

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 556**

51 Int. Cl.:

A61K 38/50 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 9/78 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2017 PCT/US2017/050816**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2018 WO18032020**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2017 E 17840420 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022 EP 3496743**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento de cáncer con agentes de disminución de arginina y de inmunoncología**

30 Prioridad:

08.08.2016 US 201662372092 P

23.06.2017 US 201762524286 P

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

09.05.2022

73 Titular/es:

AERASE, INC. (100.0%)

**901 S. Mopac Expressway Barton Oaks Plaza
One, Suite 250**

Austin, TX 78746, US

72 Inventor/es:

LOWE, DAVID;

ROWLINSON, SCOTT, W.;

ALTERS, SUSAN y

AGNELLO, GIULIA

74 Agente/Representante:

MORENO NOGALES, Ángeles

ES 2 909 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de cáncer con agentes de disminución de arginina y de inmunoncología

5

Antecedentes de la invención

Se ha reconocido durante más de 50 años que determinadas células tumorales tienen una gran demanda de aminoácidos, tales como L-arginina, y se destruyen en condiciones de disminución de L-arginina (Wheatley y Campbell, 2002). En las células humanas, se sintetiza L-arginina en tres etapas; en primer lugar, se sintetiza L-citrulina a partir de L-ornitina y fosfato de carbamoilo por la enzima ornitina transcarbamilasa (OTC), la argininosuccinato sintetasa (ASS) convierte L-citrulina y aspartato en argininosuccinato, seguido de la conversión de argininosuccinato en L-arginina y fumarato por la argininosuccinato liasa (ASL). Una gran cantidad de carcinomas hepatocelulares (CHC), melanomas y carcinomas de células renales (Ensor *et al.*, 2002; Feun *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2007) no expresan ASS y, por tanto, son sensibles a la disminución de L-arginina. La base molecular de la falta de expresión de ASS parece ser diversa e incluye una regulación génica anómala. Mientras que las células benignas entran en inactividad (G0) cuando disminuye la L-arginina y, por tanto, permanecen viables durante varias semanas, las células tumorales tienen defectos en el ciclo celular que dan lugar al reinicio de la síntesis de ADN, aunque se inhiba la síntesis de proteínas, dando como resultado posteriormente graves desequilibrios y muerte celular rápida (Shen *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2000). La toxicidad selectiva de la disminución de L-arginina para CHC, melanoma y otras células cancerosas carentes de ASS se ha demostrado ampliamente *in vitro*, en modelos de animales con xenoinjertos y en ensayos clínicos (Ensor *et al.*, 2002; Feun *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2006; Izzo *et al.*, 2004). Recientemente Cheng *et al.* (2007) demostraron que muchas células de CHC también son carentes de expresión de ornitina transcarbamilasa y, por tanto, también son susceptibles a la disminución enzimática de L-arginina.

Existe interés en el uso de hidrolasas para L-arginina para el tratamiento del cáncer, especialmente el tratamiento de cánceres tales como hepatocarcinomas, melanomas y carcinomas de células renales, por ejemplo, que son formas comunes de cáncer asociadas con una alta morbilidad. Se han usado dos enzimas degradantes de L-arginina para el tratamiento del cáncer: arginina desiminasa bacteriana y arginasas humanas. Desafortunadamente, ambas de estas enzimas muestran deficiencias significativas que presentan graves impedimentos para el uso clínico (inmunogenicidad y baja actividad catalítica con muy poca estabilidad en suero, respectivamente). Por tanto, el éxito terapéutico del tratamiento de disminución de L-arginina se basará en abordar estas deficiencias.

Otra dificultad en el tratamiento de muchos cánceres es la capacidad de algunos cánceres para evadir el sistema inmunitario. Algunos tumores, por ejemplo, hacen esto a través de las vías de punto de control inmunitario, que son vías inhibitoras en el sistema inmunitario que mantienen la autotolerancia modulando la respuesta inmunitaria. Estas vías pueden estar desreguladas por tumores dando como resultado una resistencia inmunitaria. Algunas de estas vías, tanto agonistas de receptores proestimuladores como antagonistas de señales inhibitoras, de los que ambos dan como resultado la amplificación de respuestas de linfocitos T específicos de antígeno, se han convertido en dianas para la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos receptores y ligandos ejemplares incluyen antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4), muerte celular programada 1 (PD1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL1), gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), B7-H3, B-7-H4 y proteína de membrana de linfocitos T 3 (TIM3) entre otros. (Pardoll, 2012).

Sumario de la invención

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana que comprende un cofactor de cobalto y un agente de inmunoncología para su uso en un procedimiento de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto, en la que el agente de inmunoncología se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-OX40 y un anticuerpo anti-OX40L. En algunos modos de realización, el cáncer es uno que no expresa, o es de otro modo carente de, argininosuccinato sintetasa (ASS), ornitina transcarbamilasa (OTC) o argininosuccinato liasa (ASL).

Las proteínas de arginasa I humana usadas en la presente divulgación tienen dos sitios Mn (II); cualquiera o ambos sitios se pueden sustituir para generar una proteína de arginasa I modificada con un cofactor de cobalto. En algunos modos de realización, la proteína muestra una k_{cat}/K_M mayor a $400 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4. En un modo de realización particular, la proteína muestra una k_{cat}/K_M entre $400 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $4000 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4. En otro modo de realización, la proteína muestra una k_{cat}/K_M entre $400 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $2500 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4 a 37 °C. En un modo de realización particular, la presente divulgación contempla una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de arginasa I humana y un cofactor de cobalto, en la que dicha proteína presenta una k_{cat}/K_M mayor a $400 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37 °C, pH 7,4.

La presente divulgación se refiere a la composición definida anteriormente para el tratamiento de cáncer o tumores por disminución de arginina junto con un tratamiento inmunoterápico que se dirige a una vía de punto de control

inmunitario. La disminución de arginina se lleva a cabo con la administración de una enzima arginasa I humana que comprende un cofactor de cobalto que presenta al menos un efecto aditivo o sinérgico cuando se administra con un tratamiento dirigido al punto de control inmunitario.

5 La presente divulgación se puede describir en determinados modos de realización como una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéutica de una enzima arginasa I humana que comprende un cofactor de cobalto y un agente de inmunoncología seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo PD-L1, un anticuerpo anti-OX40 y un anticuerpo anti-OX40L para su uso en un procedimiento de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto. El tumor puede ser de diversos tipos que responden al tratamiento de disminución de arginina y en determinados modos de realización es un tumor auxótrofo a arginina, o incluye células auxótrofas o dependientes de arginina. En determinados modos de realización, las células auxótrofas presentan una expresión reducida o inhibida de una o más de ASS, OTC, ASL o una combinación de las mismas, requiriendo, por tanto, que la célula tumoral utilice arginina del suero.

15 En determinados modos de realización, la arginasa I humana u otra enzima se estabiliza por asociación con un agente estabilizador para incrementar la semivida de la enzima en el suero de un paciente. Como se usa en el presente documento, "asociación" puede incluir cualquiera de una serie de tipos de asociación que incluyen, pero sin limitarse a enlaces covalentes o no covalentes, y también puede incluir una fusión de proteína expresada a partir de una construcción de ácido nucleico genomanipulada, a partir de un enlace de hidrógeno o interacción hidrófoba y otros conocidos por los expertos en la técnica. Los agentes estabilizadores para su uso en los procedimientos divulgados comprenden polietilenglicol, a menudo denominado pegilación, conjugación con uno o más polímeros proteicos sintéticos homogéneos, denominado extenilación y disponible comercialmente bajo el nombre comercial Xten[®], conjugación con uno o más fragmentos Fc o con una proteína sérica como la albúmina, por ejemplo. Todas dichas enzimas estabilizadas y otras que se concebirían por los expertos en esta técnica están contempladas por la presente divulgación.

Las composiciones divulgadas para su uso son aplicables tanto a sujetos humanos como animales no humanos incluyendo pero sin limitarse a animales de veterinaria, agrícolas, domésticos o de investigación. Un aspecto de la divulgación es que el agente de inmunoncología potencia la respuesta inmunitaria del sujeto. En determinados modos de realización, potenciar un sistema inmunitario incluye incrementar la actividad de la respuesta de linfocitos T de un paciente a la presencia de un tumor. En determinados modos de realización, por lo tanto, el agente de inmunoncología inhibe un inmunosupresor, que a veces es un receptor de superficie celular denominado inhibidor de punto de control, o un ligando para un receptor de este tipo. El agente de inmunoncología es un inhibidor de la vía de PD-1 seleccionado de un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor de la vía de OX40 (CD134) seleccionado de un anticuerpo anti-OX40 o anti-OX40L (CD252) Los anticuerpos ejemplares incluyen pero no se limitan a pembrolizumab, atezolizumab o nivolumab.

Las composiciones de la divulgación se contemplan para el tratamiento de cualquier cáncer o tumor sensible, incluyendo, pero sin limitarse a carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, cáncer de mama, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama triple negativo, linfoma hodgkiniano, cáncer gástrico, glioblastoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de pulmón, carcinomas de pulmón microcíticos o carcinomas de pulmón no microcíticos. La administración de una combinación de la enzima arginasa I humana y el anticuerpo anti-PD-1 o el anticuerpo anti-PDL-1, el anticuerpo anti-OX40 o el anticuerpo anti-OX40L puede presentar un efecto aditivo sobre la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con la inhibición del crecimiento tumoral presentada al administrar una dosis terapéutica del anticuerpo anti-PD-1 solo o el anticuerpo anti-PD-L1, el anticuerpo anti-OX40 y un anticuerpo anti-OX40L solos, o la enzima arginasa I humana sola, o en determinados modos de realización presenta un efecto mayor que aditivo, o sinérgico sobre el crecimiento tumoral o el cáncer. Los dos tratamientos se pueden administrar simultáneamente o se pueden administrar secuencialmente según sea necesario.

La divulgación actual también se puede describir en determinados modos de realización como una combinación para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con cáncer en la que la combinación comprende una composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana pegilada que comprende un cofactor de cobalto y un tratamiento de modulación del sistema inmunitario que comprende una composición farmacéutica que comprende un agente de inmunoncología seleccionado de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-OX40 o un anticuerpo anti-OX40L, en la que:

la composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana pegilada que comprende un cofactor de cobalto y la composición farmacéutica que comprende el agente de inmunoncología se administran simultáneamente; o

la composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana que comprende un cofactor de cobalto y la composición farmacéutica que comprende un agente de inmunoncología se administran secuencialmente.

65 En determinados modos de realización, una cantidad terapéutica de la enzima arginasa I humana pegilada que comprende un cofactor de cobalto es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 7,5 mg/kg, de

aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, o cualquier cantidad que se puede derivar de o contenida dentro de los intervalos precedentes.

5 La composición farmacéutica que incluye una enzima arginasa I humana pegilada que comprende un cofactor de cobalto se puede administrar por vía parenteral, o se puede administrar por diversas vías conocidas en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a por vía tópica, por vía subcutánea, por intravenosa, por intradérmica, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intracraneal, por vía intraarticular, por vía intraprostática, por vía intrapleural, por vía intratraqueal, por vía intraocular, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía subconjuntival, por vía intravesicular, por vía mucosal, por vía intrapericárdica, por vía intraumbilical, por vía oral, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada bañando las células diana directamente, por medio de un catéter o por medio de un lavado. En determinados modos de realización, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa o por vía subcutánea.

15 Cuando las composiciones y combinaciones farmacéuticas se usan para el tratamiento de cánceres, el efecto terapéutico del tratamiento puede ser aditivo en comparación con el tratamiento con la enzima arginasa I humana sola o con dicho inhibidor de la vía de punto de control solo, o el efecto terapéutico del tratamiento con dicha enzima arginasa I humana y un inhibidor de la vía de punto de control es sinérgico en comparación con el tratamiento con la enzima arginasa I sola o dicho inhibidor de la vía de punto de control solo. En determinados modos de realización, el tratamiento puede dar como resultado una reducción de un 50 % a un 99 % o de un 90 % a un 99 % en arginina sérica en el paciente, o una reducción de arginina sérica en un paciente hasta un nivel indetectable.

20 . Las enzimas arginasa I humanas pueden ser enzimas humanas recombinantes o enzimas humanas genomanipuladas.

25 En algunos modos de realización, la arginasa natural se modifica solo por la sustitución del cofactor de metal. En otros modos de realización, la arginasa se modifica por sustitución del cofactor de metal además de otras modificaciones, tales como sustituciones, deleciones, truncamientos o estabilización por conjugación con una proteína o polímero estabilizador, tal como por pegilación. En un modo de realización particular, la invención proporciona una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos natural de arginasa I humana y un cofactor de cobalto, en la que la secuencia de aminoácidos carece de parte de la secuencia natural. En algunos modos de realización, la arginasa carece de una porción de la secuencia natural. En otros modos de realización, la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de arginasa I truncada.

