pro	His	Lys	Phe	Phe	Asn		180	185			190
Thr	Leu	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Leu	Phe	Val	Thr	Asn	Asp	Ser	Glu	Leu		195	200			205
Lys	Arg	His	Ser	Leu	Val	Tyr	Glu	Tyr	Ile	Met	Arg	Phe	His	Pro	Arg		210	215			220
Phe	Asp	Gly	Val	Lys	Leu	Tyr	Thr	Asn	Arg	Asp	Phe	Lys	Asn	Cys	Leu		225	230			235
Ile	Asn	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gln	Ile	Ser	Asn	Glu	Ile	Leu	Leu	Ile		245	250			255
Gly	Ile	Ser	His	Asp	Thr	Asp	Val	Leu	Gly	Ile	Glu	Ser	Leu	Ala	Arg		260	265			270
Asn	Leu	Leu	Ser	Asp	His	Thr	Asn	Pro	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Ala	Ile		275	280			285
Asn	Ile	His	Lys	Phe	Gly	Ala	Lys	Thr	Asn	Leu	Asn	Lys	Leu	Ile	Ala		290	295			300
Met	Val	Asp	Val	Asp	Lys	Phe	Ile	Ile	Ala	Arg	Lys	Val	Leu	Gln	Ala		305	310			315
Thr	Glu	Ile	Phe	Glu	Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Gln	Arg	Asp	Val	Asp	Gly		325	330			335
Leu	Ala	Gln	Ile	Lys	Phe	Lys	Pro	Leu	Lys	Phe	Asn	Phe	Gly	Glu	Ile		340	345			350
Ile	Glu	Ala	Ile	Ile	Asp	Lys	Gln	Pro	Arg	Phe	Val	Ile	Ile	Gly	Gly		355	360			365
Gly	Asp	Glu	Val	Ala	Glu	Arg	Lys	Glu	Leu	Leu	Asp	Cys	Gly	Met	Gly		370	375			380
Val	Leu	Asn	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Ile	Val	Val	Phe	Asp	Arg	Asn	His		385	390			395

ES 2 805 360 T3

Tyr Thr Asn Asn Leu Leu Asn Glu Leu Gly Leu Ile Ile His Lys Ile
405 410 415

Pro Ala Ser Glu Leu Ser Arg Gly Pro Ser Gly Pro Leu Glu Met Val
420 425 430

Cys Ser Leu Trp Arg Glu
435

<210> 16
<211> 409
<212> PRT
<213> *Mycoplasma mobile*

<400> 16

Met Lys Asp Thr Lys Asp Ile Ile Asn Val Phe Ser Glu Ile Gly Glu
1 5 10 15

Leu Lys Lys Val Leu Ile His Thr Pro Gly Asn Glu Leu Lys Tyr Val
20 25 30

Ser Pro Tyr Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Asn Val Leu Glu Trp
35 40 45

Arg Glu Ala Lys Lys Glu His Asn Glu Phe Ile Gln Lys Leu Lys Ser
50 55 60

Glu Gly Val Glu Pro Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala Glu Ser Phe
65 70 75 80

Glu Glu Ser Ser Ile Lys Val Lys Asn Asp Phe Ile Arg Gln Tyr Leu
85 90 95

Asp Glu Ala Thr Pro Ile Leu Asp Gly Leu Thr Lys Gln Lys Leu Leu
100 105 110

Pro Phe Phe Leu Asp Ile Lys His Ser Thr Arg Lys Thr Ile Glu Leu
115 120 125

Met Met Ser Gly Ile Thr Gln Lys Asp Ile Ser Ile Ser His Ile Glu
130 135 140

Arg Glu Leu Ile Ile Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Ser Arg Asp
145 150 155 160

Asn Phe Ile Ser Ile Gly Asn Ser Val Ile Ile Ser Asn Met Lys Tyr
165 170 175

5

10

ES 2 805 360 T3

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

<210> 17
 <211> 411
 <212> PRT

ES 2 805 360 T3

<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 17

```

Met Thr Ala Gln Thr Pro Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Lys Leu
 1           5           10           15

Lys Lys Val Leu Leu His Arg Pro Gly Lys Glu Ile Glu Asn Leu Met
          20           25           30

Pro Asp Tyr Leu Glu Arg Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Phe Leu Glu
          35           40           45

Asp Ala Gln Lys Glu His Asp Ala Phe Ala Gln Ala Leu Arg Asp Glu
 50           55           60

Gly Ile Glu Val Leu Tyr Leu Glu Thr Leu Ala Ala Glu Ser Leu Val
65           70           75           80

Thr Pro Glu Ile Arg Glu Ala Phe Ile Asp Glu Tyr Leu Ser Glu Ala
          85           90           95

Asn Ile Arg Gly Arg Ala Thr Lys Lys Ala Ile Arg Glu Leu Leu Met
          100          105          110

Ala Ile Glu Asp Asn Gln Glu Leu Ile Glu Lys Thr Met Ala Gly Val
          115          120          125

Gln Lys Ser Glu Leu Pro Glu Ile Pro Ala Ser Glu Lys Gly Leu Thr
          130          135          140

Asp Leu Val Glu Ser Asn Tyr Pro Phe Ala Ile Asp Pro Met Pro Asn
145           150           155           160

Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Thr Ile Gly Thr Gly Val Ser
          165          170          175

Leu Asn His Met Phe Ser Glu Thr Arg Asn Arg Glu Thr Leu Tyr Gly
          180          185          190

Lys Tyr Ile Phe Thr His His Pro Ile Tyr Gly Gly Gly Lys Val Pro
          195          200          205

Met Val Tyr Asp Arg Asn Glu Thr Thr Arg Ile Glu Gly Gly Asp Glu
210           215           220

Leu Val Leu Ser Lys Asp Val Leu Ala Val Gly Ile Ser Gln Arg Thr

