



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 987 380**

⑫ Int. Cl.:

C12N 9/14 (2006.01)
A61K 35/14 (2015.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 35/17 (2015.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015 PCT/US2015/047475**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16033488**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015 E 15834988 (6)**

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3186371**

④ Título: **Administración de enzimas de depleción de la quinurenina para la terapia tumoral**

⑩ Prioridad:

29.08.2014 US 201462043663 P
25.02.2015 US 201562120418 P

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2024

⑦ Titular/es:

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US

⑦ Inventor/es:

GEORGIOU, GEORGE;
STONE, EVERETT;
MARSHALL, NICHOLAS;
BLAZECK, JOHN y
LU, WEI-CHENG

⑦ Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 987 380 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

Administración de enzimas de depleción de la quinurenina para la terapia tumoral

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente US n.º 62/120.418, presentada el 25 de febrero de 2015y de la solicitud provisional de patente US n.º 62/043.663, presentada el 29 de agosto de 2014.

10 Antecedentes de la invención

La invención se llevó a cabo con el apoyo gubernamental bajo la subvención n.º R01 CA154754 otorgada por el National Institutes of Health. El gobierno posee determinados derechos en la invención.

15 Campo de la invención

La invención se refiere de manera general a composiciones y a su utilización en métodos para el tratamiento del cáncer con enzimas que deplecionan la L-quinurenina o la L-3-hidroxiquinurenina. Más particularmente, se refiere a la ingeniería, optimización farmacológica y utilización de enzimas de mamíferos con actividad de degradación de la L-quinurenina adecuada para la terapia humana.

20 Descripción de la técnica relacionada

La sobreexpresión de las isoformas de indolamín-2,3-dioxigenasa (IDO1 o IDO2) por las células cancerosas o la reprogramación de leucocitos infiltrantes de cáncer para expresar cualquiera de estos enzimas ha mostrado tener un efecto profundo sobre la atenuación de las respuestas inmunitarias adaptativas contra el cáncer. IDO1 e IDO2, así como el enzima triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO, por sus siglas en inglés), cuya expresión por las células estromales puede ser inducida por algunos tumores, catalizan la etapa limitante de la velocidad del catabolismo del triptófano (Trp) en L-quinurenina (KYN) (Godin-Ethier *et al.*, 2011). Los tumores intercambian una molécula citosólica de KYN por una molécula extracelular de Trp utilizando un intercambiador de aminoácidos similar a LAT1 (Kaper *et al.*, 2007), que presenta el doble efecto sobre las células inmunitarias de elevar localmente los niveles de KYN y reducir localmente los niveles de Trp. Las células inmunitarias vecinas internalizan KYN, en donde es un ligando activador para el receptor de hidrocarburos arílicos (RAH) que resulta en la expresión de numerosas citoquinas y quimoquinas que conducen a la tolerancia tumoral a través de la diferenciación de células inmunitarias y/o la inducción de apoptosis (Della Chiesa *et al.*, 2006; Opitz *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011). Además, otros compuestos relacionados con KYN formados a partir de quinurenina, especialmente el ácido quinurénico, también ejercen un efecto inmunosupresor al servir como agonistas del receptor GPCR huérfano GPCR35. La inhibición de la formación de KYN (y, por lo tanto, la inhibición de la formación de subproductos del metabolismo de KYN, incluyendo el ácido quinurénico, 3-hidroxiquinurenina y ácido quinolínico, mediante la inhibición de IDO1 o TDO ha recibido una cantidad significativa de atención como diana de cáncer (Chen y Guillemin, 2009; Rutella *et al.*, 2009; Prendergast, 2011). Se han desarrollado inhibidores de análogos del sustrato, tales como 1-DL-metiltriptófano, para IDO1 e inicialmente han mostrado ser prometedores para superar la tolerancia tumoral inducida por el cáncer, restaurando de esta manera la capacidad del sistema inmunitario nativo para combatir los tumores (Lob *et al.*, 2009). Sin embargo, KYN también es producido por la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), que también se expresa con frecuencia en tumores y este enzima no resulta inhibido por 1-DL-metiltriptófano (Pilotte *et al.*, 2012). También hay preocupaciones adicionales con el isómero D del 1-DL-metiltriptófano (1-D-MT) actualmente en ensayos clínicos de fases 1 y 2. Paradójicamente, 1-D-MT puede regular positivamente la expresión de IDO1, de hecho *incrementando* los niveles de KYN e induciendo la inmunosupresión en determinados cánceres (Opitz *et al.*, 2011).

50 El control de la producción tumoral de KYN es el foco de muchas investigaciones y tiene el potencial de tratar, entre otros, cánceres, tales como el cáncer de mama, ovárico, glioblastoma y carcinoma pancreático. Es conocido que KYN suprime la proliferación, además de inducir la apoptosis en las células T y las células NK (Opitz *et al.*, 2011; Mandi y Vacsei, 2012), lo que permite a los tumores evadir la detección y destrucción por el sistema inmunitario del paciente. KYN es un potente ligando del receptor de hidrocarburos arílicos (RAH) cuya activación en las células T induce la diferenciación en células T reguladoras (Treg) CD25⁺FoxP3⁺ (Mezrich *et al.*, 2010). También se ha mostrado que KYN impide la regulación positiva mediada por citoquinas de receptores específicos (NKp46 y NKG2D) necesarios para la eliminación de líneas celulares tumorales mediada por células NK (Della Chiesa *et al.*, 2006), una acción que también está mediada probablemente por su efecto agonista sobre el RAH (Shin *et al.*, 2013). También hay pruebas clínicas que relacionan los niveles elevados de KYN en suero con una reducción de la supervivencia en múltiples tipos de cáncer. En pacientes sanos, los niveles de KYN en el suero están comprendidos en el intervalo de 0,5 a 1 µM. En los pacientes con tipos de cáncer que producen KYN, tales como el linfoma difuso de células B grandes, se midieron niveles séricos de KYN hasta 10 veces más altos (Yoshikawa *et al.*, 2010; De Jong *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2011) y eran pronósticos de supervivencia entre pacientes con linfoma que recibían el mismo régimen de tratamiento; aquellos con niveles séricos inferiores a 1,5 µM mostraron una tasa de supervivencia a 3 años de 89 %, en comparación con solo 58 % de supervivencia en aquellos con niveles de KYN superiores a 1,5 µM. Esta diferencia en la supervivencia se atribuyó a los efectos inmunosupresores de KYN (Yoshikawa *et al.*, 2010). La utilización de inhibidores de IDO de molécula pequeña, tales como 1-D-MT, ha demostrado utilidad en el control de los niveles de KYN para restaurar la

función inmune, aunque los efectos fuera de diana de la regulación positiva de IDO1 por 1-D-MT y la falta de inhibición de TDO y la isoforma IDO1 son motivo de preocupación.

La presente invención da a conocer la utilización de enzimas para la depleción específica de KYN y sus metabolitos en tumores y/o en sangre. Los enzimas de depleción de KYN se utilizan para reducir las concentraciones de KYN para el tratamiento de tumores que expresan IDO1, IDO2 o TDO, impidiendo de esta manera los efectos tolerogénicos mediados por tumores y, por el contrario, mediando las respuestas proinflamatorias de destrucción de tumores. En particular, la utilización de enzimas para la depleción de KYN y los subproductos metabólicos de KYN evita los problemas asociados a los inhibidores de molécula pequeña de isoformas IDO y TDO comentados anteriormente y además evita completamente los efectos fuera de diana que suelen acompañar muy habitualmente a los fármacos de molécula pequeña y que conducen a toxicidades y efectos secundarios imprevistos.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. La exposición referida a materia no comprendida en las reivindicaciones se proporciona a título de referencia. Algunos aspectos de la presente invención superan una deficiencia importante de la técnica al proporcionar enzimas que comprenden secuencias de polipéptidos de mamíferos capaces de degradar la L-quinurenina y la 3-hidroxi-L-quinurenina y que muestran una farmacocinética favorable en suero tal como se desea para el tratamiento del cáncer. En algunos aspectos, el enzima quinureninasa presenta mayor actividad catalítica hacia la quinurenina que hacia la 3OH-quinurenina. Se puede utilizar una quinureninasa de una especie bacteriana. Dicho enzima puede presentar una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID n.º: 7 y n.º 13 a n.º 52 o una versión modificada de los mismos. En particular, el terapéutico puede derivarse a partir del enzima de *Pseudomonas fluorescens*, quinureninasa (*Pf-KYNU*). Alternativamente, se puede utilizar una quinureninasa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Neurospora crassa*. El tratamiento puede derivarse del enzima quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis*. Además, para evitar los efectos adversos debidos a la inmunogenicidad de las quinureninasas heterólogas, se puede utilizar el enzima de *Homo sapiens* u otras quinureninasas de primates que muestran una identidad de secuencia > 95 % respecto al enzima humano. Por ejemplo, un enzima nuevo puede presentar una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID n.º 7 a n.º 9.

En otros aspectos, se proporcionan polipéptidos que comprenden una quinureninasa humana modificada capaz de degradar KYN y que presenta actividad de degradación de la 3-hidroxquinurenina o del ácido quinurénico. En algunas realizaciones, los polipéptidos son capaces de degradar KYN bajo condiciones fisiológicas. Por ejemplo, los polipéptidos presentan una eficiencia catalítica para KYN (k_{cat}/K_M) de por lo menos o aproximadamente igual a 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10^4 , 10^5 , 10^6 M⁻¹s⁻¹ o cualquier intervalo derivable de los mismos.

Un polipéptido modificado de la exposición, que no forma parte de la invención, puede caracterizarse por presentar un determinado porcentaje de identidad en comparación con un polipéptido no modificado (p. ej., un polipéptido nativo) o con cualquier secuencia polipeptídica dada a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, el polipéptido no modificado puede incluir por lo menos, o hasta, aproximadamente 150, 200, 250, 300, 350, 400 residuos (o cualquier intervalo derivable a partir de ellos) de una quinureninasa nativa. El porcentaje de identidad puede ser igual a aproximadamente, como máximo o como mínimo, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (o cualquier intervalo derivable a partir de ellos) entre los polipéptidos modificados y no modificados, o entre dos secuencias cualesquiera en la comparación. También se encuentra contemplado que el porcentaje de identidad comentado anteriormente puede estar relacionado con una región modificada particular de un polipéptido en comparación con una región no modificada de un polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido puede contener un sitio de reconocimiento de sustrato modificado o mutante de una quinureninasa que puede caracterizarse sobre la base de la identidad de la secuencia de aminoácidos del sitio de reconocimiento de sustrato modificado o mutante de la quinureninasa a la de una quinureninasa no modificada o mutante de la misma especie o entre especies. Un polipéptido humano modificado o mutante caracterizado, por ejemplo, por presentar por lo menos 90 % de identidad respecto a una quinureninasa no modificada significa que por lo menos el 90 % de los aminoácidos en ese polipéptido humano modificado o mutante son idénticos a los aminoácidos en el polipéptido no modificado.

Dicho polipéptido no modificado puede ser una quinureninasa nativa, particularmente una isoforma humana u otras isoformas de primate. La quinureninasa humana nativa puede presentar la secuencia SEC ID n.º 8. Entre los ejemplos no limitativos, que no forman parte de la invención, de otras quinureninasas de primate nativas se incluyen la quinureninasa de *Pongo abelii* (Genbank ID: XP_009235962.1, GI: 686708656, SEC ID n.º 10), la quinureninasa de *Macaca fascicularis* (Genbank ID: EHH54849.1, GI: 355750522, SEC ID n.º 11), y la quinureninasa de *Pan troglodytes* (Genbank ID: XP_003309314.1, GI: 332814521, SEC ID n.º 12). Entre los polipéptidos nativos de ejemplo se incluyen una secuencia que presenta, como máximo o como mínimo 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad (o cualquier intervalo derivable a partir de ellos) de SEC ID n.º 8 o n.º 10 a n.º 12 o un fragmento de los mismos. Por ejemplo, el polipéptido nativo puede comprender por lo menos o hasta aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 415 residuos (o cualquier intervalo derivable a partir de ellos) de la secuencia SEC ID n.º 8 o n.º 10 a n.º 12.

La quinureninasa nativa, que no forma parte de la invención, puede modificarse con una o más modificaciones, tales como modificaciones químicas, sustituciones, inserciones, delecciones y/o truncamientos. Por ejemplo, las modificaciones están en un sitio de reconocimiento de sustrato del enzima nativo. En el contexto de la presente invención, la quinureninasa nativa se modifica mediante sustituciones. Por ejemplo, el número de sustituciones puede ser dos, tres, cuatro o mayor. La quinureninasa nativa puede modificarse en el sitio de reconocimiento del sustrato o en cualquier ubicación que pueda afectar a la especificidad de sustrato. En un primer aspecto, la invención se refiere a un enzima quinureninasa humana aislada y modificada, en la que el enzima modificado presenta sustituciones respecto a la quinureninasa humana nativa (ver la SEC ID n.º 8), donde las sustituciones están en las posiciones definidas en las reivindicaciones.

Se da a conocer, además, un enzima quinureninasa humano aislado y modificado, en el que el enzima modificado presenta por lo menos una sustitución respecto a la quinureninasa humana nativa (ver la SEC ID n.º 8), y donde por lo menos una sustitución incluye una sustitución de Met o Leu para un Phe normalmente presente en la posición 306 de la quinureninasa humana nativa. De esta manera, se puede proporcionar un enzima quinureninasa humano aislado y modificado que comprende una sustitución Phe306Met. Además, puede proporcionarse un enzima quinureninasa humano aislado y modificado que comprenda una sustitución Phe306Leu.

Se da a conocer, además, un enzima quinureninasa humana aislada y modificada, en donde el enzima modificado presenta por lo menos una sustitución respecto a la quinureninasa humana nativa (ver la SEC ID n.º 8), y en el que la sustitución o sustituciones incluyen una sustitución en por lo menos la posición de aminoácido H41, L59, F71, A98, A99, G101, H102, I110, G112, M120, K121, D122, I131, N135, A136, T138, H142, F148, F149, K157, S167, A171, Q175, Q229, N232, G248, F249, E259, W272, S274, A282, I285, G287, A288, P300, V303, F306, L320, L322, S332, N333, P334, L337, V339, T404, I405, S408, o A436 respecto a la SEC ID n.º 8. También se dan a conocer las sustituciones en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) A99, F306, y A436; (b) A99, G112, F306, L337, I405, S408; (c) G112, F306, L337, y I405; (d) A99, T138, F306, y A436; (e) A99, G112, F306, V339, I405, y S408; (f) A99 y F306; (g) F306, L337, V339, I405, y S408; (h) G112, F306, V339, y I405; (i) G112, F306, V339, S408; (k) F71, A99, G112, T138, F306, L337, V339, I405, S408, y A436; (l) A99, G112, F306, L337, V339, I405, y S408; (m) A436; (n) A99, G112, T138, V339, y I405; (p) A99, G112, F306, I405, S408, y A436; (q) F71, A99, I131, F249, y L322; (r) A99, I131, F249, E259, y F306; (s) F71, A99, y E259; (t) F71, A99, S167, y E259; (u) I131, F249, y S274; (v) L59, G112, F306, V339, I405, y S408; (w) I110 y F306; (x) A99, I131, F249, y E259; (y) F71, E259, y L322; (z) H41, Q175, y A436; (a') A99, I131, y F249; (b') I131 y F249; (c') T138 y A436; (d') T138; (e') F71, A99, I131, E259, y V303; (f) A99, G112, F306, V339, I405, y S408; (g') F71, A99, I131, E259, y A282; (h') F71, F249, E259, y V303; (i') I110; y (j') F306. También se dan a conocer las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) A99S, F306L, y A436T; (b) A99V, G112A, F306Y, L337V, 1405L, S408N; (c) G112A, F306Y, L337V, y I405L; (d) A99S, T138S, F306L, y A436T; (e) A99V, G112A, F306Y, V339A, I405L, y S408N; (f) A99S y F306L; (g) F3061, L337V, V3391, I405F, y S408T; (h) G112A, F306Y, V339M, y I405L; (i) G112S, F306L, V339T, S408T; (j) G112A, F306Y, V339S, I405L; (k) F71L, A991, G112A, T138S, F306Y, L337V, V339I, I405L, S408N, y A436T; (l) A99V, G112A, F306Y, L337V, V339I, I405F, y S408N; (m) A436T; (n) A99V, G112A, T138S, V339A, y I405F; (o) G112S, F306Y, V339T, y I405L; (p) A991, G112A, F306Y, I405L, S408N, y A436T; (q) F71L, A991, I131V, F249W, y L322P; (r) A991, I131V, F249W, E259P, y F306L; (s) F71L, A991, y E259P; (t) F71L, A991, S167T, y E259P; (u) I131M, F249W, y S274G; (v) L59M, G112S, F306Y, V339A, I405L, y S408N; (w) I110L y F306L; (x) A991, I131V, F249W, y E259P; (y) F71L, E259P, y L322P; (z) H41R, Q175L, y A436T; (a') A991, I131V, y F249W; (b') I131V y F249W; (c') T138S y A436T; (d') T138S; (e') F71L, A991, I131V, E259P, y V303S; (f) A99F, G112A, F306Y, V339A, I405L, y S408N; (g') F71L, A991, I131V, E259P, y A282P; (h') F71L, F249W, E259P, y V303S; (i') I110L; y (j') F306Y. Se da a conocer, además, un enzima quinureninasa que comprende una de las sustituciones de aminoácidos anteriores o una combinación de sustituciones y además comprende no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos adicionales. En la presente memoria se da a conocer, además, un enzima quinureninasa humana aislada y modificado que presenta una secuencia según cualquiera de las SEC ID n.º 55, n.º 56 y n.º 58 a n.º 93.

La presente invención contempla, además, polipéptidos que comprenden una quinureninasa ligada a una secuencia de aminoácidos heteróloga. Por ejemplo, la quinureninasa puede estar ligada a la secuencia de aminoácidos heteróloga en forma de una proteína de fusión. En una realización particular, la quinureninasa está ligada a secuencias de aminoácidos, tales como una Fc de IgG, albúmina, una proteína de unión a albúmina o un polipéptido XTN para incrementar la semivida *in vivo*.

Para incrementar la estabilidad en suero, la quinureninasa puede ligarse a una o más moléculas de poliéter. En una realización particular, el poliéter es polietilenglicol (PEG). El polipéptido puede unirse (p. ej., covalentemente) a PEG mediante residuos de aminoácidos específicos, tales como lisina o cisteína. Para la administración terapéutica, dicho polipéptido que comprende la quinureninasa puede dispersarse en un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos, se encuentra contemplado un ácido nucleico codificante de dicha quinureninasa. En algunas realizaciones, los codones del ácido nucleico han sido optimizados para la expresión en bacterias. En realizaciones particulares, las bacterias son *E. coli*. En otros aspectos, el ácido nucleico ha sido optimizado para la expresión en hongos (p. ej., levaduras), insectos o mamíferos. La presente invención contempla, además, vectores, tales como los vectores de expresión, que contienen ácidos nucleicos que codifican enzimas quinureninas humanas según el primer aspecto de la presente invención. En realizaciones particulares, el ácido nucleico codificante de la

quinureninasa está ligado operablemente a un promotor, incluyendo, aunque sin limitación, promotores heterólogos. En una realización, se entrega una quinureninasa en una célula diana mediante un vector (p. ej., un vector de terapia génica). Dichos virus pueden haber sido modificados mediante tecnología de ADN recombinante para permitir la expresión del ácido nucleico codificante de quinureninasa en la célula diana. Dichos vectores pueden derivarse de vectores de origen no vírico (p. ej., plásmidos) o vírico (p. ej., adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus, virus herpes o virus vaccinia). Los vectores no víricos se complejan preferentemente con agentes para facilitar la entrada del ADN a través de la membrana celular. Entre los ejemplos de dichos complejos de vector no vírico se incluyen la formulación con agentes poliactiónicos que facilitan la condensación del ADN y los sistemas de administración basados en lípidos. Un ejemplo de un sistema de administración basado en lípidos incluiría la entrega basada en liposomas de ácidos nucleicos.

En aspectos todavía adicionales, la presente invención contempla además células huésped que comprenden dichos vectores. Las células huésped pueden ser bacterias (p. ej., *E. coli*), células fúngicas (p. ej., levaduras), células de insecto o células de mamífero.

En algunas realizaciones, los vectores se introducen en las células huésped para expresar la quinureninasa. Las proteínas pueden expresarse de cualquier manera adecuada. En una realización, las proteínas se expresan en una célula huésped de tal manera que la proteína es glicosilada. En otra realización, las proteínas se expresan en una célula huésped de tal manera que la proteína es aglicosilada.

Un aspecto de la presente invención contempla, además, composiciones para la utilización en el tratamiento de un sujeto con cáncer mediante la administración del péptido quinureninasa, o la formulación de la presente invención. El sujeto puede ser cualquier animal, tal como un ratón. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero, particularmente un primate, y más particularmente un paciente humano. En algunas realizaciones, el método puede consistir en seleccionar a un paciente con cáncer.

En algunas realizaciones, el cáncer es cualquier cáncer que sea sensible a la depleción de quinurenina. En una realización, la presente invención contempla una composición que comprende una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido del primer aspecto de la invención para la utilización en un método de tratamiento de un sujeto que presenta un tumor. En algunas realizaciones, la administración ocurre bajo condiciones tales que por lo menos una parte de las células del cáncer resulta eliminada. En otra realización, la formulación comprende una quinureninasa con actividad que degrada la quinurenina bajo condiciones fisiológicas y que comprende, además, una cadena de polietilenglicol unida. En alguna realización, la formulación es una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las quinureninasas comentadas anteriormente y excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por el experto en la materia. Todas las quinureninasas anteriormente indicadas pueden contemplarse como útiles para la terapia humana.

En una realización adicional, también puede proporcionarse una composición para la utilización en un método de tratamiento de una célula tumoral, que comprende administrar dicha composición que comprende una formulación farmacéutica que comprende una quinureninasa no bacteriana (de mamífero, p. ej., de primate o ratón) que presenta actividad de degradación de la quinurenina o de un ácido nucleico codificante de la misma.

La administración o el tratamiento pueden dirigirse a la fuente de los nutrientes para las células, y no necesariamente a las células mismas. Por lo tanto, en una aplicación *in vivo*, el tratamiento de una célula tumoral incluye poner en contacto el medio nutritivo para una población de células tumorales con la quinureninasa. En la presente realización, el medio puede ser sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y líquidos corporales similares en donde se desea la depleción de quinurenina.

Dicha formulación que contiene quinureninasa puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intrasinovial, intratraqueal, intranasal, intravítreal, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesical, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, por inhalación, infusión, infusión continua, perfusión localizada, mediante un catéter, mediante lavado, en composiciones lipídicas (p. ej., liposomas), o mediante cualquier otro método o cualquier combinación de los anteriores, tal como sería conocido por el experto habitual en la materia.

En una realización adicional, el método puede comprender, además, la administración de por lo menos una segunda terapia anticáncer al sujeto. La segunda terapia anticáncer puede ser una terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o terapia con citoquinas. En determinados aspectos, la segunda terapia anticáncer puede ser un anticuerpo anti-PD-1, anti-CTLA-4 o anti-PD-L1.

En alguna realización, se contempla la utilización de una célula que comprende un receptor de antígeno químérico (CAR, por sus siglas en inglés) y un enzima quinureninasa en el tratamiento de un sujeto con cáncer. En algunos aspectos, la célula puede ser transfundida con un ADN que codifica el CAR y la quinureninasa y, en algunos casos, una transposasa.

5 El CAR puede presentar como diana cualquier antígeno de células cancerosas de interés, incluyendo, por ejemplo, HER2, CD19, CD20 y GD2. Las regiones o dominio de unión a antígeno pueden comprender un fragmento de las cadenas V_H y V_L de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal humano particular, tal como los descritos en la patente US n.º 7.109.304. El fragmento puede ser, además, cualquier número de diferentes dominios de unión a antígeno de un anticuerpo específico de antígeno humano. Se da a conocer, además, un fragmento que es un scFv específico de antígeno codificado por una secuencia que está optimizada para la utilización de codones humanos para la expresión en células humanas. Para ejemplos adicionales de CAR, ver, por ejemplo, los documentos n.º WO 2012/031744, n.º WO 2012/079000 y n.º WO 2013/059593, y la patente US n.º 8.465.743.

10 La quinureninasa puede ser cualquier quinureninasa dada a conocer en la presente memoria. Los métodos de transfección de células son bien conocidos de la técnica, aunque en determinados aspectos se utilizan métodos de transfección altamente eficientes, tales como la electroporación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden introducirse en las células usando un aparato de nucleofección. Preferentemente, la etapa de transfección no implica infectar o transducir las células con virus, que puede causar genotoxicidad y/o comportar una respuesta inmunitaria contra las células que contienen secuencias víricas en el sujeto tratado.

