

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 664**

51 Int. Cl.:

C12N 9/78 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2014 PCT/US2014/020943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14138319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2014 E 14760354 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.01.2022 EP 2964761**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende arginina desiminasa de unión a albúmina para el tratamiento dirigido del cáncer**

30 Prioridad:

06.03.2013 US 201361773214 P

05.03.2014 US 201414197236

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

09.05.2022

73 Titular/es:

**VISION GLOBAL HOLDINGS LTD. (100.0%)
18/F, Chevalier Commercial Centre, 8 Wang Hoi
Road, Kowloon Bay, Kowloon
Hong Kong, CN**

72 Inventor/es:

**WONG, BING, LOU;
WAI, NORMAN, FUNG MAN;
KWOK, SUI, YI y
LEUNG, YUN, CHUNG**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 909 664 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

Composición farmacéutica que comprende arginina desiminasa de unión a albúmina para el tratamiento dirigido del cáncer

5

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica los derechos de la solicitud provisional de patente US número de serie 61/773.214, presentada el 6 de marzo de 2013 y la solicitud no provisional de patente US número de serie 14/197.236, presentada el 5 de marzo de 2014, publicada como el documento US 2014255377 (A1).

10

Campo técnico

La presente divulgación describe una proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina (AAD) que ha sido modificada genéticamente para crear un material que presenta una actividad elevada y una semivida *in vivo* prolongada. La presente divulgación describe además diseños para la ingeniería de ADN y proteínas destinados a crear diferentes proteínas de fusión de AAD. Las proteínas de fusión de AAD pueden aislarse y purificarse a partir de una fracción soluble y una fracción insoluble (cuerpos de inclusión) de las proteínas en bruto. La presente divulgación se refiere además a composiciones farmacéuticas que contienen arginina desiminasa de unión a albúmina para el tratamiento dirigido del cáncer ("cancer targeting treatment") y que curan enfermedades dependientes de arginina en seres humanos y en otros animales.

15

20

Antecedentes de la invención

La incidencia del cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer hepático, melanoma y cáncer cervical en la población mundial está creciendo. Se requieren urgentemente tratamientos eficaces para dichas enfermedades. En muchos tipos de cáncer, entre ellos leucemia, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer cervical y cáncer hepático, las células de cáncer son auxotróficas para la arginina, ya que carecen de expresión de argininosuccinato sintetasa (ASS), convirtiendo a estos cánceres en excelentes dianas para la terapia de agotamiento de la arginina.

25

30

La arginina es un aminoácido semiesencial para seres humanos y otros mamíferos. Puede sintetizarse a partir de citrulina mediante un procedimiento en dos etapas mediante los enzimas del ciclo de la urea argininosuccinato sintasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL). La arginina puede ser metabolizada en ornitina por el enzima arginasa, y la ornitina puede ser convertida en citrulina por la ornitina carbamoiltransferasa (OTC) en las mitocondrias. La citrulina puede utilizarse para sintetizar arginina nuevamente. Las células normales habitualmente no requieren un suministro exógeno de arginina para el crecimiento debido a la abundante actividad catalítica de ASS y ASL. En contraste, muchos tipos de cánceres no expresan ASS y, por lo tanto, son auxotróficos para la arginina. Su crecimiento es dependiente de la arginina obtenida exclusivamente de la circulación de la sangre. Por lo tanto, dirigirse ("targeting") a la arginina circulante mediante el uso de enzimas degradantes de arginina es una estrategia viable de inhibición del crecimiento de tumores negativos para ASS [Feun et al., *Curr. Pharm. Des.* 14:1049-1057 (2008); Kuo et al., *Oncotarget.* 1:246-251 (2010)]

35

40

La arginina puede ser degradada por la arginasa, la arginina descarboxilasa y la arginina desiminasa (ADI). De entre ellas, la arginina desiminasa (ADI) aparentemente presenta la afinidad más alta para la arginina (un valor bajo de K_m). La ADI convierte la arginina en citrulina y amoníaco, los metabolitos del ciclo de la urea. Por desgracia, sólo puede observarse ADI en procariotas, por ejemplo, *Mycoplasma* sp. Existen algunos problemas asociados al aislamiento y purificación de ADI a partir de los procariotas. La ADI aislada a partir de *Pseudomonas putida* no consigue mostrar eficacia *in vivo* debido a su baja actividad enzimática a pH neutro. La ADI producida a partir de *Escherichia coli* es enzimáticamente inactiva y en consecuencia requiere un procedimiento de múltiples desnaturalizaciones y renaturalizaciones, lo que eleva el consiguiente coste de producción.

45

50

Debido a que la ADI nativa se observa en microorganismos, es antigénica y resulta rápidamente lavada de la circulación en el paciente. La forma nativa de la ADI es inmunógena tras la inyección en la circulación humana con una semivida corta (~4 horas) e induce anticuerpos neutralizadores [Ensor et al., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002); Izzo et al., *J. Clin. Oncol.* 22:1815-1822 (2004)]. Estas desventajas pueden remediarse mediante pegilación. De entre las diversas formas de ADI pegilada, se encontró que la ADI unida a PEG (peso molecular de 20,000) mediante succinato de succinimidilo (ADI-PEG 20) es una formulación eficaz. Sin embargo, la actividad de ADI tras la pegilación se reduce mucho, del orden de 50% [Ensor et al., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002)]. Los intentos anteriores de crear ADI pegilada resultaron en materiales que no eran homogéneos (debido a la unión aleatoria de PEG a residuos de Lys en la superficie de las proteínas) y que además resultaban difíciles de caracterizar y de someter a control de calidad durante el procedimiento de fabricación. Además, PEG es muy caro, por lo que incrementa mucho el coste de producción. Tras la inyección intravenosa de ADI pegilada *in vivo*, se observa la fuga o desprendimiento de PEG libre y la ADI (sin PEG) puede inducir el problema de la inmunogenicidad. Por lo tanto, existe una necesidad de composiciones mejoradas de tratamiento de cáncer, en particular, composiciones mejoradas de tratamiento de cáncer que presenten una actividad y semivida *in vivo*

55

60

65

incrementadas.

El documento CN1634995 da a conocer una proteína fusionada (HSA-ADI) de albúmina de suero humano (HSA) y arginina desacilasa de micoplasma, un procedimiento para la preparación de la misma y la utilización de la misma en la preparación de medicina para el tratamiento de un tumor, tal como hepatoma.

La patente EP1987636 da a conocer una proteína antitumoral acoplada con un reactivo modificador específico en un sitio específico para superar las deficiencias inherentes de la proteína antitumoral, tal como una elevada antigenicidad y una semivida corta, y para superar las deficiencias resultantes de un método de modificación no específica, tal como sitios modificados inconsistentes, reconstituidos no homogéneos, actividad significativamente reducida y calidad difícil de controlar de los productos, y para finalmente ponerla a disposición para el tratamiento de tumores y la producción de medicamentos antitumorales.

NI et al., "Arginine deiminase, a potential anti-tumor drug", CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, EE.UU. (20080107), vol. 261, nº 1, ISSN 0304-3835, páginas 1 a 11, resumen los resultados de la expresión recombinante, análisis estructural, modificación con PEG (polietilenglicol), actividades anticancerosas *in vivo* y estudios clínicos de la arginina desiminasa (ADI) y, en particular, comentan la expresión heterogénea de la ADI, la evolución dirigida para la mejora de las propiedades enzimáticas y la fusión con HSA para conseguir una actividad *in vivo* incrementada.

El documento EP2295560 se refiere a arginina desiminasas modificadas que muestran una actividad incrementada a un pH más alto, en comparación con una arginina desiminasa no modificada, así como usos de dichas enzimas para el tratamiento de cáncer y neovascularización inducida por tumor no deseada en un cáncer.

ROLAND E KONTERMANN ED - JIN YONG-SU et al., "Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 22, nº 6, ISSN 0958-1669, (2011), páginas 868 a 876, proporcionan una vista general exhaustiva de las estrategias de prolongación de la semivida, entre ellas las destinadas a incrementar el volumen hidrodinámico de un fármaco proteico, aunque asimismo las que implementan procedimientos de reciclado mediados por el receptor neonatal de Fc.