```


ES 2 805 360 T3

225		230		235		240									
Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Val	Asn	Ile	Phe	Lys	Gln	Asn
				245					250					255	
Leu	Gly	Phe	Lys	Lys	Val	Leu	Ala	Phe	Glu	Phe	Ala	Asn	Asn	Arg	Lys
			260					265					270		
Phe	Met	His	Leu	Asp	Thr	Val	Phe	Thr	Met	Val	Asp	Tyr	Asp	Lys	Phe
		275					280					285			
Thr	Ile	His	Pro	Glu	Ile	Glu	Gly	Asp	Leu	Arg	Val	Tyr	Ser	Val	Thr
	290					295					300				
Tyr	Asp	Asn	Glu	Glu	Leu	His	Ile	Val	Glu	Glu	Lys	Gly	Asp	Leu	Ala
305					310					315					320
Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Asn	Leu	Gly	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Leu	Ile	Arg
			325						330					335	
Cys	Gly	Gly	Asp	Asn	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Arg	Glu	Gln	Trp	Asn	Asp
			340					345					350		
Gly	Ser	Asn	Thr	Leu	Thr	Ile	Ala	Pro	Gly	Val	Val	Val	Val	Tyr	Asn
		355					360					365			
Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Glu	Ser	Lys	Gly	Leu	Lys	Leu
	370					375					380				
Ile	Lys	Ile	His	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Pro	Arg
385					390					395					400
Cys	Met	Ser	Met	Pro	Phe	Glu	Arg	Glu	Asp	Ile					
				405					410						

<210> 18
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> *Enterococcus faecalis*
 <400> 18

Met	Ser	His	Pro	Ile	Asn	Val	Phe	Ser	Glu	Ile	Gly	Lys	Leu	Lys	Thr
1				5					10					15	
Val	Met	Leu	His	Arg	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Asn	Leu	Met	Pro	Asp
			20					25				30			
Tyr	Leu	Glu	Arg	Leu	Leu	Phe	Asp	Asp	Ile	Pro	Phe	Leu	Glu	Lys	Ala

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

Glu Ile Glu Gly Gly Leu Val Val Tyr Ser Ile Thr Glu Lys Ala Asp
290 295 300

Gly Asp Ile Gln Ile Thr Lys Glu Lys Asp Thr Leu Asp Asn Ile Leu
305 310 315 320

Cys Lys Tyr Leu His Leu Asp Asn Val Gln Leu Ile Arg Cys Gly Ala
325 330 335

Gly Asn Leu Thr Ala Ala Ala Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly Ser Asn
340 345 350