15 20 Se conoce de la técnica un amplio abanico de constructos y vectores de expresión de CAR para ello y se detallan más a fondo en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el vector de expresión de CAR es un vector de expresión de ADN, tal como un plásmido, vector de expresión lineal o un episoma. El vector puede comprender secuencias adicionales, tales como secuencias que facilitan la expresión de CAR, tal como un promotor, intensificador, señal poli-A y/o uno o más intrones. En una realización, la secuencia codificante de CAR está flanqueada por secuencias de transposición, de modo que la presencia de una transposasa permite que la secuencia codificante se integre en el genoma de la célula transfectada.

25 30 Las células pueden ser transfectadas con una transposasa que facilita la integración de una secuencia codificante de CAR en el genoma de las células transfectadas. En algunas realizaciones, la transposasa se proporciona en forma de vector de expresión de ADN. Sin embargo, en realizaciones preferentes, la transposasa se proporciona en forma de un ARN expresable o una proteína de tal manera que la expresión a largo plazo de la transposasa no ocurra en las células transgénicas. Puede utilizarse cualquier sistema de transposasa de acuerdo con las realizaciones. En otras realizaciones, las células pueden infectarse con un lentivirus para facilitar la integración de la secuencia codificante de CAR y la secuencia codificante de quinureninasa en el genoma de la célula.

35 40 Se proporciona una composición que comprende una quinureninasa o un ácido nucleico codificante de una quinureninasa para la utilización en un método de tratamiento de un sujeto que presenta un tumor. Se da a conocer, además, la utilización de una quinureninasa o un ácido nucleico codificante de una quinureninasa en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un tumor. Dicha quinureninasa puede ser cualquier quinureninasa según las reivindicaciones.

45 Las realizaciones comentadas en el contexto de los métodos y/o composiciones de la invención pueden utilizarse con respecto a cualquier otro método o composición descrito en la presente memoria. De esta manera, una realización referente a un método o composición también puede aplicarse a otros métodos y composiciones de la invención.

50 55 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "codifica" o "codificante", en referencia a un ácido nucleico, se utilizan para hacer que la invención resulte fácilmente comprensible para el experto en la materia; sin embargo, estos términos pueden usarse indistintamente con "comprende" o "que comprende", respectivamente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el artículo "un" o "una" puede referirse a uno o a más de uno. Tal como se utiliza en la presente memoria, en la reivindicación o reivindicaciones, cuando se utiliza junto con la expresión "que comprende", los términos "un" o "una" pueden referirse a uno o más de uno.

60 65 La utilización del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para referirse a "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o a que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la exposición incluye una definición que se refiere únicamente a alternativas e "y/o". Tal como se usa en la presente memoria, "otro" puede referirse a por lo menos un segundo elemento o más elementos.

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

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. La materia no comprendida en las reivindicaciones se proporciona a título de referencia.

65 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen con el fin de mostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede ser mejor entendida en referencia a uno o más de dichos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentada en la presente memoria. Las figuras referidas a materia no comprendida en las reivindicaciones se proporcionan a título de referencia.

5 FIG. 1 - SDS-PAGE de (carril 1) patrón de peso molecular (PM) PRECISION PLUS PROTEIN™ (BioRad) (carriles 2 a 4) aumentando las concentraciones de *Pf*-KYNU y (carril 5) *Pf*-KYNU modificado con PEG de PM 5.000.

10 FIG. 2 - Estabilidad de *Pf*-KYNU en PBS (cuadrados blancos) y suero humano agrupado (círculos blancos).

15 FIG. 3 - Eficacia de PEG-*Pf*-KYNU en un modelo de melanoma autólogo B16 en el ratón medido por las tasas de crecimiento tumoral. (Cuadrados negros) PEG-*Pf*-KYNU inactivado por calor. (Círculos negros) PEG-*Pf*-KYNU activo.

20 FIG. 4 - Eficacia de PEG-*Pf*-KYNU en un modelo de melanoma autólogo B16 en el ratón medido por la supervivencia. (Cuadrados negros) PEG-*Pf*-KYNU inactivado por calor. (Círculos negros) PEG-*Pf*-KYNU activo.

25 FIG. 5A-B - Ratones tratados con PEG-*Pf*-KYNU inactivado por calor. (•) Ratones tratados con PEG-*Pf*-KYNU activo. FIG. 5A - La población de células T reguladoras CD4⁺ circulantes es significativamente menor en el grupo tratado con PEG-*Pf*-KYNU activo. FIG 5B - La población de células T CD8⁺ infiltrantes tumorales muestra una expresión significativamente mayor de granzima B e interferón γ.

30 FIG. 6 - Selección genética para la actividad de quinureninasa en *E. coli*. Células de *E. coli*-ΔtrpE sembradas en placas de medio mínimo M9 con discos de papel de filtro empapados en L-Trp (Trp), tampón (-), ácido antranílico (AA) o L-Kyn (Kyn).

35 FIG. 7 - Estabilidad *in vitro* de la quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* (*Mu*-KYNU). Actividad en función del tiempo de *Mu*-KYNU (cuadrados blancos) en PBS a 37 °C con una semivida $^1T_{1/2}=6$ h con una amplitud de 74 % de actividad restante y una $^2T_{1/2}=150$ h posterior, y (círculos negros) en suero humano agrupado a 37 °C con una $^1T_{1/2}=5$ h con una amplitud de 30 % de actividad restante y posteriormente una $^2T_{1/2}=73$ h.

40 FIG. 8 - Gráfico de Kaplan-Meier de aloinjertos B16 en C57BL/6J tratados con PEG-*Pf*-KYNU (—•), PEG-*Pf*-KYNU desactivado (—••), anti-PD1 (—•••) o anti-CTLA-4 (—). Las flechas indican días de tratamiento, (A) indica el tratamiento con anticuerpos, (E) indica el tratamiento con enzima.

45 FIG. 9A-C - FIG. 9A - C57BL/6J con aloinjertos tumorales B16 tratados con PBS (círculos) (control), anti-PD1 solo (cuadrados), anti-PD1/PEG-*Mu*-KYNU (triángulos invertidos) o anti-PD1/PEG-*Pf*-KYNU (triángulos hacia arriba). FIG. 9B - Se observaron efectos aditivos, en donde el tratamiento de combinación de anti-PD1/PEG-*Pf*-KYNU eliminó el 60 % de los tumores y la combinación anti-PD1/PEG-*Mu*-KYNU eliminó el 20 % de los tumores, en comparación con una eliminación tumoral de 0 % con anti-PD1 solo. FIG. 9C - Gráfico de Kaplan-Meier correspondiente.

50 FIG. 10A-B - FIG. 10A - C57BL/6J portadores de aloinjertos tumorales B16 tratados con PEG-*Mu*-KYNU inactivados por calor (■) o PEG-*Mu*-KYNU activos (▲). FIG. 10B - Gráfico de Kaplan-Meier correspondiente que representa la mediana de tiempo de supervivencia de 25 días para PEG-*Mu*-KYNU (—), y la mediana de tiempo de supervivencia de 22 días para PEG-*Mu*-KYNU inactivado por calor (—). Las flechas indican días de tratamiento.

Descripción de realizaciones ilustrativas

55 La quinurenina es un metabolito del aminoácido triptófano generado mediante la acción de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). La quinurenina ejerce múltiples efectos sobre la fisiología celular, uno de los más importantes de los cuales es la modulación de las respuestas de las células T. Muchas células tumorales regulan la síntesis de IDO y/o TDO para elevar la concentración local de quinurenina, lo que se acompaña de la depleción del triptófano. Los altos niveles de quinurenina sirven como una poderosa manera de inhibir la función de las células T infiltrantes de tumor, que de otro modo atacarían el tumor.

60 La presente invención proporciona métodos para la utilización de enzimas de degradación de quinurenina como medio para reducir los niveles locales de quinurenina en el microambiente tumoral, así como en el suero, e impedir de esta manera la supresión de la acción de las células T. Los enzimas hidrolizantes de quinurenina (quinureninasas) convierten quinurenina en alanina y ácido antranílico, este último de los cuales no es conocido que afecte a la función de las células T. Los inventores han generado una preparación farmacéutica de enzima quinureninasa para permitir que el enzima persista durante períodos prolongados bajo condiciones fisiológicas. A continuación, los inventores han mostrado que la administración intratumoral de enzima resulta en un retraso drástico del crecimiento de tumores agresivos en ratones.

I. Definiciones

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y se utilizan de forma intercambiable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proteína de fusión" se refiere a una proteína químérica que contiene proteínas o fragmentos de proteína operablemente unidos de una manera no nativa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "semivida" ($\frac{1}{2}$ -vida) se refiere al tiempo que se requeriría para que la concentración de un polipéptido disminuyera a la mitad *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, después de la inyección en un mamífero.

Las expresiones "en combinación operable", "en orden operable" y "operablemente ligado" se refieren a un vínculo en el que los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar de la manera deseada, por ejemplo, un enlace de secuencias de ácidos nucleicos de tal manera que una molécula de ácido nucleico es capaz de dirigir la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de molécula de proteína deseada, o un enlace de secuencias de aminoácidos de tal manera que se produce una proteína de fusión.

El término "conector" se refiere a un compuesto o fracción que actúa como un puente molecular uniendo operablemente dos moléculas diferentes, en donde una parte del conector está ligada operablemente a una primera molécula, y en donde otra parte del conector está ligada operablemente a una segunda molécula.

El término "PEGilado" se refiere a la conjugación con polietilenglicol (PEG), que ha sido ampliamente utilizado como portador de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. El PEG puede ser acoplado (p. ej., unido covalentemente) a agentes activos a través de los grupos hidroxilo al final de la cadena de PEG mediante métodos químicos; sin embargo, el PEG en sí mismo está limitado a un máximo de dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, los copolímeros de PEG y aminoácidos han sido explorados como un nuevo biomaterial que conservaría la biocompatibilidad de PEG, pero que tendría la ventaja adicional de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando de esta manera una mayor carga de fármaco), y que puede ser diseñado sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

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

El término "nativo" se refiere a la forma típica de un gen, un producto genético o una característica de ese gen o producto genético cuando se aísla de una fuente natural. Una forma nativa es aquella que se observa con mayor frecuencia en una población natural y, por lo tanto, considerada arbitrariamente la forma normal o de tipo salvaje. Por el contrario, el término "modificado", "variante" o "mutante" se refiere a un gen o producto genético que muestra una modificación en la secuencia y las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen o producto genético nativo.

El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula donde se puede replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula excepto en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que la secuencia normalmente no se encuentra. Entre los vectores se incluyen plásmidos, cosmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (p. ej., los YAC). El experto en la materia poseerá los conocimientos para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándares (ver, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994).

La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de constructo génico que comprende un ácido nucleico codificante de un ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN a continuación se traducen en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", que se refieren a las secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante ligada operablemente en una célula huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven a otras funciones también y que se describen posteriormente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad de células y/o composición terapéutica (tal como un polinucleótido terapéutico y/o polipéptido terapéutico) que se emplea en métodos para conseguir un efecto terapéutico. La expresión "beneficio terapéutico" o "terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza a lo largo de toda la presente solicitud se refiere a cualquier cosa que promueva o mejore el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de esta afección. Lo anterior incluye, aunque sin limitación,

una reducción de la frecuencia o gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento del cáncer puede implicar, por ejemplo, una reducción del tamaño de un tumor, una reducción de la invasividad de un tumor, una reducción de la tasa de crecimiento del cáncer o la prevención de la metástasis. El tratamiento del cáncer también puede referirse a prolongar la supervivencia de un sujeto con cáncer.

5 El término " K_M " tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la constante de Michaelis-Menten para un enzima y se define como la concentración del sustrato específico a la que un enzima dado produce la mitad de su velocidad máxima en una reacción catalizada por el enzima. El término " k_{cat} " tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al número de recambio o al número de moléculas de sustrato que cada sitio enzimático convierte en producto por unidad de tiempo, y al que el enzima está trabajando a la máxima eficiencia. El término " k_{cat}/K_M " tal como se usa en la presente memoria es la constante de especificidad, que es una medida de la eficiencia con que un enzima convierte un sustrato en producto.

10 15 La expresión "receptores quiméricos de antígeno (CAR)", tal como se utiliza en la presente memoria, puede referirse a receptores artificiales de células T, receptores quiméricos de células T o inmunoreceptores quiméricos, por ejemplo, y comprende receptores modificados que injertan una especificidad artificial en una célula inmune efectora particular. Los CAR se pueden utilizar para impartir la especificidad de un anticuerpo monoclonal a una célula T, permitiendo de esta manera que se genere un gran número de células T específicas, por ejemplo, para la utilización en la terapia celular adoptiva. En realizaciones específicas, los CAR dirigen la especificidad de la célula a un antígeno asociado al tumor, por ejemplo. En algunas realizaciones, los CAR comprenden un dominio de activación intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno asociada al tumor. En particular, los CAR comprenden fusiones de fragmentos variables de cadena única (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales (tales como los descritos en la patente US n.º 7.109.304), fusionados a los dominios transmembrana y endodominiós de CD3-zeta. La especificidad de otros diseños de CAR puede derivarse de ligandos de receptores (p. ej., péptidos) o de receptores de reconocimiento de patrones, tales como las lectinas. En realizaciones particulares, las células B malignas pueden convertirse en dianas mediante redireccionamiento de la especificidad de las células T mediante la utilización de un CAR específico para la molécula del linaje B, CD19. En determinados casos, el espaciamiento del dominio de reconocimiento de antígeno puede modificarse para reducir la muerte celular inducida por activación. En determinados casos, los CAR comprenden dominios para señalización coestimulatoria adicional, tales como CD3-zeta, FcR, CD27, CD28, CD137, DAP10 y/o OX40. En algunos casos, las moléculas pueden ser expresadas conjuntamente con CAR, incluyendo moléculas coestimulatorias, genes informadores para la captación de imágenes (p. ej., para la tomografía por emisión de positrones), productos génicos que eliminan condicionalmente las células T al añadir un profármaco, receptores de dirección (en inglés, "homing"), quimioquinas, receptores de quimioquina, citoquinas y receptores de citoquinas.

20 25 30 Los términos "tratamiento" y "que trata" se refieren a la administración o aplicación de un agente terapéutico a un sujeto o la realización de un procedimiento o modalidad en un sujeto con el fin de obtener un beneficio terapéutico de una enfermedad o afección relacionada con la salud. Por ejemplo, un tratamiento puede incluir la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una quinureninasa.

35 40 Los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un ser humano o no humano, tal como primates, mamíferos y vertebrados. En realizaciones particulares, el sujeto es un ser humano.

II. Polipéptidos de quinureninasa

45 La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se refiere a una proteína o polipéptido modificado que muestra por lo menos una actividad funcional que es comparable a la de la versión no modificada, preferentemente, la actividad de degradación de quinurenina o la actividad de degradación de 3'-hidroxi-quinurenina. En aspectos adicionales, la proteína o el polipéptido puede modificarse adicionalmente para incrementar la estabilidad en suero. Por lo tanto, cuando la presente solicitud se refiere a la función o actividad de una "proteína modificada" o de un "polipéptido modificado", el experto habitual en la materia entenderá que ello incluye, por ejemplo, una proteína o polipéptido que posee una ventaja adicional sobre la proteína o polipéptido no modificado, tal como actividad de degradación de quinurenina o actividad de degradación de 3'-hidroxi-quinurenina. En determinadas realizaciones, la proteína o polipéptido no modificado es una quinureninasa nativa, preferentemente una quinureninasa humana o la quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens*. Se encuentra contemplado específicamente que las realizaciones referidas a una "proteína modificada" puedan ser implementadas con respecto a un "polipéptido modificado", y viceversa.

50 55 La determinación de la actividad puede conseguirse utilizando ensayos que resultarán familiares al experto en la materia, particularmente con respecto a la actividad de la proteína, y puede incluir, con fines de comparación, la utilización de versiones nativas y/o recombinantes de la proteína o polipéptido modificado o no modificado.

60 65 Un polipéptido modificado, tal como una quinureninasa modificada, puede identificarse basándose en el incremento de la actividad de degradación de quinurenina y/o de 3'-hidroxiquinurenina. Por ejemplo, pueden identificarse los sitios de reconocimiento de sustrato del polipéptido no modificado. Esta identificación puede basarse en el análisis estructural o en el análisis de homologías. Se puede generar una población de mutantes que impliquen modificaciones

de tales sitios de reconocimiento de sustrato. En una realización adicional, pueden seleccionarse a partir de la población mutante los mutantes con una mayor actividad de degradación de quinurenina. La selección de mutantes deseados puede incluir métodos, tales como la detección de subproductos o productos de la degradación de la quinurenina.

Las proteínas modificadas de la exposición pueden poseer delecciones y/o sustituciones de aminoácidos; de esta manera, una proteína con una delección, una proteína con una sustitución, y una proteína con una delección y una sustitución son proteínas modificadas. En algunas realizaciones, estas proteínas modificadas pueden incluir adicionalmente inserciones o aminoácidos añadidos, tales como con proteínas de fusión o proteínas con conectores, por ejemplo. Una "proteína modificada por delección" carece de uno o más residuos de la proteína nativa, pero puede poseer la especificidad y/o actividad de la proteína nativa. Una "proteína modificada por delección" también puede presentar una inmunogenicidad o antigenicidad reducida. Un ejemplo de una proteína modificada por delección es aquella en la que se ha eliminado un residuo aminoácido de por lo menos una región antigénica, es decir, una región de la proteína que se ha determinado que es antigénica en un organismo en particular, tal como el tipo de organismo al que se puede administrar la proteína modificada.

Las variantes por sustitución o reemplazo normalmente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína y pueden estar diseñadas para modular una o más propiedades del polipéptido, particularmente sus funciones efectoras y/o biodisponibilidad. Las sustituciones pueden o no ser conservadoras, es decir, un aminoácido se sustituye por uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas de la técnica y entre ellas se incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.

Además de una delección o sustitución, una proteína modificada puede poseer una inserción de residuos, lo que típicamente implica la adición de por lo menos un residuo al polipéptido. Lo anterior puede incluir la inserción de un péptido o polipéptido de reconocimiento o simplemente un solo residuo. Las adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión, se comentan posteriormente.

La expresión "equivalente biológicamente funcional" es bien entendida en la técnica y se define en mayor detalle en la presente memoria. De acuerdo con lo anterior, se incluyen secuencias que presentan entre aproximadamente 70 % y aproximadamente 80 %, o entre aproximadamente 81 % y aproximadamente 90 %, o incluso entre aproximadamente 91 % y aproximadamente 99 % de aminoácidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a los aminoácidos de un polipéptido de control, siempre que se mantenga la actividad biológica de la proteína. Una proteína modificada puede ser biológicamente equivalente funcionalmente a su contraparte nativa en determinados aspectos.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos N- o C-terminales adicionales o secuencias 5' o 3', y sin embargo seguir siendo esencialmente como se establece en una de las secuencias dadas a conocer en la presente memoria, siempre y cuando la secuencia cumpla con los criterios establecidos anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad biológica de la proteína en lo que se refiere a la expresión proteica. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a las secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las partes 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir diversas secuencias internas, es decir, intrones, que es conocido que ocurren dentro de los genes.

III. Degradación enzimática de la quinurenina para terapia

En determinados aspectos, los polipéptidos se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades, incluidos cánceres sensibles a la depleción de quinurenina, con enzimas que deplecionan la quinurenina, para impedir efectos tolerogénicos mediados por tumores y en su lugar mediar respuestas proinflamatorias de eliminación tumoral. En determinados aspectos, las quinureninasas están contempladas para la utilización en el tratamiento de tumores que expresan IDO1, IDO2 y/o TDO.

Determinados aspectos de la presente invención proporcionan una quinureninasa modificada para tratar enfermedades, tales como tumores. En particular, el polipéptido modificado puede presentar secuencias de polipéptidos humanos y, de esta manera, puede impedir reacciones alérgicas en pacientes humanos, permitir la administración repetida e incrementar la eficacia terapéutica.

Entre los tumores para los que los métodos de tratamiento actuales resultan útiles se incluyen cualquier tipo de célula maligna, tal como los que se encuentran en un tumor sólido o un tumor hematológico. Entre los tumores sólidos de ejemplo pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellos, un tumor de un órgano seleccionado del grupo que consiste en páncreas, colon, ciego, estómago, cerebro, cabeza, cuello, ovario, riñón, laringe, sarcoma, pulmón, vejiga, melanoma, próstata y mama. Entre los tumores hematológicos de ejemplo se incluyen tumores de la médula ósea, neoplasias de células T o B, leucemias, linfomas, blastomas, mielomas y similares. Entre los ejemplos adicionales de

cánceres que pueden tratarse utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluido cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluidos cáncer gastrointestinal y tumor estromal gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, así como linfoma de células B (incluyendo linfoma no Hodgkin (LNH) de grado bajo/folicular; linfoma linfocítico pequeño (LLP); linfoma folicular de grado intermedio; linfoma difuso de grado intermedio; linfoma inmunoblástico de grado alto; linfoma linfoblástico de grado alto; linfoma de células pequeñas no hendiditas de grado alto; LNH con enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia de células pilosas, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloblástica crónica.

El cáncer puede ser específicamente de los siguientes tipos histológicos, aunque sin limitación, neoplasia, maligna, carcinoma, carcinoma indiferenciado, carcinoma de células gigantes y fusiformes, carcinoma de células pequeñas, carcinoma papilar, carcinoma de células escamosas, carcinoma linfoepitelial, carcinoma de células basales, carcinoma pilomatricial, carcinoma de células de transición, carcinoma de células de transición papilar, adenocarcinoma, gastrinoma, maligno, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma hepatocelular combinado y colangiocarcinoma, adenocarcinoma trabecular, carcinoma adenoide quístico, adenocarcinoma en pólipo adenomatoso, adenocarcinoma, poliposis colónica familiar, carcinoma sólido, tumor carcinoide maligno, adenocarcinoma bronquioalveolar, adenocarcinoma papilar, carcinoma cromófobo, carcinoma acidófilo, adenocarcinoma oxifílico, carcinoma basófilo, adenocarcinoma de células claras, carcinoma de células granulares, adenocarcinoma folicular, adenocarcinoma papilar y folicular, carcinoma esclerosante no encapsulante, carcinoma cortical suprarrenal, carcinoma endometriode, carcinoma de apéndices cutáneos, adenocarcinoma apocrino, adenocarcinoma sebáceo, adenocarcinoma ceruminoso, carcinoma mucoepidermoide, cistadenocarcinoma, cistadenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma papilar seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células en anillo de sella, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma medular, carcinoma lobulillar, carcinoma inflamatorio, enfermedad de Paget, mamario; carcinoma de células acinares, carcinoma adenoscamoso, adenocarcinoma con metaplasia escamosa, timoma maligno, tumor estromal ovárico maligno, tecoma maligno, tumor de células de la granulosa maligno, androblastoma maligno, carcinoma de células de Sertoli, tumor de células de Leydig maligno, tumor de células lipídicas maligno, paraganglioma maligno, paraganglioma extramamario maligno, feocromocitoma, glomangiosarcoma, melanoma maligno, melanoma amelanótico, melanoma de extensión superficial, melanoma maligno en nevus gigante pigmentado, melanoma de células epiteloides, nevus azul maligno, sarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, mixosarcoma, liposarcoma, leiomiosarcoma, rhabdomiosarcoma, rhabdomiosarcoma embrionario, rhabdomiosarcoma alveolar, sarcoma estromal, tumor mixto maligno, tumor mixto Mülleriano, nefroblastoma, hepatoblastoma, carcinosarcoma, mesenquimoma maligno, tumor de Brenner maligno, tumor filodes maligno, sarcoma sinovial, mesotelioma maligno, disgerminoma, carcinoma embrionario, teratoma maligno, *struma ovarii* maligno, coriocarcinoma, mesonefroma maligno, hemangiosarcoma, hemangioendotelioma maligno, sarcoma de Kaposi, hemangiopericitoma maligno, linfangiosarcoma, osteosarcoma, osteosarcoma yuxtacortical, condrosarcoma, condroblastoma maligno, condrosarcoma mesenquimatoso, tumor de células gigantes de hueso, sarcoma de Ewing, tumor odontogénico maligno, odontosarcoma ameloblastico, ameloblastoma maligno, fibrosarcoma ameloblastico, pinealoma maligno, cordoma, glioma, maligno, ependimoma, astrocitoma, astrocitoma protoplásmico, astrocitoma fibrilar, astroblastoma, glioblastoma, oligodendrogioma, oligodendroblastoma, neuroectodérmico primitivo, sarcoma cerebelar, ganglioneuroblastoma, neuroblastoma, retinoblastoma, tumor neurogénico olfatorio, meningioma maligno, neurofibrosarcoma, neurilemoma maligno, tumor de células granulares maligno, linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, Hodgkin, paragranuloma, linfoma maligno, linfocítico pequeño, linfoma maligno de células grandes difusas, linfoma maligno folicular, micosis fungoide, otros linfomas no Hodgkin especificados, histiocitosis maligna, mieloma múltiple, sarcoma de células mastoides, enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado, leucemia, leucemia linfóide, leucemia de células plasmáticas, eritroleucemia, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia mieloide, leucemia basofílica, leucemia eosinofílica, leucemia monocítica, leucemia de células mastoides, leucemia megacarioblástica, sarcoma mieloide, y leucemia de células pilosas.