35 En un modo de realización particular, la arginasa natural carece de una metionina N terminal.

40 En otro aspecto, la presente divulgación contempla una proteína de arginasa I que comprende al menos una sustitución aminoacídica, en la que la proteína muestra una actividad catalítica incrementada en condiciones fisiológicas y especialmente al pH del suero humano (pH 7,4) cuando se compara con la proteína de arginasa I humana natural. La proteína de arginasa es una proteína de arginasa I humana que comprende un cofactor de Co^{2+} . La sustitución del cofactor de Mn^{2+} con Co^{2+} da como resultado un incremento acusado en la actividad catalítica y una reducción drástica en K_M a pH fisiológico. En algunos aspectos, la presente divulgación también contempla proteínas de fusión que comprenden una arginasa unida a una secuencia de aminoácidos distinta de arginasa. En un modo de realización, la secuencia distinta de arginasa comprende al menos una porción de la región Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, para incrementar la semivida de la arginasa en suero cuando se administra a un paciente. La región Fc o una porción de la misma puede ser cualquier región Fc adecuada. En un modo de realización, la región Fc o una porción de la misma es una región Fc de IgG. La secuencia de aminoácidos que tiene actividad arginasa es una secuencia de aminoácidos natural o mutada de arginasa I humana que comprende un cofactor de cobalto. En determinados modos de realización, se contempla una proteína de fusión Fc-arginasa dimerica, albúmina o una conjugación de proteína sintética.

50 La arginasa I en la proteína de fusión puede ser natural o mutada. En algunos modos de realización, la arginasa I puede contener deleciones, sustituciones, truncamientos o una combinación de los mismos. En un modo de realización particular, la presente divulgación contempla una proteína de fusión que contiene Fc-arginasa I. En un modo de realización, la arginasa I carece de una porción de la secuencia natural. En otro modo de realización, la arginasa es arginasa I que carece de una metionina N terminal. La arginasa comprende además un cofactor de cobalto. Cualquiera o ambos sitios se pueden sustituir para generar una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos de arginasa I humana y un cofactor de cobalto. En algunos modos de realización, la arginasa contiene una sustitución. Las enzimas de arginasa ejemplares para su uso en la presente divulgación se describen con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 8.440.184.

60 La presente divulgación se refiere a composiciones y combinaciones para su uso en el tratamiento de sujetos con cáncer. En algunos modos de realización, el cáncer es uno que no expresa, o es de otro modo carente de ASS, OTC o ASL. En modos de realización particulares, el cáncer humano es un cáncer auxótrofo a arginina. Como se analiza anteriormente, la proteína de arginasa puede ser natural, mutada y/o modificada de otro modo, por ejemplo,

modificada con un cofactor de metal. En un modo de realización, la presente divulgación contempla una composición farmacéutica o una combinación para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer humano, comprendiendo el tratamiento administrar una composición que comprende una proteína de fusión como se describe anteriormente y un agente de inmunoncología seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-OX40 y un anticuerpo anti-OX40L. En algunos modos de realización, la administración se produce en condiciones de modo que al menos una porción de las células cancerosas del cáncer se destruyen. En otro modo de realización, la formulación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una actividad arginasa humana mayor a la mostrada por las arginasas humanas auténticas en condiciones fisiológicas y que comprende además una o más cadenas de polietilenglicol unidas. En algún modo de realización, la formulación es una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las proteínas de arginasa analizadas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Todas las variantes de arginasa anteriores se contemplan como útiles para el tratamiento en seres humanos.

El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer o tipo de tumor. En algunos modos de realización, el cáncer es carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, melanoma, cáncer de próstata o cáncer de páncreas. En algunos modos de realización, la formulación se administra por vía tópica, por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intracraneal, por vía intraarticular, por vía intraprostática, por vía intrapleural, por vía intratraqueal, por vía intraocular, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía subconjuntival, por vía intravesicular, por vía mucosal, por vía intrapericárdica, por vía intraumbilical, por vía oral, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada bañando las células diana directamente, por medio de un catéter o por medio de un lavado.

Todas las arginasas, variantes y similares mencionadas anteriormente se contemplan en un modo de realización preferente como proteínas purificadas o aisladas, y preferentemente proteínas monoméricas.

Se entiende que los modos de realización en la sección de ejemplos son modos de realización de la invención que son aplicables a todos los aspectos de la invención.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para querer decir "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o."

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para la composición, dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor.

Siguiendo la ley de patentes de larga data, las palabras "un" y "una", cuando se usan junto con la palabra "que comprende" en las reivindicaciones o la memoria descriptiva, indican uno/a o más, a menos que se exprese específicamente.

El término "terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente activo y/o una composición terapéutica (tal como un polinucleótido terapéutico y/o un polipéptido terapéutico) que se emplea en los procedimientos de la presente divulgación para lograr un efecto terapéutico, tal como en el que al menos se mejora al menos un síntoma de una afección que se está tratando, y/o al análisis de los procedimientos o materiales usados junto con estas células.

Otros objetivos, rasgos característicos y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican modos de realización específicos de la divulgación, se dan solo a modo de ilustración.

Breve descripción de las figuras

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar además determinados aspectos de la presente divulgación. La divulgación se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de modos de realización específicos presentados en el presente documento.

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la disminución de L-arginina en suero en el modelo de ratón. Las concentraciones de L-Arg en suero de ratones Balb/c tratados con una única dosis IP de Co-hArgI se mantienen \leq a 3-4 μ M durante más de 3 días.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la reducción de xenoinjerto tumoral de CHC cuando se trata con Co-hArgI en comparación con los controles. Los ratones atímicos que portaban xenoinjertos tumorales Hep3b se trataron dos veces por inyección IP con PBS (○) o bien Co-hArgI (●) el día 9 y el día 12. Se observó reducción de tumor en los

ratones tratados con Co-hArgl mientras que los tumores tratados con PBS crecieron sin control.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra el efecto de la carga de cobalto sobre la actividad catalítica de arginasa I humana.

5 La FIG. 4 es un gráfico que muestra la inhibición de crecimiento tumoral de carcinoma de colon en un modelo de ratón CT26 con Co-hArgl, anti-PD-L1 y la combinación de Co-hArgl y anti-PD-L1. Como se ve en los datos, la combinación de los 2 agentes tiene un efecto mayor que el aditivo sobre la inhibición del crecimiento tumoral.

10 La FIG. 5 es un gráfico que muestra la inhibición de crecimiento tumoral de carcinoma de colon en un modelo de ratón MC38 con Co-hArgl, anticuerpos anti-OX40 y la combinación de Co-hArgl y anticuerpos anti-OX40. Como se ve en los datos, la combinación de los 2 agentes tiene un efecto mayor que el aditivo sobre la inhibición del crecimiento tumoral.

15 La FIG. 6 es un gráfico que muestra linfocitos T CD45+ presentes en el modelo de ratón CT26 con Co-hArgl, anti-PD-L1 y la combinación de Co-hArgl y anti-PD-L1.

20 La FIG. 7 es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+ presentes en linfocitos T CD45+ como se muestra en la FIG. 6.

Descripción de los modos de realización ilustrativos

25 La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. La divulgación en general se refiere a composiciones y combinaciones para su uso en el tratamiento de cáncer que comprenden enzimas arginasa I humanas que comprenden un cofactor de cobalto que disminuyen la L-arginina en suero. En algunos modos de realización, el cáncer es uno que no expresa, o es de otro modo carente de, argininosuccinato sintetasa (ASS), ornitina transcarbamilasa (OTC) o argininosuccinato liasa (ASL), u otras enzimas requeridas para la biosíntesis de arginina. Se contemplan tanto enzimas naturales como mutadas, así como enzimas fusionadas con otros polipéptidos, así como enzimas conjugadas con polímeros que incrementan la persistencia en suero, por ejemplo, polietilenglicol de alto peso molecular.

I. Arginasa

35 La arginasa es una enzima que contiene manganeso. Es la enzima final del ciclo de la urea. La arginasa es la quinta y última etapa en el ciclo de la urea, una serie de reacciones biofísicas en los mamíferos durante las que el cuerpo desecha el amoníaco nocivo. Específicamente, las arginasas convierten L-arginina en L-ornitina y urea.

40 La L-arginina es el sustrato donador de nitrógeno para la óxido nítrico sintasa (NOS), produciendo L-citrulina y NO. Aunque se ha informado de que la K_M de arginasa (2-5 mM) es mucho mayor que la de NOS para L-arginina (2-20 μ M), la arginasa también puede desempeñar un papel en la regulación de la actividad NOS. En determinadas condiciones, la arginasa I está Cys-S-nitrosilada, lo que da como resultado una mayor afinidad por L-arginina y una disponibilidad reducida de sustrato para NOS.

45 La arginasa es una enzima homotrimérica con un pliegue α/β de una lámina β paralela de ocho hebras rodeada por varias hélices. La enzima contiene un grupo de metal dinuclear que es esencial para generar un hidróxido para el ataque nucleofílico en el carbono guanidinio de L-arginina. El metal natural de la arginasa es Mn^{2+} . Estos iones Mn^{2+} se coordinan con agua, orientan y estabilizan la molécula y permiten que el agua actúe como un nucleófilo y ataque a la L-arginina, hidrolizándola para producir ornitina y urea.

50 Los mamíferos tienen dos isoenzimas arginasa (EC 3.5.3.1) que catalizan la hidrólisis de L-arginina a urea y L-ornitina. El gen de arginasa I está localizado en el cromosoma 6 (6q.23), está altamente expresado en el citosol de los hepatocitos y funciona en la eliminación de nitrógeno como última etapa del ciclo de la urea. El gen de arginasa II se encuentra en el cromosoma 14 (14q.24.1). La arginasa II está localizada mitocondrialmente en tejidos tales como el riñón, el cerebro y el músculo esquelético donde se cree que proporciona un suministro de L-ornitina para la biosíntesis de prolina y poliamina (Lopez *et al.*, 2005).

55 Se han investigado las arginasas durante casi 50 años como procedimiento para degradar la L-arginina extracelular (Dillon *et al.*, 2002). Se han logrado algunos resultados clínicos prometedores introduciendo arginasa por embolización arterial transhepática; después de esto varios pacientes experimentaron una remisión parcial de CHC (Cheng *et al.*, 2005). Sin embargo, puesto que la arginasa tiene una K_M alta (~2-5 mM) y presenta una actividad muy baja a valores de pH fisiológicos, se requiere una dosificación alta para propósitos quimioterápicos (Dillon *et al.*, 2002). Si bien la arginasa natural se depura de la circulación en cuestión de minutos (Savoca *et al.*, 1984), una única inyección de PEG-arginasa PM 5000 en ratas fue suficiente para lograr una disminución casi completa de arginina durante ~3 días (Cheng *et al.*, 2007).

65 Chen *et al.* hicieron la sorprendente observación de que muchas líneas celulares de CHC humanas no expresan

OTC (además de ASS) y, por tanto, son susceptibles a la PEG-arginasa (Cheng *et al.*, 2007). En ratones a los que se les implantaron células de hepatocarcinoma Hep3b, la administración semanal de PEG-arginasa dio como resultado un retraso en el crecimiento tumoral que se acentuó con la administración conjunta de 5-fluorouracilo (5-FU). Sin embargo, la PEG-arginasa se usó en dosis muy altas que no son prácticas para el tratamiento humano, lo que refleja su menor actividad fisiológica.

Para abordar estos problemas, se ha sometido a prueba *in vitro* y clínicamente una enzima hidrolizante de arginina bacteriana, la arginina desiminasa o ADI, que muestra una buena cinética y estabilidad. Desafortunadamente, la ADI es una enzima bacteriana y, por lo tanto, induce fuertes respuestas inmunitarias y efectos adversos en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, para aquellos pacientes que no manifiestan respuestas adversas significativas, un porcentaje impresionante presenta enfermedad estable o remisión.

Para uso clínico, es esencial que la arginasa se genomanipule para permitir que persista durante mucho tiempo (por ejemplo, días) en circulación. En ausencia de cualquier modificación, la arginasa humana tiene una semivida de solo unos pocos minutos en circulación principalmente porque su tamaño no es lo suficientemente grande para evitar la filtración a través de los riñones. La arginasa humana no modificada es muy susceptible a la desactivación en suero y se degrada con una semivida de solo cuatro horas. Por lo tanto, la presente invención desarrolló formas novedosas y mejoradas de arginasa para investigación clínica y uso terapéutico potencial con persistencia de circulación mejorada.