Thr Leu Ala Ile Ala Pro Gly Glu Val Val Val Tyr Asp Arg Asn Thr
355 360 365

Ile Thr Asn Lys Ala Leu Glu Glu Ala Gly Val Lys Leu Asn Tyr Ile
370 375 380

Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Tyr Arg Glu Asp Leu
405

<210> 19
<211> 403
<212> PRT
<213> *Mycoplasma capricolum*

<400> 19

Met Glu Lys Lys Ile Asn Val Phe Ser Glu Ile Gly Thr Leu Lys Thr
1 5 10 15

Val Leu Val His Arg Pro Gly Asp Glu Ile Glu Asn Leu Thr Pro Glu
20 25 30

Leu Leu Glu Arg Leu Leu Phe Asp Asp Val Pro Phe Lys Asp Val Ala
35 40 45

Val Lys Glu His Asp Ala Phe Thr Lys Ile Met Arg Asp Asn Gly Val
50 55 60

Glu Val Leu Tyr Ile Glu Lys Leu Ala Ala Glu Thr Leu Asp Gln His
65 70 75 80

Pro Asp Leu Arg Glu Lys Phe Ile Asp Gln Phe Ile Ser Glu Ala Asn
85 90 95

5

10

ES 2 805 360 T3

Ile	Glu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Glu	Lys	Tyr	Arg	Asp	Phe	Ile	Ser	Ser	Leu	100	105	110
Asp	Asn	Tyr	Arg	Met	Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Ala	Gly	Thr	Lys	Lys	Leu	115	120	125
Glu	Leu	Gly	Ile	Asp	Glu	Gly	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Pro	Phe	Ile	Ala	Asp	130	135	140
Pro	Leu	Pro	Asn	Val	Leu	Phe	Gln	Arg	Asp	Pro	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	145	150	155
Phe	Gly	Ile	Thr	Met	Asn	Arg	Met	Trp	Ser	Val	Thr	Arg	Asn	Arg	Glu	165	170	175
Thr	Ile	Phe	Pro	Asp	Leu	Val	Phe	Lys	His	His	Asn	Arg	Phe	Ala	Asn	180	185	190
Gln	Val	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Glu	Arg	Asp	Trp	Lys	Glu	Glu	Thr	Ile	Glu	195	200	205
Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Val	Leu	Asn	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Ile	Gly	Val	210	215	220
Thr	Gln	Arg	Thr	Thr	Leu	Lys	Ala	Ile	Glu	Lys	Phe	Ser	Glu	Arg	Leu	225	230	235
Phe	Asn	Asp	Pro	Glu	Ser	Ser	Tyr	Ser	Lys	Val	Ile	Ala	Leu	Asp	Leu	245	250	255
Pro	Lys	Ser	Arg	Ala	Phe	Met	His	Leu	Asp	Thr	Val	Phe	Thr	Asn	Ile	260	265	270
Asp	Tyr	Asp	Lys	Phe	Ile	Ala	His	Pro	Leu	Ile	Phe	Asp	Cys	Ile	Asp	275	280	285
Glu	Phe	Lys	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Lys	Gln	Gly	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	290	295	300
Lys	Thr	Leu	Ile	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Ala	Ala	Gly	Arg	Glu	Val	Gln	305	310	315
Ile	Ile	Arg	Cys	Gly	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Gly	Ala	Ser	Arg	Glu	Gln	325	330	335
Trp	Asn	Asp	Gly	Thr	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Lys	Val	Ile	340	345	350

ES 2 805 360 T3

Ala Tyr Glu Arg Asn Trp Ile Thr Ile Asp Leu Leu Arg Lys Ala Gly
355 360 365

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

Gly Pro Arg Cys Met Thr Met Pro Leu Trp Arg Glu Asp Leu Gln Glu
385 390 395 400

Ile Lys Arg

<210> 20

<211> 410

5 <212> PRT

<213> *Halothermothrix orenii*

<400> 20

Met Phe Lys Lys Ser Pro Leu Asn Val Thr Ser Glu Ile Gly Lys Leu
1 5 10 15

Lys Lys Val Leu Leu His Arg Pro Gly His Glu Ile Glu Asn Leu Thr
20 25 30

Pro Asp Leu Leu Glu Arg Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Lys
35 40 45

Val Ala Gln Glu Glu His Asp Ala Phe Ala Gln Thr Leu Arg Asp Asn
50 55 60

Gly Val Glu Val Leu Tyr Leu His Glu Leu Ala Ala Glu Ala Ile Gln
65 70 75 80

Glu Asp Glu Ile Arg Lys Lys Phe Ile Glu Gln Phe Leu Asp Glu Ala
85 90 95

Gly Val Ile Gly Lys Gly Ala Arg Gln Val Leu Lys Glu Tyr Phe Ala
100 105 110

Asp Met Asp Asn Glu Thr Leu Ile Arg Lys Met Met Ala Gly Val Arg
115 120 125

Lys Lys Glu Ile Pro Ala Ile Glu Lys Val Ala Ser Leu Asn Asp Met
130 135 140

Val Glu Glu Asp Tyr Pro Phe Val Leu Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr
145 150 155 160

ES 2 805 360 T3

Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Thr Ile Gly Thr Gly Ile Thr Leu Asn
 165 170 175
 His Met Arg Thr Glu Thr Arg Asn Arg Glu Val Ile Phe Ala Glu Tyr
 180 185 190
 Ile Phe Ser Tyr His Pro Asp Phe Lys Asp Thr Glu Ile Pro Phe Trp
 195 200 205
 Phe Asp Arg Asn Glu Thr Thr Ser Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Ile
 210 215 220
 Leu Ser Asp Lys Val Leu Ala Met Gly Ile Ser Glu Arg Thr Asp Ala
 225 230 235 240
 Ala Ser Ile Glu Lys Val Ala Arg Asn Ile Phe Thr Asp Gly Gln Pro
 245 250 255
 Phe Glu Thr Ile Leu Ala Phe Lys Ile Pro Glu Lys Arg Ala Phe Met
 260 265 270
 His Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Val Asp Tyr Asp Lys Phe Thr Ile
 275 280 285
 His Ala Glu Ile Glu Gly Pro Leu Lys Val Tyr Ser Ile Thr Lys Gly
 290 295 300
 Asp Asn Asp Glu Leu Lys Ile Asp Glu Glu Lys Ala Thr Leu Glu Asp
 305 310 315 320
 Thr Leu Lys Lys Tyr Leu Gly Leu Asp Glu Val Thr Leu Ile Arg Cys
 325 330 335
 Ala Gly Gly Asp Tyr Ile Asp Ala Gly Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly
 340 345 350
 Ser Asn Thr Leu Ala Ile Ala Pro Gly Glu Val Val Val Tyr Asn Arg
 355 360 365
 Asn His Thr Thr Asn Arg Leu Leu Glu Glu His Gly Ile Lys Leu His
 370 375 380
 Val Ile Pro Ser Ser Glu Leu Ser Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys
 385 390 395 400
 Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Asp Ile
 405 410