Sumario de la presente divulgación

En la presente divulgación, las proteínas de fusión de arginina desiminasa (AAD) de unión a albúmina presentan una actividad y semivida en plasma incrementadas con el fin de reducir eficientemente la cantidad de arginina en las células de cáncer. Puede observarse ADI nativa en los microorganismos y es antigénica y resulta rápidamente lavada de la circulación en el paciente. La presente divulgación construye diferentes proteínas de fusión de AAD con una o dos proteínas de unión a albúmina para mantener una actividad elevada con una semivida *in vivo* más larga (por lo menos 5 días de agotamiento de la arginina después de una inyección). En la presente divulgación, la proteína de unión a albúmina en el producto de proteína de fusión de AAD aparentemente no influye sobre su actividad enzimática específica, sino que por el contrario aparentemente incrementa la semivida en circulación. Las actividades específicas de la ADI de tipo salvaje y la proteína de fusión de AAD en la presente divulgación son de 8.4 y 9.2 U/mg (a pH fisiológico 7.4), respectivamente.

En su sentido más amplio, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina que comprende una primera parte que comprende uno o dos componentes seleccionados de un dominio de unión a albúmina, un péptido de unión a albúmina o una o más proteínas de unión a albúmina fusionadas con una segunda parte que comprende arginina desiminasa para formar la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina, de manera que la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina conserva la actividad de la arginina desiminasa y asimismo es capaz de unirse a la albúmina sérica.

La presente divulgación se refiere además a composiciones farmacéuticas que contienen proteína de fusión de arginina desiminasa (AAD) de unión a albúmina para el tratamiento dirigido del cáncer en seres humanos y otros animales. El primer aspecto de la presente divulgación es construir la proteína de fusión de AAD modificada con elevada actividad contra las células de cáncer. El segundo aspecto de la presente divulgación es purificar la proteína de fusión de AAD con alta pureza a partir de fracciones tanto solubles como insolubles de las proteínas en bruto. El tercer aspecto de la presente divulgación es prolongar la semivida de la proteína de fusión de AAD ya que puede unirse a la albúmina muy bien en la circulación. El cuarto aspecto de la presente divulgación es proporcionar un método de utilización de la composición farmacéutica que contiene AAD de la presente divulgación para el tratamiento de cáncer mediante la administración de dicha composición en un sujeto que lo necesita que sufre de diversos tumores, cánceres o enfermedades asociadas a tumores o cánceres u otras enfermedades dependientes de arginina.

La proteína de fusión de AAD de la presente divulgación asimismo se modifica para evitar la disociación en proteína de unión a albúmina y ADI de manera que deviene más estable y presenta una semivida en circulación más prolongada. La ADI se fusiona con un dominio/péptido/proteína de unión a albúmina en un producto de fusión de AAD para prolongar la semivida en plasma y reducir la inmunogenicidad del producto de fusión. El dominio de

unión a albúmina (DAB) es un péptido que se une a la albúmina en la sangre. Existen diferentes variantes de DAB que muestran afinidades diferentes o mejoradas para la albúmina de suero humano (HSA). Pueden construir diferentes variantes de DAB y pueden fusionarse con la ADI. Al contrario que la ADI natural, esta propiedad de semivida más prolongada facilita el agotamiento de la arginina eficientemente en las células cancerosas, células madre de cáncer y/o células progenitoras de cáncer.

La composición farmacéutica que contiene proteína de fusión de AAD puede utilizarse para la inyección intravenosa (i.v.) (para la administración de acción rápida de la medicación) y la inyección intramuscular (i.m.) (para la administración de acción bastante rápida y de duración prolongada de la medicación). La aplicación de proteína de fusión de AAD en la presente divulgación puede utilizarse en el tratamiento de diversos cánceres, tales como cáncer pancreático, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer hepático, cáncer nasofaríngeo, cáncer esofágico y cáncer cerebral. La presente divulgación se refiere a proteínas de fusión de AAD, a dichas proteínas de fusión de AAD para la utilización en métodos de tratamiento de cáncer, para la utilización en método de tratamiento y/o inhibición de la metástasis de tejido canceroso, y para la utilización en métodos de curación de enfermedades dependientes de la arginina.

Las proteínas de fusión de AAD de la presente divulgación asimismo resultan útiles en métodos que incluyen la utilización de una combinación de diferentes fármacos quimioterápicos y/o radioterapia con proteína de fusión de AAD de la presente divulgación, proporcionando un efecto sinérgico sobre el tratamiento de cáncer.

Sumario de la invención

En una primera forma de realización, la presente invención se refiere a una proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina, en la que dicha proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 40 y nº 41.

En una segunda forma de realización, la presente invención se refiere a un método para preparar la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina de la primera forma de realización que comprende construir un gen de fusión codificante de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina, insertar el gen de fusión en un vector, insertar el vector en un organismo hospedador y expresar una proteína que incluye la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina de la primera forma de realización.

En una tercera forma de realización, la presente invención se refiere a un método de preparación de la proteína de fusión de desiminasa de unión a albúmina de la primera forma de realización mediante ligadura de proteínas mediada por inteína entre el dominio de unión a albúmina, el péptido de unión a albúmina o la proteína o proteínas de unión a albúmina y la segunda parte que comprende arginina desiminasa.

En una cuarta forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de un cáncer en un paciente, en el que dicha composición comprende una cantidad clínicamente eficaz de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina de la primera forma de realización en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 (comparativa) representa el enfoque de diseño para la construcción de diferentes proteínas de fusión de AAD con uno o dos dominios/péptidos/proteínas de unión a albúmina en estructura tridimensional. Puede fusionarse uno o dos dominios/péptidos/proteínas de unión a albúmina a la ADI para formar la proteína de fusión de AAD. La posición del dominio/péptido/proteína de unión a albúmina se encuentra lejos del sitio activo de la ADI. El dominio/péptido/proteína de unión a albúmina puede fusionarse con el extremo N y/o el extremo C de la ADI. La estructura en dicha figura se basa en la estructura de la ADI de *Mycoplasma arginini* (Protein Data Bank: 1LXY). (A) ADI nativa, (B) proteína de fusión de AAD con dos ABD o ABD1, (C) proteína de fusión de AAD con un ABD o ABD1 en el extremo N, (D) proteína de fusión de AAD con un ABD o ABD1 en el extremo C.

La figura 2 (comparativa) representa la alineación de secuencias para la ADI en algunas especies bacterianas, incluyendo *Mycoplasma arginini* (SEC ID nº 23), *Lactococcus lactis* (SEC ID nº 24), *Bacillus cereus* (SEC ID nº 25) y *Bacillus licheniformis* (SEC ID nº 26).

La figura 3 representa los diseños y secuencias de aminoácidos para diferentes proteínas de fusión de AAD originadas a partir de *Mycoplasma arginini* (en el que A, B, C y D son comparativos y E, según la invención) y proteína de fusión de AAD originada a partir de *Bacillus cereus* (F, según la invención).

La figura 4 (comparativa) representa la creación de proteína de fusión de AAD en las dos formas de realización (A) y (B) mediante la utilización de proteínas de fusión de inteína y ligadura de proteínas expresadas (CBD, dominio de unión a quitina) bajo los esquemas siguientes: (C) fusión de extremo C-terminal, (D) fusión de

extremo N-terminal y (E) ligadura de proteínas mediada por inteína.

5 La figura 5 representa el mapa plasmídico del vector de expresión construido para producir la proteína de fusión de AAD.

La figura 6 representa (A) el mapa génico, (B) la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 44) y (C) la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 40) de His-ABD-PoliN-ADI (ADI: la ADI de *Mycoplasma arginini*)

10 La figura 7 representa (A) el mapa génico, (B) la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 45) y (C) la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 41) de His-ABD-PoliN-bcADI (bcADI, la ADI de *Bacillus cereus*)

15 La figura 8 representa la expresión y purificación de la proteína de fusión de AAD: (A) AAD es -90% soluble al expresarse a 20°C (carriles 2 y 3) y -90% insoluble (cuerpos de inclusión) al expresarse a 37°C (carriles 4 y 5), (B) la proteína de fusión de AAD purificada en electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE): carril 1, proteína de fusión de AAD purificada (52.8 kDa); carril 2: marcador de peso molecular.