II. Variantes de arginasa

Los mamíferos tienen dos isoenzimas arginasa (EC 3.5.3.1) que catalizan la hidrólisis de L-arginina a urea y L-ornitina. El gen de arginasa I está localizado en el cromosoma 6 (6q.23), está altamente expresado en el citosol de los hepatocitos y funciona en la eliminación de nitrógeno como última etapa del ciclo de la urea. El gen de arginasa II se encuentra en el cromosoma 14 (14q.24.1). La arginasa II está localizada mitocondrialmente en tejidos tales como riñón, cerebro y músculo esquelético donde se cree que proporciona un suministro de L-ornitina para la biosíntesis de prolina y poliamina (Lopez *et al.*, 2005). La L-arginina es el único sustrato para la óxido nítrico sintasa (NOS), produciendo L-citrulina y NO. Aunque se ha informado de que la K_M de arginasa (2-5 mM) es mucho mayor que la de NOS para L-arginina (2-20 μ M), la arginasa también puede desempeñar un papel en la regulación de la actividad NOS (Durante *et al.*, 2007). En determinadas condiciones, la arginasa I está Cys-S-nitrosilada, lo que da como resultado una mayor afinidad por L-arginina y una disponibilidad reducida de sustrato para NOS (Santhanam *et al.*, 2007). La arginasa es una enzima homotrimérica con un pliegue α/β de una lámina β paralela de ocho hebras rodeada por varias hélices. La enzima contiene un grupo de metal dinuclear que es esencial para generar un hidróxido para el ataque nucleofílico en el carbono guanidinio de L-arginina (Cama *et al.*, 2003; Dowling *et al.*, 2008). El metal natural de arginasa es Mn^{2+} . La arginasa con el metal natural (es decir, Mn^{2+}) presenta un pH óptimo de 9. A pH fisiológico, la enzima presenta una k_{cat}/K_M más de 10 veces menor en la hidrólisis de L-arginina. La baja actividad catalítica mostrada por la arginasa humana auténtica con la enzima con Mn^{2+} natural presenta un problema para el tratamiento humano, puesto que quiere decir que es posible que se tengan que usar dosis poco prácticas de la enzima para lograr una reducción terapéuticamente pertinente en los niveles plasmáticos de L-arginina.

La presente divulgación hace uso de arginasas mutantes en las que el cofactor de metal natural (Mn^{2+}) se reemplaza por cobalto (Co^{2+}). La incorporación de Co^{2+} en lugar de Mn^{2+} en la arginasa I humana o la arginasa II humana da como resultado una actividad impresionantemente mayor a pH fisiológico. Se descubrió que una enzima arginasa I humana que contenía Co^{2+} ("Co-hArgI") mostró un incremento de 10 veces en k_{cat}/K_M *in vitro* a pH 7,4, lo que a su vez se tradujo en un incremento de 15 veces en la citotoxicidad de CHC y un incremento de 13 veces en la citotoxicidad de melanoma en comparación con arginasa I humana que contiene Mn^{2+} ("Mn-hArgI"). También se descubrió que una preparación farmacológica de Co-hArgI podía depurar L-Arg en suero durante más de 3 días en ratones con una única inyección. Además, se descubrió que una preparación farmacológica de Co-hArgI podía reducir los xenoinjertos tumorales de CHC en ratones atímicos, mientras que Mn-hArgI solo ralentizaba el crecimiento tumoral (Ensor *et al.*, 2002).

En determinados aspectos de la divulgación se divulgan composiciones relacionadas con arginasa pegilada. Específicamente, la pegilación de arginasa en un residuo de cisteína genomanipulado (por ejemplo, sustituyendo el tercer residuo del extremo N) se puede usar para producir una composición de arginasa pegilada homogénea. También se divulgan procedimientos para el aislamiento de arginasa pegilada en base a la interrupción temporal de la polimerización.

La pegilación es el proceso de unión covalente de cadenas poliméricas de polietilenglicol a otra molécula, habitualmente un fármaco o una proteína terapéutica. La pegilación se logra de forma rutinaria por incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula diana. La unión covalente de PEG a un fármaco o una proteína terapéutica puede "enmascarar" el agente del sistema inmunitario del huésped (inmunogenicidad y antigenicidad reducidas), incrementar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente, lo que prolonga su tiempo circulatorio reduciendo la depuración renal. La pegilación también puede proporcionar solubilidad en agua a fármacos y proteínas hidrófobos.

La primera etapa en la pegilación es la funcionalización adecuada del polímero PEG en uno o ambos extremos. Los PEG que se activan en cada extremo con el mismo resto reactivo son conocidos como "homobifuncionales", mientras que si los grupos funcionales presentes son diferentes, entonces el derivado de PEG se denomina "heterobifuncional" o "heterofuncional". Los derivados químicamente activos o activados del polímero PEG se preparan para unir el PEG a la molécula deseada.

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

Las técnicas usadas para formar derivados de PEG de primera generación en general hacen reaccionar el polímero PEG con un grupo que es reactivo con grupos hidroxilo, típicamente anhídridos, cloruros de ácido, cloroformatos y carbonatos. En la química de pegilación de segunda generación, los grupos funcionales más eficaces tales como aldehído, ésteres, amidas, etc., están disponibles para la conjugación.

A medida que las aplicaciones de la pegilación se han vuelto cada vez más avanzadas y sofisticadas, ha habido un incremento en la necesidad de PEG heterobifuncionales para la conjugación. Estos PEG heterobifuncionales son muy útiles para unir dos entidades, donde se necesita un espaciador hidrófilo, flexible y biocompatible. Los grupos de extremo preferentes para los PEG heterobifuncionales son maleimida, vinilsulfonas, disulfuro de piridilo, amina, ácidos carboxílicos y ésteres de NHS.

Los agentes de modificación más comunes, o conectores, se basan en moléculas de metoxi-PEG (mPEG). Su actividad depende de la adición de un grupo modificador de proteína al extremo de alcohol. En algunos casos se usa polietilenglicol (PEG-diol) como molécula precursora. Posteriormente, el diol se modifica en ambos extremos para preparar una molécula unida a PEG hetero- u homodimérica (como se muestra en el ejemplo con PEG-bis-vinilsulfona).

Las proteínas en general se PEGilan en sitios nucleófilos tales como tioles no protonados (residuos de cisteinilo) o grupos amino. Los ejemplos de reactivos de modificación específicos de cisteinilo incluyen PEG-maleimida, PEG-yodoacetato, PEG-tioles y PEG-vinilsulfona. Los cuatro son fuertemente específicos de cisteinilo en condiciones suaves y a pH de neutro a ligeramente alcalino, pero cada uno tiene algunas desventajas. La amida formada con las maleimidias puede ser algo inestable en condiciones alcalinas, así que puede haber alguna limitación en las opciones de formulación con este conector. El enlace amida formado con PEG-yodo es más estable, pero el yodo libre puede modificar los residuos tirosina en algunas condiciones. Los PEG-tioles forman enlaces disulfuro con los tioles proteicos, pero este enlace también puede ser inestable en condiciones alcalinas. La reactividad de PEG-vinilsulfona es relativamente lenta en comparación con PEG-maleimida y -yodo; sin embargo, el enlace tioéter formado es bastante estable. Su velocidad de reacción más lenta también puede hacer que la reacción de PEG-vinilsulfona sea más fácil de controlar.

La pegilación específica de sitio en los residuos cisteinilo naturales rara vez se lleva a cabo, puesto que estos residuos están normalmente en forma de enlaces disulfuro o se requieren para la actividad biológica. Por otra parte, se puede usar mutagénesis dirigida al sitio para incorporar sitios de pegilación de cisteinilo para conectores específicos de tiol. La mutación de cisteína se debe diseñar de modo que sea accesible al reactivo de pegilación y todavía sea biológicamente activa después de la pegilación.

Los agentes de modificación específicos de amina incluyen PEG-éster de NHS, PEG-tresilato, PEG-aldehído, PEG-isotiocianato y varios otros. Todos reaccionan en condiciones suaves y son muy específicos para los grupos amino. El PEG-éster de NHS es probablemente uno de los agentes más reactivos; sin embargo, su alta reactividad puede dificultar el control de la reacción de pegilación a gran escala. El PEG-aldehído forma una imina con el grupo amino, que a continuación se reduce a una amina secundaria con cianoborohidruro de sodio. A diferencia del borohidruro de sodio, el cianoborohidruro de sodio no reducirá los enlaces disulfuro. Sin embargo; este compuesto químico es altamente tóxico y se debe manipular con precaución, en particular a un pH menor donde se vuelve volátil.

Debido a los múltiples residuos lisina en la mayoría de las proteínas, la pegilación específica de sitio puede ser una dificultad. Afortunadamente, debido a que estos reactivos reaccionan con grupos amino no protonados, es posible dirigir la pegilación a grupos amino de menor pK realizando la reacción a un pH menor. En general, la pK del grupo α -amino es 1-2 unidades de pH menores que el grupo ϵ -amino de los residuos lisina. Al PEGilar la molécula a pH 7 o inferior, con frecuencia se puede conseguir una alta selectividad por el extremo N. Sin embargo; esto solo es factible si la porción N terminal de la proteína no se requiere para la actividad biológica. Todavía, los beneficios farmacocinéticos de la pegilación con frecuencia superan una pérdida significativa de bioactividad *in vitro*, lo que da como resultado un producto con una bioactividad *in vivo* mucho mayor, independientemente de la química de pegilación.

Existen varios parámetros a considerar cuando se desarrolla un procedimiento de pegilación. Afortunadamente, normalmente no existen más de cuatro o cinco parámetros clave. El enfoque de "diseño de experimentos" para la optimización de las condiciones de pegilación puede ser muy útil. Para las reacciones de pegilación específicas de tiol, los parámetros a considerar incluyen: concentración de proteína, proporción de PEG con respecto a proteína (sobre una base molar), temperatura, pH, tiempo de reacción y, en algunos casos, la exclusión de oxígeno. El oxígeno puede contribuir a la formación de disulfuro intermolecular por la proteína, lo que reducirá el rendimiento del producto PEGilado. Se deben considerar los mismos factores (con la excepción del oxígeno) para la modificación específica de amina, excepto que el pH puede ser incluso más crucial, en particular cuando se dirige al grupo amino N terminal.

Tanto para las modificaciones específicas de amina como de tiol, las condiciones de reacción pueden afectar la estabilidad de la proteína. Esto puede limitar la temperatura, la concentración de proteínas y el pH. Además, se debe conocer la reactividad del conector PEG antes de iniciar la reacción de pegilación. Por ejemplo, si el agente de pegilación es solo un 70 % activo, la cantidad de PEG usada debe garantizar que solo se cuenten las moléculas de PEG activas en la estequiometría de la reacción de proteína con respecto a PEG. Más adelante se describirá cómo determinar la reactividad y la calidad de PEG.

IV. Proteínas y péptidos

En determinados modos de realización, la presente divulgación se refiere a composiciones novedosas que comprenden al menos una proteína o un péptido, tal como multímeros de arginasa estabilizados. Estos péptidos pueden estar comprendidos en una proteína de fusión o conjugados con un agente como se describe anteriormente.