<210> 21
 <211> 411

ES 2 805 360 T3

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 21

5

```

Met Thr Asp Gly Pro Ile Lys Val Asn Ser Glu Ile Gly Ala Leu Lys
 1          5          10          15

Thr Val Leu Leu Lys Arg Pro Gly Lys Glu Leu Glu Asn Leu Val Pro
          20          25          30

Asp Tyr Leu Asp Gly Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Glu Val
          35          40          45

Ala Gln Lys Glu His Asp His Phe Ala Gln Val Leu Arg Glu Glu Gly
          50          55          60

Val Glu Val Leu Tyr Leu Glu Lys Leu Ala Ala Glu Ser Ile Glu Asn
65          70          75          80

Pro Gln Val Arg Ser Glu Phe Ile Asp Asp Val Leu Ala Glu Ser Lys
          85          90          95

Lys Thr Ile Leu Gly His Glu Glu Glu Ile Lys Ala Leu Phe Ala Thr
          100          105          110

Leu Ser Asn Gln Glu Leu Val Asp Lys Ile Met Ser Gly Val Arg Lys
          115          120          125

Glu Glu Ile Asn Pro Lys Cys Thr His Leu Val Glu Tyr Met Asp Asp
          130          135          140

Lys Tyr Pro Phe Tyr Leu Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
145          150          155          160

Asp Pro Gln Ala Ser Ile Gly His Gly Ile Thr Ile Asn Arg Met Phe
          165          170          175

Trp Arg Ala Arg Arg Arg Glu Ser Ile Phe Ile Gln Tyr Ile Val Lys
          180          185          190

His His Pro Arg Phe Lys Asp Ala Asn Ile Pro Ile Trp Leu Asp Arg
          195          200          205

Asp Cys Pro Phe Asn Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Val Leu Ser Lys
          210          215          220

```

ES 2 805 360 T3

Asp Val Leu Ala Ile Gly Val Ser Glu Arg Thr Ser Ala Gln Ala Ile
225 230 235 240

Glu Lys Leu Ala Arg Arg Ile Phe Glu Asn Pro Gln Ala Thr Phe Lys
245 250 255

Lys Val Val Ala Ile Glu Ile Pro Thr Ser Arg Thr Phe Met His Leu
260 265 270

Asp Thr Val Phe Thr Met Ile Asp Tyr Asp Lys Phe Thr Met His Ser
275 280 285

Ala Ile Leu Lys Ala Glu Gly Asn Met Asn Ile Phe Ile Ile Glu Tyr
290 295 300

Asp Asp Val Asn Lys Asp Ile Ala Ile Lys Gln Ser Ser His Leu Lys
305 310 315 320

Asp Thr Leu Glu Asp Val Leu Gly Ile Asp Asp Ile Gln Phe Ile Pro
325 330 335

Thr Gly Asn Gly Asp Val Ile Asp Gly Ala Arg Glu Gln Trp Asn Asp
340 345 350

Gly Ser Asn Thr Leu Cys Ile Arg Pro Gly Val Val Val Thr Tyr Asp
355 360 365

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

Ile Glu Ile Ser Gly Ser Glu Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg
385 390 395 400

Cys Met Ser Gln Pro Leu Phe Arg Glu Asp Ile
405 410

<210> 22
<211> 417
<212> PRT
<213> *Pseudomonas plecoglossicida*

<400> 22

Met Ser Ala Glu Lys Gln Lys Tyr Gly Val His Ser Glu Ala Gly Lys
1 5 10 15

Leu Arg Lys Val Met Val Cys Ala Pro Gly Leu Ala His Lys Arg Leu
20 25 30

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

275					280					285					
Asp	Leu	Val	Thr	Val	Phe	Pro	Glu	Val	Val	Arg	Glu	Ile	Val	Pro	Phe
290						295					300				
Ile	Ile	Arg	Pro	Asp	Glu	Ser	Lys	Pro	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Arg	Arg
305					310					315					320
Glu	Asn	Lys	Ser	Phe	Ile	Glu	Val	Val	Gly	Glu	Gln	Leu	Gly	Val	Lys
				325					330					335	
Leu	Arg	Val	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Phe	Ala	Ala	Glu	Arg	Glu
				340				345					350		
Gln	Trp	Asp	Asp	Gly	Asn	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Glu	Pro	Gly	Val	Val
		355					360					365			
Ile	Gly	Tyr	Asp	Arg	Asn	Thr	Tyr	Thr	Asn	Thr	Leu	Leu	Arg	Lys	Ala
	370					375					380				
Gly	Ile	Glu	Val	Ile	Thr	Ile	Ser	Ala	Gly	Glu	Leu	Gly	Arg	Gly	Arg
385					390					395					400
Gly	Gly	Gly	His	Cys	Met	Thr	Cys	Pro	Ile	Val	Arg	Asp	Pro	Ile	Asn
				405					410					415	