20 La figura 9 ilustra que la proteína de fusión de AAD agota la arginina eficientemente e inhibe el crecimiento de diversos tipos de estirpes celulares de cáncer humano en estudios de cultivo tisular *in vitro*, incluyendo el melanoma humano (A375), el carcinoma de colon humano (HCT116) y el cáncer pancreático humano (Pancl).

25 La figura 10 representa los resultados de unión a albúmina de la proteína de fusión de AAD: (A) gel de poliácridamida nativo no desnaturizante (al 12%) que muestra el incremento en la cantidad de complejo HSA+AAD al incrementarse la cantidad añadida de proteína de fusión de AAD (la secuencia de aminoácidos se representa en la SEC ID nº 36, figura 3A). Las proporciones molares de albúmina de suero humano (HSA): AAD en los carriles 3 a 6 son de 1:1, 1:2, 1:5 y 1:15, respectivamente. Los carriles 1 y 2 representan HSA y AAD en 6 y 30 pmoles, respectivamente; (B) En otro experimento basado en proteína de fusión de AAD (SEC ID nº 40, figura 3E), una proporción albúmina: AAD de 1:8 resulta suficiente para ligar toda la albúmina presente (carril 5).

30 La figura 11 es un gráfico que representa la respuesta a dosis de la proteína de fusión de AAD sobre los niveles plasmáticos de arginina en ratones. Una dosis de 100 µg de AAD resulta suficiente para agotar la arginina plasmática durante como mínimo 5 días.

35 Definiciones

La expresión "célula madre de cáncer" se refiere a la célula biológicamente diferente dentro del clon neoplásico que es capaz de iniciar y sostener el crecimiento tumoral *in vivo* (es decir, la célula iniciadora de cáncer).

40 Descripción detallada de la invención

45 La arginina es un aminoácido semiesencial para seres humanos y otros mamíferos. Puede sintetizarse a partir de citrulina mediante un procedimiento en dos etapas catalizado por los enzimas del ciclo de la urea argininosuccinato sintasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL). La arginina puede ser metabolizada en ornitina por el enzima arginasa, y la ornitina puede ser convertida en citrulina por la ornitina carbamoiltransferasa (OTC) en las mitocondrias. La citrulina puede utilizarse para sintetizar arginina nuevamente. Las células normales habitualmente no requieren un suministro exógeno de arginina para crecer debido a la abundante actividad catalítica de ASS y ASL. En contraste, muchos tipos de cánceres no expresan ASS y, por lo tanto, son auxotróficos para la arginina. Su crecimiento es exclusivamente dependiente de la arginina en la circulación. Por lo tanto, dirigirse a la arginina circulante mediante el uso de enzimas degradantes de arginina es una estrategia viable de inhibición del crecimiento de tumores negativos para ASS.

50 La arginina puede ser degradada por la arginina desiminasa (ADI). La ADI convierte la arginina en citrulina y amoniaco, los metabolitos del ciclo de la urea. Desafortunadamente, sólo puede observarse ADI en procariotas, por ejemplo, *Mycoplasma* sp. Existen muchos problemas asociados al aislamiento y purificación de arginina desiminasa a partir de los procariotas. La ADI aislada a partir de *Pseudomonas putida* no consigue mostrar eficacia *in vivo* debido a su baja actividad enzimática a pH neutro. La ADI producida a partir de *Escherichia coli* es enzimáticamente inactiva y en consecuencia requiere un procedimiento de múltiples desnaturalizaciones y renaturalizaciones, lo que eleva el consiguiente coste de producción. La semivida en plasma de la forma nativa de ADI es corta (~4 horas) tras la inyección en la circulación humana [Ensor et al., Cancer Res. 62:5443-5450 (2002); Izzo et al., J. Clin. Oncol. 22:1815-1822 (2004)]. Estas desventajas pueden remediarse parcialmente mediante pegilación. De entre las diversas formas de ADI pegilada, se encontrado que la ADI unida a PEG (peso molecular de 20,000) mediante succinato de succinimidilo (ADI-PEG 20) es una formulación eficaz. Sin embargo, la actividad de ADI tras la pegilación se reduce en gran medida (en -50%) [Ensor et al., Cancer Res. 62:5443-5450 (2002); Wang et al., Bioconj. Chem. 17:1447-1459 (2006)]. Además, el conector de succinato de succinimidilo PEG puede hidrolizarse fácilmente y desprenderse de la proteína, causando problemas inmunógenos tras un corto

periodo de uso en el cuerpo. Por lo tanto, existe una necesidad de composiciones mejoradas de tratamiento del cáncer, particularmente composiciones mejoradas de tratamiento del cáncer con actividad incrementada.

La ADI aislada a partir de *P. putida* no consiguió mostrar eficacia *in vivo* debido a que presentaba poca actividad enzimática a pH neutro y resultaba rápidamente lavada de la circulación en los animales experimentales. La ADI derivada de *Mycoplasma arginini* se describe en, por ejemplo, Takaku et al, Int. J. Cancer, 51:244-249 (1992) y en la patente US nº 5.474.928. Sin embargo, un problema asociado a la utilización terapéutica de dicha proteína heteróloga es su antigenicidad. La modificación química de la ADI de *Mycoplasma arginina*, mediante un grupo de enlace de cloruro cianúrico, con polietilenglicol (PEG) ha sido descrita por Takaku et al., Jpn. J. Cancer Res., 84:1195-1200 (1993). Sin embargo, la proteína modificada era tóxica al ser metabolizada debido a la liberación del cianuro a partir del grupo de enlace de cloruro cianúrico. En contraste, incluso para ADI-PEG20, el conector de PEG puede ser fácilmente hidrolizado y desprenderse de la proteína, causando problemas inmunógenos tras un corto periodo de uso en el cuerpo. Por lo tanto, existe una necesidad de composiciones que degraden aminoácidos no esenciales y que no presenten los problemas asociados a la técnica anterior.

En muchos tipos de cáncer, entre ellos el melanoma, cáncer pancreático, cáncer de colon, leucemia, cáncer de mama, cáncer prostático, carcinoma de células renales y cáncer hepático, las células de cáncer son auxotróficas para la arginina ya que carecen de expresión de argininosuccinato sintetasa (ASS), convirtiéndolas en excelentes dianas para la terapia de agotamiento de arginina. En la presente invención, las proteínas de fusión de arginina desiminasa (AAD) de unión a albúmina presentan una actividad elevada con semividas prolongadas para un agotamiento eficientes de la arginina en las células de cáncer.

El tamaño del monómero para la ADI es del orden de 45 kDa y existe en forma de dímero (del orden de 90 kDa) [Das et al., Structure. 12:657-667 (2004)]. Se representa un diseño para la construcción de una proteína de fusión de AAD, según la presente divulgación, en la figura 1 (comparativa). Se fusionan uno o dos dominios/péptidos/proteínas de unión a albúmina con o sin conectores, SEC ID nº 46 a nº 49, a ADI para formar la proteína de fusión de AAD. Cabe señalar que la selección de una o más dominios/péptidos/proteínas de unión a albúmina particulares puede llevarse a cabo dependiendo del tipo de tejido de cáncer que va a ser la diana, el tamaño y semivida deseados de la proteína de fusión resultante, y de si se selecciona un dominio o una proteína completa. Además, el material de unión a albúmina seleccionado puede ser igual o diferente. Es decir, puede fusionarse una proteína y un péptido, dos proteínas, dos dominios, un dominio y una proteína, etc., con la condición de que la molécula resultante conserve la actividad de la ADI y asimismo sea capaz de unirse a la albúmina sérica sin que ninguna parte de la proteína de fusión resulte interferida por otra parte de la proteína de fusión. La posición del dominio/péptido/proteína de unión a albúmina se encuentra lejos del sitio activo. El dominio/péptido/proteína de unión a albúmina puede fusionarse con el extremo N y/o el extremo C de la ADI. Existen diferentes variantes de DAB que muestran afinidades diferentes o mejoradas para la albúmina de suero humano (HSA). Pueden construir diferentes variantes de DAB y pueden fusionarse con la ADI. Algunos microorganismos datos de ADI (por ejemplo, *Pseudomonas* sp) no pueden ser utilizados debido a su potencial patogenicidad y pirogenicidad. Según la presente divulgación, la fuente de ADI puede ser, aunque sin limitación de diferentes microorganismos, por ejemplo, *Mycoplasma* (por ejemplo, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*), *Lactococcus* (por ejemplo, *Lactococcus lactis*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*), *Streptococcus* (por ejemplo *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*), *Escherichia*, *Mycobacterium* (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*) y *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*). Resulta preferente que la ADI se clone a partir de *Mycoplasma arginini*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, o cualquier combinación de los mismos. Según la presente invención, la ADI se clona a partir de *Mycoplasma arginine* o *Bacillus cereus*. Sus secuencias de aminoácidos con SEC ID (SEC ID nº 23 a nº 25) y la alineación de secuencias para algunas de las secuencias de aminoácidos en la figura 2 (comparativa) se dan a conocer en la presente memoria y asimismo en la literatura [Das et al., Structure. 12:657-667 (2004); Wang et al., Bioconjug. Chem. 17:1447-1459 (2006); Ni et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:193-201 (2011)].