A. Proteínas y péptidos

Como se usa en el presente documento, una proteína o un péptido en general se refiere, pero no se limita a, una proteína de más de aproximadamente 200 aminoácidos, hasta una secuencia de longitud completa traducida de un gen; un polipéptido de más de aproximadamente 100 aminoácidos; y/o un péptido de desde aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos. Por conveniencia, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

En determinados modos de realización, el tamaño de al menos una proteína o un péptido puede comprender, entre otros, 1, 2, 3, 4, 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, 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, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 210, aproximadamente 220, aproximadamente 230, aproximadamente 240, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 300, aproximadamente 325, aproximadamente 350, aproximadamente 375, aproximadamente 400, aproximadamente 425, aproximadamente 450, aproximadamente 475, aproximadamente 500, aproximadamente 525, aproximadamente 550, aproximadamente 575, aproximadamente 600, aproximadamente 625, aproximadamente 650, aproximadamente 675, aproximadamente 700, aproximadamente 725, aproximadamente 750, aproximadamente 775, aproximadamente 800, aproximadamente 825, aproximadamente 850, aproximadamente 875, aproximadamente 900, aproximadamente 925, aproximadamente 950, aproximadamente 975, aproximadamente 1000, aproximadamente 1100, aproximadamente 1200, aproximadamente 1300, aproximadamente 1400, aproximadamente 1500, aproximadamente 1750, aproximadamente 2000, aproximadamente 2250, aproximadamente 2500 o más residuos aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, un "residuo aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier imitador de aminoácido conocido en la técnica. En determinados modos de realización, los residuos de la proteína o el péptido son secuenciales, sin que ningún aminoácido interrumpa la secuencia de residuos aminoácidos. En otros modos de realización, la secuencia puede comprender uno o más restos no aminoácidos. En modos de realización particulares, la secuencia de residuos de la proteína o el péptido se puede interrumpir por uno o más restos no aminoácidos. En consecuencia, el término "proteína o péptido" engloba secuencias de aminoácidos que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en las proteínas naturales, o al menos un aminoácido modificado o inusual, incluyendo pero sin limitarse a los mostrados en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Aminoácidos modificados e inusuales	
Abr.	Aminoácido
Aad	Ácido 2-aminoadípico
Baad	Ácido 3-aminoadípico
Bala	β -alanina, ácido β -amino-propiónico
Abu	Ácido 2-aminobutírico
4Abu	Ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico
Acp	Ácido 6-aminocaproico
Ahe	Ácido 2-aminoheptanoico
Aib	Ácido 2-aminoisobutírico
Baib	Ácido 3-aminoisobutírico
Apm	Ácido 2-aminopimélico
Dbu	Ácido 2,4-diaminobutírico
Des	Desmosina
Dpm	Ácido 2,2'-diaminopimélico
Dpr	Ácido 2,3-diaminopropiónico
EtGly	N-etilglicina
EtAsn	N-etilasparagina
Hyl	Hidroxilisina
AHyl	alo-hidroxilisina
3Hyp	3-hidroxiprolina
4Hyp	4-hidroxiprolina
Ide	Isodesmosina
Alle	alo-isoleucina
MeGly	N-metilglicina, sarcosina
Melle	N-metilisoleucina
MeLys	6-N-metilisina
MeVal	N-metilvalina
Nva	Norvalina
Nle	Norleucina
Orn	Ornitina

Las proteínas o los péptidos se pueden elaborar por cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas de biología molecular estándar, el aislamiento de proteínas o péptidos de fuentes naturales o la síntesis química de proteínas o péptidos. Se han divulgado previamente las secuencias nucleotídicas y proteicas, polipeptídicas y peptídicas correspondientes a diversos genes, y se pueden encontrar en bases de datos informáticas conocidas por los expertos en la técnica. Una de dichas bases de datos es la base de datos Genbank y GenPept del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (disponible en la red informática mundial en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones codificantes de genes conocidos se pueden amplificar y/o expresar usando las técnicas divulgadas en el presente documento o como serían conocidos por los expertos en la técnica. De forma alternativa, diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos son conocidas por los expertos en la técnica.

B. Ácidos nucleicos y vectores

En determinados aspectos de la divulgación, se pueden divulgar secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión como una arginasa multimérica estabilizada. Dependiendo del sistema de expresión que se use,

las secuencias de ácido nucleico se pueden seleccionar en base a procedimientos convencionales. Por ejemplo, la arginasa I y II humana contienen múltiples codones que rara vez se utilizan en *E. coli* que pueden interferir con la expresión, por lo tanto, los genes respectivos o variantes de los mismos pueden tener codones optimizados para la expresión de *E. coli*. También se pueden usar diversos vectores para expresar la proteína de interés, tal como una arginasa multimérica de fusión o una arginasa sustituida con cisteína. Los vectores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, vectores de plásmidos, vectores víricos, vectores basados en transposones o liposomas.

C. Células huésped

Las células huésped, preferentemente las células eucariotas, útiles en la presente divulgación son cualquiera que se pueda transformar para permitir la expresión y secreción de arginasa y multímeros de fusión de la misma. Las células huésped pueden ser bacterias, células de mamífero, levaduras u hongos filamentosos. Diversas bacterias incluyen *Escherichia* y bacilos. Las levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia* encontrarían uso como célula huésped apropiada. Se pueden usar diversas especies de hongos filamentosos como huéspedes de expresión incluyendo los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochliobolus* y *Pyricularia*.

Los ejemplos de organismos huéspedes utilizables incluyen bacterias, por ejemplo, *Escherichia coli* MC1061, derivados de *Bacillus subtilis* BRB1 (Sibakov *et al.*, 1984), *Staphylococcus aureus* SAI123 (Lordanescu, 1975) o *Streptococcus lividans* (Hopwood *et al.*, 1985); levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* AH22 (Mellor *et al.*, 1983) y *Schizosaccharomyces pombe*; hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus awamori* (Ward, 1989), *Trichoderma reesei* (Penttila *et al.*, 1987; Harkki *et al.*, 1989).

Los ejemplos de células huésped de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61), células de hipófisis de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548) células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658). Lo anterior es ilustrativo pero no limitante de los muchos posibles organismos huéspedes conocidos en la técnica. En principio, se pueden usar todos los huéspedes que pueden efectuar secreción, ya sean procariotas o eucariotas.

Las células huésped de mamífero que expresan la arginasa y/o sus multímeros de fusión se cultivan en las condiciones típicamente empleadas para cultivar la línea celular original. En general, las células se cultivan en un medio estándar que contiene sales fisiológicas y nutrientes, tales como RPMI, MEM, IMEM o DMEM estándar, típicamente complementado con un 5-10 % de suero, tal como suero fetal bovino. Las condiciones de cultivo también son estándar, por ejemplo, los cultivos se incuban a 37 °C en cultivos estacionarios o rodantes hasta que se alcanzan los niveles deseados de las proteínas.

D. Purificación de proteínas

Las técnicas de purificación de proteínas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas técnicas implican, en un nivel, la homogeneización y el fraccionamiento bruto de las células, tejido u órgano en fracciones polipeptídicas y no polipeptídicas. La proteína o polipéptido de interés se puede purificar además usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr una purificación parcial o completa (o una purificación hasta la homogeneidad) a menos que se especifique de otro modo. Los procedimientos analíticos en particular adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmovilización y enfoque isoelectrico. Un procedimiento en particular eficaz de purificación de péptidos es cromatografía de líquidos de rendimiento rápida (FPLC) o incluso cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).

Se pretende que una proteína o un péptido purificado se refiera a una composición, aislable de otros componentes, en la que la proteína o el péptido se purifica en cualquier grado en relación con su estado obtenible naturalmente. Una proteína o un péptido aislado o purificado, por lo tanto, también se refiere a una proteína o un péptido libre del entorno en el que se puede producir naturalmente. En general, "purificado" se referirá a una composición de proteína o de péptido que se ha sometido a fraccionamiento para retirar otros componentes diversos, y con una composición que conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término "sustancialmente purificada", esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o el péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o más de las proteínas en la composición.

Diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o por desnaturalización por calor, seguida de: centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxipatita y afinidad; enfoque isoelectrico; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Como es conocido en general en la técnica, se cree que se puede cambiar el orden de realización de las diversas etapas de purificación, o que se pueden omitir determinadas etapas,

y todavía dar como resultado un procedimiento adecuado para la preparación de una proteína o un péptido sustancialmente purificado.

A la luz de la presente divulgación, diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o el péptido son conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción por análisis SDS/PAGE. Un procedimiento preferente para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, compararla con la actividad específica del extracto inicial y, por tanto, calcular el grado de pureza en la misma, evaluada por un "número de purificación de x veces". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir a la purificación, y de si la proteína o el péptido expresado presenta o no una actividad detectable.

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

En determinados modos de realización, se puede aislar o purificar una proteína o un péptido, por ejemplo, una proteína de fusión multimérica de arginasa estabilizada, o una arginasa antes o después de la pegilación. Por ejemplo, una marca His o un epítipo de afinidad pueden estar comprendidos en una variante de arginasa de este tipo para facilitar la purificación. La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre una sustancia que se va a aislar y una molécula a la que se puede unir específicamente. Este es un tipo de interacción receptor-ligando. El material de columna se sintetiza acoplado de forma covalente uno de los compañeros de unión a una matriz insoluble. A continuación, el material de columna puede adsorber específicamente la sustancia de la solución. La elución se produce cambiando las condiciones a aquellas en las que no se producirá la unión (por ejemplo, pH, fuerza iónica, temperatura modificados, etc.). La matriz debe ser una sustancia que por sí misma no adsorba moléculas en un grado significativo y que tenga una amplia gama de estabilidad química, física y térmica. El ligando se debe acoplar de tal manera que no afecte sus propiedades de unión. El ligando también debe proporcionar una unión relativamente estrecha. Y debe ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando.

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

El principio subyacente de SEC es que las partículas de diferentes tamaños eluirán (se filtrarán) a través de una fase estacionaria a diferentes tasas. Esto da como resultado la separación de una solución de partículas en base al tamaño. Siempre que todas las partículas se carguen simultáneamente o casi simultáneamente, las partículas del mismo tamaño se deberían eluir juntas. Cada columna de exclusión por tamaño tiene un intervalo de pesos moleculares que se pueden separar. El límite de exclusión define el peso molecular en el extremo superior de este intervalo y es donde las moléculas son demasiado grandes para quedar atrapadas en la fase estacionaria. El límite de permeación define el peso molecular en el extremo inferior del intervalo de separación y es donde las moléculas de un tamaño lo suficientemente pequeño pueden penetrar completamente en los poros de la fase estacionaria y todas las moléculas por debajo de esta masa molecular son tan pequeñas que eluyen como una única banda.

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (o cromatografía de líquidos a alta presión, HPLC) es una forma de cromatografía en columna usada con frecuencia en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos. HPLC utiliza una columna que contiene material de relleno cromatográfico (fase estacionaria), una bomba que mueve la(s) fase(s) móvil(es) a través de la columna y un detector que muestra los tiempos de retención de las moléculas. El tiempo de retención varía dependiendo de las interacciones entre la fase estacionaria, las moléculas que se analizan y el/los disolvente(s) usado(s).

V. Composiciones farmacéuticas

Se contempla que las arginasas para su uso de acuerdo con la presente divulgación se pueden administrar sistémica o localmente para inhibir el crecimiento de células tumorales y, lo más preferentemente, para destruir células cancerosas en pacientes con cáncer con cánceres localmente avanzados o metastásicos. Se pueden administrar por vía intravenosa, intratecal y/o intraperitoneal. Se pueden administrar solas o en combinación con

fármacos antiproliferativos. En un modo de realización, se administran para reducir la carga de cáncer en el paciente antes de la cirugía u otras intervenciones quirúrgicas. De forma alternativa, se pueden administrar después de la cirugía para garantizar que cualquier cáncer restante (por ejemplo, cáncer que la cirugía no pudo eliminar) no sobreviva.

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

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

20 Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, puede ser necesario preparar composiciones farmacéuticas (vectores de expresión, reservas de virus, proteínas, anticuerpos y fármacos) en una forma apropiada para la aplicación prevista. En general, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden una cantidad eficaz de una o más variantes de arginasa o un agente adicional disuelto o disperso en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción indeseable cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una variante de arginasa, tal como una arginasa multimérica estabilizada o una arginasa pegilada aislada por el procedimiento divulgado en el presente documento, o un ingrediente activo adicional, será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., 1990. Además, para la administración en animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la Oficina de normas biológicas de la FDA.

35 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sería conocido por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., 1990). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

45 La presente invención puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o aerosol, y si necesita ser estéril para dichas vías de administración como inyección. La presente divulgación se puede administrar por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía intratecal, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intranasal, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía tópica, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía mucosal, por vía oral, por vía tópica, por vía local, inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando las células diana directamente, por medio de un catéter, por medio de un lavado, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o por otro procedimiento o cualquier combinación de los anteriores como sería conocido por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., 1990).

55 Las variantes de arginasa se pueden formular en una composición en forma de base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. También se pueden derivar sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas tales como las formuladas para administraciones parenterales tales como soluciones inyectables o aerosoles para administración a los pulmones, o formuladas para administraciones alimentarias tales como cápsulas de liberación de fármacos y similares.

65 Además, de acuerdo con la presente divulgación, la composición para su uso en la presente divulgación adecuada para la administración se proporciona en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte.

El vehículo debe ser asimilable e incluye vehículos líquidos, semisólidos, es decir, pastas, o sólidos. Excepto en la medida en que cualquier medio, agente, diluyente o vehículo convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de una composición contenida en el mismo, es apropiado su uso en una composición administrable para su uso en la práctica de los procedimientos de la presente divulgación. Los ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, cargas y similares o combinaciones de los mismos. La composición también puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr por conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo pero sin limitarse a parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con la presente divulgación, la composición se combina con el vehículo de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, por solución, suspensión, emulsión, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Dichos procedimientos son de rutina para los expertos en la técnica.

En un modo de realización específico de la presente divulgación, la composición se combina o se mezcla completamente con un vehículo semisólido o sólido. La mezcla se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente tal como trituración. También se pueden añadir agentes estabilizadores en el procedimiento de mezcla para proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, es decir, de la desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizadores para su uso en la composición incluyen tampones, aminoácidos como glicina y lisina, carbohidratos tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

En otros modos de realización, la presente divulgación se puede referir al uso de composiciones farmacéuticas de vehículos lipídicos que incluyen variantes de arginasa, uno o más lípidos y un disolvente acuoso. Como se usa en el presente documento, el término "lípido" se definirá para incluir cualquiera de una amplia gama de sustancias que es característicamente insoluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos es bien conocida por los expertos en la técnica, y como se usa en el presente documento el término "lípido", no se limita a ninguna estructura particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede ser natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípido normalmente es una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos unidos a éter y éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos. Por supuesto, los compuestos distintos de los descritos específicamente en el presente documento que se entienden por un experto en la técnica como lípidos también están englobados por las composiciones y procedimientos de la presente divulgación.