La quinureninasa puede utilizarse en la presente memoria como agente antitumoral en una variedad de modalidades para deplecionar la quinurenina y/o la 3'-hidroxiquinurenina del tejido tumoral, o la circulación de un mamífero con cáncer, o para la deplección de la quinurenina cuando su deplección se considere deseable.

El deplección puede llevarse a cabo *in vivo* en la circulación de un mamífero, *in vitro* en los casos en que se deseé la deplección de quinurenina y 3'-hidroxiquinurenina en cultivos de tejidos u otros medios biológicos, y en procedimientos *ex vivo* donde los líquidos biológicos, células o tejidos se manipulan fuera del cuerpo y posteriormente se devuelven al cuerpo del mamífero paciente. La deplección de la quinurenina en circulación, los medios de cultivo, los líquidos biológicos o las células se lleva a cabo para reducir la cantidad de quinurenina accesible al material que se está tratando, y por lo tanto comprende poner en contacto el material que se va a deplecionar con una cantidad de

quinureninasa de depleción de la quinurenina bajo condiciones de depleción de quinurenina a fin de degradar la quinurenina ambiental en el material que se está poniendo en contacto.

La depleción puede centrarse en la fuente de los nutrientes para las células, y no necesariamente en las células mismas. Por lo tanto, en una aplicación *in vivo*, el tratamiento de una célula tumoral incluye poner en contacto el medio nutritivo para una población de células tumorales con la quinureninasa. En la presente realización, el medio puede ser sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y líquidos corporales similares en los que se desea la depleción de la quinurenina.

La eficiencia de depleción de quinurenina y 3'-hidroxi-quinurenina puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación, y normalmente depende de la cantidad de quinurenina presente en el material, la tasa deseada de depleción y la tolerancia del material para la exposición a quinureninasa. Los niveles de quinurenina y metabolitos de quinurenina en un material, y por lo tanto las tasas de depleción de quinurenina y metabolitos de quinurenina del material, pueden seguirse fácilmente mediante una variedad de métodos químicos y bioquímicos bien conocidos de la técnica. Las cantidades de ejemplo de depleción de quinurenina se describen con mayor detalle en la presente memoria, y pueden estar comprendidas entre 0,001 y 100 unidades (U) de quinureninasa, preferentemente entre aproximadamente 0,01 y 10 U, y más preferentemente entre aproximadamente 0,1 y 5 U de quinureninasa por mililitro (ml) de material a tratar. Las dosis típicas se pueden administrar en función del peso corporal, y están comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 5 y 1000 U/kilogramo (kg)/día, preferentemente entre aproximadamente 5 y 100 U/kg/día, más preferentemente entre aproximadamente 10 y 50 U/kg/día, y más preferentemente entre aproximadamente 20 y 40 U/kg/día.

Las condiciones de depleción de la quinurenina son condiciones de tampón y temperatura compatibles con la actividad biológica de una quinureninasa, e incluyen condiciones moderadas de temperatura, sal y pH compatibles con el enzima, por ejemplo, condiciones fisiológicas. Entre las condiciones de ejemplo se incluyen aproximadamente 4 °C a 40 °C., fuerza iónica equivalente a aproximadamente 0,05 a 0,2 M de NaCl, y un pH de entre aproximadamente 5 y 9, mientras que las condiciones fisiológicas están incluidas.

En una realización particular, la invención contempla métodos de utilizar una quinureninasa como agente antitumoral y, por lo tanto, comprende poner en contacto con una población de células tumorales con una cantidad terapéuticamente eficaz de quinureninasa durante un período de tiempo suficiente para inhibir el crecimiento de las células tumorales.

En una realización, la puesta en contacto *in vivo* se lleva a cabo mediante la administración, mediante inyección intraperitoneal intravenosa o intratumoral, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que comprende una quinureninasa de la presente invención a un paciente, agotando de esta manera la fuente de quinurenina de las células tumorales presentes en el paciente.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una quinureninasa es una cantidad predeterminada calculada para conseguir el efecto deseado, es decir, para deplecionar la quinurenina en el tejido tumoral o en la circulación de un paciente, y por lo tanto mediar una respuesta proinflamatoria de eliminación del tumor. De esta manera, los intervalos de dosis para la administración de quinureninasa de la invención son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado de reducción de los síntomas de división celular tumoral y ciclado celular. La dosis no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, efectos neurológicos, etc. Generalmente, la dosis variará con la edad, estado, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente y podrá ser determinada por experto en la materia. La dosis puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier complicación.

La quinureninasa puede administrarse por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual durante el tiempo. La quinureninasa puede administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, oral, intramuscular, subcutánea, intracavitaria, transdérmica, dérmica, puede administrarse por medios peristálticos, puede inyectarse directamente en el tejido que contiene las células tumorales, o puede administrarse mediante una bomba conectada a un catéter que puede contener un biosensor potencial para la quinurenina.

Las composiciones terapéuticas que contienen quinureninasa se administran convencionalmente por vía intravenosa, por ejemplo, mediante inyección de una dosis unitaria. La expresión "dosis unitaria" cuando se utiliza en referencia a una composición terapéutica se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitaria para el sujeto, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido, es decir, portador o vehículo.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de la dosis, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo que se requiere administrar dependen del criterio del profesional y son específicas de cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para la aplicación sistémica se dan a conocer en la presente memoria y dependen de la vía de administración. También se encuentran contemplados regímenes adecuados para

la administración inicial e inyecciones de refuerzo, tipificadas por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas por una inyección posterior u otra administración. En la presente memoria se describen múltiples administraciones de ejemplo y resulta particularmente preferente mantener continuamente altos niveles en suero y en los tejidos de quinureninasa y, a la inversa, bajos niveles en suero y tejidos de quinurenina. Alternativamente, se encuentra contemplada una infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en sangre dentro de los intervalos especificados para las terapias *in vivo*.

IV. Conjugados

10 Las composiciones y métodos de la presente invención implican quinureninasas modificadas, tal como mediante la formación de conjugados con segmentos peptídicos heterólogos o polímeros, tales como el polietilenglicol. En otros aspectos, las quinureninasas pueden unirse a PEG para incrementar el radio hidrodinámico del enzima y, por lo tanto, incrementar la persistencia en suero. En determinados aspectos, el polipéptido dado a conocer puede conjugarse con cualquier agente de direccionamiento, tal como un ligando que presenta la capacidad de unirse específica y establemente a un receptor externo o sitio de unión en una célula tumoral (publicación de patente US n.º 2009/0304666).

A. Proteínas de fusión

20 Determinadas realizaciones se refieren a proteínas de fusión. Dichas moléculas pueden presentar una quinureninasa nativa o modificada unida en el extremo N- o C-terminal a un dominio heterólogo. Por ejemplo, las fusiones también pueden utilizar secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un huésped heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de una etiqueta de afinidad proteica, tal como una etiqueta de afinidad de albúmina sérica o seis residuos de histidina, o un dominio inmunitariamente activo, tal como un epítopo de anticuerpo, preferentemente escindible, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. Entre las etiquetas de afinidad no limitantes se incluyen polihistidina, proteína de unión a quitina (CBP, por sus siglas en inglés), proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés) y glutatión-S-transferasa (GST).

30 En una realización particular, la quinureninasa puede unirse a un péptido que incrementa la semivida *in vivo*, tal como un polipéptido XTEN (Schellenberger *et al.*, 2009), dominio Fc de IgG, albúmina o péptido de unión a albúmina.

35 El experto en la materia conocerá perfectamente métodos de generación de proteínas de fusión. Tales proteínas pueden ser producidas, por ejemplo, mediante síntesis *de novo* de la proteína de fusión completa, o mediante la unión de la secuencia de ADN que codifica el dominio heterólogo, seguido de la expresión de la proteína de fusión intacta.

40 La producción de proteínas de fusión que recuperan las actividades funcionales de las proteínas originales puede facilitarse mediante conexión de genes con un segmento de ADN puente codificante de un conector peptídico que se empalma entre los polipéptidos conectados en tandem. El conector sería de longitud suficiente para permitir el plegado adecuado de la proteína de fusión resultante.

B. Conectores

45 En determinadas realizaciones, la quinureninasa puede conjugarse químicamente usando reactivos de entrecruzamiento bifuncionales o fusionarse a nivel de proteínas con conectores peptídicos.

50 Los reactivos de entrecruzamiento bifuncionales han sido ampliamente utilizados para una variedad de propósitos, incluyendo la preparación de matrices de afinidad, la modificación y estabilización de diversas estructuras, la identificación de sitios de unión de ligando y de receptores, y estudios estructurales. También se pueden utilizar conectores peptídicos adecuados para unir la quinureninasa, tales como los conectores Gly-Ser.

55 Los reactivos homobifuncionales que llevan dos grupos funcionales idénticos han demostrado ser altamente eficientes en la inducción de entrecruzamiento entre macromoléculas o subunidades idénticas y diferentes de una macromolécula, y la unión de ligandos polipéptidos a sus sitios de unión específicos. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Aprovechando las reactividades diferenciales de los dos grupos funcionales diferentes, puede controlarse el entrecruzamiento tanto de forma selectiva como secuencial. Los reactivos de entrecruzamiento bifuncionales se pueden dividir de acuerdo con la especificidad de sus grupos funcionales, p. ej., grupos específicos de aminoácido, sulfhidrilo, guanidina, indol o carboxilo. De ellos, los reactivos con diana en grupos amino libres se han vuelto especialmente populares debido a su disponibilidad comercial, facilidad de síntesis y las condiciones de reacción moderadas bajo las que se pueden aplicar.

60 La mayoría de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales contienen un grupo primario reactivo con aminas y un grupo reactivo con tiol. En otro ejemplo, se describen los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales y los métodos de utilización de los reactivos de entrecruzamiento (patente US n.º 5.889.155). Los reactivos de entrecruzamiento combinan un residuo de hidrazida nucleofílica con un residuo de maleimida electrofílica, permitiendo el acoplamiento, en un ejemplo, de aldehídos con tioles libres. El reactivo de entrecruzamiento se puede modificar para entrecruzar diversos grupos funcionales.

Además, se puede utilizar cualquier otro agente de enlace/acoplamiento y/o mecanismo conocido por el experto en la materia para combinar quinureninasa, tales como, por ejemplo, la interacción anticuerpo-antígeno, los enlaces de biotina-avidina, los enlaces de amida, los enlaces éster, los enlaces tioéster, los enlaces tioéter, los enlaces fosfoéster, los enlaces fosforamida, los enlaces de anhídrido, los enlaces disulfuro, las interacciones iónicas e hidrofóbicas, los anticuerpos biespecíficos y los fragmentos de anticuerpos, o las combinaciones de los mismos.

Resulta preferente la utilización de un reticulante que presente una estabilidad razonable en sangre. Se conocen numerosos tipos de enlaces disulfuro que pueden utilizarse con éxito para conjugar agentes de direccionamiento y terapéuticos/preventivos. Los conectores que contienen un enlace disulfuro estéricamente impedido pueden proporcionar una mayor estabilidad *in vivo*. De esta manera, dichos conectores son un grupo de agentes conectores.

Además de los entrecruzantes impedidos, también pueden utilizarse conectores no impedidos de acuerdo con lo expuesto en la presente memoria. Otros entrecruzantes útiles, que no se considera que contengan ni generen un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano (Wawrzynczak y Thorpe, 1987). La utilización de tales entrecruzantes es bien conocida de la técnica. Otra realización implica la utilización de conectores flexibles.

Una vez conjugado químicamente, el péptido generalmente se purifica para separar el conjugado de los agentes no conjugados y de otros contaminantes. Existe un gran número de técnicas de purificación disponibles para la utilización en la provisión de conjugados de un grado de pureza suficiente para hacerlos clínicamente útiles.

Los métodos de purificación basados en la separación de tamaños, tales como la filtración en gel, la permeación en gel o la cromatografía líquida de alto rendimiento, generalmente resultarán de mayor utilidad. También se pueden utilizar otras técnicas cromatográficas, tales como la separación mediante Blue-Sepharose. Los métodos convencionales para purificar las proteínas de fusión de los cuerpos de inclusión pueden resultar útiles, tales como la utilización de detergentes débiles, tales como la N-lauroil-sarcosina sódica (SLS, por sus siglas en inglés).

C. PEGilación

En determinados aspectos de la invención, se dan a conocer métodos y composiciones relacionados con la PEGilación de la quinureninasa. Por ejemplo, la quinureninasa puede PEGilarse según los métodos descritos en la presente memoria.

La PEGilación es el proceso de unión covalente de cadenas de polímero de polietilenglicol a otra molécula, normalmente un fármaco o proteína terapéutica. La PEGilación se lleva a cabo normalmente mediante incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula diana. La unión covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede "enmascarar" el agente del sistema inmune del huésped (inmunogenicidad y antigenicidad reducidas) o incrementar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente, lo que prolonga su tiempo circulatorio al reducir el aclaramiento renal. La PEGilación también puede proporcionar solubilidad en agua a fármacos y proteínas hidrofóbicas.

La primera etapa de la PEGilación es la adecuada funcionalización del polímero PEG en uno o ambos extremos. Los PEG que se activan en cada extremo con la misma fracción reactiva se conocen como "homobifuncionales", mientras que si los grupos funcionales presentes son diferentes, entonces el derivado de PEG se denomina "heterobifuncional" o "heterofuncional". Los derivados químicamente activos o activados del polímero de 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, entre los aminoácidos reactivos típicos se incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina. El grupo amino N-terminal y el ácido carboxílico C-terminal también se pueden utilizar.

Las técnicas utilizadas para formar derivados de PEG de primera generación generalmente reaccionan el polímero de PEG con un grupo que es reactivo con grupos hidroxilo, habitualmente anhídridos, cloruros ácidos, cloroformatos y carbonatos. En la segunda generación de reacciones químicas de PEGilación se ponen a disposición grupos funcionales más eficientes, tales como aldehídos, ésteres, amidas, etc., para la conjugación.

A medida que las aplicaciones de PEGilación se han vuelto cada vez más avanzadas y sofisticadas, se ha producido un incremento en la necesidad de PEG heterobifuncionales para la conjugación. Estos PEG heterobifuncionales resultan muy útiles para unir dos entidades, donde se necesita un espaciador hidrofílico, flexible y biocompatible. Los grupos terminales 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 metoxi-PEG (mPEG). Su actividad depende de la adición de un grupo modificador de proteína al extremo alcohol. En algunos casos el polietilenglicol

(PEG-diol) se utiliza como molécula precursora. El diol se modifica posteriormente en ambos extremos para formar una molécula hetero- u homo-dimérica unida a PEG.

Las proteínas generalmente se PEGilan en sitios nucleofílicos, tales como tioles no protonados (residuos cisteinilo) o grupos amino. Entre los ejemplos de reactivos de modificación específicos de cisteinilo se incluyen maleimida-PEG, yodoacetato-PEG, tioles-PEG y vinilsulfona-PEG. Los cuatro son fuertemente específicos de cisteinilo bajo condiciones leves y pH neutro a ligeramente alcalino, aunque cada uno adolece de algunas desventajas. El tioéter formado con las maleimidas puede ser algo inestable bajo condiciones alcalinas, por lo que puede haber alguna limitación a las opciones de formulación con este conector. El enlace de carbamotioato formado con yodo-PEG es más estable, aunque el yodo libre puede modificar los residuos tirosina bajo algunas condiciones. Los PEG-tioles forman enlaces disulfuro con tioles de proteína, aunque este enlace también puede ser inestable en condiciones alcalinas. La reactividad de PEG-vinilsulfona es relativamente lenta en comparación con la maleimida y el yodo-PEG; sin embargo, el enlace tioéter formado es bastante estable. Su velocidad de reacción más lenta también puede hacer que la reacción de PEG-vinylsulfona resulte más fácil de controlar.

La PEGilación específica de sitio en residuos nativos de cisteinilo rara vez se lleva a cabo, ya que estos residuos normalmente presentan la forma de enlaces disulfuros o resultan necesarios para la actividad biológica. Por otro lado, la mutagénesis dirigida a sitio se puede utilizar para incorporar sitios de PEGilación cisteinilo para conectores específicos de tiol. La mutación de la cisteína debe diseñarse de tal manera que resulte accesible al reactivo de PEGilación y todavía sea biológicamente activa después de PEGilación.

Entre los agentes de modificación específicos de amino se incluyen el éster NHS de PEG, tresilato de PEG, PEG-aldehído, isotiocianato de PEG y varios otros. Todos reaccionan bajo condiciones suaves y son muy específicos para grupos amino. El éster NHS de PEG es probablemente uno de los agentes más reactivos; sin embargo, su alta reactividad puede hacer que la reacción de PEGilación resulte difícil de controlar a gran escala. El PEG-aldehído forma una imina con el grupo amino, que después se reduce a una amina secundaria con cianoborohidruro sódico. A diferencia del borohidruro sódico, el cianoborohidruro sódico no reducirá los enlaces disulfuro. Sin embargo, este producto químico es altamente tóxico y debe manipularse con precaución, particularmente a un pH más bajo, al que se vuelve volátil.

Debido a los múltiples residuos de lisina en la mayoría de las proteínas, la PEGilación específica de sitio puede resultar difícil. Afortunadamente, debido a que estos reactivos reaccionan con grupos amino no protonados, resulta posible dirigir la PEGilación a grupos amino de menor pK mediante la realización de la reacción a un pH más bajo. Por lo general, el pK del grupo alfa-amino es 1 a 2 unidades de pH más baja que el grupo amino épsilon de los residuos de lisina. Al PEGilar la molécula a pH 7 o inferior, se puede alcanzar con frecuencia una alta selectividad para el extremo N-terminal. Sin embargo, ello solo resulta factible si la parte N-terminal de la proteína no resulta necesaria para la actividad biológica. Sin embargo, los beneficios farmacocinéticos de la PEGilación frecuentemente superan una pérdida significativa de bioactividad *in vitro*, lo que resulta en un producto con una bioactividad *in vivo* mucho mayor independientemente de la química de la PEGilación.

Hay varios parámetros a considerar al desarrollar un procedimiento de PEGilación. Afortunadamente, normalmente no hay más de cuatro o cinco parámetros clave. El enfoque del "diseño de experimentos" para la optimización de las condiciones de PEGilación puede resultar muy útil. Para las reacciones de PEGilación específicas de tiol, entre los parámetros a considerar se incluyen: la concentración de proteína, la proporción PEG-proteína (sobre una base molar), la temperatura, el pH, el tiempo de reacción y, en algunos casos, la exclusión del oxígeno. (El oxígeno puede contribuir a la formación de disulfuros intermoleculares por la proteína, lo que reducirá el rendimiento del producto PEGilado). Deben considerarse los mismos factores (con la excepción del oxígeno) para la modificación específica de aminas, excepto en que el pH puede ser todavía más crítico, particularmente cuando la diana es el grupo amino N-terminal.

Para las modificaciones específicas de amina y de tiol, las condiciones de reacción pueden afectar la estabilidad de la proteína. Ello 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 70 por ciento activo, la cantidad de PEG utilizada debe garantizar que solo se cuentan las moléculas de PEG activas en la estequiometría de reacción proteína a-PEG.

V. Proteínas y Péptidos

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a nuevas composiciones que comprenden por lo menos una proteína o péptido, tal como una quinureninasa. Estos péptidos pueden estar comprendidos en una proteína de fusión o conjugados con un agente tal como se ha indicado anteriormente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una proteína o péptido generalmente se refiere, aunque sin limitación, a una proteína de más de aproximadamente 200 aminoácidos, hasta una secuencia de longitud completa traducida a partir de un gen; un polipéptido de más de aproximadamente 100 aminoácidos, y/o un péptido de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 aminoácidos. Por conveniencia, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en la presente memoria.

§ Tal como se utiliza en la presente memoria, un "residuo aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido natural, cualquier derivado de aminoácido, o cualquier mimético de aminoácido conocido de la técnica. En determinadas realizaciones, los residuos de la proteína o péptido son secuenciales, sin que ningún grupo no-aminoácido interrumpa la secuencia de residuos aminoácido. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender una o más fracciones no aminoácido. En realizaciones particulares, la secuencia de residuos de la proteína o péptido puede estar interrumpida por una o más fracciones no aminoácido.

10 De acuerdo con lo anterior, la expresión "proteína o péptido" comprende secuencias de aminoácidos que comprenden por lo menos uno de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en las proteínas naturales, o por lo menos un aminoácido modificado o inusual.

15 Las proteínas o los péptidos pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos mediante técnicas biológicas moleculares estándares, el aislamiento de proteínas o péptidos a partir de fuentes naturales, o la síntesis química de proteínas o péptidos. Las secuencias de nucleótidos y proteínas, polipéptidos y péptidos correspondientes a diversos genes han sido previamente dadas a conocer, y se pueden encontrar en bases de datos computarizadas conocidas por el experto habitual en la materia. Unas de estas bases de datos son las bases de datos Genbank y GenPept del National Center for Biotechnology Information (disponibles en internet, en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones codificantes de los genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse utilizando las técnicas dadas a conocer en la presente memoria, o tal como conocerá el experto habitual en la materia. Alternativamente, diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos son conocidas por el experto habitual en la materia.

VI. Ácidos nucleicos y vectores

25 En determinados aspectos de la invención, pueden darse a conocer secuencias de ácidos nucleicos que codifican una quinureninasa o una proteína de fusión que contenga una quinureninasa. Dependiendo del sistema de expresión que se utilice, pueden seleccionarse secuencias de ácidos nucleicos basándose en métodos convencionales. Por ejemplo, si la quinureninasa se deriva de quinureninasa humana y contiene múltiples codones que rara vez se utilizan en *E. coli*, entonces ello puede interferir con la expresión. Por lo tanto, los genes correspondientes o variantes de los mismos pueden optimizarse para los codones para la expresión en *E. coli*. También se pueden utilizar diversos vectores para expresar la proteína de interés. Entre los vectores de ejemplo se incluyen, aunque sin limitación, vectores plásmidos, vectores víricos, transposones o vectores basados en liposomas.

VII. Células huésped

30 Las células huésped pueden ser cualesquiera que puedan ser transformadas para permitir la expresión y secreción de quinureninasa y conjugados de la misma. Las células huésped pueden ser bacterias, células de mamíferos, levaduras u hongos filamentosos. Entre las diversas bacterias se incluyen *Escherichia* y *Bacillus*. Las levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia* resultarán útiles como células huésped apropiadas. Pueden utilizarse 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*.

35 Entre los ejemplos de organismos huésped utilizables se incluyen bacterias, p. ej., *Escherichia coli* MC1061, derivados de *Bacillus subtilis* BRB1 (Sibakov et al., 1984), *Staphylococcus aureus* SA1123 (Lordanescu, 1975) o *Streptococcus lividans* (Hopwood et al., 1985); levaduras, p. ej., *Saccharomyces cerevisiae* AH 22 (Mellor et al., 1989), o *Schizosaccharomyces pombe*; y hongos filamentosos, p. ej., *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus awamori* (Ward, 1989), o *Trichoderma reesei* (Penttila et al., 1987; Harkki et al., 1989).

40 Entre los ejemplos de células huésped de mamíferos se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61), células pituitarias de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC n.º CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC n.º CRL 1548), células renales de mono transformado por SV40 (COS-1; ATCC n.º CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC n.º CRL 1658).

45 Las células huésped de mamífero que expresan la quinureninasa y/o sus proteínas de fusión se cultivan bajo condiciones normalmente utilizadas para cultivar la línea celular parental. Generalmente, las células se cultivan en un medio estándar que contiene sales y nutrientes fisiológicos, tales como RPMI, MEM, IMEM o DMEM estándar habitualmente suplementado con suero al 5 % a 10 %, tal como suero fetal bovino. Las condiciones de cultivo también son estándares, p. ej., los cultivos se incuban a 37 °C en cultivos estacionarios o en botellas giratorias hasta que se alcancen los niveles deseados de las proteínas.