El diseño y secuencia de aminoácidos de (A) proteína ADI nativa de *Mycoplasma arginini* (SEC ID nº 23), (B) diferentes proteínas de fusión de AAD originadas a partir de ADI de *Mycoplasma arginini* (SEC ID nº 36 a nº 40) y (C) diferentes proteínas de fusión de AAD originadas a partir de ADI de *Bacillus cereus* (SEC ID nº 41) se representan en la figura 3. Se han construido con éxito diferentes proteínas de fusión de AAD, de entre las que las proteínas de fusión de AAD originadas a partir de ADI de *Mycoplasma arginini* (SEC ID nº 40) y proteína de fusión de AAD originadas a partir de ADI de *Bacillus cereus* (SEC ID nº 41) son proteínas de fusión según la primera forma de realización de la presente invención. Se ha insertado un conector entre la proteína de unión a albúmina y la ADI en la proteína de fusión de AAD en dichas formas de realización.

Por otra parte, según la presente divulgación, asimismo se ha creado una nueva proteína de fusión de AAD mediante la utilización de proteínas de fusión de proteína y ligadura de las proteínas expresadas (figura 4, comparativa). La nueva proteína de fusión de AAD puede formarse (1) mediante reacción de la ADN que presenta un residuo de cisteína N-terminal con un tioéster reactivo en el extremo C de ABD, o (2) mediante reacción de ABD que presenta un residuo de cisteína N-terminal con un tioéster reactivo en el extremo C de la ADI, de manera que ADI y ABD se unen mediante un enlace covalente. En la figura 4E, la ADI con residuo de cisteína N-terminal

reacciona con el tioéster reactivo en el extremo C de ABD. La etiqueta tioéster en el extremo C de ABD y una α -cisteína en el extremo N de la ADI resultan necesarios para facilitar la ligadura de la proteína. Dichos productos se producen utilizando un vector pTWIN1 (New England Biolabs) siguiendo el manual del fabricante. En particular, el gen codificante de la proteína de fusión ABD-inteína-CBD se sintetiza y se clona en el vector bajo el control del promotor de T7 para la expresión en *E. coli* (figura 4C). La proteína de fusión ABD-inteína-CBD producida se une a la quitina en una columna. La secuencia de aminoácidos de ABD-inteína-CBD (SEC ID nº 42) se representa en la figura 4A. Tras la escisión inducible con tiol y la elución a partir de la columna, se obtiene la ABD con tioéster reactivo en su extremo C (figura 4C). Por otra parte, el gen codificante de la proteína de fusión CBD-inteína-ADI se sintetiza y se clona en el vector bajo el control del promotor de T7 para la expresión en *E. coli* (figura 4D). La proteína de fusión CBD-inteína-ADI producida se une a la quitina en una columna. La secuencia de aminoácidos de CBD-inteína-ADI (SEC ID nº 43) se representa en la figura 4B. Tras la escisión a pH 7 y 25°C, y la elución a partir de la columna, se obtiene la ADI con α -cisteína en su extremo N (figura 4D). Finalmente, la proteína de fusión de AAD, según la presente divulgación, se produce mediante la reacción de ligadura de proteínas, tal como se representa en la figura 4E.

Resulta importante, según la invención, que las proteínas de fusión de AAD puedan producirse y purificarse de una manera conveniente. Por ejemplo, una proteína de fusión de AAD se expresa y purifica con éxito a partir de *E. coli* tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble, y se representa este resultado en la figura 8. Además, la figura 8 representa la proteína de fusión de AAD purificada, analizada mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se determina que el tamaño de la proteína de fusión de AAD purificada es de 52.8 kDa.

La composición farmacéutica de la cuarta forma de realización de la presente invención contiene proteína de fusión de AAD de alta actividad para agotar la arginina en las células tumorales para el tratamiento de cáncer. La actividad específica de la proteína de fusión de AAD purificada se ha encontrado que es similar a la de la ADI de tipo salvaje. IC_{50} es la concentración de inhibición semimáxima, es decir, representa la concentración de proteína de fusión de AAD que resulta necesaria para la inhibición al 50% de una estirpe de células de cáncer. La IC_{50} es una medida de la eficacia de un fármaco. La C_{50} de la proteína de fusión de AAD (la secuencia de aminoácidos se representa en la SEC ID nº 40, figura 3E) para diferentes estirpes celulares de cáncer (melanoma humano, A375 y SK-mel-28; carcinoma de colon humano, HCT116; cáncer pancreático humano, Pancl, cáncer hepático humano, Sk-hep1; cáncer cervical humano, C33-A) se representa en la tabla 1. La eficacia *in vitro* de la proteína de fusión de AAD sobre diferentes estirpes celulares de cáncer se representa en la figura 9. Ilustra que la proteína de fusión de AAD puede eliminar muchos tipos de cáncer, entre ellos el melanoma humano, el carcinoma de colon humano y las estirpes celulares de cáncer pancreático.

Tabla 1

Estirpe celular de cáncer	IC_{50} de AAD ($\mu\text{g/ml}$)
A375 (melanoma humano)	0.104
SK-mel-28 (melanoma humano)	1.92
Pancl (cáncer pancreático humano)	1
Sk-hep1 (cáncer hepático humano)	10
C-33A (cáncer cervical humano)	0.063
HCT116 (carcinoma de colon humano)	1.30

Para el estudio de unión a albúmina, los presentes inventores demostraron con éxito que la proteína de fusión de AAD manipulada puede unirse a la albúmina de suero humano (HSA). La figura 10 representa que la proteína de fusión de AAD (la secuencia de aminoácidos se representa en la SEC ID nº 40, figura 3E) se une a HSA fácilmente. En una proporción molar de 1:5 o 1:15, se produce la formación del complejo HSA-AAD según el constructo de la figura 1 utilizando el diseño de la molécula de conector. Se espera que la semivida en circulación de la proteína de fusión de AAD en sangre se incremente gracias a la formación del complejo no covalente HSA-AAD. Por lo tanto, se ha creado con éxito una versión de larga duración de la proteína de fusión de AAD.

Ningún producto comercial muestra una elevada eficacia en comparación con la composición farmacéutica que contiene proteína de fusión de AAD preparada en la presente invención. Para el uso en el tratamiento del cáncer, la composición farmacéutica que contiene proteína de fusión de AAD de la presente invención sirve como agente anticanceroso para agotar la arginina en los tejidos tumorales. La proteína de fusión de AAD es un buen candidato para la utilización en combinación con otros agentes de direccionamiento molecular o citotóxicos.