Tyr

<210> 23

<211> 417

<212> PRT

<213> *Pseudomonas putida*

<400> 23

ES 2 805 360 T3

Met Ser Ala Glu Lys Gln Lys Tyr Gly Val His Ser Glu Ala Gly Lys
1 5 10 15

Leu Arg Lys Val Met Val Cys Ser Pro Gly Leu Ala His Lys Arg Leu
20 25 30

Thr Pro Ser Asn Cys Asp Glu Leu Leu Phe Asp Asp Val Ile Trp Val
35 40 45

Asp Gln Ala Lys Arg Asp His Phe Asp Phe Val Thr Lys Met Arg Glu
50 55 60

Arg Gly Val Asp Val Leu Glu Met His Asn Leu Leu Thr Asp Ile Val

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

Glu Asn Lys Ser Phe Ile Glu Val Val Gly Glu Gln Leu Gly Val Lys
325 330 335

Leu Arg Val Val Glu Thr Gly Gly Asn Ser Phe Ala Ala Glu Arg Glu
340 345 350

Gln Trp Asp Asp Gly Asn Asn Val Val Ala Met Glu Pro Gly Val Val
355 360 365

Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Thr Tyr Thr Asn Thr Leu Leu Arg Lys Ala
370 375 380

Gly Ile Glu Val Ile Thr Ile Ser Ala Gly Glu Leu Gly Arg Gly Arg
385 390 395 400

Gly Gly Gly His Cys Met Thr Cys Pro Ile Val Arg Asp Pro Ile Asp
405 410 415

Tyr

<210> 24

<211> 418

5 <212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 24

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

Leu Arg Lys Val Met Val Cys Ser Pro Gly Leu Ala His Gln Arg Leu
20 25 30

Thr Pro Ser Asn Cys Asp Glu Leu Leu Phe Asp Asp Val Ile Trp Val
35 40 45

Asn Gln Ala Lys Arg Asp His Phe Asp Phe Val Thr Lys Met Arg Glu
50 55 60

Arg Gly Ile Asp Val Leu Glu Met His Asn Leu Leu Thr Glu Thr Ile
65 70 75 80

Gln Asn Pro Glu Ala Leu Lys Trp Ile Leu Asp Arg Lys Ile Thr Ala
85 90 95

Asp Ser Val Gly Leu Gly Leu Thr Ser Glu Leu Arg Ser Trp Leu Glu
100 105 110

10

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

Val Val Gly Tyr Asp Arg Asn Thr Tyr Thr Asn Thr Leu Leu Arg Lys
370 375 380

Ala Gly Val Glu Val Ile Thr Ile Ser Ala Ser Glu Leu Gly Arg Gly
385 390 395 400

Arg Gly Gly Gly His Cys Met Thr Cys Pro Ile Ile Arg Asp Pro Ile
405 410 415

Asp Tyr

<210> 25

<211> 402

<212> PRT

<213> *Mycobacterium bovis*

<400> 25

Met Gly Val Glu Leu Gly Ser Asn Ser Glu Val Gly Ala Leu Arg Val
1 5 10 15

Val Ile Leu His Arg Pro Gly Ala Glu Leu Arg Arg Leu Thr Pro Arg
20 25 30

Asn Thr Asp Gln Leu Leu Phe Asp Gly Leu Pro Trp Val Ser Arg Ala
35 40 45

Gln Asp Glu His Asp Glu Phe Ala Glu Leu Leu Ala Ser Arg Gly Ala
50 55 60

Glu Val Leu Leu Leu Ser Asp Leu Leu Thr Glu Ala Leu His His Ser
65 70 75 80

Gly Ala Ala Arg Met Gln Gly Ile Ala Ala Ala Val Asp Ala Pro Arg
85 90 95

Leu Gly Leu Pro Leu Ala Gln Glu Leu Ser Ala Tyr Leu Arg Ser Leu
100 105 110

Asp Pro Gly Arg Leu Ala His Val Leu Thr Ala Gly Met Thr Phe Asn
115 120 125

Glu Leu Pro Ser Asp Thr Arg Thr Asp Val Ser Leu Val Leu Arg Met
130 135 140

His His Gly Gly Asp Phe Val Ile Glu Pro Leu Pro Asn Leu Val Phe
145 150 155 160

5

10

ES 2 805 360 T3

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

<210> 26
 <211> 410
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Arginina desiminasa de *Mycoplasma arginini* con restos sintetizados flanqueantes añadidos
 10 <400> 26

```

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1      5      10      15

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
      20      25      30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
      35      40      45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
50      55      60

Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
65      70      75      80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
      85      90      95

Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val
100      105      110

Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val
115      120      125

Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
130      135      140

Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
145      150      155      160

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
165      170      175

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser
180      185      190

Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu
195      200      205
  