Un experto en la técnica estará familiarizado con la gama de técnicas que se pueden emplear para dispersar una composición en un vehículo lipídico. Por ejemplo, la arginasa pegilada o multimérica estabilizada se puede dispersar en una solución que contiene un lípido, disolver con un lípido, emulsionar con un lípido, mezclar con un lípido, combinar con un lípido, enlazar de forma covalente a un lípido, contener como una suspensión en un lípido, contener o formar complejos con una micela o liposoma, o asociar de otro modo con un lípido o estructura lipídica por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. La dispersión puede o no dar como resultado la formación de liposomas.

La cantidad de dosificación real de una composición de la presente divulgación administrada a un paciente animal se puede determinar por factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, la idiopatía del paciente y en la vía de administración. Dependiendo de la dosificación y la vía de administración, el número de administraciones de una dosificación preferente y/o una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la respuesta del sujeto. El facultativo responsable para su administración determinará, en cualquier caso, la concentración del/de los ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el sujeto concreto.

En determinados modos de realización, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente un 0,1 % de un compuesto activo. En otros modos de realización, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo que se puede derivar en el mismo. Naturalmente, la cantidad de compuesto(s) activo(s) en cada composición terapéuticamente útil se puede preparar de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Se contemplarán factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, período de validez del producto, así como otras consideraciones farmacológicas por un experto en la técnica de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas y, como tal, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y tratamientos.

En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal,

aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo que se puede derivar en el mismo. En ejemplos no limitantes de un intervalo que se puede derivar de los números enumerados en el presente documento, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., se puede administrar en base a los números descritos anteriormente.

VIII. Definiciones

El término "aa" se refiere a aminoácido(s). Las sustituciones aminoacídicas se indican por la posición del aminoácido, por ejemplo, 303, en la molécula usando un código de letras (la letra delante del número indica el aminoácido que se reemplaza, mientras que la letra después del número indica el aminoácido que se introduce).

Como se usa en el presente documento, el término "porción" cuando se refiere a una proteína (como en "una porción de una proteína dada") se refiere a fragmentos de esa proteína. Los fragmentos pueden variar en tamaño de cuatro residuos aminoacídicos a la secuencia de aminoácidos completa menos un aminoácido.

Como se usa en el presente documento, los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos por medio de enlaces peptídicos y se usan de manera intercambiable.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína de fusión" se refiere a una proteína quimérica que contiene la proteína de interés (es decir, una arginasa humana o una variante de la misma) unida (o unido de forma funcional) a un fragmento de proteína exógena (el compañero de fusión que consiste en una proteína distinta de arginasa). El compañero de fusión puede potenciar la solubilidad, la semivida en suero o ambas. También puede proporcionar una marca de afinidad (por ejemplo, marca his) para permitir la purificación de la proteína de fusión recombinante de la célula huésped o del sobrenadante de cultivo, o de ambos.

Los términos "en combinación funcional", "en orden funcional" y "unido de forma funcional" se refieren al enlace de secuencias de ácido nucleico de tal manera que se produce una molécula de ácido nucleico que puede dirigir la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de una molécula de proteína deseada. El término también se refiere al enlace de secuencias de aminoácidos de tal manera que se produce una proteína funcional.

El término " K_m " como se usa en el presente documento se refiere a la constante de Michaelis-Menten para una enzima y se define como la concentración del sustrato específico a la que una enzima dada proporciona la mitad de su velocidad máxima en una reacción catalizada por enzima.

El término k_{cat} como se usa en el presente documento se refiere al número de recambio o el número de moléculas de sustrato que cada sitio de enzima convierte en producto por unidad de tiempo, y en el que la enzima está trabajando con la máxima eficacia.

El término K_{cat}/K_m como se usa en el presente documento es la constante de especificidad que es una medida de cuán eficazmente una enzima convierte un sustrato en producto.

El término "Mn-hArgI" se refiere a arginasa I humana con un cofactor de Mn (II). El término "Co-hArgI" se refiere a arginasa I humana (mutante o natural) con un cofactor de Co (II).

El término " CI_{50} " es la mitad de la concentración inhibitoria (CI) máxima (50 %) y, por tanto, una medida de eficacia.

El término "pegilado" se refiere a la conjugación con polietilenglicol (PEG), que se ha usado ampliamente como vehículo de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. (Harris *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la unión a diversos fármacos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. (Greenwald *et al.*, 2000; Zalipsky *et al.*, 1997). El PEG se puede acoplar (por ejemplo, unirse de forma covalente) a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y por medio de otros procedimientos químicos; sin embargo, el propio PEG está limitado como máximo a dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, se han explorado copolímeros de PEG y aminoácidos como biomateriales novedosos que conservarían las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando una mayor carga de fármaco), y que se pueden diseñar sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones (Nathan *et al.*, 1992; Nathan *et al.*, 1993).

El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias de control y codificantes

necesarias para la producción de un polipéptido o precursor del mismo. El polipéptido se puede codificar por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante siempre que se conserve la actividad enzimática deseada.

5 El término "sujeto" se refiere a animales, incluyendo los seres humanos.

El término "natural" se refiere a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente natural. Un gen natural es el que se observa con mayor frecuencia en una población y, por tanto, se designa arbitrariamente como la forma "normal" o "natural" del gen. Por el contrario, el término "modificado" o "variante" o "mutante" se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en la secuencia o propiedades funcionales (es decir, características modificadas) cuando se compara con el gen o producto génico natural. Cabe destacar que se pueden aislar mutantes naturales; estos se identifican por el hecho de que tienen características modificadas en comparación con el gen o producto del gen natural.

15 VIII. Kits

Las composiciones y combinaciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente divulgación se pueden proporcionar como kits, tales como kits terapéuticos. Por ejemplo, un kit puede comprender una o más composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento y, opcionalmente, instrucciones para su uso. Los kits también pueden comprender uno o más dispositivos para llevar a cabo la administración de dichas composiciones. Por ejemplo, un kit en cuestión puede comprender una composición farmacéutica y un catéter para llevar a cabo la inyección intravenosa directa de la composición en un tumor canceroso. En otros modos de realización, un kit en cuestión puede comprender ampollas precargadas de una arginasa multimérica estabilizada o una arginasa pegilada aislada, opcionalmente formulada como un producto farmacéutico, o liofilizada, para su uso con un dispositivo de administración.

Los kits pueden comprender un recipiente con una ficha técnica. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener una composición que incluya un anticuerpo que es eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tales como las descritas anteriormente. La ficha técnica en el envase puede indicar que la composición se usa para un tratamiento específico o una aplicación no terapéutica, y también puede indicar instrucciones para su uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente. El kit de la invención típicamente comprenderá el recipiente descrito anteriormente y uno o más de otros recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos del envase con instrucciones de uso.

IX. Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar determinados modos de realización y aspectos preferentes de la presente invención y no se han de interpretar como limitantes del alcance de la misma. En la divulgación experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (molar); μM (micromolar); mM (milimolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles); μmol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μg (microgramos); l (litros); ml (mililitros); μl (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μm (micrómetros); nm (nanómetros); $^{\circ}\text{C}$ (grados centígrados); PM (peso molecular); PBS (solución salina tamponada con fosfato); min (minutos).

Ejemplo 1

Incorporación y determinación del contenido de metal en la arginasa I

La incorporación de Mn^{2+} y Co^{2+} se puede lograr purificando la arginasa, seguido de una etapa de incubación con metal 10 mM a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Para determinar el contenido de metal final y la identidad de las preparaciones de arginasa, se diluyeron muestras de proteína de Mn-hArgI (145 μM), Co-hArgI (182 μM) y tampones de diálisis asociados (Hepes 100 M, pH 7,4) en ácido nítrico al 2 % y se analizaron por espectrometría de masas de plasma acoplado por inducción (ICP-EM, Departamento de Ciencias Geológicas, Universidad de Texas en Austin) para cuantificar el contenido de cobalto, hierro, manganeso y cinc de la proteína restando la concentración de metales encontrados en el tampón de diálisis a la concentración de metal de las muestras de proteína finales y dividiendo entre la concentración de proteína. Para determinar las concentraciones de proteína, se calculó un coeficiente de extinción para hArgI en base a la secuencia de aminoácidos (Gill y von Hippel, 1989). Todas las concentraciones de proteína para arginasa I se calcularon en base a $\epsilon_{280}=24.180 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ calculado en una concentración de tampón final de clorhidrato de guanidinio 6 M, tampón fosfato 20 mM, pH 6,5. A modo de comparación, también se calculó la concentración de arginasa por el ensayo BCA usando diluciones de BSA como patrón. Con este procedimiento se encontró que las muestras de arginasa incubadas con Co^{2+} contienen 2,1 \pm 0,5 equivalentes de Co y 0,4 \pm 0,1 equivalentes de Fe, sin cantidades detectables de Zn o Mn. Las muestras incubadas con Mn^{2+} contienen 1,5 \pm 0,2 equivalentes de Mn y 0,4 \pm 0,1 equivalentes de Fe, y cantidades no detectables de Zn o Co. Por tanto, la incubación con calor es un procedimiento eficaz para la incorporación de cobalto.

Los estudios adicionales de carga de cobalto han demostrado que se puede lograr una mayor proporción de carga de cobalto y da como resultado una actividad específica mayor. Los resultados de estos estudios se muestran en la siguiente tabla y en la fig.3.

5

TABLA2

Carga de cobalto en Co-arginasa I						
Identidad	Co (mM)	Temp. (°C)	Tiempo (min)	Co total (µg/mg de arginasa)	Mn total (µg/mg de arginasa)	Actividad específica (U/mg)
APO-arginasa I*	N/A	N/A	N/A	<0,025	0,008	24
Carga APO 1*	0,1	5	15	0,3	ND	117
Coh-Arg I*	10	20	60	2	0,06	410
Carga APO 2*	1	5	15	2,4	ND	395
Carga APO 3*	10	20	15	2,8	ND	493
Carga APO 4*	10	20	60	2,9	ND	489
Carga APO 5	10	37	15	2,8	ND	NT
Carga APO 6	10	53	15	2,6	ND	NT
Co-ArgI-PEG	10	53	15	3	ND	500
Teórica				3,4		
* Graficado						

Los datos con asterisco se muestran en la fig. 3.

10

Ejemplo 2

Citotoxicidad de Co-Arg y sus variantes hacia células de carcinoma hepatocelular y melanomas metastásicos

15

Para someter a prueba la citotoxicidad *in vitro* de la arginasa genomanipulada, se incubaron concentraciones variables (0-100 nM) de variantes Mn-ArgI, Co-ArgI o Co-hArgI con células de CHC (Hep 3b) o células de melanoma (A375) (American Type Culture Collection) en placas de 96 pocillos a una densidad de siembra de 500 células/pocillo, en medio DMEM complementado con suero fetal bovino. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se trataron las células con medio que contenía arginasa por triplicado a diversas concentraciones. La solución de control era una solución salina equilibrada en medios. Las células tratadas se mantuvieron a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se sometieron a prueba las células por un ensayo MTT estándar (Sigma-Aldrich) los días 1, 3, 5 y 7 por la adición de 100 µl/pocillo de MTT (5 mg/ml) y se incubaron durante 4 horas con agitación suave de una a dos veces por hora. Después de esto, se aspiró la solución y a continuación se añadieron 200 µl de DMSO a cada pocillo. Se interpretó la absorbancia a 570 nm para cada pocillo usando un lector de placas automático para determinar el número relativo de células supervivientes en comparación con los controles. Los datos resultantes se ajustaron a una ecuación exponencial para determinar un valor de CI₅₀ aparente para la citotoxicidad de la arginasa. Se calcularon los valores de CI₅₀ del día 5, proporcionando un valor de CI₅₀ para Mn-hArgI de 5±0,3 nM (~0,18 µg/ml) y un valor de 0,33±0,02 nM para Co-hArgI (~0,012 µg/ml). Por tanto, la enzima Co-ArgI parece ser 15 veces más citotóxica que la enzima sustituida con Mn frente a CHC. Frente a la línea celular de melanoma metastásico (A375), Mn-hArgI dio como resultado una CI₅₀ aparente de 4,1±0,1 nM (~0,15 µg/ml). La incubación con Co-hArgI dio lugar a un incremento de 13 veces en la citotoxicidad con una CI₅₀ aparente de 0,32±0,06 nM (~0,012 µg/ml).