VIII. Purificación de proteínas

50 Las técnicas de purificación de proteínas son bien conocidas por el experto en la materia. Estas técnicas implican, en un nivel, la homogeneización y el fraccionamiento en bruto de las células, tejidos u órganos en fracciones polipeptídicas

- 5 y no polipeptídicas. La proteína o polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente utilizando técnicas cromatográficas y electroforéticas para conseguir una purificación parcial o completa (o purificación a homogeneidad) a menos que se especifique lo contrario. Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión en gel, la electroforesis en gel de poliacrilamida, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de inmunoafinidad y el enfoque isoeléctrico. Un método particularmente eficiente de purificación de péptidos es la cromatografía líquida rápida (FPLC, por sus siglas en inglés) o incluso la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés).
- 10 Una proteína o péptido purificado está destinada a referirse a una composición, aislable de otros componentes, en donde la proteína o péptido se purifica en cualquier grado en relación con su estado obtenible naturalmente. Una proteína o péptido aislado o purificado, por lo tanto, también se refiere a una proteína o péptido libre del ambiente en el que puede encontrarse naturalmente. Generalmente, "purificado" se refiere a una composición de proteína o péptido que ha sido sometido a fraccionamiento para eliminar diversos otros componentes, y cuya composición conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se utiliza la expresión "sustancialmente purificado", esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituir aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o más de las proteínas en la composición.
- 15 Diversas técnicas adecuadas para la utilización en la purificación de proteínas son bien conocidas por el experto en la materia. Entre ellas se incluyen, por ejemplo, la precipitación con sulfato amónico, PEG, anticuerpos y similares, o mediante desnaturización térmica, seguida de centrifugación; etapas de cromatografía, tales como intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxiapatita y cromatografía de afinidad; enfoque isoeléctrico; electroforesis en gel; y combinaciones de éstas y otras técnicas. Tal como es generalmente conocido, se cree que el orden de conducción de las diversas etapas de purificación puede modificarse, o que determinadas etapas pueden omitirse, y todavía resultan en un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.
- 20 Diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido son conocidos por el experto en la materia a la luz de la presente exposición. Entre ello se incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un método 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 calcular de esta manera el grado de pureza de la misma, evaluado por un "factor numérico de purificación". Las unidades reales utilizadas para representar la cantidad de actividad, por supuesto, dependerán de la técnica de ensayo particular seleccionada para seguir la purificación, y de si la proteína o péptido expresado muestra o no una actividad detectable.
- 25 No hay ningún requisito general de que la proteína o péptido siempre se proporcione en su estado más purificado. De hecho, se contempla que los productos purificados menos sustancialmente puedan presentar utilidad en determinadas realizaciones. La purificación parcial puede llevarse a cabo mediante la utilización de menos etapas de purificación en combinación, o mediante la utilización de diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía de columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC generalmente dará como resultado un "factor" mayor de purificación que la misma técnica que utiliza un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que muestran un menor grado de purificación relativa pueden presentar ventajas en la recuperación total del producto proteico, o en el mantenimiento de la actividad de la proteína expresada.
- 30 En determinadas realizaciones se puede aislar o purificar una proteína o péptido, por ejemplo, una quinureninasa, una proteína de fusión que contiene una quinureninasa, o una quinureninasa modificada después de la PEGilación. Por ejemplo, una etiqueta de His o un epítopo de afinidad pueden estar comprendido en la quinureninasa para facilitar la purificación. La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre la sustancia a aislar y la molécula a la que puede unirse específicamente. Este es un tipo de interacción de receptor-ligando. El material de la columna se sintetiza mediante acoplamiento covalente de una de las parejas de unión a una matriz insoluble. El material de la columna es entonces capaz de adsorber específicamente la sustancia a partir de la solución. La elución se produce mediante modificación de las condiciones a aquellas en las que no se producirá la unión (p. ej., pH alterado, fuerza iónica, temperatura, etc.). La matriz debe ser una sustancia que no adsorbe moléculas en ninguna medida significativa y que presenta un amplio abanico de estabilidad química, física y térmica. El ligando debe acoplarse de tal manera que no afecte a sus propiedades de unión. El ligando también debe proporcionar un enlace relativamente fuerte. Debe ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando.
- 35 La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) es un método cromatográfico en el que las moléculas en solución se separan en función de su tamaño, o en términos más técnicos, en función de su volumen hidrodinámico. Generalmente se aplica a moléculas grandes o complejos macromoleculares, tales como proteínas y polímeros industriales. Típicamente, cuando se utiliza una solución acuosa para transportar la muestra a través de la columna, la técnica se conoce como cromatografía de filtración de gel, frente a cromatografía de permeación en gel, que se utiliza cuando un solvente orgánico se utiliza como una fase móvil.
- 40 El principio subyacente de la SEC es que las partículas de diferentes tamaños eluirán (filtrarán) a través de la fase estacionaria a diferentes velocidades. Lo anterior resulta en la separación de una solución de partículas en función del

5 tamaño. Siempre que todas las partículas se carguen simultáneamente o casi simultáneamente, las partículas del mismo tamaño deberían eluir juntas. Cada columna de exclusión de tamaño presenta 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 resultar 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 en los poros de la fase estacionaria completamente y todas las moléculas por debajo de esta masa molecular son tan pequeñas que eluyen en forma de una sola banda.

10 La cromatografía líquida de alto rendimiento (o chromatografía líquida de alta presión, HPLC) es una forma de chromatografía de columna que se utiliza con frecuencia en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos. La HPLC utiliza una columna que contiene material de relleno cromatográfico (fase estacionaria), una bomba que mueve la fase o fases móviles por 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 solvente o solventes utilizados.

15 *IX. Composiciones farmacéuticas*

20 Se encuentra contemplado que la quinureninasa nueva, tal como se define en las reivindicaciones, pueda administrarse sistémica o localmente para inhibir el crecimiento de células tumorales y, lo más preferentemente, para destruir células cancerosas en pacientes con cáncer localmente avanzado o metastásico. Se pueden administrar por vía intravenosa, intratecal y/o intraperitoneal. Pueden administrarse solos o en combinación con fármacos antiproliferativos. En una realización, se administran para reducir la carga de cáncer en el paciente antes de cirugía u otros procedimientos. Alternativamente, se pueden administrar después de la cirugía para garantizar que cualquier cáncer restante (p. ej., cáncer que la cirugía no ha podido eliminar) no sobreviva.

25 No se pretende que la presente invención esté limitada por la naturaleza particular de la preparación terapéutica. Por ejemplo, tales composiciones se pueden proporcionar en formulaciones junto con líquidos, gel o portadores, diluyentes y excipientes sólidos fisiológicamente tolerables. Estas preparaciones terapéuticas pueden administrarse a mamíferos para uso veterinario, tal como con animales domésticos, y para uso clínico en seres humanos de manera similar a otros agentes terapéuticos. En general, la dosis requerida para la eficacia terapéutica variará según el tipo de uso y modo de administración, así como los requerimientos particularizados de los sujetos individuales.

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

35 Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, puede ser necesario preparar composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas, anticuerpos y fármacos en una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad eficaz de una o más de quinureninasa o agentes adicionales disueltos o dispersos en un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según corresponda. La preparación de una composición farmacéutica que contenga por lo menos una quinureninasa aislada mediante el método dado a conocer en la presente memoria, o ingrediente activo adicional será conocida por el experto en la materia a la luz de la presente exposición, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., 1990. Además, para la administración animal (p. ej., humana), se entenderá que las preparaciones pueden requerir el cumplimiento de normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo exigido por las normas de la Oficina de biológicos de la FDA.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (p. ej., agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, tal como serán conocidos por el experto habitual en la materia (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., 1990). Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se encuentra contemplada la utilización del mismo en composiciones farmacéuticas.

45 Se da a conocer, además, que determinadas realizaciones de la presente invención pueden comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si se administra en forma sólida, líquida o aerosol, y si necesita ser estéril para la vía de administración, tal como la inyección. Las composiciones pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intramuscular, subcutánea, mucosa, oral, tópica, localmente, mediante inhalación (p. ej., inhalación de aerosol), mediante inyección, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada que baña directamente las células diana,

a través de un catéter, mediante un lavado, en composiciones lipídicas (p. ej., liposomas), o mediante otros métodos o cualquier combinación de los anteriores que serían conocidos por el experto habitual en la materia (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., 1990).

5 Los polipéptidos modificados tal como se definen en las reivindicaciones pueden formularse en una composición en forma de base libre, forma neutra o sal. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las sales de adición ácida, p. ej., aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaina. Tras la formulación, las soluciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosis y en una cantidad que resulte terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosis, tal como formuladas para administraciones parenterales, tales como soluciones inyectables, o aerosoles para la administración a los pulmones, o formuladas para administraciones alimentarias, tales como cápsulas de liberación de fármacos y similares.

10 La composición adecuada para la administración puede proporcionarse en un portador farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El portador debe ser asimilable e incluye líquidos, semisólidos, es decir, pastas o portadores sólidos. Salvo en la medida en que cualquier medio convencional, agente, diluyente o portador resulte perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de la composición contenida en el mismo, resulta apropiado su uso en composición administrable para la utilización en la puesta en práctica de los métodos. Entre los ejemplos de portadores o diluyentes se incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, rellenos y similares, o combinaciones de los mismos. La composición puede comprender, además, diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por conservantes, tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluidos, aunque sin limitación, los parabenos (p. ej., metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sóblico, timerosal o combinaciones de los mismos.

15 Según determinados aspectos de la presente invención, la composición se combina con el portador de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, mediante solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Dichos procedimientos son habituales para el experto en la materia.

20 Se da a conocer, además, que la composición puede combinarse o mezclarse a fondo con un portador semisólido o sólido. La mezcla se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, tal como la molienda. Los agentes estabilizantes también se pueden añadir en el procedimiento de mezcla para proteger la composición frente a la pérdida de la actividad terapéutica, es decir, la desnaturalización en el estómago. Entre los ejemplos de estabilizadores para la utilización en una composición se incluyen tampones, aminoácidos, tales como glicina y lisina, carbohidratos, tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

25 40 En una exposición adicional, la presente invención puede referirse a la utilización de una composición de vehículos lipídicos farmacéuticos que incluye quinureninas, uno o más lípidos y un solvente acuoso. Tal como se usa en la presente memoria, el término "lípido" se definirá para incluir cualquiera de una amplia gama de sustancias que son característicamente insolubles en agua y extraíbles con un disolvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos es bien conocida por el experto en la materia, y como el término "lípido" tal como se utiliza en la presente memoria, no se encuentra limitada a ninguna estructura particular. Entre los ejemplos se 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 habitualmente es una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos de la técnica, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicoesfingolípidos, glicolípidos, sulfatídos, lípidos con ácidos grasos unidos a éster y a éster, lípidos polimerizables y combinaciones de los mismos. Evidentemente, los compuestos distintos de los descritos específicamente en la presente memoria considerados lípidos por el experto en la materia también se encuentran comprendidos en las composiciones y métodos.

30 45 50 55 El experto habitual en la materia estará familiarizado con la gama de técnicas que se pueden utilizar para dispersar una composición en un vehículo lipídico. Por ejemplo, la quinureninasa o una proteína de fusión de la misma puede dispersarse en una solución que contenga un lípido, disuelta con un lípido, emulsionada con un lípido, mezclada con un lípido, combinada con un lípido, unida covalentemente a un lípido, contenida en forma de una suspensión en un lípido, contenida o acompañada con una micela o liposoma, o asociada de otro modo a una estructura lipídica por cualquier medio conocido por el experto habitual en la materia. La dispersión puede o no dar lugar a la formación de liposomas.

60 65 70 La dosis real de una composición administrada a un paciente animal puede determinarse a partir de factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad bajo tratamiento, las intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, la idiopatía del paciente y la vía de administración. Dependiendo de la dosis y la vía de administración, el número de administraciones de una dosis preferida y/o una cantidad eficaz puede variar según la respuesta del sujeto. El profesional encargado de la administración determinará, en cualquier

caso, la concentración del ingrediente o ingredientes activos en una composición y la dosis o dosis adecuadas para el sujeto individual.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0,1% de un compuesto activo. En otras realizaciones, un compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable a partir de ellos. Naturalmente, la cantidad de compuesto o compuestos activos en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtenga una dosis adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores como la solubilidad, la biodisponibilidad, la semivida biológica, la vía de administración, la vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, serán contemplados por el experto en la materia de preparación de tales formulaciones farmacéuticas, y de esta manera, puede resultar deseable una variedad de dosis y regímenes de tratamiento.

En otros ejemplos no limitativos, una dosis puede comprender, además, entre aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, to aproximadamente 1000 miligramos/kg de peso corporal o más por cada administración, y cualquier intervalo derivable a partir de los ellos. En ejemplos no limitativos de un intervalo derivable a partir de los números enumerados en la presente memoria, puede administrarse un intervalo de entre aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal y aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, entre aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal y aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., basados en los números indicados anteriormente.

X. Tratamientos de combinación

En determinadas realizaciones, las composiciones y métodos de las presentes realizaciones implican la administración de una quinureninasa en combinación con una segunda terapia o terapia adicional. Dicha terapia se puede aplicar en el tratamiento de cualquier enfermedad que está asociada a dependencia de la quinurenina. Por ejemplo, la enfermedad puede ser cáncer.

Los métodos y las composiciones, incluidas las terapias de combinación, mejoran el efecto terapéutico o protector, y/o incrementar el efecto terapéutico de otra terapia anticáncer o antihiperproliferativa. Los métodos y composiciones terapéuticos y profilácticos se pueden proporcionar en una cantidad combinada eficaz para conseguir el efecto deseado, tal como la destrucción de una célula cancerosa y/o la inhibición de la hiperproliferación celular. Este proceso puede implicar la administración de una quinureninasa y una segunda terapia. La segunda terapia puede o no presentar un efecto citotóxico directo. Por ejemplo, la segunda terapia puede ser un agente que regula positivamente el sistema inmunitario sin presentar un efecto citotóxico directo. Un tejido, tumor o célula puede estar expuesto a una o más composiciones o formulaciones farmacológicas que comprenden uno o más agentes (p. ej., una quinureninasa o un agente anticáncer), o mediante la exposición del tejido, tumor y/o célula con dos o más composiciones o formulaciones distintas, en donde una composición proporciona 1) una quinureninasa, 2) un agente anticáncer, o 3) una quinureninasa y un agente anticáncer. Además, se encuentra contemplado que dicha terapia de combinación se puede utilizar junto con quimioterapia, radioterapia, terapia quirúrgica o inmunoterapia.

Los términos "contactado" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, se utilizan en la presente memoria para describir el procedimiento por el cual un constructo terapéutico y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico son entregados en una célula diana o se sitúan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir la eliminación celular, por ejemplo, ambos agentes se entregan a una célula en una cantidad combinada eficaz para matar la célula o evitar que se divida.

Se puede administrar una quinureninasa antes, durante, después o en diversas combinaciones en relación con un tratamiento anticáncer. Las administraciones pueden realizarse a intervalos que van desde simultáneamente a minutos a días a semanas. En las realizaciones en las que la quinureninasa se proporciona a un paciente por separado de un agente anticáncer, generalmente se garantiza que un período de tiempo significativo no expire entre el momento de cada administración, de manera que los dos compuestos todavía podrían ejercer un efecto ventajosamente combinado en el paciente. En tales casos, se encuentra contemplado que se proporcione al paciente la quinureninasa y la terapia anticáncer separadas por aproximadamente 12 a 24 o 72 h y, más particularmente, por aproximadamente 6 a 12 h. En algunas situaciones puede resultar deseable extender el período de tiempo de tratamiento significativamente, en donde transcurran varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

En determinadas realizaciones, un curso de tratamiento durará 1 a 90 días o más (este intervalo incluye los días intermedios). Se encuentra contemplado que pueda administrarse un agente cualquier día entre el día 1 y el día 90 (este intervalo incluye los días intermedios) o cualquier combinación de los mismos, y se administra otro agente en cualquier día entre el día 1 y el día 90 (este intervalo incluye los días intermedios) o cualquier combinación de los mismos. Dentro de un solo día (un período de 24 horas), el paciente puede recibir una o varias administraciones del agente o agentes. Además, después de un curso de tratamiento, se encuentra contemplado que hay un período de tiempo en el que no se administre ningún tratamiento anticáncer. Este período de tiempo puede durar 1 a 7 días, y/o 1 a 5 semanas, y/o 1 a 12 meses o más (este intervalo incluye días intermedios), dependiendo del estado del paciente, tal como su pronóstico, fuerza, salud, etc. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario.

Se pueden utilizar diversas combinaciones. Para el ejemplo siguiente, una quinureninasa es "A" y una terapia anticáncer es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de cualquier compuesto o terapia de las presentes realizaciones a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de dichos compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiere, de los agentes. Por lo tanto, en algunas realizaciones hay una etapa de seguimiento de la toxicidad que es atribuible a la terapia de combinación.

A. Quimioterapia

Se puede utilizar una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos según las presentes realizaciones. El término "quimioterapia" se refiere a la utilización de medicamentos para tratar el cáncer. La expresión "agente quimioterapéutico" se utiliza para connotar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento del cáncer. Estos agentes o fármacos se categorizan por su modo de actividad dentro de una célula, por ejemplo, si y en qué etapa afectan al ciclo celular. Alternativamente, un agente puede caracterizarse basándose en su capacidad para entrecruzar directamente el ADN, para intercalarse en el ADN, o para inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas al afectar la síntesis de ácidos nucleicos.

Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etilenaminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptofincinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; esponjistatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma I y caliqueamicina omega I1); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromoproteínas enedina relacionadas, aclacinomicinas, actinomicina, autrarnicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, ciano-morfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalarnicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiopurina y tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didexouridina, doxifluridina, enocitabina y floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostano, mepitiostano y testolactona; antiadrenales, tales como mitotano y trilostano; reconstituyente de ácido fólico, tal como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldfosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; decolicina; diazicuona; elformitina; acetato de elipticina; un epotilón; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; moidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilico; 2-ethylhidrazida; procarbazina; complejo de polisacáridos PSK; razoxano; rizoxina; sizofirano; espinogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotriethylamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazine; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptoperurina; complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina;

platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (p. ej., CPT-11); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomithina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; carboplatino, procarbazina, plicomicina, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la proteína farnesil-transferasa, transplatino y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

B. Radioterapia

Entre otros factores que causan daño al ADN y que se han utilizado ampliamente se incluyen lo que se conoce comúnmente como rayos γ, rayos X y/o la administración dirigida de isótopos radioactivos a las células tumorales. También se encuentran contempladas otras formas de factores dañinos para el ADN, tales como microondas, irradiación de haz de protones (patentes US n.º 5.760.395 y n.º 4.870.287) y la irradiación UV. Es muy probable que todos estos factores afecten una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN, y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosis para las radiografías varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosis de los isótopos radioactivos varían ampliamente y dependen de la vida media del isótopo, la potencia y el tipo de radiación emitida y la incorporación por las células neoplásicas.

C. Inmunoterapia

El experto en la materia entenderá que las inmunoterapias pueden utilizarse en combinación o conjuntamente con los métodos de las realizaciones. En el contexto del tratamiento del cáncer, los inmunoterapéuticos, en general se basan en la utilización de células y moléculas efectoras inmunitarias para reconocer y destruir las células cancerosas. El rituximab (RITUXAN®) es un ejemplo de ello. Los inhibidores de puntos de control, tales como, por ejemplo, ipilimumab, son otro ejemplo de ellos. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo por sí solo puede servir como un efector de la terapia o puede reclutar otras células para que estas provoquen la destrucción celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionucleido, cadena A de la ricina, toxina del cólera, toxina de la tosferina, etc.) y servir simplemente como un agente de direccionamiento. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa, ya sea directa o indirectamente, con una diana celular tumoral. Entre las diversas células efectoras se incluyen las células T citotóxicas y las células NK.

En un aspecto de inmunoterapia, la célula tumoral debe llevar algún marcador que sea susceptible de ser seleccionado, es decir, que no está presente en la mayoría de las demás células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de ellos puede resultar adecuado para el direccionamiento en el contexto de presentes las realizaciones. Entre los marcadores tumorales comunes se incluyen CD20, antígeno carcinoembionario, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Lewis sialilo, MicA, MucB, PLAP, receptor de laminina, erb B y p155. Un aspecto alternativo de inmunoterapia es combinar los efectos anticáncer con los efectos inmunoestimuladores. También existen moléculas inmunoestimuladoras, incluyendo: citoquinas, tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gamma-IFN; quimioquinas, tales como MIP-1, MCP-1, IL-8, y factores de crecimiento, tales como el ligando FLT3.

Son ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso los adyuvantes inmunitarios, p. ej., *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos (patentes US n.º 5.801.005 y n.º 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998); terapia de citoquinas, p. ej., los interferones α, β y γ, IL-1, GM-CSF y TNF (Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998); la terapia génica, p. ej., TNF, IL-1, IL-2 y p53 (Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; patentes US n.º 5.830.880 y n.º 5.846.945); y anticuerpos monoclonales, p. ej., anti-CD20, anti-gangliósido GM2 y anti-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi *et al.*, 1998; patente US n.º 5.824.311). Se contempla que puedan utilizarse una o más terapias anticancer con las terapias de anticuerpos descritas en la presente memoria.

D. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa incluye la resección en la que se extrae físicamente, se extirpa y/o se destruye físicamente todo o parte del tejido canceroso y se puede usar junto con otras terapias, tales como el tratamiento de las presentes realizaciones, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas. La resección tumoral se refiere a la extirpación física de por lo menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento quirúrgico incluye cirugía láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs).

Al extirpar parte o la totalidad de las células, tejidos o tumores cancerosos, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede conseguir mediante perfusión, inyección directa o aplicación local en la zona de una terapia anticáncer adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos también pueden ser de dosis variables.

E. Otros agentes

Se encuentra contemplado que puedan utilizarse otros agentes en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones a fin de mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Entre estos agentes adicionales se incluyen agentes que afectan la regulación positiva de los receptores de superficie celular y las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que incrementan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos, u otros agentes biológicos. Los incrementos en la señalización intercelular al incrementar el número de uniones GAP incrementarían los efectos antihiperproliferativos en la población celular hiperproliferativa vecina. En otras realizaciones, los agentes citostáticos o de diferenciación se pueden utilizar en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones a fin de mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se encuentran contemplados inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de las presentes realizaciones. Son ejemplos de inhibidores de la adhesión celular los inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) y la lovastatina. Se encuentra adicionalmente contemplado que otros agentes que incrementan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225, puedan ser utilizados en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones a fin de mejorar la eficacia del tratamiento.

XI. Kits

Se dan a conocer, a modo de referencia, kits, tales como kits terapéuticos. Por ejemplo, un kit puede incluir una o más composiciones farmacéuticas tal como se describen en la presente memoria y opcionalmente instrucciones para la utilización de las mismas. Los kits pueden comprender, además, uno o más dispositivos para llevar a cabo la administración de dichas composiciones. Por ejemplo, un kit de la invención puede incluir una composición farmacéutica y un catéter para llevar a cabo la inyección intravenosa directa de la composición en un tumor canceroso. En otra exposición, un kit de la invención puede incluir ampollas precargadas de una quinureninasa, formuladas opcionalmente como farmacéutico, o liofilizadas, para la utilización con un dispositivo de administración.

Los kits pueden incluir un recipiente con una etiqueta. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, frascos, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener una composición que incluya una quinureninasa que resulte eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tal como se describe anteriormente. La etiqueta del recipiente puede indicar que la composición se utiliza para una terapia específica o una aplicación no terapéutica, y también puede indicar instrucciones para la utilización *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente. El kit de la invención comprenderá típicamente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes que comprenden materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e impresos en el envase con instrucciones de utilización.

Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar realizaciones preferentes de la invención. El experto en la materia debería apreciar que las técnicas dadas a conocer en los ejemplos siguientes representan técnicas encontradas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y de esta manera pueden considerarse modos preferentes para su práctica. Los ejemplos referidos a materia no comprendida en las reivindicaciones se proporcionan a título de referencia.

*Ejemplo 1. Construcción, expresión y purificación de quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens**

Se ha construido un gen para la expresión del enzima quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*-KYNU) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con extensión de solapamiento de cuatro bloques de genes con codones optimizados diseñados con el software DNA-Works (Hoover y Lubkowski, 2002). El gen de longitud completa incluye un sitio enzimático de restricción *Xba*I N-terminal (nucleótidos 1 a 6), un sitio de unión ribosómica optimizado (RBS; nucleótidos 29 a 55), un codón de inicio (nucleótidos 56 a 58), una etiqueta N-terminal His₆ (nucleótidos 59 a 91), un gen de *Pf*-KYNU con codones optimizados para *E. coli* (nucleótidos 92 a 1336), un codón de parada (nucleótidos 1337 a 1342) y un sitio de enzima de restricción *Bam*H I C-terminal (núcleótidos 1342 a 1347) (ver la SEC ID n.º 58 1). Los sitios de enzimas de restricción mencionados anteriormente se utilizaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Este constructo se utilizó entonces para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Se cultivaron las células a 37 °C bajo agitación a 210 rpm en caldo *Terrific Broth* (TB) con 50 mg/l de kanamicina. Se indujo la expresión al alcanzar una $OD_{600\text{nm}}$ ~ 1,0 mediante la adición de IPTG (concentración final de 0,5 mM) bajo agitación continua durante la noche a 37 °C. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, piridoxilfosfato (PLP) 0,5 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM y 1 µg/ml de ADNasa. Se llevó a cabo la lisis mediante prensa francesa y el lisado se clarificó de partículas mediante centrifugación a 20.000xg durante 1 h a 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de jeringa de 5 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en un tampón compuesto por fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM NaCl y PLP 0,1 mM, a pH 7,4. Después de cargar el lisado en la columna, se lavó la resina con 5 volúmenes de columna (VC) de fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. A continuación, se fijó el caudal para el lavado lento

de la columna durante la noche con 100 VC de tampón de PBS libre de endotoxinas (Corning) con PLP 0,1 mM y TRITON® X114 al 1 % v/v. Este lavado durante la noche elimina el lipopolisacárido (LPS o endotoxina) que es un contaminante típico de los sistemas de expresión bacteriana. A continuación, se eluyó el enzima lavado, en 5 VC de PBS libre de endotoxinas con PLP 0,1 mM con imidazol 250 mM, y se enjuagó la resina con una segunda porción de 5 VC de PBS libre de endotoxinas con PLP de 0,1 mM. En este punto, se intercambió el enzima por PBS nuevo a fin de eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y las alícuotas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C. Alternativamente, se intercambió el enzima por fosfato sódico recién preparado y estéril 100 mM, pH 8,4, tanto para eliminar el imidazol como para prepararlo para la PEGilación (ver el Ejemplo 4). Las purezas enzimáticas típicamente eran >95 % según el análisis de SDS-PAGE y los rendimientos típicos proporcionaron un valor promedio aproximado de 75 mg/l de cultivo. Las cantidades de proteína se evaluaron mediante la medición de ABS_{280 nm} y utilizando el coeficiente de extinción de enzima calculado de 63.745 M⁻¹cm⁻¹.