Ejemplos

Los ejemplos a continuación se proporcionan mediante la descripción de formas de realización específicas de la presente invención sin pretender limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

Varios de los ejemplos, a continuación, se refieren a métodos de preparación de una proteína de fusión de arginina

desiminasa de unión a albúmina. Pueden utilizarse diversas técnicas, entre ellas la clonación y la ligadura de proteínas mediada por inteína. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "clonación" se utiliza ampliamente y comprende construir un gen de fusión codificante de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina, insertar el gen de fusión en un vector, insertar el vector en un organismo hospedador y expresar una proteína que incluye una proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina. Pueden llevarse a cabo numerosas variantes de dicha técnica y todavía se encuentran comprendidas dentro de la clonación contemplada por la presente invención.

Ejemplo 1

Construcción del gen codificante de dominio/péptido/proteína de unión a albúmina (ABD)

El gen codificante de ABD se construyó mediante dos rondas de PCR. En la primera ronda, la mezcla de reacción de PCR (volumen total: 25 µl) contenía los materiales siguientes:

1 × tampón para PCR iProof (Bio-Rad)

mezcla de dNTP 50 µM

0.5 unidades de ADN polimerasa iProof (Bio-Rad)

10 nM de cada uno de los oligos siguientes:

cebador directo ABD-F1 (SEC ID nº 01):

5'-CATGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACT-3'

cebador inverso ABD-R2 (SEC ID nº 02):

5'-TAGTCACTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTCTGTTAGCTAAGACTTTAGC-3'

cebador directo ABD-F3 (SEC ID nº 03):

5'-GAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAA-3'

cebador inverso ABD-R4 (SEC ID nº 04):

5'-TACACCTTCAACAGTTTTGGCATTGTTGATTAGTTCTTGTAAATAGTCAC-3'

cebador directo ABD-F5 (SEC ID nº 05):

5'-GCCAAAAGTGTGAAGGTGTAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGC-3'

cebador inverso ABD-R6 (SEC ID nº 06):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Se utilizó el programa de PCR siguiente:

98°C, 30 s; 20 ciclos de {98°C, 10 s; 50°C, 20 s; 72°C, 20 s}.

En la segunda ronda de PCR, la mezcla de PCR (volumen total: 50 µl) contenía los materiales siguientes:

1 × tampón para PCR iProof (Bio-Rad),

mezcla de los dNTP 50 µM,

1 µl de reactivo de PCR como molde de ADN de la primera ronda,

1 unidad de ADN polimerasa iProof (Bio-Rad),

200 nM de cada uno de los oligos siguientes:

cebador directo ABD-F7 (SEC ID nº 07):

5'-CATGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACT-3'

cebador inverso ABD-R8 (SEC ID nº 08):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Se utilizó el programa de PCR siguiente:

98°C, 30 s; 35 ciclos de {98°C, 10 s; 60°C, 20 s; 72°C, 20 s}; 72°C, 5 min.

Se obtuvo un producto de PCR que contenía la secuencia de ADN de ABD (169 pb) y se purificó con un kit de extracción en gel de ADN Qiagen para fines de clonación.

5 **Ejemplo 2A**

Construcción del gen de fusión codificante de la proteína de fusión de AAD

En la primera PCR, la mezcla de PCR (volumen total: 50 µl) contenía los materiales siguientes:

10

1 × tampón para PCR iProof (Bio-Rad),

mezcla de los dNTP 50 µM,

15

25 ng de ADN genómico de *Mycoplasma arginini*,

1 unidad de ADN polimerasa iProof (Bio-Rad),

20

200 nM de cada uno de los oligos siguientes:

cebador directo ADINde-F (SEC ID nº 09):

5'-ATCGATCGATGTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

25

cebador inverso ADIhis-R (SEC ID nº 10):

5'-AGCTAAGGAATTCGCATCATGATGGTGATGGTGGTGGCTACCCCACTTAAC-3'

Se utilizó el programa de PCR siguiente:

30

98°C, 1 min; 35 ciclos de {98°C, 10 s; 50°C, 20 s; 72°C, 40 s}; 72°C, 5 min.

Se obtuvo un producto de PCR de 1280 pb de longitud y se purificó con el kit de extracción en gel de ADN Qiagen. Después, se llevó a cabo la segunda PCR. La mezcla de PCR (volumen total: 50 µl) contenía los materiales siguientes:

35

1 × tampón para PCR iProof (Bio-Rad),

mezcla de los dNTP 50 µM,

40

10 ng del producto de PCR de 1280 pb,

40

10 ng del producto de PCR de 169 pb,

1 unidad de ADN polimerasa iProof (Bio-Rad),

45

200 nM de cada uno de los oligos siguientes:

cebador directo ADINde-F (SEC ID nº 11):

5'-ATCGATCGATGTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

50

cebador inverso ABD-R10 (SEC ID nº 12):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Se utilizó el programa de PCR siguiente:

55

98°C, 1 min; 35 ciclos de {98°C, 10 s; 50°C, 20 s; 72°C, 45 s}; 72°C, 5 min.

Se obtuvo un producto de PCR de 1428 pb de longitud y se purificó con el kit de extracción en gel de ADN Qiagen. A continuación, se digirió con los enzimas de restricción NdeI e HindIII y se ligó al plásmido pREST A (Invitrogen) que se había predigerido con los mismos enzimas. Seguidamente, el producto de ligadura se transformó en células de *E. coli* BL21 (DE3). La secuencia del gen de fusión construido se confirmó mediante secuenciación de ADN.

60

Ejemplo 2B

Clonación de His-ABD-PoliN-ADI

65

La construcción de His-ABD-PoliN-ADI (SEC ID nº 40, en la figura 3E) se llevó a cabo en dos etapas de PCR

solapante; el fragmento de PCR obtenido de la última etapa se insertó en el vector pET3a entre los sitios NdeI y BamHI. El mapa génico, la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de His-ABD-PoliN-ADI se representan en la figura 6.

5 Cebadores implicados en la construcción de His-ABD-PoliN-ADI:

cebador directo hisABDNde-F (SEC ID nº 13):
5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATG-3'

10 *cebador inverso ABDnn-R1* (SEC ID nº 14):
5'-TTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATC-3'

cebador inverso ABDn-R2 (SEC ID nº 15):
5'-AGAACCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGA-3'

15 *cebador directo ADIn-F* (SEC ID nº 16):
5'-AATAATAACAATGGTAGCGGCGTTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

20 *cebador inverso ADIBam-R* (SEC ID nº 17):
5'-TAGATCAATGGATCCTTACCACTTAACATCTTTACGTGATAAAG-3'

25 En la primera ronda de PCR, se prepararon 50 µl de volumen de reacción que contenía una concentración conocida de componentes en dos tubos para PCR. En cada uno de los tubos se mezcló dNTP, tampón iProof (BIO-RAD), ADN polimerasa iProof (BIO-RAD), cebadores y molde de ADN y se enrasó a 50 µl con ddH₂O. El molde de ADN utilizado en la reacción era un vector pET3a que contenía el gen de ADI de *Mycoplasma arginini* con eliminación de una mutación interna del sitio NdeI sin alterar la secuencia proteica del gen ADI.

30 Los dos tubos de reacción contenían las mezclas de cebadores de (A) 10 pmoles de *hisABDNde-F* (SEC ID nº 13), 0.5 pmoles de *ABDnn-R1* (SEC ID nº 14) y 10 pmoles de *ABDn-R2* (SEC ID nº 15) y (B) 10 pmoles de *ADIn-F* (SEC ID nº 16) y 10 pmoles de *ADIBam-R* (SEC ID nº 17), respectivamente.

35 El programa de la PCR se configuró según las etapas recomendadas en el manual, con una temperatura de hibridación y extensión (tiempo) de 50°C (20 s) y de 72°C (40 s), respectivamente. Los dos productos generados mediante PCR presentaban un tamaño de 237 pb y 1278 pb. Se extrajeron los productos y se aplicaron como molde para la siguiente ronda de PCR.

40 En la segunda etapa solapante, se preparó la mezcla de reacción de una manera similar a la primera ronda, excepto en que el molde utilizado era la mezcla de 1 pmol del producto de PCR de 237 pb y 1 pmol del producto de PCR de 1278 pb de la primera ronda de PCR. Los cebadores utilizados se cambiaron a 10 pmoles de *hisABDNde-F* (SEC ID nº 13) y 10 pmoles de *ADIBam-R* (SEC ID nº 17).