35

Ejemplo 3**Genomanipulación de una proteína de fusión Fc-arginasa para una semivida *in vivo* potenciada**

La fusión con el dominio Fc de IgG se ha empleado ampliamente para prolongar las semividas *in vivo* de polipéptidos terapéuticos tales como el inhibidor de TNF- α etanercept (EnbriTM). El dominio Fc se une al receptor Fc γ Rn, que se expresa en el endotelio vascular y muchos otros tejidos (Roopenian y Akilesh, 2007). La afinidad de Fc γ Rn por el dominio Fc de IgG depende en gran medida del pH. La unión se produce en el pH ácido de los compartimentos endosómicos, lo que permite que la proteína se recicle en la superficie celular y, por tanto, evite la degradación proteolítica. En la superficie celular, el dominio Fc se libera de Fc γ Rn porque la afinidad de unión es muy baja a pH fisiológico. Se estima que el reciclaje endosómico por medio de Fc γ Rn incrementa la semivida en suero de las inmunoglobulinas al menos 4-7 veces, a aproximadamente 7-14 días en seres humanos. Las fusiones de Fc aprovechan esta propiedad para dotar a las moléculas de vida corta con una semivida larga. Sin embargo, la arginasa humana es un homotrímero y, por lo tanto, si se fusiona con el Fc de IgG, que por sí mismo es un dímero, el polipéptido de Fc-arginasa resultante probablemente formará agregados de alto peso molecular.

Este problema se evitó empleando formas mutantes de arginasa que interrumpen la trimerización y son estables en la forma monomérica. La interfase de subunidad y trimerización de arginasa I se ha estudiado con cierto detalle (Lavulo *et al.*, 2001). Se ha demostrado que una sustitución de un único aminoácido en Glu256Gln interrumpe la trimerización, lo que da como resultado la formación de la enzima arginasa I monomérica (Sabio *et al.*, 2001). Después de la expresión y purificación de esta variante, el análisis cinético en situación de equilibrio reveló una actividad casi idéntica en comparación con Co-hArgI con una k_{cat}/K_M de $1320 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

A continuación, se clonó esta construcción en vectores de expresión de Fc. El vector de expresión de Fc es una construcción en base a un plásmido pTRC99a (Amersham) que contiene una secuencia líder DsbA seguida de la región codificante de Fc de IgG, un sitio de restricción EcoRI y un codón de parada. El gen de arginasa monomérica se colocó dentro del marco de lectura detrás de la región codificante de Fc digiriendo tanto el vector como el gen con EcoRI, y posteriormente se fijó y transformó en *E. coli* (BL21) para su secuenciación y expresión. Puesto que el Fc de IgG es habitualmente una proteína glucosilada, la expresión de IgG recombinantes o de fusiones de Fc se ha llevado a cabo hasta ahora en células de mamífero recombinantes que, a diferencia de las bacterias, pueden efectuar glucosilación unida a N. Sin embargo, mientras que la glucosilación en Asn297 es crucial para la unión a los receptores de Fc γ activadores e inhibidores (Fc γ RI-III en seres humanos), no tiene un efecto notable sobre la afinidad o la unión dependiente del pH a Fc γ Rn (Tao y Morrison, 1989; Simmons *et al.*, 2002). Por tanto, los anticuerpos IgG no glucosilados expresados en bacterias presentan una persistencia sérica en primates casi indistinguible de la de los anticuerpos completamente glucosilados expresados en células de mamífero (Simmons *et al.*, 2002). A diferencia de las nociones anteriores predominantes, los anticuerpos IgG y las proteínas de Fc se pueden expresar eficazmente en *E. coli* hasta niveles de g/l en fermentadores. La expresión en *E. coli* es técnicamente mucho más simple y más rápida. Además, puesto que la proteína resultante no está glucosilada, no muestra heterogeneidad de glucano, un problema importante en la expresión de glucoproteínas terapéuticas (Jefferis, 2007). La proteína de fusión se purifica por cromatografía con proteína A y el rendimiento de la fusión Fc-arginasa dimérica correctamente plegada en relación con los polipéptidos que no logran dimerizarse se cuantifica por cromatografía de filtración en gel FPLC. Esta formulación ha dado lugar a una forma de arginasa humana altamente activa y muy estable, adecuada para ensayos *in vivo*.

Ejemplo 4**Pegilación de arginasa**

Se purificó la arginasa y a continuación se hizo 10 mM con CoCl_2 y se calentó a 50°C durante 10 minutos. Después de centrifugar para retirar cualquier precipitado, se intercambió ampliamente el tampón (PBS con glicerol al 10 %) de PEG-5000-arginasa usando un dispositivo de filtración de 100.000 MWCO (Amicon) y se esterilizó con un filtro de jeringuilla de 0,2 micrómetros (VWR). Se analizó el contenido de lipopolisacáridos (LPS) de todas las enzimas pegiladas usando un kit de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) (Cape Cod Incorporated).

Se descubrió que Co-hArgI pegilada tenía una estabilidad en suero casi idéntica a la de la enzima natural y mostraba un valor de k_{cat}/K_M de $1690 \pm 290 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

Ejemplo 5**Disminución en suero de L-Arg en el modelo de ratón**

Se trataron ratones Balb/c por inyección IP única con 500 μg de Co-hArgI pegilada preparada farmacológicamente o un volumen igual de PBS. Se sacrificaron los ratones por punción venosa cardíaca para la extracción de sangre en los puntos temporales de 0,48, 72 y 96 h. Las muestras de sangre se mezclaron de inmediato 50:50 (v/v) con tampón citrato de sodio 400 mM, pH 4, se dejaron coagular durante 30 minutos y se centrifugaron para la separación del suero. A continuación, se filtró el suero resultante en un dispositivo de 10.000 MWCO (Amicon) para la retirada de proteínas grandes y precipitados y se recogió el flujo pasante para su análisis. Se derivatizaron los patrones de L-arginina, el suero de ratón de control y las muestras experimentales con OPA (Agilent) y se separaron en una columna de HPLC de fase inversa C18 (Agilent) (5 μm , 4,6 \times 150 mm) esencialmente como se describe por Agilent Technologies (número de publicación: 5980-3088), excepto por la modificación leve del

protocolo de separación reduciendo el caudal a la mitad y duplicando el tiempo de adquisición para obtener una mejor separación de picos. Se construyó una curva estándar de L-arginina trazando el área del pico de L-Arg frente a la concentración para cuantificar los niveles de L-Arg en suero. Una única dosis de Co-hArgl preparada farmacológicamente fue suficiente para mantener L-Arg en o por debajo de los límites de detección durante más de 3 días (FIG. 1).

Ejemplo 6

Tratamiento de xenoinjerto tumoral de CHC con Co-hArgl

A ratones atímicos se les inyectó por vía subcutánea en el flanco ~10° de células de CHC recogidas de un cultivo de tejido confluyente al 75 %. Después de que los tumores con xenoinjerto de CHC habían crecido hasta ~0,5 cm³ de diámetro (día 9), se clasificaron los ratones en dos grupos. El grupo experimental recibió una inyección IP de 500 µg de Co-hArgl farmacológicamente optimizada el día 9 y el día 12. El grupo de control recibió inyecciones IP de PBS los días 9 y 12. Como se puede ver en la FIG. 2, los tumores tratados con PBS habían incrementado 3 veces su tamaño el día 15. En marcado contraste, los tumores tratados con Co-hArgl habían disminuido de tamaño el día 15. Solo se había demostrado que los tumores tratados con Mn-hArgl presentaban un retraso en la tasa de crecimiento (Cheng *et al.*, 2007). Co-hArgl parece ser un agente quimioterápico altamente eficaz frente a los CHC tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ejemplo 7

Interrupción del equilibrio de L-arginina en el microentorno tumoral con Co-hArgl y anti-PD-L1 Ab

La arginasa I humana (hArgl) es una enzima dependiente de Mn²⁺ que muestra baja actividad y baja estabilidad en suero. Las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) expresan hArgl y óxido nítrico sintasa (NOS), que controlan la disponibilidad de L-arginina en el microentorno tumoral y, a su vez, regulan la función de los linfocitos T. La disminución de L-arginina por MDSC se ha correlacionado con el deterioro de la función antitumoral de los linfocitos T y la evasión tumoral de la inmunidad del huésped. Se analizó la expresión de enzimas de la vía biosintética de L-arginina en leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica, leucocitos monomorfonucleares de médula ósea y células CD34⁺, revelando que estas células expresan niveles bajos de OTC y ASS, lo que sugiere la dependencia de estas células de L-arginina exógena/extracelular para la función fisiológica. En base a este descubrimiento, se contempla que la disminución a largo plazo de L-arginina puede afectar negativamente a la población de MDSC y, por lo tanto, potenciar la regulación inmunitaria del crecimiento tumoral. Esta hipótesis se sometió a prueba usando hArgl genomanipulada (AEB1102), desarrollada por el reemplazo del cofactor natural de Mn²⁺ por Co²⁺, lo que da como resultado una actividad catalítica y estabilidad en suero significativamente mejoradas en comparación con hArgl endógena. La enzima genomanipulada también está pegilada como se describe anteriormente. Se sometieron a prueba los efectos de la disminución mediada por Co-hArgl pegilada crónica, amplia de L-arginina *in vivo* en el modelo murino de cáncer de colon CT26 dosificado solo y en combinación con anticuerpos monoclonales (mAb) anti-PD-L1 y anti-PD-1.

En estos estudios se usaron ratones hembra Envigo Balb/c (BALB/cAnNHsd). Tenían 6-7 semanas de edad el día 1 de la prueba. Se realizaron implantes en los animales de prueba por vía subcutánea el día 0 con 5,0E+05 células CT26.WT. Se clasificaron todos los ratones en grupos de estudio y se inició el tratamiento como sigue:

- Grupo 1: vehículo (PBS) IP, Q7Dx4; más control de isotipo, 10 mg/kg IP, (Q3Dx2; 3 descanso)x4

- Grupo 2: AEB1102, (3 mg/kg IP, Q7Dx4)

- Grupo 3: Ab anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, (Q3Dx2; 3 descanso)x4

- Grupo 4: AEB1102, 3 mg/kg IP, Q7Dx4; más Ab anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, (Q3Dx2; 3 descanso)x4;

Se dosificó AEB1102 4 veces, una vez por semana (días 3, 10, 17, 24)

Se dosificó anti-PD-L1 8 veces, una con dosis, dos de descanso, una con dosis, tres de descanso cada semana (días 3, 6, 10, 13, 17, 20, 24, 27)

Se observaron todos los animales para detectar signos clínicos al menos una vez al día. Se registraron los pesos corporales concretos y los volúmenes de los tumores tres veces por semana. Se sacrificaron los ratones concretos cuando el tamaño del tumor alcanzó un valor de 2000 mm³.

El tratamiento *in vivo* de ratones CT26 con AEB1102 (Co-hArgl pegilada) dio como resultado un efecto terapéutico comparable al de los anticuerpos inmunomoduladores estándar que se dirigen a PD-1 y PD-L1. De importancia, la

politerapia de AEB1102 con mAb anti-PD-1 y PD-L1 dio como resultado un efecto antitumoral aparentemente sinérgico o al menos aditivo en comparación con AEB1102 solo e inmunoterapia sola.

Los datos de este estudio se muestran gráficamente en la fig. 4. Los datos reflejan el efecto del tratamiento con una Co-hArgl pegilada en combinación con un anti-receptor de proteína de punto de control inmunitario (anti-PD-1) y un ligando (anti-PD-L1). En la figura, la curva superior es un anticuerpo de control de isotipo, la segunda curva es un anticuerpo anti-PD-L1, la tercera curva es Co-hArgl pegilada y la curva inferior es el tratamiento combinado de Co-hArgl pegilada y anticuerpo anti-PD-L1. Como se ve en los datos, la combinación de los 2 agentes tiene un efecto mayor que el aditivo sobre la inhibición del crecimiento tumoral.

También se midió el efecto sobre la activación de linfocitos T de linfocitos en muestras tomadas el día 3. En la tabla 3 se muestra el porcentaje de células vivas totales que expresaron CD45+ en los cuatro grupos, así como el porcentaje de células CD45+ que también eran CD8+. Estos datos también se muestran en forma gráfica en las figs. 6 y 7.

La tabla informa de la media \pm EEM

Grupos	Células CD45+ el día 3	Células CD8+ el día 3
Vehículo	14,8 \pm 3,4	19,4 \pm 3,9
Isotipo	13,8 \pm 2,2	18,7 \pm 2,1
AEB1102	26,5 \pm 3,7	18,7 \pm 7,1
anti-PD-LI	13,1 \pm 3,5	26,3 \pm 3,24
AEB1102 + anti-PD-LI	22,4 \pm 2,3	34,2 \pm 5,0

En conjunto, estos resultados demuestran que la interrupción del equilibrio fisiológico de L-arginina en el microentorno tumoral inhibe el crecimiento tumoral y sensibiliza además el tumor a la inmunoterapia.