*Ejemplo 2. Construcción génica, expresión y purificación de quinureninasa de *Homo sapiens**

Se construyó un gen para la expresión del enzima quinureninasa de *Homo sapiens* (h-KYNU) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con extensión de solapamiento de cuatro bloques de genes con codones optimizados diseñados con el software DNA-Works (Hoover y Lubkowski, 2002). El gen de longitud completa incluía un sitio enzimático de restricción *Xba*I N-terminal (nucleótidos 1 a 6), un RBS optimizado (nucleótidos 28 a 60), un codón de inicio (nucleótidos 61 a 63), una etiqueta N-terminal His₆ (nucleótidos 64 a 96), un gen de *h-KYNU* con codones optimizados para *E. coli* (nucleótidos 97 a 1488), un codón de parada (nucleótidos 1489 a 1491) y un sitio de enzima de restricción *Bam*HI C-terminal (núcleótidos 1492 a 1497) (ver la SEC ID n.º 2). Los sitios de enzimas de restricción mencionados anteriormente se utilizaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Este constructo se utilizó entonces para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Se cultivaron las células a 37 °C bajo agitación a 210 rpm en caldo *Terrific Broth* (TB) con 50 mg/l de kanamicina. Se indujo la expresión al alcanzar una DO₆₀₀~ 1,0 mediante la adición de IPTG (concentración final de 0,5 mM) bajo agitación continua durante la noche a 37 °C. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, piridoxilfosfato (PLP) 0,5 mM, fenilmetilsulfoniifluoruro 1 mM y 1 µg/ml de ADNasa. Se llevó a cabo la lisis mediante prensa francesa y el lisado se clarificó de partículas mediante centrifugación a 20.000xg durante 1 h a 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de jeringa de 5 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en un tampón compuesto por fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM NaCl y PLP 0,1 mM. Después de cargar el lisado en la columna, se lavó la resina con 5 volúmenes de columna (VC) de fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. A continuación, se fijó el caudal para el lavado lento de la columna durante la noche con 100 VC de tampón de PBS libre de endotoxinas (Corning) con PLP 0,1 mM y TRITON® X114 al 1 % v/v. Este lavado durante la noche elimina el lipopolisacárido (LPS o endotoxina) que es un contaminante típico de los sistemas de expresión bacteriana. A continuación, se eluyó el enzima lavado, en 5 VC de PBS libre de endotoxinas con PLP 0,1 mM con imidazol 250 mM, y se enjuagó la resina con una segunda porción de 5 VC de PBS libre de endotoxinas con PLP 0,1 mM. En este punto, se intercambió el enzima por PBS nuevo a fin de eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y las alícuotas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C. Alternativamente, se intercambió el enzima por fosfato sódico recién preparado y estéril 100 mM, pH 8,4, tanto para eliminar el imidazol como para prepararlo para la PEGilación (ver el Ejemplo 4). Las purezas enzimáticas típicamente eran >95 % según el análisis de SDS-PAGE y los rendimientos típicos proporcionaron un valor promedio aproximado de 20 mg/l de cultivo líquido. Las cantidades de proteína se evaluaron mediante la medición de ABS_{280 nm} y utilizando el coeficiente de extinción de enzima calculado de 76.040 M⁻¹cm⁻¹.

*Ejemplo 3. Construcción génica, expresión y purificación de quinureninasa de *Mus musculus**

Se construyó un gen para la expresión del enzima quinureninasa de *Mus musculus* (m-KYNU) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con extensión de solapamiento de tres bloques de genes con codones optimizados diseñados con el software DNA-Works (Hoover et al., 2002). El gen de longitud completa incluía un sitio enzimático de restricción *Xba*I N-terminal (nucleótidos 1 a 6), un RBS optimizado (nucleótidos 29 a 58), un codón de inicio (nucleótidos 59 a 61), una etiqueta N-terminal His₆ (nucleótidos 62 a 94), un gen de m-KYNU con codones optimizados para *E. coli* (nucleótidos 95 a 1483), un codón de parada (nucleótidos 1489 a 1486) y un sitio de enzima de restricción *Bam*HI C-terminal (núcleótidos 1487 a 1492) (ver la SEC ID n.º 3). Los sitios de enzimas de restricción mencionados anteriormente se utilizaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Este constructo se utilizó entonces para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Se cultivaron las células a 37 °C bajo agitación a 210 rpm en caldo *Terrific Broth* (TB) con 50 mg/l de kanamicina. Se indujo la expresión al alcanzar una DO₆₀₀~ 1,0 mediante la adición de IPTG 0,5 mM y continuó durante la noche a 37 °C. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, piridoxilfosfato (PLP) 0,5 mM, fenilmetilsulfoniifluoruro 1 mM y 1 µg/ml de ADNasa. Se llevó a cabo la lisis mediante prensa francesa y el lisado se clarificó de partículas mediante centrifugación a 20.000xg durante 1 h a 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de jeringa de 5 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en un tampón compuesto por fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM NaCl y PLP 0,1 mM. Después de cargar el lisado en la columna, se lavó la resina con 5 volúmenes de columna (VC) de fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. A continuación, se fijó el caudal para el lavado lento durante la noche con 100 VC de tampón de PBS libre de endotoxinas (Corning) con PLP 0,1 mM y TRITON® X114 al 1 % v/v. Este lavado durante

la noche elimina el lipopolisacárido (LPS o endotoxina) que es un contaminante típico de los sistemas de expresión bacteriana. A continuación, se eluyó el enzima lavado, en 5 VC de PBS libre de endotoxinas con PLP 0,1 mM con imidazol 250 mM, y se enjuagó la resina con una segunda porción de 5 VC de PBS libre de endotoxinas con PLP 0,1 mM. En este punto, se intercambió el enzima por PBS nuevo a fin de eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y las alícuotas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C.

*Ejemplo 4. Preparación farmacológica de quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens**

Para mejorar el tiempo de circulación del enzima *in vivo*, se incrementó el radio hidrodinámico de los enzimas KYNU mediante funcionalización de los grupos reactivos de superficie en la proteína mediante conjugación con PEG. En una realización, *Pf*-KYNU fue funcionalizado mediante reacción de residuos lisina superficiales con metoxil-PEG succinimidil-carbonato 5000 PM (NANOCS). El enzima purificado libre de endotoxinas se intercambió completamente por tampón de fosfato sódico 100 mM recién preparado, pH 8,4, y se concentró a 10 mg/ml. La solución resultante se añadió directamente a un exceso molar 100:1 de reactivo PEG sólido y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h (FIG. 1). El PEG no reaccionado se eliminó de la solución mediante un intercambio completo por tampón en PBS nuevo libre de endotoxinas, en un dispositivo de filtración centrífuga con corte de 100 kDa (AMICON®). La masa molecular aparente de enzima se verificó entonces en una columna de HPLC de exclusión por tamaño (Phenomenex) en PBS. Se utilizó una solución patrón de peso molecular (PM) de BioRad para generar una curva patrón y los tiempos de retención enzimática se compararon con los patrones de proteínas. Basándose en la curva patrón, el enzima no PEGilado presenta una masa aparente de 40 kDa, que es cercana a la de la masa de un monómero de *Pf*-KYNU. Se observó que la versión PEGilada del enzima presentaba una masa aparente de 1.300 kDa, es decir, sustancialmente mayor que la del enzima no modificado. Los niveles de endotoxinas se cuantificaron utilizando el kit de ensayo cinético cromogénico de endotoxinas Chromo-LAL (Associates of Cape Cod, Inc.). El enzima lavado de la manera descrita anteriormente dio lugar típicamente a niveles de endotoxina de 0,19±0,07 UE/mg de *Pf*-KYNU purificado.

*Ejemplo 5. Preparación farmacológica de quinureninasa de *Homo sapiens**

Para mejorar el tiempo de residencia circulatoria del enzima *in vivo*, se incrementó el radio hidrodinámico de *h*-KYNU mediante funcionalización de los grupos reactivos de superficie en la proteína mediante conjugación con PEG. En una realización, se funcionalizó *h*-KYNU mediante la reacción de los residuos de lisina superficiales con metoxil-PEG succinimidil-carbonato 5000 PM (NANOCS). El enzima purificado libre de endotoxinas se intercambió completamente por tampón de fosfato sódico 100 mM recién preparado, pH 8,4, y se concentró a 10 mg/ml. La solución resultante se añadió directamente a un exceso molar 100:1 de reactivo PEG sólido y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h. El PEG no reaccionado se eliminó de la solución mediante un intercambio de tampón completo en PBS nuevo y libre de endotoxinas en un dispositivo de filtración centrífuga de corte de 100 kDa (AMICON®). La masa molecular aparente de enzima se determinó mediante una columna de HPLC de exclusión por tamaño (Phenomenex) equilibrada con PBS y tiempos de retención en comparación con una solución patrón de PM (BioRad). Los niveles de endotoxinas se cuantificaron utilizando el kit de ensayo cinético cromogénico de endotoxinas Chromo-LAL (Associates of Cape Cod, Inc.).

Ejemplo 6. Ensayo para medir parámetros cinéticos de la quinureninasa

Los parámetros cinéticos de *Pf*-KYNU y A-KYNU, así como de sus versiones PEGiladas, descritas en los Ejemplos 4 y 5, se cuantificaron mediante un ensayo espectrofotométrico, en el que se monitorizó la desintegración en la absorbancia máxima del sustrato enzimático, L-quinurenina, en función del tiempo. Las soluciones de L-quinurenina se prepararon en un tampón de PBS, pH 7,4, para obtener concentraciones finales comprendidas entre 8 μ M y 250 μ M. L-quinurenina presenta un coeficiente de extinción de 4.500 $M^{-1}cm^{-1}$ con una $\lambda_{máximo}$ a 365 nm mientras que los productos de la reacción de quinureninasa, ácido L-antranílico y L-alanina, no absorben apreciablemente a 365 nm. Las reacciones se iniciaron mediante la adición y mezcla rápida de soluciones enzimáticas (~20 nM final) con las soluciones de sustrato y siguiendo la pérdida de sustrato KYN a 25 °C mediante la medición de la $Abs_{365\text{ nm}}$ en el tiempo. Los datos resultantes fueron procesados y ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar las constantes cinéticas. La cinética del enzima PEGilado *Pf*-KYNU se midió de manera idéntica. Para el enzima no PEGilado, $k_{cat}/K_M=1,0\times 10^5\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y para la forma PEGilada, $k_{cat}/K_M=1,3\times 10^5\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Los parámetros cinéticos para la hidrólisis del ácido 3-hidroxi-L-quinurénico también se determinaron tal como se describe en la presente memoria.

*Ejemplo 7. Estabilidad *in vitro* de la quinureninasa*

Para medir la estabilidad *in vitro* de *Pf*-KYNU, se añadió el enzima al tampón de PBS o al suero humano agrupado a una concentración final de 10 μ M y se incubó a 37 °C. Se extrajeron porciones de 10 μ l, en cada uno de los puntos temporales y se añadieron a 990 μ l de una solución 250 μ M de L-quinurenina/PBS. La velocidad inicial de reacción se siguió mediante la medición de la caída de la absorbancia a 365 nm a lo largo del tiempo tal como se describe en el Ejemplo 3. La estabilidad enzimática se determinó mediante comparación de la tasa inicial de catálisis de L-quinurenina en cada punto de tiempo y comparándola con la tasa en el tiempo=0. Los datos resultantes se representaron gráficamente como % de actividad vs. tiempo y se ajustaron a una ecuación exponencial para

determinar la semivida ($T_{1/2}$). Se encontró que el enzima *Pf-KYNU* presentaba una $T_{1/2}=34,3$ horas en PBS y una $T_{1/2}=2,4$ horas en suero humano agrupado (FIG. 2).

Ejemplo 8. Ensayo para cuantificar los niveles de quinurenina y triptófano in vivo

Los niveles *in vivo* de L-quinurenina, triptófano, ácido quinurenínico, 3-hidroxi-L-quinurenina y ácido L-antranílico (uno de los productos de la catálisis por quinureninasa) fueron cuantificados y seguidos mediante HPLC. Tras la necropsia de los ratones, se extrajeron muestras de sangre, tumor, bazo e hígado. Las muestras de sangre se centrifugaron para separar la sangre entera respecto del suero. Las muestras de tejido en primer lugar se homogeneizaron y después se centrifugaron para eliminar la parte sólida. A cada parte líquida se añadió una parte 1:10 v/v de ácido tricloroacético al 100 % para precipitar las macromoléculas. Se separaron los sólidos nuevamente mediante centrifugación y los sobrenadantes se pasaron a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm . Los sobrenadantes tratados se aplicaron directamente en un HPLC (Shimadzu) y se separaron en una columna analítica estándar C-18 utilizando un gradiente partiendo de 0 % de solución B a 100 % de solución B donde la solución A es $\text{H}_2\text{O} +$ ácido trifluoroacético al 0,1 % y la solución B es acetonitrilo + ácido trifluoroacético al 0,1 %. El intervalo de absorbancia total de 190 nm a 900 nm se recolectó continuamente para el seguimiento de todas las moléculas posibles y se realizó una espectroscopía de fluorescencia ($\text{Ex}=365$ nm, $\text{Em}=480$ nm) simultáneamente para seguir específicamente los niveles de quinurenina. Se determinaron las concentraciones y los tiempos de retención utilizando soluciones patrón preparadas con las moléculas puras (Sigma).

*Ejemplo 9. Eficacia de PEG-*Pf-KYNU* en el modelo de melanoma B16 autólogo en ratones*

Cada uno de los ratones B6-WT ($n=20$) fue inoculado con $2,5 \times 10^5$ células de melanoma murino B16 mediante inyección subcutánea en el flanco. Después de permitir que los tumores se establecieran durante 10 días (media tumoral=20 mm^2), los ratones se dividieron en dos grupos de $n=10$ cada uno. El grupo de control seguidamente se trató con 20 mg/kg de PEG-*Pf-KYNU* inactivado por calor mediante inyección intratumoral cada tres días hasta que los tumores alcanzaron un tamaño de 350 mm^2 . El grupo experimental fue tratado de manera idéntica excepto con 20 mg/kg de PEG-*Pf-KYNU* activo mediante inyección intratumoral cada tres días hasta que los tumores alcanzaron un punto final de tamaño de 350 mm^2 . Las tasas de crecimiento de los tumores de melanoma B16 se retrasaron significativamente en el grupo de tratamiento administrado PEG-*Pf-KYNU* activo en comparación con el grupo PEG-*Pf-KYNU* inactivado térmicamente y tratado idénticamente (FIG. 3), resultando en una extensión significativa de la vida útil (FIG. 4). Los linfocitos aislados de los grupos control y de tratamiento experimental fueron evaluados con paneles de anticuerpos (es decir, anti-CD45, CD4, Nk1.1, CD25, FoxP3, CD8, granzima B, IFN γ , CTLA4, CD11c, CD11b, F4/80, GR-1 y Ly6-C) que revelaron que la población de células T reguladoras CD4 $^+$ CD25 $^+$ FoxP3 $^+$ circulantes era significativamente menor en el grupo tratado con PEG-*Pf-KYNU* ($4,8 \pm 0,8$ % vs. $8,6 \pm 0,8$ %). Además, la población de células T CD8 $^+$ infiltrantes de tumor que expresan granzima B e interferón y fue significativamente mayor en ratones tratados con enzima activo (26 ± 19 % vs. 4 ± 2 %) (figs. 5A y B).

Ejemplo 10. Proteínas de fusión de quinureninasa-scFv para el reconocimiento tumoral

En algunos aspectos, la presente invención contempla, además, polipéptidos que comprenden la quinureninasa bacteriana o de mamífero modificada ligada a una secuencia de aminoácidos heteróloga. Por ejemplo, la quinureninasa nativa o modificada puede estar unida a un anticuerpo de fragmento variable de cadena única (scFv) que se une a antígenos tumorales específicos de superficie celular. En esta realización, una proteína de fusión de scFv-quinureninasa con la porción scFv de la proteína que presenta afinidad específica para un antígeno tumoral conocido, preferentemente un antígeno específico tumoral que se internaliza a una velocidad más lenta, p. ej., MUC-1, permitiría que la porción quinureninasa de la proteína de fusión se administrara en la célula tumoral y degradara KYN. Un ejemplo sería una proteína de fusión de scFv-quinureninasa donde la porción scFv reconoce y se une al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, por sus siglas en inglés) que está regulado positivamente en determinados tipos de cáncer de mama.

En la presente realización, una proteína de fusión nativa o modificada de quinureninasa-anti-HER2-scFv actuaría reconociendo y concentrando la quinureninasa directamente en la superficie del tumor y actuaría degradando la KYN producida por el mismo.

Ejemplo 11. Proteínas de fusión quinureninasa-scFv anti-CTLA4

En algunos aspectos, la presente invención contempla, además, polipéptidos que comprenden la quinureninasa bacteriana o de mamífero modificada unida a una secuencia de aminoácidos heteróloga. Por ejemplo, la quinureninasa nativa o modificada puede unirse a un anticuerpo de fragmento variable de cadena única (scFv) que se une al receptor del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4, por sus siglas en inglés), a la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, por sus siglas en inglés) o al ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1, por sus siglas en inglés). El bloqueo de CTLA-4, PD-1 o PD-L1 por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo antagonista permite revertir la señal inhibitoria de las células T permitiendo que CD28 estimule la activación de las células T. En la presente realización, una proteína de fusión nativa o modificada de quinureninasa-anti-CTLA4-, anti-PD-1- o anti-PD-L1-scFv actuaría para eliminar tanto la señalización de interacción proteína inhibidora:proteína como la señalización inhibitoria de

quinurenina. La presente realización de una proteína de fusión nativa o modificada de quinureninasa-scFv se esperaría que regulase positivamente de manera potente la activación de las células T y promoviese respuestas antitumorales robustas.

§ *Ejemplo 12. Constructos de receptor de antígeno químérico para el transporte de quinureninasa a las células T*

En algunos aspectos, la presente invención contempla, además, un vector lentivírico adecuado para la transfección de células T con constructos de receptores de antígeno químérico (CAR), de tal manera que una quinureninasa bacteriana o de mamífero modificada sería coexpresada además del constructo de CAR. Los constructos de CAR son proteínas que contienen un dominio de unión de antígeno extracelular fusionado a un dominio de señalización transmembranal y citoplasmático de una cadena CD3- ζ y frecuentemente una molécula CD28 (Ahmed *et al.*, 2010). El dominio de unión a antígeno puede ser un scFv diseñado para unir un antígeno expresado por una célula tumoral, con ejemplos de HER2 expresado por glioblastoma u osteosarcoma, CD19 o CD20 expresado por diversas neoplasias malignas de células B, o GD2 expresado por neuroblastoma (Lipowska-Bhalla *et al.*, 2012) o cualquier otra diana relevante. En la presente realización, el vector lentivírico, que administra un constructo de CAR apropiado a un linfocito T, además coexpresaría una quinureninasa bacteriana o de mamífero nativa o modificada en el citosol. La célula T que contiene este constructo de CAR/quinureninasa presentaría la doble capacidad de 1) unirse a células tumorales específicas y 2) degradar KYN, impidiendo la inducción de KYN de un fenotipo regulador y/o apoptosis. En otra realización, una célula T expresaría un constructo de CAR que se une a un linfoma difuso de células B grandes CD19⁺ o CD20⁺ coexpresando simultáneamente una quinureninasa para degradar las altas concentraciones de KYN frecuentemente producidas por este tipo de tumor (Yoshikawa *et al.*, 2010; De Jong *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2011).

§ *Ejemplo 13. Selección genética para la actividad de quinureninasa*

El aminoácido L-triptófano (L-Trp) se sintetiza a partir del precursor derivado de pentosa, corismato, mediante expresión de los genes biosintéticos *trp*. En bacterias tales como *E. coli* los genes biosintéticos *trp* están organizados en un operón compuesto por cinco genes: *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* y *trpA*. Las proteínas TrpE y TrpD son componentes del complejo antranilato sintetasa que cataliza la primera etapa en la conversión de corismato y L-glutamina en ácido antranílico y L-glutamato. A continuación, el ácido antranílico se convierte en L-Trp por la acción de TrpC, TrpA y TrpB. Las células que carecen de un gen funcional de antranilato sintasa son auxotróficas para L-Trp y no pueden crecer en medio mínimo sin triptófano. Los inventores postularon que puesto que la quinurenina puede ser transportada al citosol de muchos organismos, las células que expresan enzimas recombinantes de L-quinureninasa que muestran una actividad catalítica suficientemente alta deberían ser capaces de convertir la L-quinurenina citosólica en ácido antranílico y este último permite entonces la síntesis de L-Trp. Por el contrario, las células que no expresan el enzima o expresan variantes con baja actividad catalítica deberían mostrar un crecimiento nulo o muy lento, respectivamente, en medio mínimo con L-quinurenina.

Los mutantes por delección de *E. coli* *trpE* y *trpD* se obtuvieron de Genetic Resources en Yale CGSC. Los genotipos de cepa fueron (F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(:rrnB-3), λ-, ΔtrpE772::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514) y (F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(:rrnB-3), λ-, ΔtrpD771::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514), respectivamente. Las células se sembraron en placas con medio mínimo M9. Los discos de papel de filtro empapados en L-Trp, L-Kyn, ácido antranílico o tampón se depositaron en las placas, seguido de incubación a 37 °C. Las células de *E. coli*-Δ*trpD* solo crecieron en presencia de L-Trp, sin embargo, *E. coli*-Δ*trpE* también podía crecer en presencia de ácido antranílico pero no tampón o L-Kyn, demostrando que *trpC*, *trpA* y *trpB* se expresaban, permitiendo el rescate de la auxotrofia de L-Trp con ácido antranílico como metabolito intermedio (FIG. 6). Además, las células de *E. coli*-Δ*trpE* transformadas con un plásmido que albergaba el gen *Pf-KYNU* crecieron con fuerza en placas con medio mínimo M9 en presencia de L-Kyn.

§ *Ejemplo 14. Construcción, expresión y purificación génica de quinureninasas bacterianas que muestran alta actividad catalítica para quinurenina e identidad respecto a la quinureninasa humana*

Al igual que otras quinureninasas eucarióticas, el enzima de *Homo sapiens* es altamente selectivo para la hidrólisis de quinurenina 3'-OH y presenta una actividad catalítica aproximadamente 1.000 veces inferior hacia la quinurenina. Debido a su reducida actividad catalítica hacia la quinurenina, el enzima humano no resulta adecuado con fines terapéuticos. La administración de *Pf-KYNU* PEGilado (Ejemplo 9), *Mu-KYNU* (Ejemplos 22 y 23), o *Cp-KYNU* (Ejemplo 17) (todos los cuales muestran alta actividad catalítica hacia quinurenina en lugar de 3'-OH quinurenina) resultó en un retraso del crecimiento tumoral, tal como se muestra en el Ejemplo 9 (FIG. 3). Sin embargo, la administración de quinureninasa humana PEGilada a dosis similares o superiores no presentó ningún efecto sobre el crecimiento de tumores de melanoma B16 (n=4). Sin embargo, tal como se muestra en el Ejemplo 20, la ingeniería de *h-KYNU* puede mejorar la actividad de degradación de L-quinurenina del enzima humano. Estas variantes de *h-KYNU* diseñadas pueden dar lugar a un retraso del crecimiento tumoral, tal como se observa con *Pf-KYNU* PEGilado (Ejemplo 9), *Mu-KYNU* (Ejemplos 22 y 23) y *Cp-KYNU* (Ejemplo 17).