```

ES 2 805 360 T3

Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr
 210 215 220
 Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu
 225 230 235 240
 Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Ser Glu Phe Lys Arg Ile
 245 250 255
 Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
 260 265 270
 Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
 275 280 285
 Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
 290 295 300
 Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln
 305 310 315 320
 Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly
 325 330 335
 Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
 340 345 350
 Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
 355 360 365
 Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
 370 375 380
 His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
 385 390 395 400
 Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405 410

<210> 27
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Arginina desiminasa de *Mycoplasma arthritidis* con restos sintetizados flanqueantes añadidos
 <400> 27

ES 2 805 360 T3

Met	Ser	Val	Phe	Asp	Ser	Lys	Phe	Lys	Gly	Ile	His	Val	Tyr	Ser	Glu	1	5	10	15
Ile	Gly	Glu	Leu	Glu	Thr	Val	Leu	Val	His	Glu	Pro	Gly	Lys	Glu	Ile	20	25	30	
Asp	Tyr	Ile	Thr	Pro	Ala	Arg	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Phe	Ser	Ala	Ile	35	40	45	
Leu	Glu	Ser	His	Asp	Ala	Arg	Lys	Glu	His	Lys	Glu	Phe	Val	Ala	Glu	50	55	60	
Leu	Lys	Lys	Arg	Gly	Ile	Asn	Val	Val	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Val	65	70	75	80
Glu	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	85	90	95	
Glu	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Val	Pro	Val	Leu	Ser	Asp	Glu	His	Arg	Ala	100	105	110	
Thr	Val	Lys	Lys	Phe	Leu	Gln	Ser	Gln	Lys	Ser	Thr	Arg	Ser	Leu	Val	115	120	125	
Glu	Tyr	Met	Ile	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	His	Asp	Leu	Lys	Ile	Glu	Ser	130	135	140	
Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg	145	150	155	160
Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	His	Tyr	Met	Arg	165	170	175	
Tyr	Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	180	185	190	
Asn	His	Pro	Lys	Leu	Val	Asn	Thr	Pro	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ala	Glu	195	200	205	
Gly	Leu	Thr	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Tyr	Asn	Asn	Asp	Thr	210	215	220	
Leu	Val	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	Leu	Gln	Thr	Ile	Thr	Leu	225	230	235	240
Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ser	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile				

ES 2 805 360 T3

				245				250				255			
Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Trp	Thr	Asn	Leu	Met	His	Leu	Asp	Thr
			260					265					270		
Trp	Leu	Thr	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ala
			275				280					285			
Asn	Asp	Val	Phe	Lys	Phe	Trp	Asp	Tyr	Asp	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Asp
		290				295					300				
Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Asp	Asn	Gly	Leu	Pro	Leu	Glu	Asp	Leu	Leu	Lys
305					310					315					
Ser	Ile	Ile	Gly	Lys	Lys	Pro	Thr	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly
				325					330					335	
Ala	Ser	Gln	Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	Glu	Thr	His	Phe	Asp	Gly	Thr	Asn
			340					345					350		
Tyr	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Ile	Val	Ile	Gly	Tyr	Ala	Arg	Asn	Glu
		355					360					365			
Lys	Thr	Asn	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Val	Leu	Pro	Phe
		370					375					380			
Arg	Gly	Asn	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Met	Gly	Asn	Ala	Arg	Cys	Met	Ser
385					390					395					400
Met	Pro	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Lys	Trp						
				405					410						

<210> 28

$\langle 211 \rangle$ 410

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Arginina desiminasa de *Mycoplasma phocicerebrale* con restos sintetizados flanqueantes añadidos

<400> 28

ES 2 805 360 T3

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile

ES 2 805 360 T3

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

ES 2 805 360 T3

Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
290 295 300

Glu Pro Gln Pro Lys Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln
305 310 315 320

Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Asn Asn
325 330 335

Ala Ser His Ile Asp Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Lys Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ala Arg Asn Glu
355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Ala Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
370 375 380

His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
405 410

<210> 29

<211> 410

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Arginina desiminasa de *Mycoplasma gateae* con restos sintetizados flanqueantes añadidos

<400> 29

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Leu Phe Val Ser Glu
50 55 60

Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Thr
65 70 75 80

ES 2 805 360 T3

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Asn Leu Ile Glu
 85 90 95
 Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Thr Glu Glu Leu Lys Ser
 100 105 110
 Val Val Arg Thr Tyr Leu Lys Ser Ile Lys Ser Thr Arg Glu Leu Ile
 115 120 125
 Gln Met Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
 130 135 140
 Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
 145 150 155 160
 Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
 165 170 175
 Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser
 180 185 190
 Asn His Pro Lys Leu Val Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu
 195 200 205
 Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asn Thr
 210 215 220
 Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Glu Thr Val Thr Leu
 225 230 235 240
 Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile
 245 250 255
 Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
 260 265 270
 Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
 275 280 285
 Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Glu
 290 295 300
 Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Glu
 305 310 315 320
 Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly
 325 330 335

ES 2 805 360 T3

Ala Ser Gln Ile Asp Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
370 375 380

His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
405 410

<210> 30

<211> 410

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Arginina desiminasa de *Mycoplasma phocidae* con restos sintetizados flanqueantes añadidos