45 La temperatura de hibridación y extensión (tiempo) eran de 50°C (20 s) y 72°C (60 s), respectivamente. Se generó un producto de PCR de un tamaño de 1484 pb a partir de la reacción. El producto de PCR se purificó y se digirió con NdeI y BamHI y después se ligó en el plásmido pET3a predigerido. A continuación, el producto ligado se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) para la producción de proteína recombinante.

Ejemplo 2C

50 Clonación de His-ABD-PoliN-bcADI

La construcción de His-ABD-PoliN-bcADI (SEC ID nº 41, en la figura 3E) se llevó a cabo en dos etapas de PCR solapante; el fragmento de PCR obtenido de la última etapa se insertó en el vector pET3a entre los sitios NdeI y BamHI. El mapa génico, la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de His-ABD-PoliN-bcADI se representan en la figura 7.

55 Cebadores implicados en la construcción de His-ABD-PoliN-bcADI:

cebador directo hisABDNde-F2 (SEC ID nº 18):
5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATG-3'

60 *cebador inverso bcABDnn-R1* (SEC ID nº 19):
5'-TTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATC-3'

65 *cebador inverso bcABDn-R2* (SEC ID nº 20):
5'-TTTACCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGA-3'

cebador directo *bcADIn-F* (SEC ID nº 21):

5'-AATAATAACAATGGTAGCGGCGGTAACATCCGATACATGTTACTTCAGA-3'

cebador inverso *bcADIBam-R* (SEC ID nº 22):

5'-TAGATCAATGGATCCCTAAATATCTTTACGAACAATTGGCATAC-3'

En la primera ronda de PCR, se prepararon 50 µl de volumen de reacción que contenía una concentración conocida de componentes en dos tubos para PCR. En cada uno de los tubos se mezcló dNTP, tampón iProof (BIO-RAD), ADN polimerasa iProof (BIO-RAD), cebadores y molde de ADN y se enrasó a 50 µl con ddH₂O. El molde de ADN utilizado en la reacción era un vector pET3a que contenía el gen de ADI de *Bacillus cereus* con eliminación de una mutación interna del sitio NdeI sin alterar la secuencia proteica del gen ADI.

Los dos tubos de reacción contenían las mezclas de cebadores de (A) 10 pmoles de *hisABDNde-F2* (SEC ID nº 18), 0.5 pmoles de *bcABDnn-R1* (SEC ID nº 19) y 10 pmoles de *bcABDn-R2* (SEC ID nº 20) y (B) 10 pmoles de *bcADIn-F* (SEC ID nº 21) y 10 pmoles de *bcADIBam-R* (SEC ID nº 22), respectivamente. El programa de la PCR se configuró según las etapas recomendadas en el manual, con una temperatura de hibridación y extensión (tiempo) de 50°C (20 s) y de 72°C (40 s), respectivamente. Los dos productos generados mediante PCR presentaban un tamaño de 237 pb y 1250 pb. Se extrajeron los productos y se aplicaron como molde para la siguiente ronda de PCR.

En la segunda etapa solapante, se preparó la mezcla de reacción de una manera similar a la primera ronda, excepto en que el molde utilizado era la mezcla de 1 pmol del producto de PCR de 237 pb y 1 pmol del producto de PCR de 1250 pb de la primera ronda de PCR. Los cebadores utilizados se cambiaron a 10 pmoles de *hisABDNde-F2* (SEC ID nº 18) y 10 pmoles de *bcADIBam-R* (SEC ID nº 22).

La temperatura de hibridación y extensión (tiempo) eran de 50°C (20 s) y 72°C (60 s), respectivamente. Se generó un producto de PCR de un tamaño de 1512 pb a partir de la reacción. El producto de PCR se purificó y se digirió con NdeI y BamHI y después se ligó en el plásmido pET3a predigerido. A continuación, el producto ligado se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) para la producción de proteína recombinante.

Ejemplo 3

Expresión y purificación de la proteína de fusión de AAD

Para preparar el cultivo de inóculo, se cultivó la cepa *E. coli* BL21(DE3) portadora del plásmido codificante de la proteína de fusión de AAD (figura 5) en 5 ml de medio 2xTY, a 30°C, 250 rpm, durante la noche. El cultivo inóculo de durante la noche (2.5 ml) se añadió a 250 ml de 2xTY, a 37°C, 250 rpm, durante 2.5 h (hasta una DO₆₀₀ ≈ 0.6-0.7). Tras alcanzar la DO₆₀₀, se añadió IPTG al cultivo (concentración final: 0.2 mM). Se continuó con el crecimiento durante 22 horas más a 20°C y después se recolectaron las células mediante centrifugación. Se resuspendió el sedimento celular en 25 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7.4. Las células se lisaron mediante sonicación. La parte soluble se recolectó mediante centrifugación. A continuación, la proteína de fusión (que contenía una etiqueta de His) se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel. La tabla 2 muestra que la temperatura de cultivo es un factor importante que afecta la solubilidad de la proteína de fusión de AAD (la secuencia de aminoácidos se representa en la SEC ID nº 40, figura 3E) obtenida a partir del hospedador de expresión.

Para aislar la fracción soluble de la proteína de fusión de AAD, el sedimento celular se resuspendió en 25 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7.4. Las células se lisaron mediante sonicación. La parte soluble se recolectó mediante centrifugación. A continuación, la proteína de fusión de AAD (que contenía una etiqueta de His) se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel.

Para aislar la fracción soluble de la proteína de fusión de AAD, el sedimento celular se resuspendió en 25 ml de tampón de Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, Triton X-100 al 1%. Las células se lisaron mediante sonicación. La parte insoluble (cuerpos de inclusión) se recolectó mediante centrifugación. La proteína se desplegó mediante resuspensión en 10 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, HCl de guanidina 6 M, y se agitó con vórtex hasta solubilizarse. La proteína se plegó nuevamente mediante la adición de solución de proteína no plegada gota a gota en una solución de agitación rápida de 100 ml de tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7.4. Los materiales insolubles se eliminaron mediante centrifugación. La precipitación salina de la proteína se llevó a cabo mediante la adición de polvos sólidos de sulfato amónico al sobrenadante hasta alcanzar una saturación de 70%. Se recolectó la parte insoluble mediante centrifugación y se resuspendió en 10 ml de tampón de fosfato sódico 20 mM. A continuación, la proteína de fusión de AAD (que contenía una etiqueta de His) se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel.

TABLA 2

AAD	1	2	3
Temperatura de cultivo (°C)	30	20	37

Producción (mg) / 250 ml de cultivo	~0.66	~12.0	~7.0
Solubilidad	50% soluble	90% soluble	90% cuerpos de inclusión
IC ₅₀ (µg/ml) en células A375	0.10	0.68	0.23

Ejemplo 4

Ensayo de actividad enzimática y cinética enzimática de la proteína de fusión de AAD

5

Con el fin de determinar la actividad enzimática de la ADI de tipo salvaje y la proteína de fusión de AAD en la presente invención, se utilizó monoxima de diacetilo (DAM) - tiosemicarbazida (TSC) para la detección de citrulina. se representa la reacción a continuación:

10 L-arginina arginina desiminasa (ADI) o proteína de fusión de AAD > L-citrulina + amoníaco

Se llevó a cabo dicho ensayo mediante la adición de muestra a un reactivo de color, que se preparó mediante la mezcla de solución ácida de cloruro férrico y solución de DAM-TSC. Brevemente, se incubó el enzima con arginina 20 mM, fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, durante 5 min a 37°C. La mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 5 min para revelar el color y se leyó a 540 nm (camino óptico=1 cm). Se construyó una curva patrón mediante la utilización de diversas concentraciones de citrulina. Una unidad del enzima nativo ADI es la cantidad de actividad enzimática que convierte 1 µmol de arginina en 1 µmol de citrulina por minuto a 37°C bajo las condiciones de ensayo. Las actividades específicas de la ADI de tipo salvaje y la proteína de fusión de AAD en la presente invención son de 8.4 y 9.2 U/mg (a pH fisiológico 7.4), respectivamente. Asimismo se determinaron las actividades específicas para la ADI de tipo salvaje y la proteína de fusión de AAD en un intervalo de pH diferente (pH de 5.5 a 9.5) y el pH óptimo se encontraba en 6.5. Por lo tanto, los resultados indican que la proteína de fusión de AAD agota la arginina eficientemente, ya que la fusión con proteína de unión a albúmina no afecta la actividad enzimática de la ADI.