El *Pf-KYNU* muestra una baja identidad de secuencia respecto a su contraparte humana (identidad de aminoácidos del 24 %). Debido a su baja identidad de secuencia respecto a la proteína humana, *Pf-KYNU* puede inducir respuestas inmunitarias adversas en pacientes, así como la producción de anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, es importante

identificar enzimas quinureninasas que muestran alta actividad catalítica y selectividad hacia quinurenina y que presentan un mayor grado de identidad de aminoácidos respecto a la quinureninasa de *Homo sapiens*. Los inventores han identificado una serie de enzimas bacterianos que muestran una identidad de aminoácidos >38 % respecto a la quinureninasa de *Homo sapiens* y también presentan una alta actividad de hidrólisis de quinurenina. Las secuencias de estos enzimas se proporcionan como SEC ID n.º 13 a n.º 52. El porcentaje de identidad de estos enzimas en comparación con la quinureninasa de *Homo sapiens* se proporciona en la Tabla 1. A modo de ejemplo representativo, se construyó un gen para la expresión de el enzima quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* (*Mu-KYNU*) (SEC ID n.º 33) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión de solapamiento de dos bloques genéticos de codones optimizados utilizando el software DNA-Works (Hoover y Lubkowski, 2002). El gen de longitud completa incluye un sitio de enzima de restricción *Nco*I N-terminal, un RBS optimizado, una etiqueta His₆ N-terminal, el gen *Mu-KYNU* de codones optimizados para *E. coli*, un codón de parada y un sitio de enzimas de restricción *Eco*RI C-terminal. Los sitios de enzimas de restricción mencionados anteriormente se utilizaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Este constructo se utilizó entonces para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Se cultivaron las células a 37 °C bajo agitación a 210 rpm en caldo *Terrific Broth* (TB) con 50 mg/l de kanamicina. Se indujo la expresión al alcanzar una OD₆₀₀ ~ 1,0 mediante la adición de IPTG (concentración final de 0,5 mM) bajo agitación continua durante la noche a 37 °C. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, piridoxilfosfato (PLP) 0,5 mM, fenilmetsulfonilfluoruro 1 mM y 1 µg/ml de ADNasa. Se llevó a cabo la lisis mediante prensa francesa y el lisado se clarificó de partículas mediante centrifugación a 20.000xg durante 1 h a 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de jeringa de 5 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en un tampón compuesto por fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM NaCl y PLP 0,1 mM. Después de cargar el lisado en la columna, se lavó la resina con 5 volúmenes de columna (VC) de fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. El enzima lavado se eluyó en 5 VC de PBS con PLP de 0,1 mM con imidazol 250 mM. En este punto, se intercambió el enzima por PBS nuevo para eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y se congelaron instantáneamente alícuotas en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C. La pureza de los enzimas típicamente eran >95 % según el análisis de SDS-PAGE y los rendimientos típicos mostraron un promedio aproximado de 75 mg/l de cultivo. Las cantidades de proteína se evaluaron mediante la medición de ABS_{280 nm} y utilizando el coeficiente de extinción de enzima calculado de 78.185 M⁻¹cm⁻¹.

Tabla 1. Porcentaje de identidad de enzimas quinureninasa eubacterianos en comparación con la quinureninasa de *Homo sapiens*

Espece	SEC ID n.º	% de identidad
<i>Arenitalea lutea</i>	13	44,1
<i>Belliella baltica DSM 15883</i>	14	43,3
<i>Bizionia argentinensis</i>	15	42,9
<i>Candidatus Entotheonella sp. TSY2</i>	16	44,9
<i>Candidatus Koribacter versatilis Ellin345</i>	17	43,3
<i>Cecembia ionarensis</i>	18	45,1
<i>Clamidia pecorum PV3056/3</i>	19	38,2
<i>Chlamydophila caviae GPIC</i>	20	40,8
<i>Corallococcus coralloides DSM 2259</i>	21	43
<i>Cyclobacterium marinum DSM 74</i>	22	44,5
<i>Cystobacter fuscus</i>	23	43,5
<i>Echinicola vietnamensis DSM 17526</i>	24	44,5
<i>Bacteri Flavobacteria BBFL7</i>	25	43,4
<i>Flexibacter litoralis DSM 6794</i>	26	47,5
<i>Formosa sp. AK20</i>	27	45,7
<i>Fulvivirga imtechensis</i>	28	47,1
<i>Kangiella aquimarina</i>	29	44,1
<i>Kangiella koreensis DSM 16069</i>	30	44,3
<i>Lacinutrix sp. 5H 3-7-4</i>	31	44,2
<i>Mariniradius saccharolyticus</i>	32	44,5
<i>Mucilaginibacter paludis</i>	33	43,9
<i>Myroides odoratimimus</i>	34	42,2
<i>Myxococcus fulvus HW-1</i>	35	44,5
<i>Myxococcus stipitatus DSM 14675</i>	36	44,4
<i>Myxococcus xanthus DK 1622</i>	37	45,1
<i>Nafulsellia turpanensis</i>	38	48,2
<i>Niastella coreensis GR20-10</i>	39	44,8
<i>Nonlabens dokdonensis DSW-6</i>	40	44
<i>Pedobacter agri</i>	41	44,1
<i>Pedobacter sp. BAL39</i>	42	42,1

(continuación)

Especie	SEC ID n.º	% de identidad
<i>Pedobacter sp. V48</i>	43	44,1
<i>Rhodonellum psychrophilum</i>	44	45,4
<i>Salinispora arenicola</i>	45	39,1
<i>Saprospira grandis str. Lewin</i>	46	43,2
<i>Stigmatella aurantiaca DW4/3-1</i>	47	42,5
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	48	42
<i>Psychroflexus gondwanensis</i>	49	44
<i>Lewinella cohaerens</i>	50	45,6
<i>Lewinella persica</i>	51	44,9
<i>Pontibacter roseus</i>	52	44,8

Ejemplo 15. Parámetros cinéticos de la quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* (MU-KYNU)

Los parámetros cinéticos de *Mu-KYNU* se cuantificaron mediante un ensayo espectrofotométrico, en el que se siguió la caída de la absorbancia máxima del sustrato enzimático, L-quinurenina, en función del tiempo. Las soluciones de L-quinurenina se prepararon en un tampón de PBS, pH 7,4, para obtener concentraciones finales comprendidas entre 16 μ M y 500 μ M. L-quinurenina presenta un coeficiente de extinción de 4.500 $M^{-1}cm^{-1}$ con una $\lambda_{máxima}$ a 365 nm mientras que los productos de la reacción de quinureninasa, ácido L-antranílico y L-alanina, no absorben apreciablemente a 365 nm. Las reacciones se iniciaron mediante la adición y mezcla rápida de soluciones enzimáticas (concentración final ~20 nM) con las soluciones de sustrato y siguiendo la pérdida de sustrato a 25 °C mediante la medición de la $Abs_{365\text{ nm}}$ en el tiempo. Los datos resultantes se procesaron y ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar las constantes cinéticas. Se determinó que *Mu-KYNU* presentaba un $k_{gato}/K_M=1,2\times 10^5\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Ejemplo 16. Estabilidad *in vitro* de la quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* (MU-KYNU)

Para medir la estabilidad *in vitro* de *Pf-KYNU*, se añadió el enzima al tampón de PBS o al suero humano agrupado a una concentración final de 10 μ M y se incubó a 37 °C. Se extrajeron porciones de 10 μ l, en cada uno de los puntos temporales y se añadieron a 990 μ l de una solución 250 μ M de L-quinurenina/PBS. La velocidad inicial de reacción se siguió mediante la medición de la caída de la absorbancia a 365 nm a lo largo del tiempo tal como se describe en el Ejemplo 3. La estabilidad enzimática se determinó mediante comparación de la tasa inicial de catálisis de L-quinurenina en cada punto de tiempo y comparándola con la tasa en el tiempo=0. Los datos resultantes se representaron gráficamente como porcentaje de actividad vs. tiempo y se ajustaron a un modelo de caída bifásico (Stone *et al.*, 2010) para determinar las semividas ($T_{1/2}$). La actividad del enzima *Mu-KYNU* en PBS se encontró que presentaba una $^1T_{1/2}=6$ h con una amplitud de 74 % de actividad restante y una semivida posterior de $^2T_{1/2}=150$ h (FIG. 7). Se determinó que la estabilidad del enzima *Mu-KYNU* en suero humano agrupado presentaba una $^1T_{1/2}=5$ h con una amplitud de 30 % de actividad restante y una $^2T_{1/2}=73$ h (FIG. 7).

Ejemplo 17. Construcción génica, expresión y purificación de quinureninasa de *Chlamydophila pecorum*

Un gen para la expresión del enzima quinureninasa de *Chlamydophila pecorum* (*Cp-KYNU*) se sintetizó utilizando bloques génicos con codones optimizados para *E. coli*. El gen de longitud completa incluía un sitio enzimático de restricción *Nco*I N-terminal (nucleótidos 1 a 6), un codón de inicio (nucleótidos 3 a 5), una etiqueta His₆ N-terminal (nucleótidos 6 a 35), un gen de *Cp-KYNU* con codones optimizados para *E. coli* (nucleótidos 36 a 1295), un codón de parada (nucleótidos 1296 a 1298) y un sitio de enzima de restricción *EcoRI* C-terminal (nucleótidos 1299 a 1304) (SEC ID n.º 53). Los sitios de enzimas de restricción mencionados anteriormente se utilizaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). A continuación, se utilizó este constructo para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Se cultivaron las células a 37 °C bajo agitación a 210 rpm en caldo *Terrific Broth* (TB) con 50 mg/l de kanamicina. Se indujo la expresión al alcanzar una $DO_{600}\sim 1,0$ mediante la adición de IPTG (concentración final de 0,5 mM) bajo agitación continua durante la noche a 16 °C. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, piridoxilfosfato (PLP) 0,5 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM y 1 μ g/ml de ADNasa. Se llevó a cabo la lisis mediante prensa francesa y el lisado se clarificó de partículas mediante centrifugación a 20.000xg durante 1 h a 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de jeringa de 5 μ m y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en un tampón compuesto por fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM NaCl y PLP 0,1 mM. Después de cargar el lisado en la columna, se lavó la resina con 10 volúmenes de columna (VC) de fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. El enzima lavado seguidamente se eluyó en 5 VC de PBS que contenía PLP 0,1 mM e imidazol 250 mM. Se intercambió por tampón el enzima eluido con PBS nuevo a fin de eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y las alícuotas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido para el almacenamiento a -80 °C.

Ejemplo 18. Parámetros cinéticos de la quinureninasa de *Chlamydophila pecorum* (CP-KYNU)

Los parámetros cinéticos de *Cp*-KYN (SEC ID n.º 57) se cuantificaron mediante un ensayo espectrofotométrico, en el que se siguió la caída de la absorbancia máxima del sustrato enzimático, L-quinurenina, en función del tiempo. Las soluciones de L-quinurenina se prepararon en un tampón de PBS, pH 7,4, para obtener concentraciones finales comprendidas entre 16 μ M y 500 μ M. L-quinurenina presenta un coeficiente de extinción de 4.500 M⁻¹cm⁻¹ con una $\lambda_{\text{máximo}}$ a 365 nm mientras que los productos de la reacción de quinureninasa, antranilato y L-alanina, no absorben apreciablemente a 365 nm. Las reacciones se iniciaron mediante la adición y mezcla rápida de soluciones enzimáticas (concentración final de 200 nM) con las soluciones de sustrato y siguiendo la pérdida de sustrato a 25 °C mediante la medición de la Abs_{365 nm} en el tiempo. Los datos resultantes se procesaron y ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar las constantes cinéticas. Se determinó que *Cp*-KYN presentaba un $k_{\text{cat}}/K_M = 3 \times 10^4$ M⁻¹s⁻¹.

Ejemplo 19. Preparación farmacológica de quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis*

Para mejorar el tiempo de circulación del enzima *in vivo*, se incrementó el radio hidrodinámico de *Mu*-KYN mediante funcionalización de los grupos reactivos de superficie en la proteína mediante conjugación con PEG. En una realización, se PEGiló *Mu*-KYN mediante la reacción de los residuos de lisina superficiales con metoxil-PEG succinimid-carbonato 5000 PM (NANOCS). Se determinó que *Mu*-KYN purificado contenía niveles muy bajos de endotoxinas (<20 UE/mg) tal como se describe a continuación. Se intercambió a fondo por tampón en tampón de fosfato sódico recién preparado 100 mM, pH 8,4, y se concentró hasta una concentración superior a 1 mg/ml. La solución resultante se añadió directamente a un exceso molar 100:1 de reactivo PEG sólido y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h bajo agitación. El PEG no reaccionado se eliminó de la solución mediante un intercambio a fondo por tampón en PBS nuevo libre de endotoxinas, en un dispositivo de filtración centrífuga con corte de 100 kDa (Amicon). La masa molecular aparente de el enzima se verificó seguidamente en una columna de HPLC de exclusión por tamaño (Phenomenex) en PBS utilizando una solución patrón de PM de BioRad para generar una curva patrón, y los tiempos de retención de enzimas se compararon con los de los patrones de proteína. Los niveles de endotoxinas se cuantificaron utilizando el kit de ensayo cinético cromogénico de endotoxinas Chromo-LAL (Associates of Cape Cod, Inc.).

Ejemplo 20. Degradación mejorada de la L-quinurenina en una variante de quinureninasa humana modificada

El enzima *h*-KYN es altamente selectiva hacia la hidrólisis de la 3'-OH-quinurenina y presenta una actividad catalítica aproximadamente 1.000 veces menor hacia la L-quinurenina. Debido a su reducida actividad catalítica hacia la L-quinurenina, el enzima humano de tipo salvaje no resulta adecuado para fines terapéuticos. Para diseñar una actividad de degradación mejorada de L-quinurenina en *h*-KYN, se construyó una biblioteca de mutagénesis de saturación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión de solapamiento con el gen *h*-KYN y un par de oligonucleótidos diseñados para introducir mutaciones del codón correspondiente al aminoácido F306. F306 se localiza dentro del sitio activo de *h*-KYN, donde aparentemente desempeña un papel en la unión al sustrato. La biblioteca de saturación F306 se examinó para actividad utilizando el ensayo en placa de microtitulación de quinureninasa del Ejemplo 6. Más de una docena de clones mostraron una actividad significativamente mayor que la de *h*-KYN de tipo salvaje y fueron seleccionados para su posterior análisis. La secuenciación de estos clones reveló que dos sustituciones de aminoácidos en la posición F306 resultaban en una actividad de degradación incrementada de la L-quinurenina, a saber, *h*-KYN-F306M (SEC ID n.º 55) y *h*-KYN-F306L (SEC ID n.º 56). A continuación, se purificaron estas variantes a homogeneidad y un análisis cinético detallado reveló un aumento de 2 y 5 veces en k_{cat}/K_M para L-quinurenina para *h*-KYN-F306M y *h*-KYN-F306L, respectivamente, en comparación con *h*-KYN de tipo salvaje.

Para mejorar adicionalmente la actividad de degradación de la L-quinurenina en *h*-KYN, se construyeron una serie de bibliotecas mediante métodos de PCR propensos a errores de todo el gen *h*-KYN o mediante mutagénesis de saturación dirigida a oligonucleótidos de los codones correspondientes a posiciones de aminoácidos que fueron seleccionados en análisis estructurales y filogenéticos (Cole y Gaucher, 2011) que potencialmente contribuyen a una mayor actividad y/o selectividad de sustrato. Entre esas posiciones se incluyen los residuos H41, L59, F71, A98, A99, G101, H102, I110, G112, M120, K121, D122, I131, N135, A136, T138, H142, F148, F149, K157, S167, A171, Q175, Q229, N232, G248, F249, E259, W272, S274, A282, I285, G287, A288, P300, V303, F306, L320, L322, S332, N333, P334, L337, V339, T404, I405, S408 y A436. Estas bibliotecas fueron analizadas en un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, después de la construcción de cada biblioteca, los plásmidos resultantes se transformaron en células de *E. coli*-*ΔtrpE* y se sembraron en placas con medio mínimo M9 en presencia de L-Kyn para seleccionar las variantes que permitían el rescate de la auxotrofia de L-Trp en esta cepa, tal como se describe en el Ejemplo 13. En segundo lugar, se seleccionaron las colonias de crecimiento más grandes y seguidamente se evaluaron para la actividad catalítica utilizando un ensayo en placa de microtitulación de quinureninasa, tal como se describe en el Ejemplo 6. Los clones que mostraban una actividad aparente mayor que los controles fueron secuenciados para identificar mutaciones, y seguidamente se purificaron hasta alcanzar prácticamente la homogeneidad, tal como se describe en el Ejemplo 2 y se evaluaron en detalle para sus parámetros cinéticos de estado estacionario. Este enfoque produjo numerosas variantes con mejoras significativas en la catálisis de L-Kyn en comparación con *h*-KYN de tipo salvaje (WT, por sus siglas en inglés). La Tabla 2 muestra las variantes *h*-KYN con una mejora ≥ 2 veces de k_{cat}/K_M .

Tabla 2. Cinética de las variantes *h*-KYNU que muestran ≥ 2 veces mayor k_{cat}/K_M que *h*-KYNU WT

SEC ID n.º	Variante	k_{cat}/K_M (s $^{-1}$ mM $^{-1}$)	Factor de cambio respecto a WT
8	WT <i>h</i> -KYNU	0,1	-
58	A436T	1,4	14
59	A99F/G112A/F306Y/V339A/I405L/S408N	0,2	2
60	A99I/I131V/F249W	0,4	4
61	A99I/I131V/F249W/E259P	0,6	6
62	A99I/I131V/F249W/E259P/F306L	0,9	9
63	A99S/F306L	1,7	17
64	A99S/F306L/A436T	2,4	24
65	A99S/T138S/F306L/A436T	1,9	19
66	A99V/G112A/F306Y/L337V/I405L/S408N	2,1	21
67	A99V/G112A/F306Y/L337V/V339I/I405F/S408N	1,4	14
68	A99V/G112A/F306Y/V339A/I405L/S408N	1,9	19
69	A99V/G112A/T138S/V339A/I405F	1,3	13
70	F306I/L337V/V339I/I405F/S408T	1,7	17
71	F71L/A99I/E259P	0,9	9
72	F71L/A99I/I131V/E259P/A282P	0,2	2
73	F71L/A99I/I131V/E259P/V303 S	0,3	3
74	F71L/A99I/I131V/F249W/L322P	1,1	11
75	F71L/E259P/L322P	0,5	5
76	F71L/F249W/E259P/V303S	0,2	2
77	G112A/F306Y/L337V/I405L	2,0	20
78	G112A/F306Y/V339M/I405L	1,6	16
79	G112A/F306Y/V339S/I405L	1,5	15
80	G112S/F306L/V339T/S408T	1,6	16
81	G112S/F306Y/V339T/I405L	1,2	12
82	I110L	0,2	2
83	I110L/F306L	0,6	6
84	I131M/F249W/S274G	0,8	8
85	I131V/F249W	0,4	4
86	T138S	0,3	3
87	L59M/G112S/F306Y/V339A/I405L/S408N	0,6	6
88	H41R/Q175L/A436T	0,4	4
89	T138S/A436T	0,3	3
90	F71L/A99I/G112A/T138S/F306Y/L337V/V339I/I405L/S408N/A436T	1,4	14
91	F306Y	0,2	2
92	F71L/A99I/S167T/E259P	0,9	9
93	A99I/G112A/F306Y/I405L/S408N/A436T	1,2	12

Ejemplo 21. Comparación de las terapias Pf-KYNU, anti-PD1 y anti-CTLA-4 en el modelo de melanoma B16 autólogo en ratones

La quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens* PEGilada (Pf-KYNU-PEG) fue evaluada en el modelo de ratón de melanoma B16 en una comparación lado a lado con los anticuerpos inmunitarios de punto de control inmunitario anti-PD1 (clon RMP1-14, BioXCell n.º BE0146) o anti-CTLA-4 (clon UC10-4F10-11, BioXCell n.º BE0032). Se implantaron cincuenta mil células B16 en el flanco de ratones C57BL/6J (día 0, n=8 ratones en cada grupo). Una vez se desarrollaron tumores palpables (día 10), los animales fueron tratados con 250 µg de anti-PD1, 100 µg de anti-CTLA-4 (200 µg de 1^a dosis según Holmgård *et al.* (2013)), o 500 µg de PEG-Pf-KYNU en los tiempos mostrados (FIG. 8). Se utilizó como control PEG-Pf-KYNU inactivado por calor. La administración de PEG-Pf-KYNU produjo un retraso significativo del crecimiento tumoral y una supervivencia prolongada de una manera indistinguible de la observada con los anticuerpos inhibidores de punto de control anti-PD1 o anti-CTLA-4 (FIG. 8) para PEG-Pf-KYNU vs. enzima inactivado o solo PBS.

Ejemplo 22. Eficacia de la terapia combinada Mu-KYNU o Pf-KYNU y anti-PD1 en el modelo de melanoma B16 autólogo en ratones

Los enzimas pegilados (PEG-Pf-KYNU y PEG-Mu-KYNU) fueron evaluadas en aloinjertos de melanoma B16 en combinación con el anticuerpo inhibidor de punto de control inmunitario anti-PD1 (Curran *et al.*, 2010). En cuatro grupos de ratones C57BL/6J (10 por grupo) se implantaron 50.000 células B16 (Día 0) y se permitió el desarrollo de

5 tumores. Una vez se habían desarrollado tumores palpables (día 10), los animales fueron tratados con 250 µg de anti-PD1 por inyección IP (clon RMP1-14, BioXCell n.º BE0146) los días 10, 13 y 16, ya sea con o sin 500 µg de PEG-Pf-KYNU o 500 µg de PEG-Mu-KYNU s.c. en un sitio próximo al tumor. Los ratones recibieron un total de seis dosis de KYNU entre los días 10 y 25. A un grupo se le administraron inyecciones de PBS i.p. como control para PD-1. El crecimiento tumoral se deterioró drásticamente o incluso se revirtió en todos los grupos de tratamiento en comparación con el control de PBS (FIG. 9A). Es importante destacar que se observaron efectos aditivos con anti-PD1 en combinación con KYNU, lo que resultó en la remisión completa del 60 % de los tumores con el tratamiento con PEG-Pf-KYNU/anti-PD1 y del 20 % de los tumores con el tratamiento con PEG-Mu-KYNU/anti-PD1 (FIG. 9B). Los gráficos de Kaplan-Meier correspondientes se proporcionan en la FIG. 9C.

10 **Ejemplo 23. Eficacia de las terapias de PEG-Mu-KYNU en el modelo de melanoma B16 autólogo en ratones**

15 La quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* PEGilada (PEG-Mu-KYNU) fue evaluada en el modelo de melanoma B16 en ratones. Los aloinjertos se iniciaron mediante implantación de 50.000 células B16 en los flancos de ratones C57BL/6J (día 0, n=9 ratones por grupo). Una vez se habían desarrollado tumores palpables (día 10), los animales fueron tratados con 500 µg de PEG-Mu-KYNU mediante inyección subcutánea cerca del sitio del tumor cada tres días para un total de 6 dosis. Se utilizó como control un régimen de tratamiento idéntico con PEG-Mu-KYNU inactivado por calor. La administración de PEG-Mu-KYNU resultó en el retraso del crecimiento tumoral (FIG. 10A) con una mediana de supervivencia prolongada de 25 días en comparación con 22 días para el control de PEG-Mu-KYNU inactivado por calor (FIG. 10B).

20 **Ejemplo 24. Desarrollo y verificación de una selección genética competitiva para la actividad de quinureninasa incrementada**

25 Se diseñó un método de selección genética que utilizaba un medio de cultivo definido para permitir el aislamiento de clones de *E. coli* que expresaban variantes de quinureninasa que mostraban una mayor actividad, a partir de un gran exceso de clones que expresaban variantes menos activas de quinureninasa en bibliotecas combinatoriales. Los medios de cultivo definidos, denominados medios M9-KYN, contenían sales mínimas M9, sulfato de magnesio 2 mM, cloruro de calcio 0,1 mM, glucosa al 2 %, IPTG 10 µM, ampicilina, quinurenina 100 µM y agua. Tal como se describe en el Ejemplo 13, se utilizó un mutante por delección de *E. coli* *ΔtrpE* para los experimentos de selección genética. La cepa de *E. coli* *ΔtrpE* se obtuvo de Genetic Resources en Yale CGSC y presentaba el genotipo (F-, Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787($::rrnB-3$), λ ; Δ trpE772::kan, rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514). Las células de *E. coli* *ΔtrpE* que expresaban *h*-KYNU, *Mu*-KYNU, o *Pf*-KYNU bajo el control transcripcional del promotor tac inducible con IPTG fueron capaces de crecer en medio líquido M9-KYN, mientras que las células de *E. coli* *ΔtrpE* que no contenían enzima quinureninasa no pudieron crecer en medio M9-KYN, demostrando la necesidad de enzima quinureninasa activa para el crecimiento de las células de *E. coli* *ΔtrpE* en medio M9-KYN-KYN. Del mismo modo, en medio que carecía de quinurenina, las células de *E. coli* *ΔtrpE* que contenían *h*-KYNU, *Mu*-KYNU o *Pf*-KYNU fueron incapaces de crecer. Específicamente, después de la inoculación de 10^4 células de *E. coli* *ΔtrpE* que contenían la mayor actividad de *Pf*-KYNU en 25 ml de medio líquido M9-KYN a 37 °C bajo agitación a 220 rpm, el cultivo alcanzó la saturación a una $DO_{600}=2$ después de 18 horas. Por el contrario, la inoculación del mismo número (10^4) de células de *E. coli* *ΔtrpE* que contenían *Mu*-KYNU (4 veces menor actividad catalítica) alcanzó la saturación ($DO_{600}=2$) en 18 a 24 horas. Bajo las mismas condiciones, la inoculación de un cultivo con el mismo número de células, pero que expresaba en cambio la baja actividad de *h*-KYNU, alcanzó la saturación ($DO_{600}=2$) en > 48 horas.