Ejemplo 8

Efecto del tratamiento de tratamiento de carcinoma de colon con ArgI y OX40

Se inyectaron suspensiones de células de carcinoma de colon MC38 en los flancos de ratones hembra C57BL/6. Cuando el volumen del tumor alcanzó 75-100 mm³ el día 0, se aleatorizaron los ratones en grupos. Se midió el volumen del tumor dos veces por semana usando compases calibradores. Los tratamientos se iniciaron el día 0.

A un primer grupo se le inyectó 10 mg/kg de control de isotipo quincenalmente durante 6 semanas, al segundo grupo se le inyectó 3 mg/kg de Co-arginasa I, semanalmente durante 6 semanas, a un tercer grupo se le inyectó 10 mg/kg de anti-OX40ab semanalmente durante 6 semanas, y a un cuarto grupo se le inyectó 3 mg/kg de Co-ArgI y 10 mg/kg de anti OX40ab semanalmente durante 6 semanas. Los datos de este estudio se muestran en la fig. 5. Aunque parece que la Co-ArgI se administró a una dosis subóptima, se observa una tendencia en la que la combinación de ArgI y aOX40 tiene un efecto más que aditivo sobre la reducción o inhibición del volumen del tumor.

Referencias

Se da la siguiente referencia, en la medida en que proporciona detalles de procedimiento ejemplares u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento.

Cama *et al.*, Biochemistry, 42:7748-7758, 2003.

Cheng *et al.*, Cancer Lett., 224:67-80, 2005.

Cheng *et al.*, Cancer Res., 67:309, 2007.

Cheng *et al.*, Cancer Res., 67:4869-4877, 2007.

Dillon *et al.*, Med. Sci. Monit., 8:BR248-253, 2002.

Dowling *et al.*, Cell Mol. Life. Sci., 65(13):2039-55, 2008.

- Durante *et al.*, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 34:906-911, 2007.
- Ensor *et al.*, Cancer Res., 62:5443-5450, 2002.
- 5 Feun *et al.*, J. Neurooncol., 82:177-181, 2007.
- Gill y von Hippel, Anal. Biochem., 182:319-326, 1989.
- Greenwald *et al.*, Crit. Rev Therap Drug Carrier Syst., 17:101-161, 2000.
- 10 Harkki *et al.*, BioTechnology, 7:596-603, 1989.
- Harris *et al.*, Clin. Pharmacokinet., 40(7):539-51, 2001.
- 15 Hopwood *et al.*, en: Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.
- Izzo *et al.*, J. Clin. Oncol., 22:1815-1822, 2004.
- 20 Jefferis, Expert Opin. Biol. Ther., 7:1401-1413, 2007.
- Lavulo *et al.*, J. Biol. Chem., 276:14242-14248, 2001.
- Lopez *et al.*, Febs J., 272:4540-4548, 2005.
- 25 Lordanescu, J. Bacteriol, 12:597 601, 1975.
- Mellor *et al.*, Gene, 24:1-14, 1983.
- 30 Nathan *et al.*, Bioconj Chem., 4:54-62, 1993.
- Nathan *et al.*, Macromolecules, 25:4476-4484, 1992.
- Pardoll, Drew, Nature Reviews Cancer 12, 252-264 (abril de 2012)
- 35 Penttila *et al.*, Gene, 61:155-164, 1987.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- 40 Roopenian y Akilesh, Nat. Rev. Immunol., 7:715-725, 2007.
- Sabio *et al.*, FEBS Lett., 501:161-165, 2001.
- Santhanam *et al.*, Circ. Res., 101:692-702, 2007.
- 45 Savoca *et al.*, Cancer Biochem. Biophys., 7:261-268, 1984.
- Scott *et al.*, Br. J. Cancer, 83:800-810, 2000.
- 50 Shen *et al.*, Cancer Lett., 231:30-35, 2006.
- Sibakov *et al.*, Eur. J. Biochem., 145:567 572, 1984.
- Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods, 263:133-147, 2002.
- 55 Tao *et al.*, J. Immunol., 143:2595-2601, 1989.
- Ward, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.
- 60 Wheatley y Campbell, Pathol. Oncol. Res., 8:18-25, 2002.
- Yoon *et al.*, Int. J. Cancer, 120:897-905, 2007.
- Zalipsky *et al.*, Bioconjug Chem., 8:111-118, 1997.
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana que comprende un cofactor de cobalto y un agente de inmunoncología para su uso en un procedimiento de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto, en la que el agente de inmunoncología se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-OX40 y un anticuerpo anti-OX40L.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que el tumor comprende células tumorales auxótrofas a arginina; preferentemente en la que el tumor presenta una expresión reducida o inhibida de argininosuccinato sintetasa, ornitina transcarbamilasa, argininosuccinato liasa o una combinación de las mismas.
- 15 3. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que la enzima arginasa I humana se estabiliza por asociación con un polietilenglicol o conjugación con un polímero de proteína sintética, un fragmento Fc o albúmina.
- 20 4. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la enzima arginasa I humana está pegilada.
5. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el sujeto es un sujeto animal o un paciente con cáncer humano.
- 25 6. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el agente de inmunoncología comprende pembrolizumab, atezolizumab o nivolumab.
- 30 7. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el tumor es un carcinoma hepatocelular, un carcinoma de células renales, un cáncer de mama, un melanoma, un cáncer de próstata, un cáncer de páncreas, un cáncer de vejiga, un carcinoma de colon, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama triple negativo, un linfoma hodgkiniano, un cáncer gástrico, un glioblastoma, un carcinoma de células de Merkel, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de pulmón microcítico o un carcinoma de pulmón no microcítico.
- 35 8. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que, en el procedimiento de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto:
la enzima arginasa I humana y el anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo anti-PDL-1, el anticuerpo anti-OX40 o el anticuerpo anti-OX40L se administran simultáneamente; o bien
la enzima arginasa I humana y el anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo anti-PDL-1, el anticuerpo anti-OX40 o el anticuerpo anti-OX40L se administran secuencialmente.
- 40 9. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la enzima arginasa I humana muestra una k_{cat}/K_M para la hidrólisis de arginina entre $400 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $4000 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4 y $37 \text{ }^\circ\text{C}$; o
la enzima arginasa I humana comprende una proporción de cobalto con respecto a arginasa de desde 2 a $3 \mu\text{g}$ de Co/mg de arginasa; o
la enzima arginasa I humana se puede obtener poniendo en contacto una apoenzima arginasa con cobalto o un ion de cobalto a una temperatura de desde $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un período de 15 minutos a 60 minutos.
- 50 10. Una combinación para su uso en el tratamiento de cáncer en un paciente con cáncer, en la que la combinación comprende una composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana pegilada que comprende un cofactor de cobalto y un tratamiento de modulación del sistema inmunitario que comprende una composición farmacéutica que comprende un agente de inmunoncología seleccionado de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-OX40 o un anticuerpo anti-OX40L, en la que:
55 la composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana pegilada que comprende un cofactor de cobalto y la composición farmacéutica que comprende el agente de inmunoncología se administran simultáneamente; o
60 la composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana que comprende un cofactor de cobalto y la composición farmacéutica que comprende un agente de inmunoncología se administran secuencialmente.
- 65 11. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que una cantidad terapéutica de la enzima arginasa I humana pegilada que comprende un cofactor de cobalto es de $0,01 \text{ mg/kg}$ a $7,5 \text{ mg/kg}$; o de $0,05 \text{ mg/kg}$ a 5 mg/kg o de $0,1 \text{ mg/kg}$ a 5 mg/kg .

12. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que el agente de inmunoncología se selecciona de pembrolizumab, atezolizumab y nivolumab.
- 5 13. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el paciente con cáncer se trata por carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, cáncer de mama, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama triple negativo, linfoma hodgkiniano, cáncer gástrico, glioblastoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico o carcinoma de pulmón no microcítico.
- 10 14. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que la composición farmacéutica que comprende una enzima arginasa I humana pegilada que comprende un cofactor de cobalto se administra por vía parenteral o se administra por vía tópica, por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intracraneal, por vía intraarticular, por vía intraprostática, por vía intrapleural, por vía intratraqueal, por vía intraocular, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía subconjuntival, por vía intravesicular, por vía mucosal, por vía intrapericárdica, por vía intraumbilical, por vía oral, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada bañando las células diana directamente, por medio de un catéter o por medio de un lavado.
- 15