25 La constante de Michaelis, K_m, es la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es semimáxima y es una medida inversa de la afinidad del sustrato para el enzima. Una K_m pequeña indica una afinidad elevada para el sustrato, y ello significa que la velocidad se aproximará a la velocidad de reacción máxima con mayor rapidez. Para la determinación de la cinética enzimática o el valor de K_m, se mide la actividad de la ADI de tipo salvaje y de la proteína de fusión de AAD bajo diferentes concentraciones de sustrato de arginina (2000 µM, 1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62.5 µM) a pH 7.4. Los valores medidos de K_m de la proteína de fusión de AAD mostrados en la figura 3E (SEC ID nº 40; la proteína ADI se originó a partir de *Mycoplasma arginini*) y la proteína de fusión de AAD mostrada en la figura 3F (SEC ID nº 41; la proteína ADI se originó a partir de *Bacillus cereus*) eran de 0.0041 mM y 0.132 mM, respectivamente. Los resultados sugieren que la fusión con ABD no afecta a la afinidad de unión de las diferentes proteínas de fusión de AAD a la arginina.

35

Ejemplo 5

Ensayo de proliferación celular y eficacia *in vitro* de la proteína de fusión de AAD sobre estirpes celulares de cáncer

40 Se utilizó el medio de cultivo DMEM para cultivar las estirpes celulares de melanoma humano A375 y SK-mel-28, de cáncer pancreático humano Pancl y de cáncer cervical humano C-33A. Se utilizó medio EMEM para cultivar las estirpes celulares de cáncer hepático SK-hep 1 y de cáncer cervical C-33A. Se sembraron células de cáncer (2-5 x 10³) en 100 µl de medio de cultivo en los pocillos de placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. El medio de cultivo se sustituyó por medio que contenía diferentes concentraciones de proteína de fusión de AAD. Las placas se incubaron durante 3 días adicionales a 37°C en una atmósfera de 95% de aire/5% de CO₂. Se llevó a cabo un ensayo de MTT para estimar el número de células viables en el cultivo siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de enzima necesaria para conseguir una inhibición de 50% del crecimiento celular se define como IC₅₀.

50 Tal como se representa en la tabla 1 y en la figura 9, los resultados indican que la proteína de fusión de AAD agota la arginina eficientemente e inhibe el crecimiento de diversos tipos de estirpes celulares de cáncer humanas en estudios de cultivo tisular *in vitro*. Por ejemplo, el melanoma humano, el carcinoma de colon humano, el cáncer pancreático humano, el cáncer hepático humano y el cáncer cervical humano presentan todos valores bajos de IC₅₀ (ver la tabla 1), ya que estos tipos de cáncer resultan todos inhibidos por la proteína de fusión de AAD con facilidad. Tal como se había predicho, la proteína de fusión de AAD inhibe todos los tipos de cáncer que son dependientes de arginina (por ejemplo, los cánceres negativos para ASS).

55

Ejemplo 6

60 Determinación *in vivo* de la semivida de la proteína de fusión de AAD

En el presente estudio se utilizaron ratones Balb/c (5 a 7 semanas) y se dejó que se aclimasen durante una semana antes del experimento. Los ratones (n=3) se separaron en tres grupos y recibieron inyecciones de 0, 100,

500 o 1000 µg de proteína de fusión de AAD (SEC ID nº 40, figura 3E) en 100 µl de PBS por vía intraperitoneal, respectivamente. Se recogió sangre de cada ratón a las 0 h y los días 1 a 7. Se obtuvieron sueros después de la centrifugación. A continuación, los sueros se desproteinizaron y se analizaron con un analizador de aminoácidos para la arginina.

Tal como se representa en la figura 11, la proteína de fusión de AAD (SEC ID nº 40, figura 3E), incluso a la dosis más baja, de 100 µg, agotó la arginina en plasma eficientemente los días 1, 3 y 5, sugiriendo que la AAD puede agotar la arginina *in vivo* eficientemente durante como mínimo 5 días. El nivel de arginina volvió a la normalidad gradualmente el día 6y el día 7 en todos los grupos de tratamiento.

Ejemplo 7

Eficacia *in vivo* de la proteína de fusión de AAD sobre xenoinjertos de células de cáncer

En el presente estudio se utilizaron ratones Balb/c (5 a 7 semanas) y se dejó que se aclimatasen durante una semana antes del experimento. Los ratones recibieron inoculaciones por vía subcutánea de 2×10^6 células de cáncer en 100 µl de medio de cultivo fresco. Diez días después, los ratones fueron separados aleatoriamente en grupo de control y grupo de tratamiento. El grupo de control recibió 100 µl de PBS y el grupo de tratamiento recibió 100 µl de proteína de fusión de AAD por vía intraperitoneal cada semana. Se midió el tamaño tumoral con calibrador y se calculó el volumen tumoral mediante la utilización de la fórmula: $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$. Se realizaron extracciones de sangre el día 5 después de cada tratamiento para la medición en plasma de la arginina.

Listado de secuencias

<110> Vision Global Holdings Ltd. WONG, Bing Lou

<120> Composición farmacéutica que comprende arginina desiminasa de unión a albúmina para el tratamiento focalizado de cáncer

<130> P6890US01

<140> PCT/US14/020943

<141> 2014-03-06

<150> US 61/773,214

<151> 2013-03-06

<150> US 14/197,236

<151> 2014-03-05

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo ABD-F1

<400> 1

catgatcgga attccttagc tgaagctaaa gtcttagcta acagagaact 50

<210> 2

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso ABD-R2

<400> 2

tagtcactta ctccatattt gtcaagttct ctgtagcta agacttagc 50

ES 2 909 664 T3

5
<210> 3
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo ABD-F3

<400> 3
10 gaacttgaca aatatggagt aagtgactat tacaagaacc taatcaacaa 50

<210> 4
<211> 50
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso ABD-R4

<400> 4
20 tacacctca acagtttgg cattgtgat taggttctg taatagtcac 50

<210> 5
<211> 50
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo ABD-F5

<400> 5
30 gccaaaactg ttgaaggtgt aaaagcactg atagatgaaa tttagctgc 50

<210> 6
<211> 48
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso ABD-R6

<400> 6
40 agctacgata agcttaaggt aatgcagcta aaatttcac tatcagtg 48

<210> 7
<211> 50
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo ABD-F7

<400> 7
50 catgatgcca atccttagc tgaagctaaa gtcttagcta acagagaact 50

<210> 8
<211> 48
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso ABD-R8

<400> 8
60 agctacgata agcttaaggt aatgcagcta aaatttcac tatcagtg 48

65

ES 2 909 664 T3

5
<210> 9
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo ADINde-F

<400> 9
10 atcgatcgat gtctgtattt gacagtaa ttaaagg 37

<210> 10
<211> 51
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso ADIhis-R

<400> 10
20 agctaaggaa ttcgatcat gatggtgatg gtggtggcta cccacttaa c 51

<210> 11
<211> 37
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo ADINde-F2

30 <400> 11
atcgatcgat gtctgtattt gacagtaa ttaaagg 37

<210> 12
<211> 48
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso ABD-R10

<400> 12
40 agctacgata agcttaaggt aatgcagcta aaattcatc tatcagtg 48

<210> 13
<211> 49
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso hisABDNde-F

<400> 13
50 ggagatatac atatgatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatg 49

<210> 14
<211> 50
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso ABDnn-R1