30 Se diseñó un procedimiento de selección genética generalizado que utilizaba medio M9-KYN para permitir el aislamiento de variantes de quinureninasa más activas respecto de variantes menos activas. En la selección genética generalizada, se raspó un inóculo inicial de 10^4 - 10^{10} células *E. coli* *ΔtrpE* que contenían una biblioteca de variantes mutadas de quinureninasa de placas de agar LB + 0,1 mg/ml de ampicilina y se inoculó en 25 ml de medio M9-KYN. El número de células utilizadas para el inóculo inicial habitualmente fue 10 veces el número estimado de variantes para una biblioteca dada de quinureninasa. El inóculo inicial se lavó 3 veces mediante peletización mediante centrifugación a 3000xg durante 5 minutos, descartando el sobrenadante, y después resuspendiendo en 1 ml de PBS estéril, pH=7,4. Después de la inoculación en 25 ml de medio M9-KYN, las células se cultivaron en las mismas condiciones que las indicadas en el párrafo anterior a una $DO_{600}>1,0$ y <2,0 (cultivo de fase 1). Las células de 1 ml de cultivo se lavaron mediante peletización mediante centrifugación a 3000xg durante 5 minutos, descartando el sobrenadante, y después se resuspendieron en 1 ml de PBS estéril, pH=7,4. Este procedimiento de lavado se repitió 3 veces. Posteriormente, se utilizó un número de células igual a 20 % del número de células que se habían utilizado para inocular el cultivo de fase 1, se utilizaron para inocular 25 ml de medio M9-KYN nuevo. A continuación, se dejó que las células crecieran hasta una $DO_{600}>1,0$ y <2,0, tal como se ha indicado anteriormente. Para lo anterior y cada ronda de fase posterior, las células de la ronda anterior equivalentes a 20 % del número de células que habían sido utilizadas como inóculo para el fase anterior se cultivaron en medio de selección hasta una $DO_{600}>1,0$ y <2,0. Se realizaron múltiples rondas de fase según lo requerido. Se sembraron 10^4 células de la ronda final de selección en placas de agar LB + 0,1 mg/ml de ampicilina para su posterior análisis. Por ejemplo, para una biblioteca propensa a errores con un tamaño calculado= $1,0\times 10^7$, el inóculo inicial utilizaría 1×10^8 células, y las rondas 2 a 6 seguidamente utilizarían 2×10^7 , 4×10^6 , 8×10^5 , $1,6\times 10^5$ y $3,2\times 10^4$, células de las rondas anteriores, respectivamente, y después se sembraron 10^4 células de la sexta ronda de selección en agar LB + 0,1 mg/ml de ampicilina para su análisis posterior.

El procedimiento de selección genética anterior fue validado mediante la demostración del enriquecimiento con éxito de células que expresaban variantes de quinureninasa de mayor actividad a partir de un exceso de 100 o 10.000 veces de células que expresaban variantes de quinureninasa de menor actividad. Se mezclaron 10^4 células de *E. coli* $\Delta trpE$ expresantes de *Pf-KYNU* con 10^8 células de *E. coli* $\Delta trpE$ expresantes de *Mu-KYNU* menos activo. Estas células habían crecido durante la noche en medio LB + 0,1 mg/ml de ampicilina, y se lavaron 3 veces mediante peletización por centrifugación a 3000xg durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y después resuspendiendo en 1 ml de PBS estéril, pH=7,4 antes de inocular en 25 ml de medio líquido M9-KYN y cultivando a 37°C bajo agitación a 220 rpm hasta una $DO_{600}>1,0$ y $<2,0$. Para la segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta rondas de selección, los inóculos comprendían 2×10^7 , 4×10^6 , 8×10^5 , $1,6 \times 10^5$, y después $3,2 \times 10^4$ células lavadas del cultivo anterior, respectivamente. Despues de seis rondas de crecimiento en medio selectivo, se sembraron 10^4 células en placas de agar con medio LB + 0,1 mg/ml de ampicilina y el ADN plasmídico se extrajo de 5 colonias y se sometió a secuenciación del ADN. 4/5 plásmidos codificaban *Pf-KYNU* y 1/5 codificaban *Mu-KYNU*, indicando un enriquecimiento de 8000 veces. En un experimento separado, se mezclaron 10^8 células de *E. coli* $\Delta trpE$ expresantes de la variante *h-KYNU* F71L/A99I/G112A/T138S/F306Y/L337V/V339I/I405L/S408N/A436T (SEC ID n.º 90), que mostraba una actividad 14 veces mayor que *h-KYNU* de tipo salvaje, con 10^4 células de *E. coli* $\Delta trpE$ codificantes de *Mu-KYNU* de tipo salvaje (370 veces mayor actividad que *h-KYNU* de tipo salvaje) y se cultivaron en 25 ml de medio selectivo M9-KYN, tal como anteriormente. Las rondas posteriores de crecimiento en medio de selección utilizaron inóculos que comprendían 2×10^7 , 4×10^6 , 8×10^5 , $1,6 \times 10^5$, y finalmente $3,2 \times 10^4$ células lavadas de la ronda de selección anterior. Despues de seis rondas de selección, se sembraron 10^4 células en placas de agar con medio LB + 0,1 mg/ml de ampicilina y se extrajo el ADN plasmídico de 5 colonias y se sometió a secuenciación del ADN. Se mostró que 5/5 plásmidos codificaban el *Mu-KYNU* más activo, indicando un enriquecimiento de 10.000 veces y demostrando fuertemente la selección basada en la actividad.

Ejemplo 25. Utilización de la selección genética competitiva para aislar variantes *h-KYNU* con actividad de quinureninasa altamente mejorada a partir de mutagénesis de saturación dirigida a sitio y recombinada, o bibliotecas de PCR propensas a errores

Para modificar adicionalmente la actividad de degradación de L-quinurenina en *h-KYNU*, se construyó una serie de bibliotecas codificantes de enzimas mutantes mediante "barajado" de ADN (en inglés, *DNA shuffling*), mutagénesis de saturación dirigida al sitio o PCR propensa a errores. El ADN plasmídico de estas bibliotecas se transformó en células de *E. coli* $\Delta trpE$ y creció en medio selectivo M9-KYN. Despues de varias rondas de selección por transferencia secuencial a medio selectivo, tal como se describe en el Ejemplo 24, las células se sembraron en placas de agar con medio LB + 0,1 mg/ml de ampicilina, se recolectaron colonias individuales y se cultivaron en placas de 96 pocillos, y las actividades catalíticas se determinaron tal como se describe en el Ejemplo 6. Se secuenciaron los clones que mostraban una actividad aparente mayor a fin de identificar mutaciones, y seguidamente se purificaron hasta alcanzar prácticamente la homogeneidad, tal como se describe en el Ejemplo 2, y se evaluaron en detalle para sus parámetros cinéticos de estado estacionario. Los resultados de estos esfuerzos condujeron al aislamiento de cuatro variantes con actividad de degradación mejorada de quinurenina (SEC ID n.º 90 a n.º 93).

Todos los métodos dados a conocer y reivindicados en la presente memoria pueden llevarse a cabo y ejecutarse sin necesidad de experimentación indebida a la luz de la presente exposición. Si bien las composiciones y métodos de la presente invención han sido descritos en términos de realizaciones preferentes, resultará evidente para el experto en la materia que pueden aplicarse variaciones a los métodos y en las etapas, o en la secuencia de etapas, del método descrito en la presente memoria.

BIBLIOGRAFÍA

Patente US n.º 4.870.287
 Patente US n.º 5.739.169
 Patente US n.º 5.760.395
 Patente US n.º 5.801.005
 Patente US n.º 5.824.311
 Patente US n.º 5.830.880
 Patente US n.º 5.846.945
 Patente US n.º 5.889.155
 Patente US n.º 7.109.304
 Patente US n.º 8.465.743
 Publicación de patente US n.º 2009/0304666
 WO 2012/031744
 WO 2012/079000
 WO 2013/059593

Ahmed et al., HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clinical Cancer Research*, 16(2):474-485, 2010.
 Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

- 5 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.
- 6 Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.
- 7 Chen and Guillemin, *Kynurene pathway metabolites in humans: disease and healthy States*. *Int J Tryptophan Res*, 2:1-19, 2009.
- 8 Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
- 9 Cole and Gaucher, *Exploiting models of molecular evolution to efficiently direct protein engineering*. *J. Mol. Evol.*, 72:193, 2011.
- 10 Curran et al., *PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:4275-4280, 2010.
- 11 Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
- 12 de Jong et al., *Serum tryptophan and kynurene concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian, and vulvar cancer*. *Int J Gynecol Cancer*, 21(7):1320-1327, 2011.
- 13 Della Chiesa et al., *The tryptophan catabolite L-kynurene inhibits the surface expression of NKp46-and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function*. *Blood*, 108(13):4118-4125, 2006.
- 14 Godin-Ethier et al., *Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives*. *Clinical Cancer Research*, 17(22):6985-6991, 2011.
- 15 Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- 16 Harkki et al., *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.
- 17 Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- 18 Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- 19 Holmgard et al., *Indoleamine 2, 3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4*. *The Journal of Experimental Medicine*, 210:1389-1402, 2013.
- 20 Hoover and Lubkowski, *DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis*. *Nucleic Acids Research*, 30(10):e43-e43, 2002.
- 21 Hopwood et al., In: *Genetic Manipulation of Streptomyces*, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.
- 22 Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- 23 Ito et al., *J. Biochem.*, 79:1263, 1976.
- 24 Kaper et al., *Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurene efflux cycle*. *PLoS Biology*, 5(10):e257, 2007.
- 25 Lipowska-Bhalla et al., *Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges*. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61(7):953-962, 2012.
- 26 Lob et al., *Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees?* *Nat Rev Cancer*, 9(6):445-452, 2009.
- 27 Lordanescu, *J. Bacteriol*, 12:597-601, 1975.
- 28 Mandi and Vecsei, *The kynurene system and immunoregulation*. *J Neural Transm*, 119(2):197-209, 2012.
- 29 Maniatis, et al., *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- 30 Mellor et al., *Gene*, 24:1-14, 1983.
- 31 Mezrich et al., *An interaction between kynurene and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells*. *The Journal of Immunology*, 185(6):3190-3198, 2010.
- 32 Opitz et al., *The Indoleamine-2, 3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells*. *PLoS One*, 6(5):e19823, 2011.
- 33 Opitz et al., *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. *Nature*, 478(7368):197-203, 2011.
- 34 Penttila et al., *Gene*, 61:155-164, 1987.
- 35 Pilote et al., *Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(7):2497-2502, 2012.
- 36 Prendergast, *Cancer: Why tumours eat tryptophan*. *Nature*, 478(7368):192-194, 2011.
- 37 Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- 38 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- 39 Rutella et al., *Targeting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) to counteract tumour-induced immune dysfunction: from biochemistry to clinical development*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 9(2):151-177, 2009.
- 40 Schellenberger et al., *Nature Biotech.*, 27:1186-1190, 2009.
- 41 Shin et al., *Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(30):12391-12396, 2013.
- 42 Sibakov et al., *Eur. J. Biochem.*, 145:567-572, 1984.
- 43 Song et al., *L-Kynurene-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species*. *International Immunopharmacology*, 11(8):932-938, 2011.
- 44 Stone et al., *Replacing Mn²⁺ with Co²⁺ in human arginase I enhances cytotoxicity toward L-arginine auxotrophic cancer cell lines*. *ACS Chemical Biology*, 5:333-342, 2010.
- 45 Voigt et al., *Protein building blocks preserved by recombination*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9:553, 2002.
- 46 Ward, *Proc. Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi*, Helsinki, 119-128, 1989.

- §
- Wawrzynczak and Thorpe, In: Immunoconjugates, Antibody Conjugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.
- Yao et al., Serum metabolic profiling and features of papillary thyroid carcinoma and nodular goiter. *Mol Biosyst*, 7(9):2608-2614, 2011.
- Yoshikawa et al., Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Eur J Haematol*, 84(4):304-309, 2010.

REIVINDICACIONES

5. 1. Enzima quinureninasa humano aislado y modificado, en donde dicho enzima modificado presenta sustituciones respecto a la quinureninasa humana nativa (ver SEC ID n.º 8), en el que las sustituciones están en las posiciones:
- (1) A99, F306 y A436, o
 (2) A99, G112, F306, V339, 1405 y S408, o
 (3) A99, 1131, F249, E259 y F306, o
 (4) A99 y F306, o
 (5) A99, T138, F306 y A436, o
 (6) A99, G112, F306, L337, 1405 y S408, o
 (7) A99, G112, F306, L337, V339, 1405 y S408, o
 (8) A99, G112, F306, V339, 1405 y S408.
10. 2. Enzima según la reivindicación 1, en el que las sustituciones están por lo menos en las siguientes posiciones:
- (1) A99F, G112A, F306Y, V339A, 1405L y S408N, o
 (2) A99I, 1131V, F249W, E259P y F306L, o
 (3) A99S y F306L, o
 (4) A99S, T138S, F306L y A436T, o
 (5) A99V, G112A, F306Y, L337V, 1405L y S408N, o
 (6) A99V, G112A, F306Y, L337V, V339I, 1405F y S408N, o
 (7) A99V, G112A, F306Y, V339A, 1405L y S408N.
15. 3. Enzima según la reivindicación 1 o 2, que comprende, además, un segmento de péptido heterólogo.
20. 4. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el enzima está acoplado a polietilenglicol (PEG), en particular, en donde el enzima está acoplado a PEG mediante uno o más residuos de Lys o Cys.
25. 5. Ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos codificante del enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en particular, en donde el ácido nucleico ha sido optimizado para los codones para la expresión en bacterias, hongos, insectos o mamíferos.
30. 6. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 5.
35. 7. Célula huésped que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 5, en particular en el que la célula huésped es una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de insecto, o una célula de mamífero.
40. 8. Formulación farmacéutica que comprende una quinureninasa según la reivindicación 1 o 2 en un portador farmacéuticamente aceptable.
45. 9. Formulación farmacéutica según la reivindicación 8, en la que la quinureninasa comprende, además, un segmento peptídico heterólogo.
50. 10. Formulación farmacéutica según la reivindicación 8 o 9, en la que la quinureninasa está acoplada a polietilenglicol (PEG).
55. 11. Composición que comprende una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica según la reivindicación 8 para la utilización en el tratamiento de un sujeto que presenta un tumor.
60. 12. Célula T transgénica que comprende un receptor de antígeno químérico de células T (CAR) expresado y un enzima quinureninasa expresado según la reivindicación 1 o 2.
65. 13. Composición que comprende una cantidad eficaz de células transgénicas según la reivindicación 12 para la utilización en el tratamiento de un sujeto que presenta un tumor.