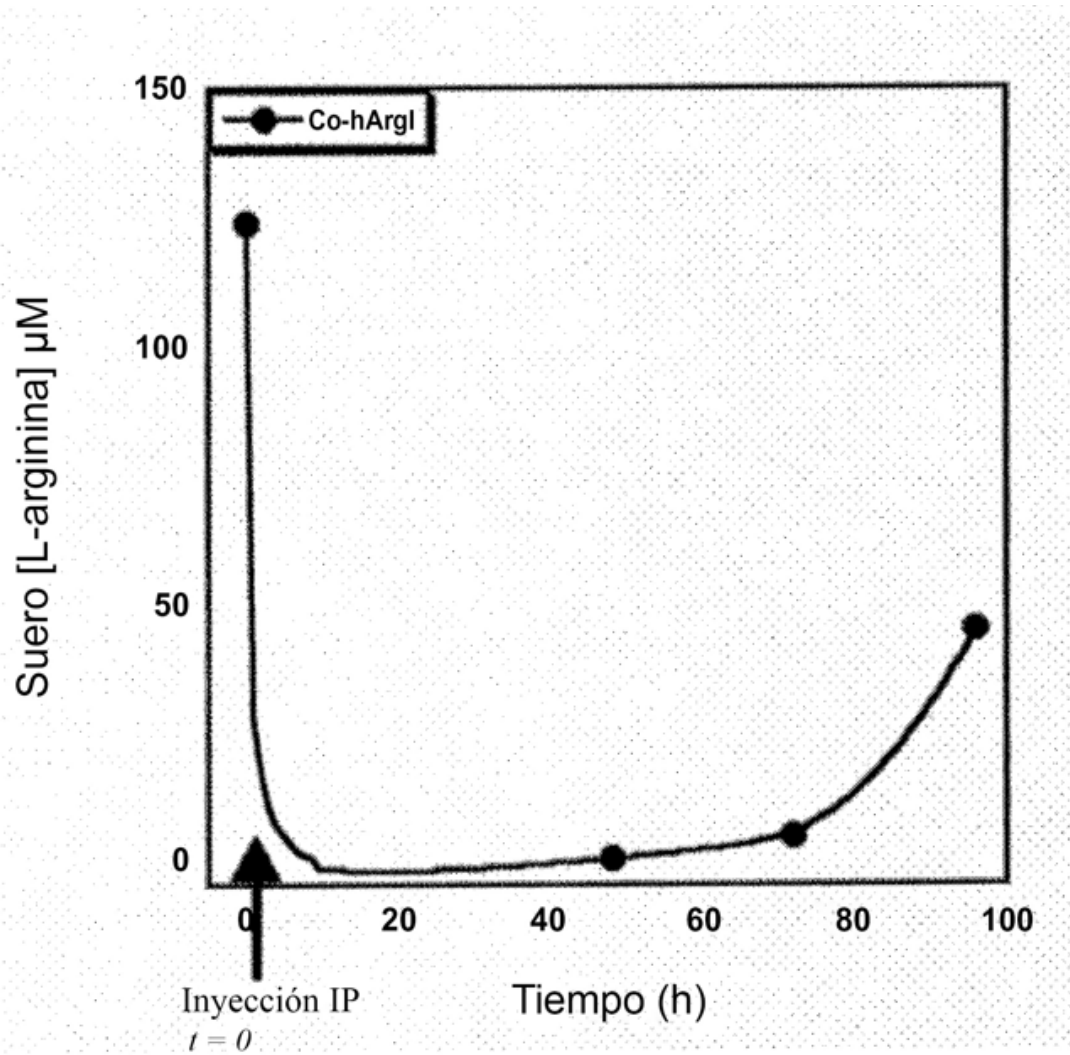


FIG. 1

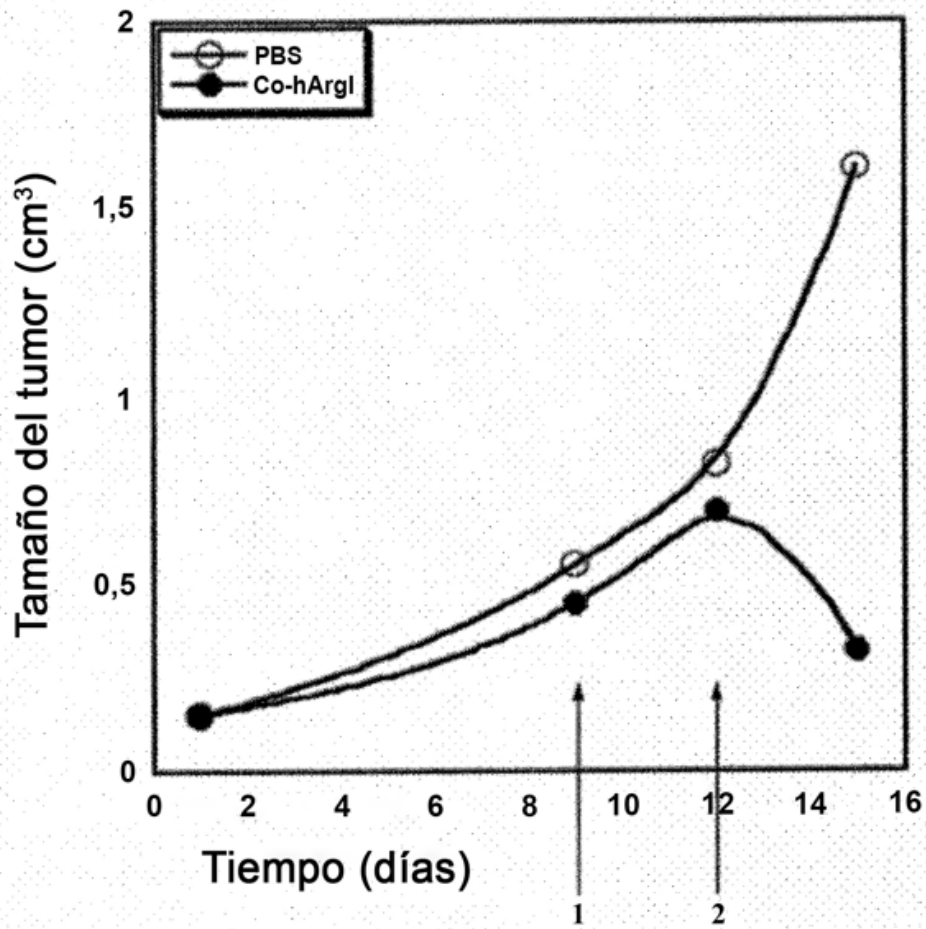


FIG. 2

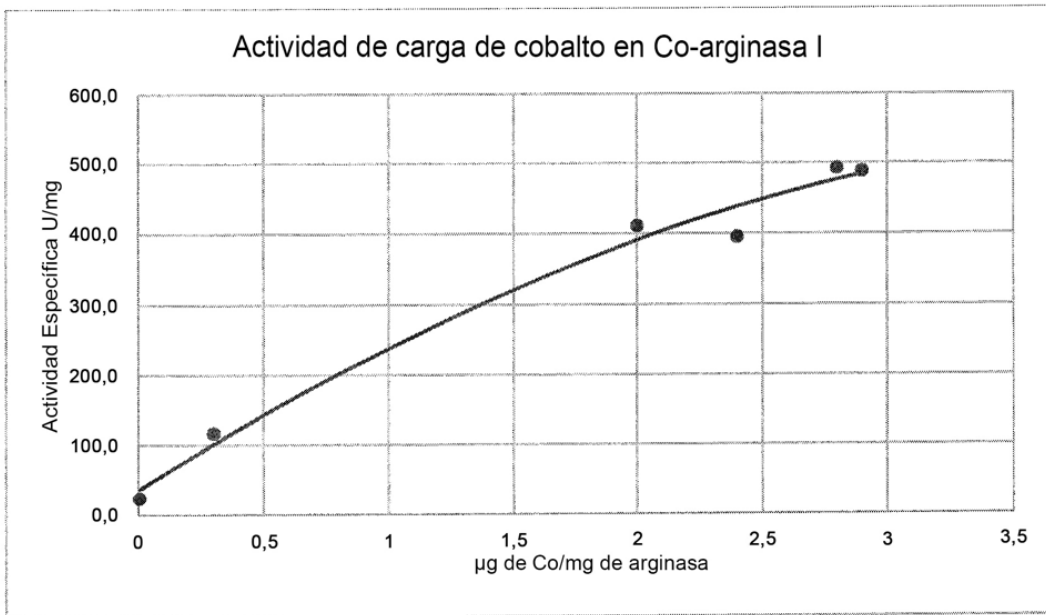
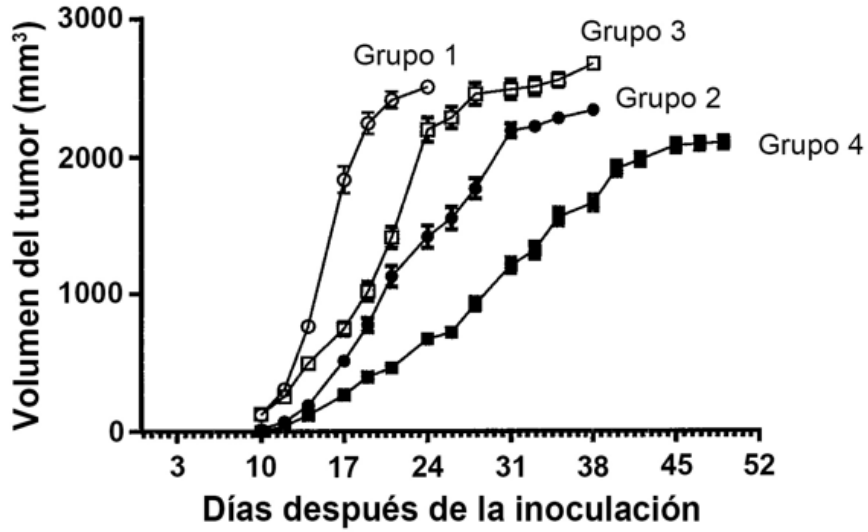


FIG. 3

**Carcinoma de colon CT26 murino
(Media±EEM)**



- Grupo 1: vehículo + control de isotipo (n=10)
- Grupo 2: AEB1102 (3 mg/kg, Q7Dx4, n=10)
- ◻ Grupo 3: Ab anti-PD-L1 (10 mg/kg, (Q3Dx2; 3 descanso)x4, n=10)
- Grupo 4: AEB1102 + Ab anti-PD-L1 (3 mg/kg + 10 mg/kg, Q7D4 + (Q3Dx2; 3 descanso)x4, n=15)

FIG. 4

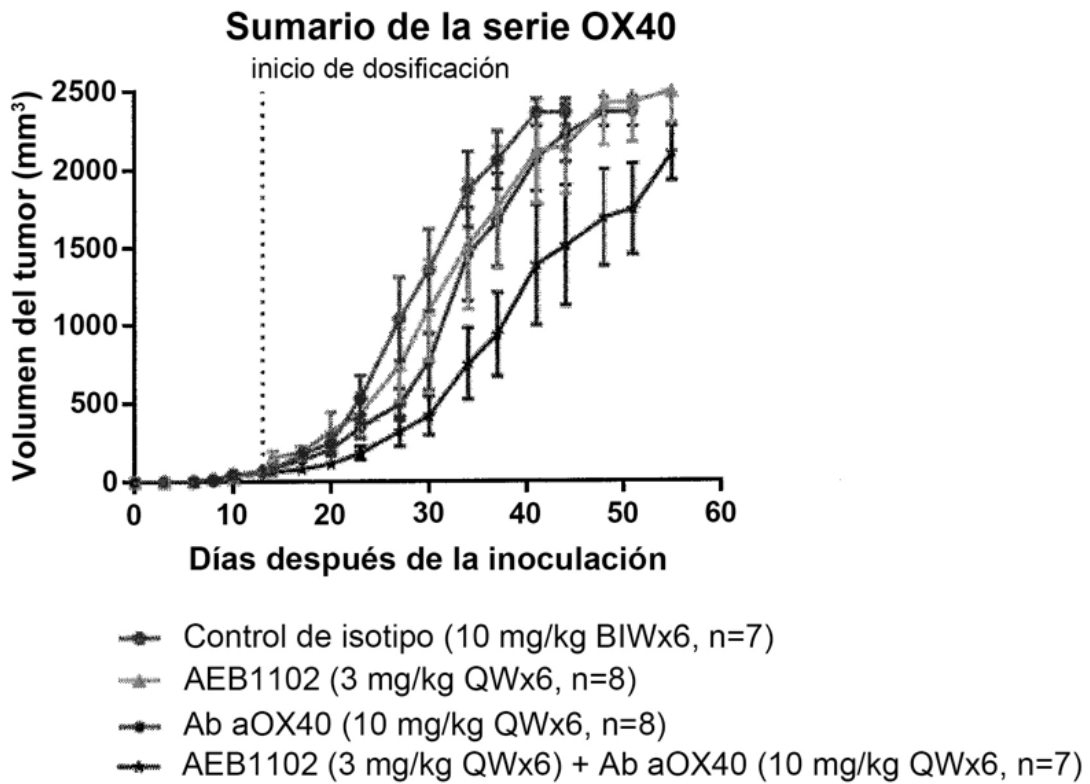


FIG. 5

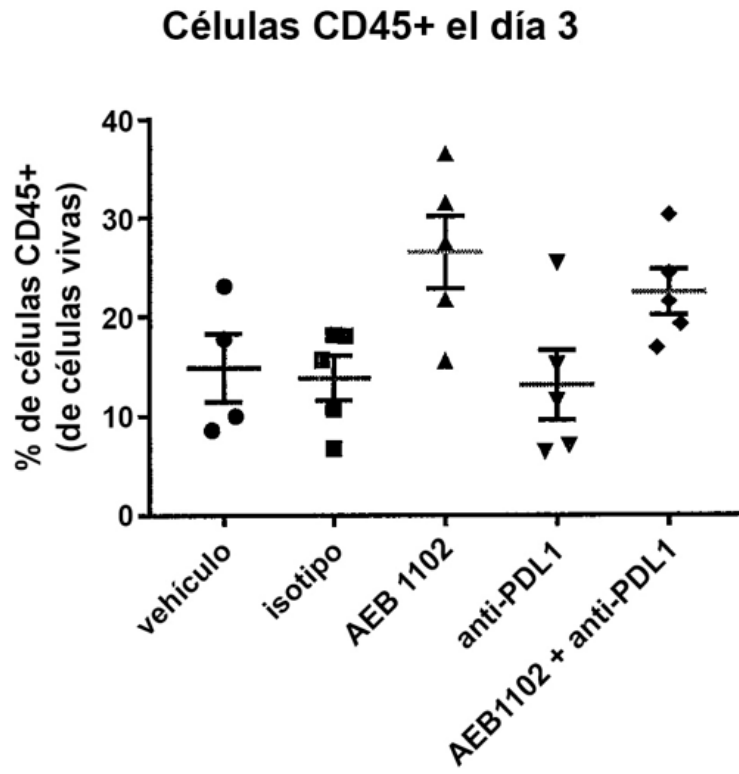


FIG. 6

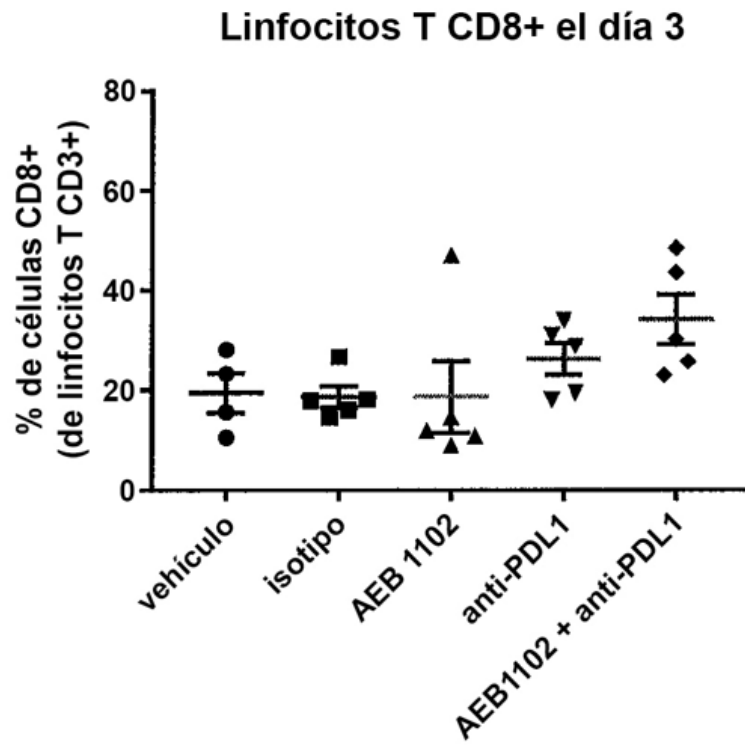


FIG. 7