<400> 30

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Gln Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Glu Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Glu Phe Val Ala Glu
50 55 60

Leu Lys Lys Asn Asn Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ser
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Met Val Ser Lys Glu Lys Gln Glu Lys Leu Ile Glu
85 90 95

Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Gly
100 105 110

Leu Val Arg Lys Phe Leu Lys Ser Leu Lys Ser Ser Lys Glu Leu Ile
115 120 125

ES 2 805 360 T3

Gln	Tyr	Met	Met	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	His	Asp	Leu	Asn	Ile	Glu	Ala	130	135	140
Asp	His	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg	145	150	155
Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	His	Tyr	Met	Arg	165	170	175
Tyr	Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Phe	Ile	Phe	Ala	180	185	190
Asn	His	Pro	Lys	Leu	Met	Asn	Thr	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Asp	Met	195	200	205
Lys	Leu	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Val	Tyr	Asn	Asn	Glu	Thr	210	215	220
Leu	Val	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	Leu	Asp	Thr	Ile	Thr	Leu	225	230	235
Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile	245	250	255
Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Trp	Thr	Asn	Leu	Met	His	Leu	Asp	Thr	260	265	270
Trp	Leu	Thr	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ala	275	280	285
Asn	Asp	Val	Phe	Lys	Phe	Trp	Asp	Tyr	Asp	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Asp	290	295	300
Glu	Pro	Gln	Pro	Lys	Val	Asn	Gly	Leu	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	305	310	315
Ser	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Pro	Ile	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Gly	Thr	Ser	325	330	335
Ala	Ser	Asn	Ile	Asp	Val	Glu	Arg	Glu	Thr	His	Phe	Asp	Gly	Thr	Asn	340	345	350
Tyr	Leu	Ala	Ile	Ala	Pro	Gly	Val	Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asn	Val	355	360	365
Lys	Thr	Asn	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Leu	Pro	Phe	370	375	380

ES 2 805 360 T3

Lys Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
405 410

<210> 31

<211> 411

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Arginina desiminasa de *H. orenii* con restos sintetizados flanqueantes añadidos

<400> 31

Met Ser Phe Lys Lys Ser Pro Leu Asn Val Thr Ser Glu Ile Gly Lys
1 5 10 15

Leu Lys Lys Val Leu Leu His Arg Pro Gly His Glu Ile Glu Asn Leu
20 25 30

Thr Pro Asp Leu Leu Glu Arg Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu
35 40 45

Lys Val Ala Gln Glu Glu His Asp Ala Phe Ala Gln Thr Leu Arg Asp
50 55 60

Asn Gly Val Glu Val Leu Tyr Leu His Glu Leu Ala Ala Glu Ala Ile
65 70 75 80

Gln Glu Asp Glu Ile Arg Lys Lys Phe Ile Glu Gln Phe Leu Asp Glu
85 90 95

Ala Gly Val Ile Gly Lys Gly Ala Arg Gln Val Leu Lys Glu Tyr Phe
100 105 110

Ala Asp Met Asp Asn Glu Thr Leu Ile Arg Lys Met Met Ala Gly Val
115 120 125

Arg Lys Lys Glu Ile Pro Ala Ile Glu Lys Val Ala Ser Leu Asn Asp
130 135 140

Met Val Glu Glu Asp Tyr Pro Phe Val Leu Asp Pro Met Pro Asn Leu
145 150 155 160

Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Thr Ile Gly Thr Gly Ile Thr Leu
165 170 175

ES 2 805 360 T3

Asn	His	Met	Arg	Thr	Glu	Thr	Arg	Asn	Arg	Glu	Val	Ile	Phe	Ala	Glu	
			180							185				190		
Tyr	Ile	Phe	Ser	Tyr	His	Pro	Asp	Phe	Lys	Asp	Thr	Glu	Ile	Pro	Phe	
			195				200							205		
Trp	Phe	Asp	Arg	Asn	Glu	Thr	Thr	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Glu	Leu	
			210				215							220		
Ile	Leu	Ser	Asp	Lys	Val	Leu	Ala	Met	Gly	Ile	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	
			225				230							235		
Ala	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Val	Ala	Arg	Asn	Ile	Phe	Thr	Asp	Gly	Gln	
			245							250				255		
Pro	Phe	Glu	Thr	Ile	Leu	Ala	Phe	Lys	Ile	Pro	Glu	Lys	Arg	Ala	Phe	
			260							265				270		
Met	His	Leu	Asp	Thr	Val	Phe	Thr	Met	Val	Asp	Tyr	Asp	Lys	Phe	Thr	
			275							280				285		
Ile	His	Ala	Glu	Ile	Glu	Gly	Pro	Leu	Lys	Val	Tyr	Ser	Ile	Thr	Lys	
			290				295							300		
Gly	Asp	Asn	Asp	Glu	Leu	Lys	Ile	Asp	Glu	Glu	Lys	Ala	Thr	Leu	Glu	
			305				310							315		
Asp	Thr	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp	Glu	Val	Thr	Leu	Ile	Arg	
			325							330				335		
Cys	Ala	Gly	Gly	Asp	Tyr	Ile	Asp	Ala	Gly	Arg	Glu	Gln	Trp	Asn	Asp	
			340							345				350		
Gly	Ser	Asn	Thr	Leu	Ala	Ile	Ala	Pro	Gly	Glu	Val	Val	Val	Tyr	Asn	
			355							360				365		
Arg	Asn	His	Thr	Thr	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Glu	His	Gly	Ile	Lys	Leu	
			370										380			
His	Val	Ile	Pro	Ser	Ser	Glu	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Pro	Arg	
			385				390							395		
Cys	Met	Ser	Met	Pro	Leu	Val	Arg	Glu	Asp	Ile						
						405				410						