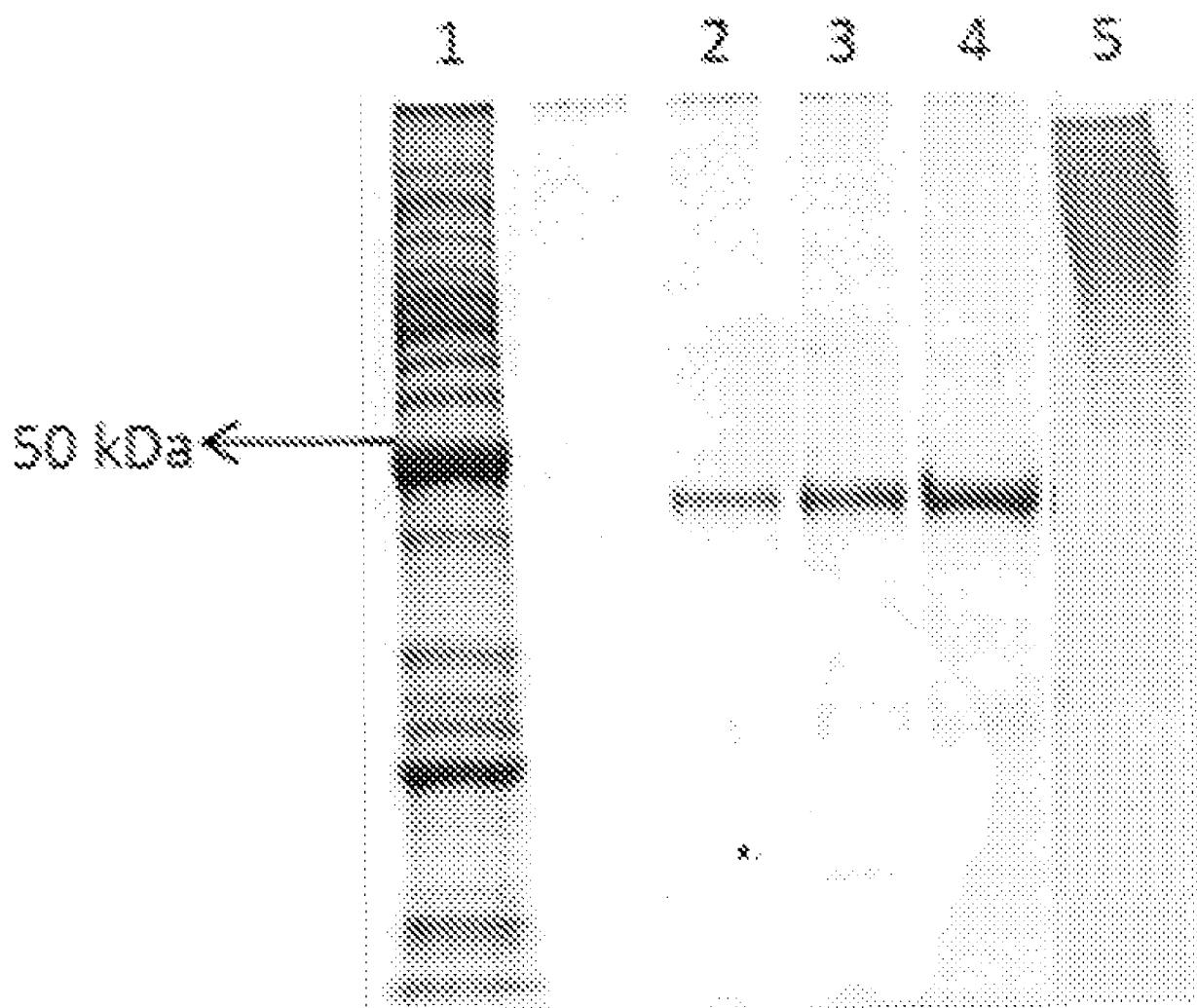


FIG. 1

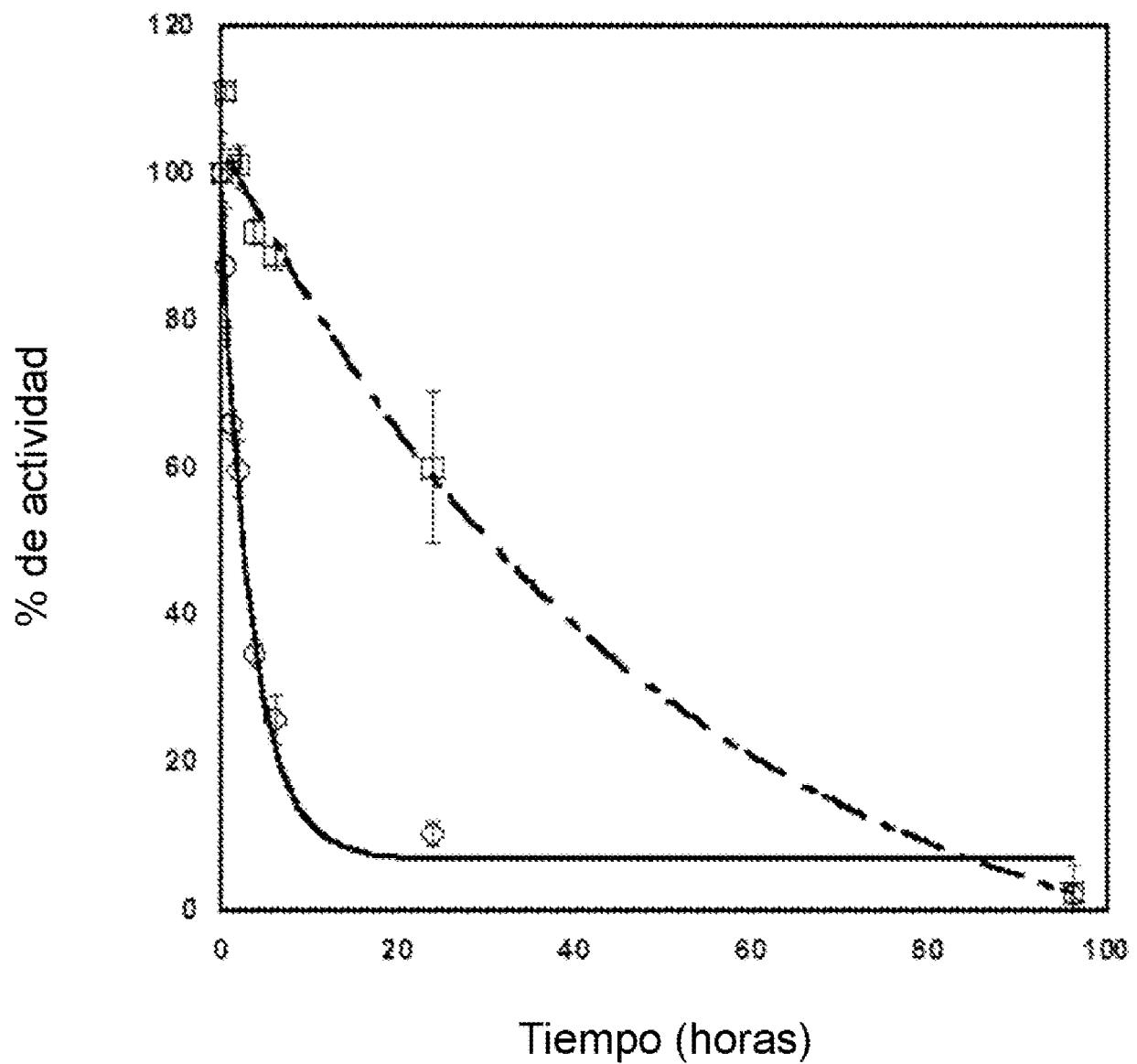


FIG. 2

Datos agrupados de crecimiento tumoral

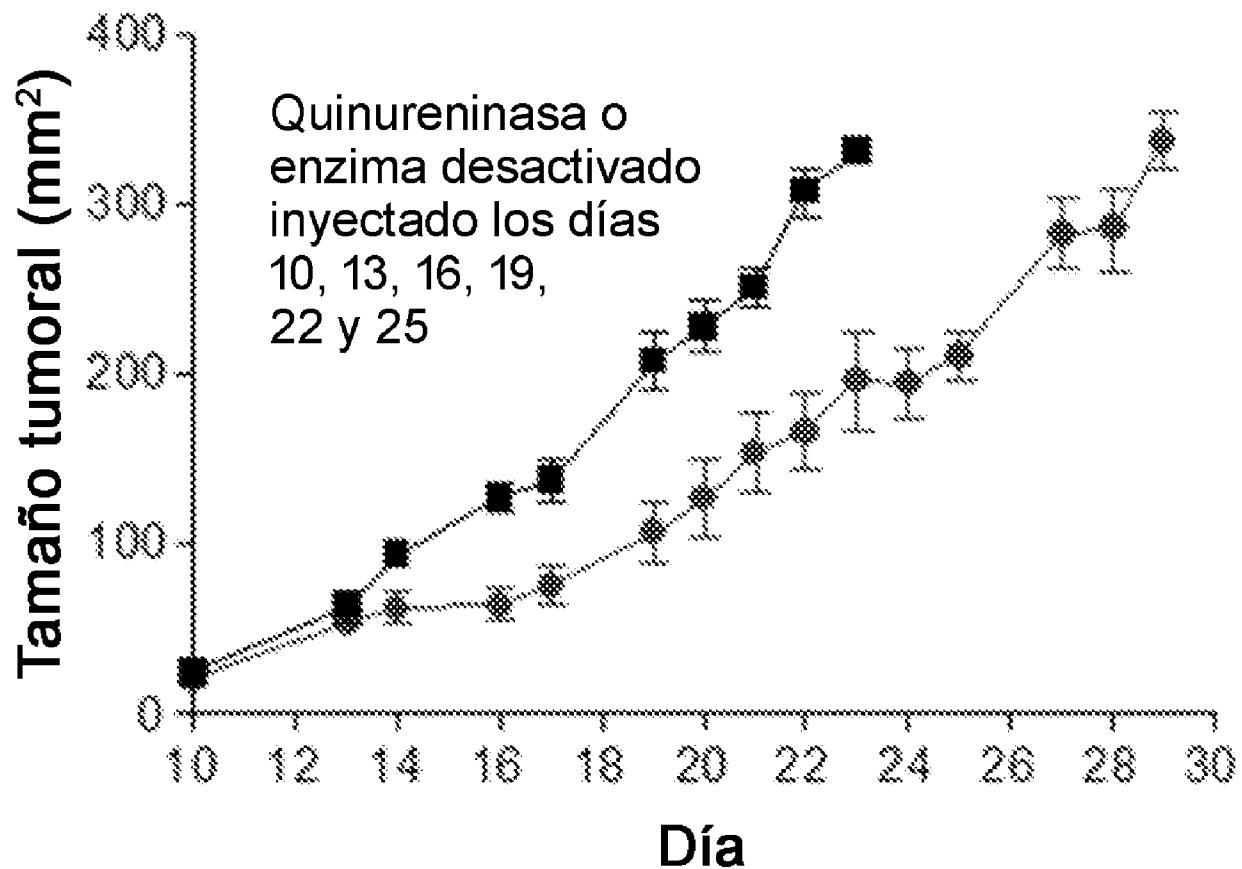


FIG. 3

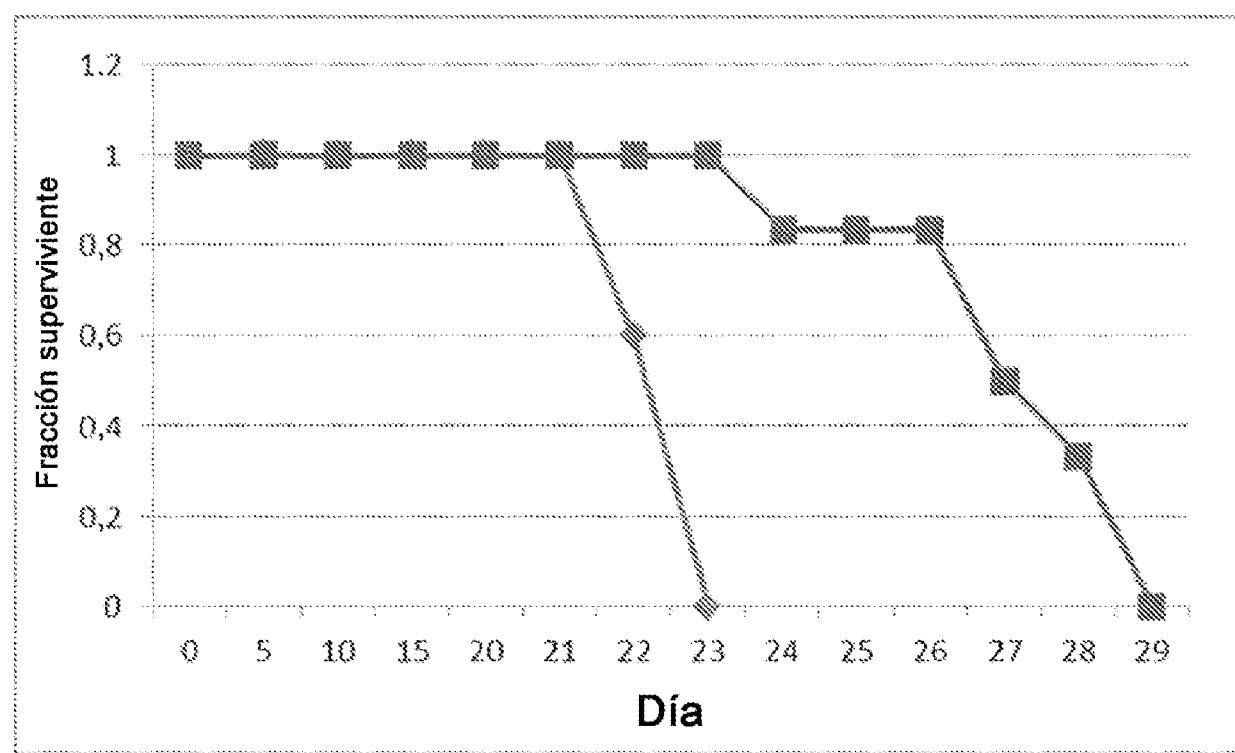
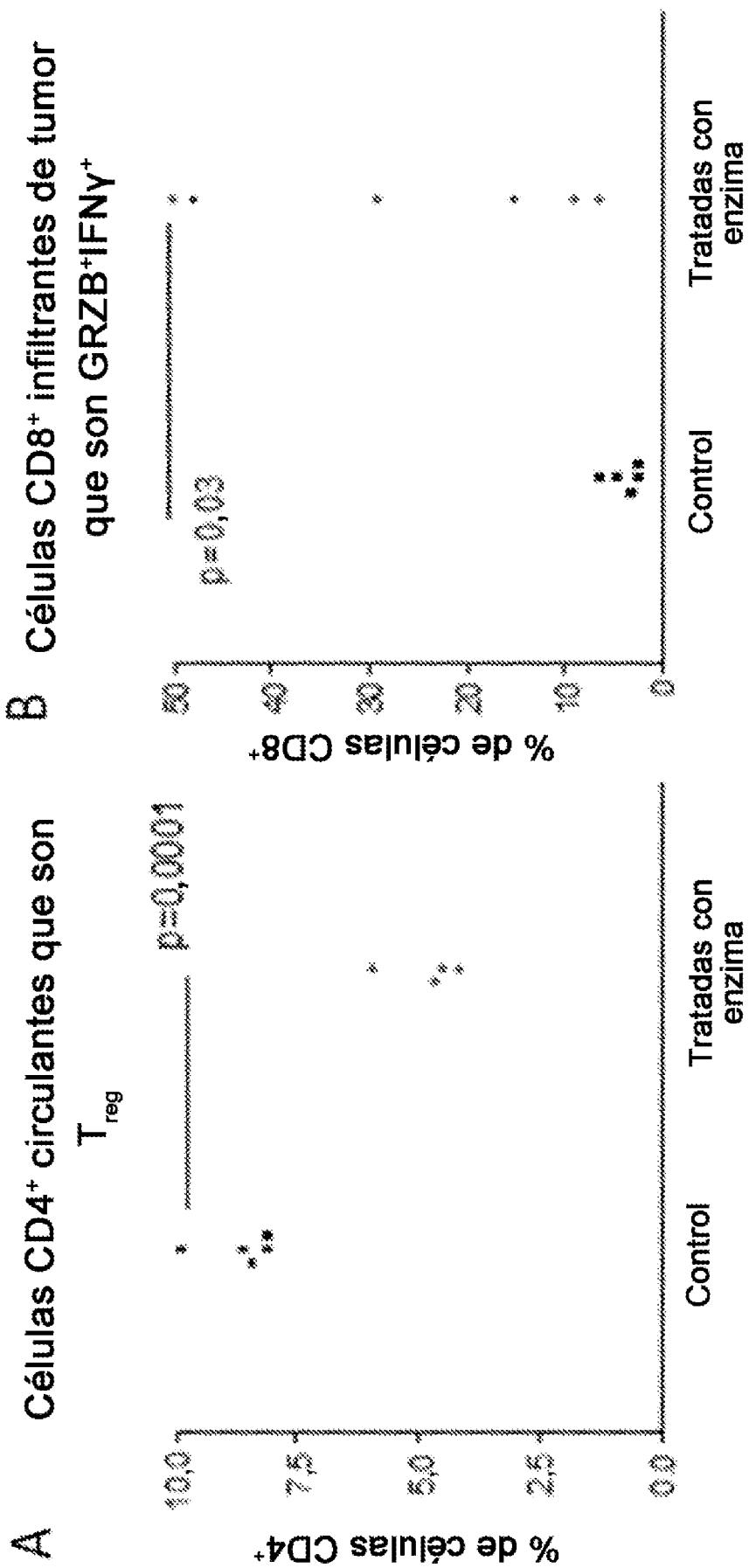


FIG. 4



FIGS. 5A-B

Césped

Ausencia de crecimiento

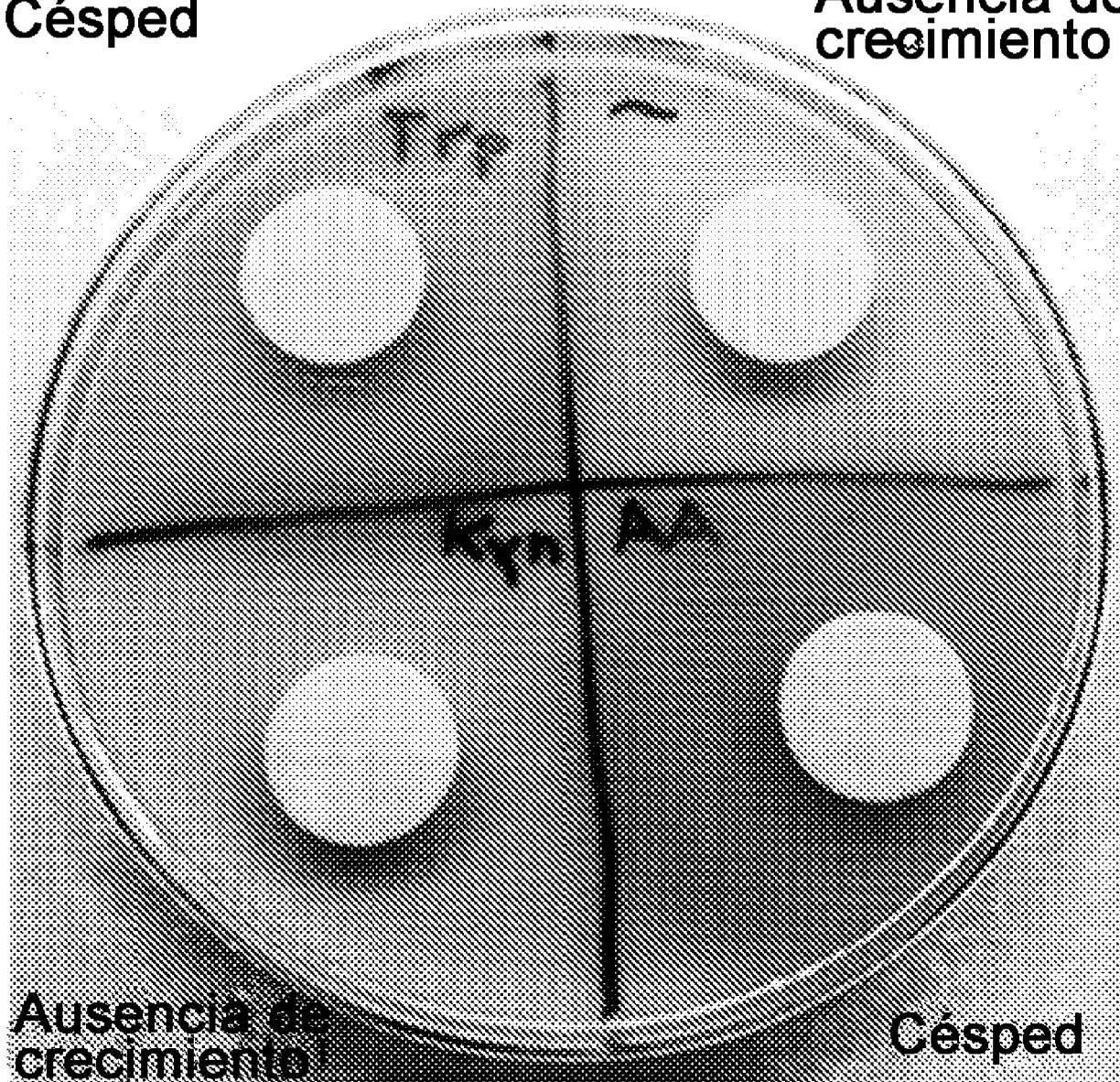


FIG. 6

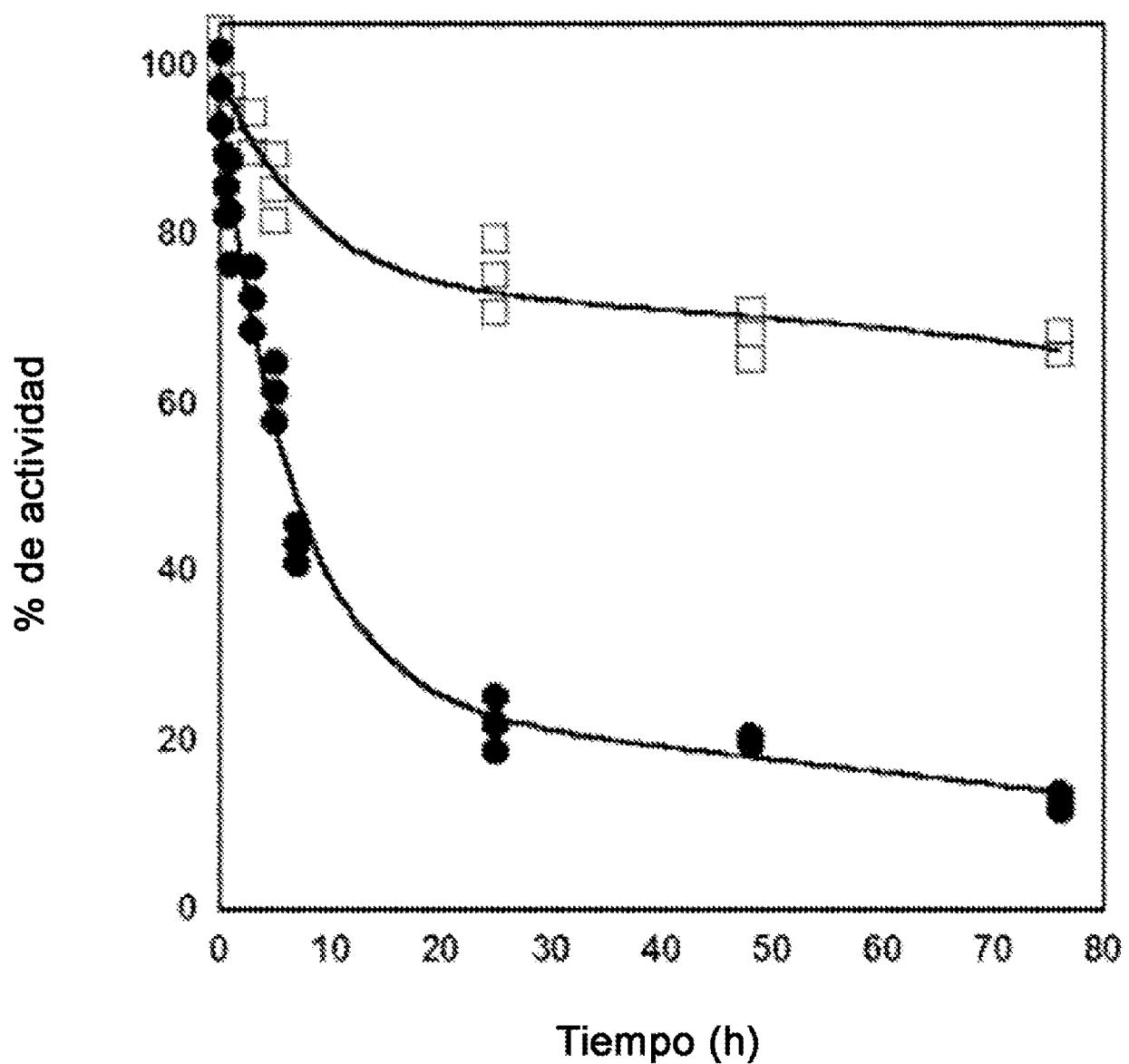


FIG. 7

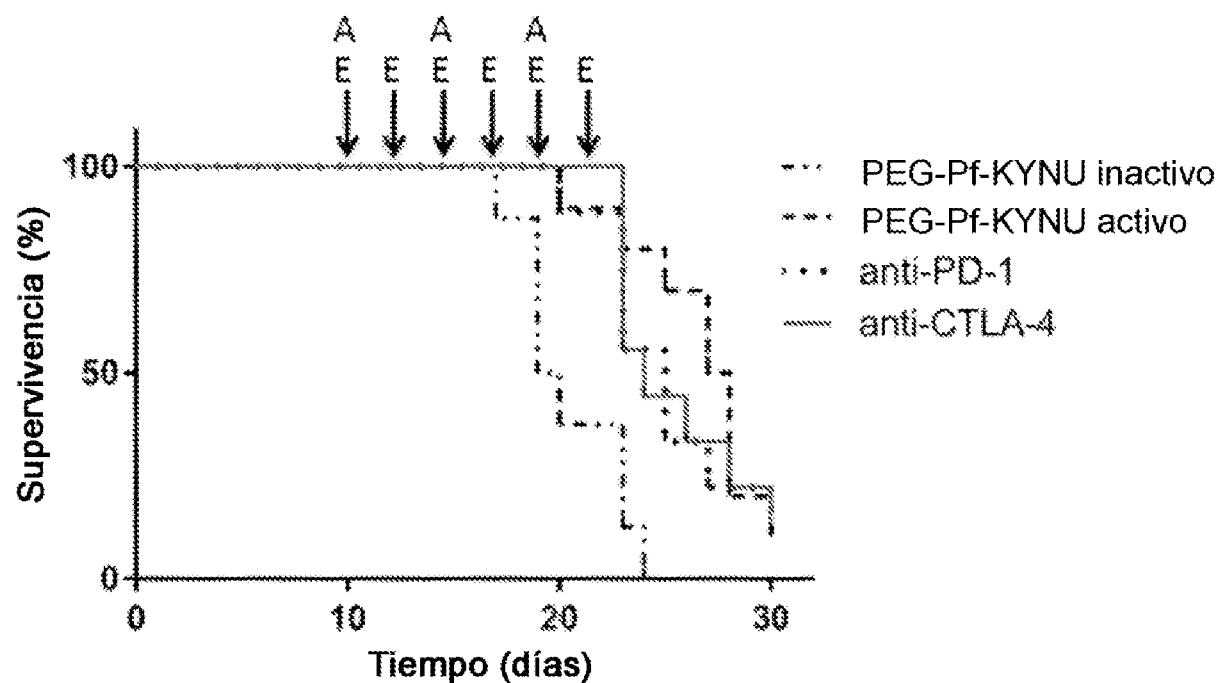
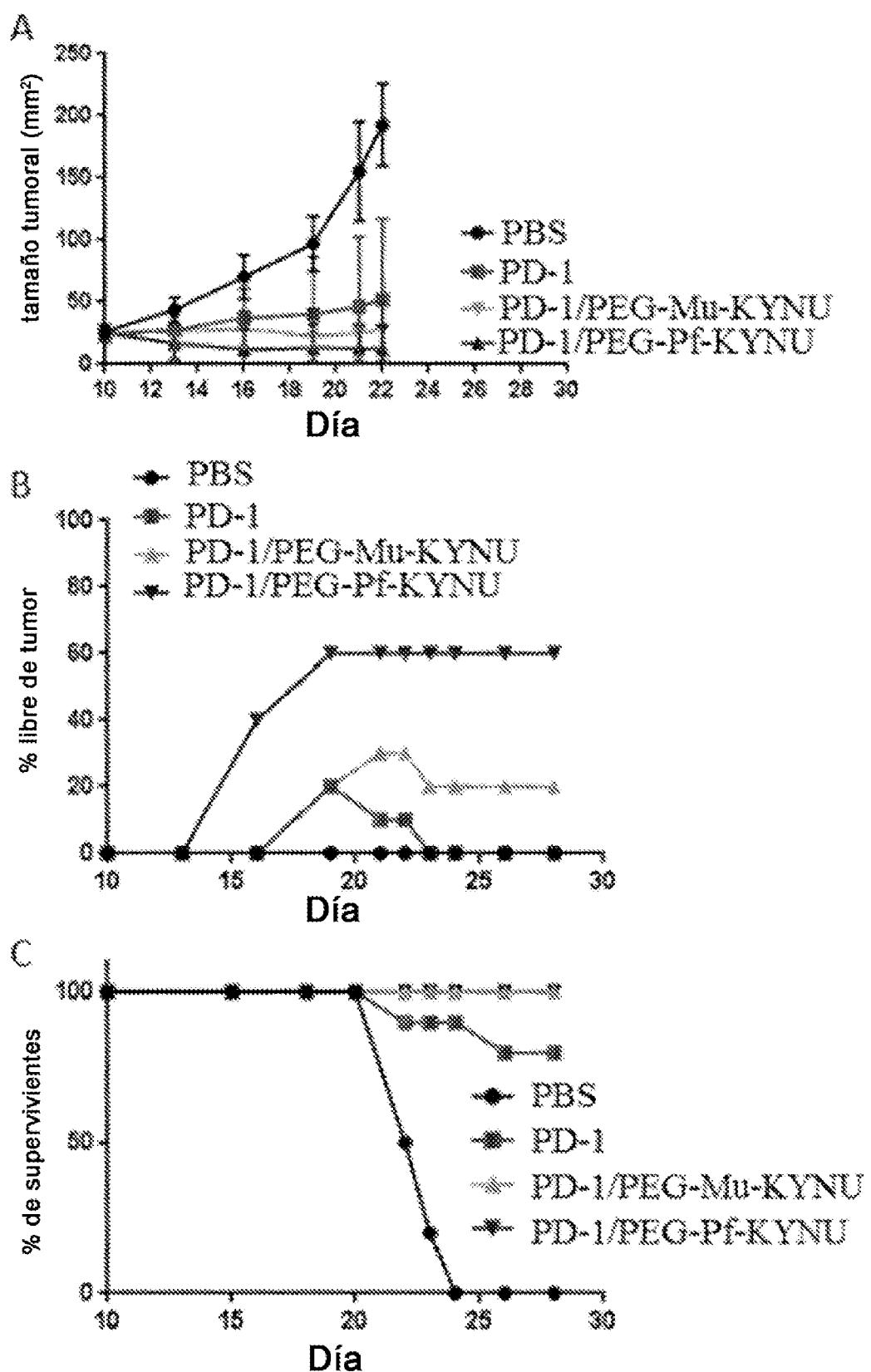
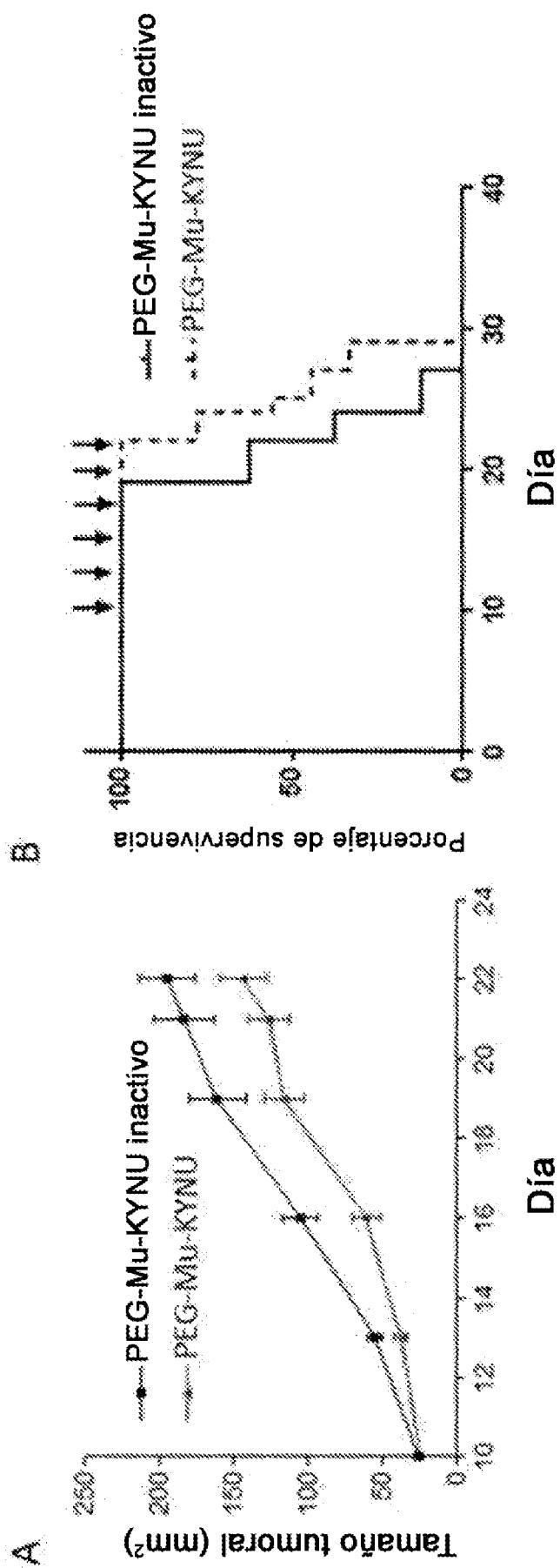


FIG. 8



FIGs. 9A-C



FIGs. 10A-B