<210> 32

<211> 404
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Arginina desiminasa de *Mycobacterium bovis* con restos sintetizados flanqueantes añadidos
 <400> 32

Met Ser Val Gly Val Glu Leu Gly Ser Asn Ser Glu Val Gly Ala Leu
 1 5 10 15

Arg Val Val Ile Leu His Arg Pro Gly Ala Glu Leu Arg Arg Leu Thr
 20 25 30

Pro Arg Asn Thr Asp Gln Leu Leu Phe Asp Gly Leu Pro Trp Val Ser
 35 40 45

Arg Ala Gln Asp Glu His Asp Glu Phe Ala Glu Leu Leu Ala Ser Arg
 50 55 60

Gly Ala Glu Val Leu Leu Leu Ser Asp Leu Leu Thr Glu Ala Leu His
 65 70 75 80

His Ser Gly Ala Ala Arg Met Gln Gly Ile Ala Ala Ala Val Asp Ala
 85 90 95

Pro Arg Leu Gly Leu Pro Leu Ala Gln Glu Leu Ser Ala Tyr Leu Arg
 100 105 110

Ser Leu Asp Pro Gly Arg Leu Ala His Val Leu Thr Ala Gly Met Thr
 115 120 125

Phe Asn Glu Leu Pro Ser Asp Thr Arg Thr Asp Val Ser Leu Val Leu
 130 135 140

Arg Met His His Gly Gly Asp Phe Val Ile Glu Pro Leu Pro Asn Leu
 145 150 155 160

Val Phe Thr Arg Asp Ser Ser Ile Trp Ile Gly Pro Arg Val Val Ile
 165 170 175

Pro Ser Leu Ala Leu Arg Ala Arg Val Arg Glu Ala Ser Leu Thr Asp
 180 185 190

Leu Ile Tyr Ala His His Pro Arg Phe Thr Gly Val Arg Arg Ala Tyr
 195 200 205

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

10

ES 2 805 360 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica que comprende una arginina desiminasa (ADI) aislada y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la ADI aislada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 6, 8 o 14 o una secuencia de al menos 90 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 6, 8 o 14.
2. La composición terapéutica de la reivindicación 1, en donde al menos un resto de lisina se ha modificado mediante una sustitución de aminoácidos.
3. La composición terapéutica de la reivindicación 2 en donde:
 - a) al menos 5 restos de lisina se han modificado por una sustitución de aminoácidos;
 - b) al menos 10 restos de lisina se han modificado por una sustitución de aminoácidos;
 - c) al menos 15 restos de lisina se han modificado por una sustitución de aminoácidos; o
 - d) al menos 20 restos de lisina se han modificado por una sustitución de aminoácidos.
4. La composición terapéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la ADI está unida covalentemente a través de un conector a una molécula de PEG.
5. La composición terapéutica de la reivindicación 4 en donde:
 - a) la ADI está unida covalentemente a más de una molécula de PEG;
 - b) la ADI está unida covalentemente a 1 a 10 moléculas de PEG;
 - c) la ADI está unida covalentemente a 2 a 8 moléculas de PEG.
6. La composición terapéutica de la reivindicación 4, en donde las moléculas de PEG son moléculas de PEG de cadena lineal o de cadena ramificada.
7. La composición terapéutica de la reivindicación 4 en donde el PEG tiene un peso molecular promedio en peso total de 1.000 a 40.000, tal como de 10.000 a 30.000.
8. La composición terapéutica de la reivindicación 4 en donde el conector es un grupo succinilo, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo éster, un grupo epoxi, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un hidrato de carbono, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina, un grupo metileno o cualquier combinación de los mismos.
9. La composición terapéutica de la reivindicación 8 en donde la fuente del grupo succinilo es succinato de succinimidilo.
10. La composición terapéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende además un agente quimioterapéutico.
11. La composición terapéutica de la reivindicación 10 en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en docetaxel, carboplatino, ciclofosfamida, gemcitabina, cisplatino, sorafenib, sunitinib y everolimus.
12. La composición terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un método para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer, comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición terapéutica.
13. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde se ha determinado que el paciente que lo necesita tiene anticuerpos anti-ADI-PEG 20.
14. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 12 o 13, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, melanoma, melanoma metastásico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma, leucemia linfocítica, leucemia mielógena crónica, linfoma, hepatoma, sarcoma, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide aguda recidivante, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo y cáncer de estómago.