<400> 14
60 ttgtattat tgtgttact acccgaaggt aatgcagcta aaattcatc 50

65

ES 2 909 664 T3

5
<210> 15
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso ABDn-R2

<400> 15
agaaccgccg ctaccattgt tattattggt gttactacc ga 42

15
<210> 16
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo ADIn-F

20
<400> 16
aataataaca atgtagcgg cggttctgta ttgacagta aatftaaagg 50

25
<210> 17
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso ADIBam-R

30
<400> 17
tagatcaatg gatcctacc acttaacatc ttacgtgat aaag 44

35
<210> 18
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo hisABDNde-F2

40
<400> 18
ggagatatac atatgatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatg 49

45
<210> 19
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> cebador inverso bcABDnn-R1

<400> 19
ttgtattat tgtgttact acccgaaggt aatgcagcta aaatttcac 50

55
<210> 20
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> cebador inverso bcABDn-R2

<400> 20
ttaccgccg ctaccattgt tattattggt gttactacc ga 42

65

ES 2 909 664 T3

<210> 21
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador directo bcADIn-F
 <400> 21
 10 aataataaca atggtagcgg cggtaaacaat ccgatacatg ttacttcaga 50
 <210> 22
 <211> 44
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso bcADIBam-R
 20 <400> 22
 tagatcaatg gatccctaaa tatctttacg aacaattggc atac 44
 <210> 23
 <211> 410
 25 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma arginini*
 <400> 23
 Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30
 Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45
 Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
 50 55 60
 Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80
 30 Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu

ES 2 909 664 T3

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

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

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

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

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

<210> 24
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*

5

<400> 24
 Met Asn Asn Gly Ile Asn Val Asn Ser Glu Ile Gly Lys Leu Lys Ser
 1 5 10 15

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

Thr Met Lys Gln Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Lys Ile Ala
 35 40 45

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

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

Ser Glu Thr Lys Glu Glu Phe Leu Ser His Leu Leu His Glu Ala Gly
 85 90 95

Tyr Arg Pro Gly Arg Thr Tyr Asp Gly Leu Thr Glu Tyr Leu Thr Ser
 100 105 110

Met Pro Thr Lys Asp Met Val Glu Lys Val Tyr Ala Gly Val Arg Lys
 115 120 125

Asn Glu Leu Asp Ile Lys Arg Thr Ala Leu Ser Asp Met Ala Gly Ser
 130 135 140

10

ES 2 909 664 T3

Asp Ala Glu Asn Tyr Phe Tyr Leu Asn Pro Leu Pro Asn Ala Tyr Phe
 145 150 155 160
 Thr Arg Asp Pro Gln Ala Ser Met Gly Val Gly Met Thr Ile Asn Lys
 165 170 175
 Met Thr Phe Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser Leu Ile Thr Glu Tyr Val
 180 185 190
 Met Ala Asn His Pro Arg Phe Lys Asp Thr Pro Ile Trp Arg Asp Arg
 195 200 205
 Asn His Thr Thr Arg Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Ile Leu Asn Lys
 210 215 220
 Thr Thr Val Ala Ile Gly Val Ser Glu Arg Thr Ser Ser Lys Thr Ile
 225 230 235 240
 Gln Asn Leu Ala Lys Glu Leu Phe Ala Asn Pro Leu Ser Thr Phe Asp
 245 250 255
 Thr Val Leu Ala Val Glu Ile Pro His Asn His Ala Met Met His Leu
 260 265 270
 Asp Thr Val Phe Thr Met Ile Asn His Asp Gln Phe Thr Val Phe Pro
 275 280 285
 Gly Ile Met Asp Gly Ala Gly Asn Ile Asn Val Phe Ile Leu Arg Pro
 290 295 300
 Gly Gln Asp Gly Glu Val Glu Ile Glu His Leu Thr Asp Leu Lys Ala
 305 310 315 320
 Ala Leu Lys Lys Val Leu Asn Leu Ser Glu Leu Asp Leu Ile Glu Cys
 325 330 335
 Gly Ala Gly Asp Pro Ile Ala Ala Pro Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly
 340 345 350
 Ser Asn Thr Leu Ala Ile Ala Pro Gly Glu Ile Val Thr Tyr Asp Arg
 355 360 365
 Asn Tyr Val Thr Val Glu Leu Leu Lys Glu His Gly Ile Lys Val His
 370 375 380
 Glu Ile Leu Ser Ser Glu Leu Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ala Arg Cys
 385 390 395 400
 Met Ser Gln Pro Leu Trp Arg Glu Asp Leu
 405 410

5 <210> 25
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> *Bacillus cereus*

ES 2 909 664 T3

<400> 25

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

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

Tyr Leu Gln Gln Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Pro Ile Ile
35 40 45

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

Glu Val Leu Tyr Leu Glu Lys Leu Ala Ala Glu Ala Leu Val Asp Lys
65 70 75 80

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

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

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

Glu Ile Glu Thr Ser Lys Lys Thr His Leu Tyr Glu Leu Met Glu Asp
130 135 140

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

Asp Pro Ala Ala Ser Val Gly Asp Gly Leu Thr Ile Asn Lys Met Arg
165 170 175

Glu Pro Ala Arg Arg Arg Glu Ser Leu Phe Met Glu Tyr Ile Ile Lys
180 185 190

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

ES 2 909 664 T3

Asp Tyr Lys Phe Pro Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Ile Leu Asn Glu
 210 215 220

Glu Thr Ile Ala Ile Gly Val Ser Ala Arg Thr Ser Ala Lys Ala Ile
 225 230 235 240

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

Val Leu Ala Ile Glu Ile Pro Lys Cys Arg Ala Phe Met His Leu Asp
 260 265 270

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

Ile Gln Gly Pro Lys Gly Asn Met Asn Ile Tyr Ile Leu Glu Lys Gly
 290 295 300

Ala Asp Glu Glu Thr Leu Lys Ile Thr His Arg Thr Ser Leu Met Glu
 305 310 315 320

Ala Leu Lys Glu Val Leu Asp Leu Ser Glu Leu Val Leu Ile Pro Cys
 325 330 335

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

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

Asn Tyr Val Ser Asn Thr Leu Leu Arg Glu His Gly Ile Glu Val Ile
 370 375 380

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

Met Ser Met Pro Ile Val Arg Lys Asp Ile
 405 410

<210> 26
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis*

<400> 26
 Met Ile Met Thr Thr Pro Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Pro Leu
 1 5 10 15

5

10

ES 2 909 664 T3

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

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

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

Gly Ala Glu Val Leu Tyr Leu Glu Lys Leu Thr Ala Glu Ala Leu Asp
 65 70 75 80

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

Lys Ala Asp Ile Asn Gly Ala Tyr Asp Arg Leu Lys Glu Phe Leu Leu
 100 105 110

Thr Phe Asp Ala Asp Ser Met Val Glu Gln Val Met Ser Gly Ile Arg
 115 120 125

Lys Asn Glu Leu Glu Arg Glu Lys Lys Ser His Leu His Glu Leu Met
 130 135 140

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

Thr Arg Asp Pro Ala Ala Ala Ile Gly Ser Gly Leu Thr Ile Asn Lys
 165 170 175

Met Lys Glu Pro Ala Arg Arg Arg Glu Ser Leu Phe Met Arg Tyr Ile
 180 185 190

Ile Asn His His Pro Arg Phe Lys Gly His Glu Ile Pro Val Trp Leu
 195 200 205

Asp Arg Asp Phe Lys Phe Asn Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Val Leu
 210 215 220

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

Ala Ile Glu Arg Leu Val Arg Asn Leu Phe Gln Arg Gln Ser Arg Ile
 245 250 255

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

ES 2 909 664 T3

Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Val Asp Arg Asp Gln Phe Thr Ile His
 275 280 285

Pro Ala Ile Gln Gly Pro Glu Gly Asp Met Arg Ile Phe Val Leu Glu
 290 295 300

Arg Gly Lys Thr Ala Asp Glu Ile His Thr Thr Glu Glu His Asn Leu
 305 310 315 320

Pro Glu Val Leu Lys Arg Thr Leu Gly Leu Ser Asp Val Asn Leu Ile
 325 330 335

Phe Cys Gly Gly Gly Asp Glu Ile Ala Ser Ala Arg Glu Gln Trp Asn
 340 345 350

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

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

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

Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Tyr Arg Glu Asp Val Lys
 405 410

<210> 27

<211> 409

<212> PRT

<213> *Mycoplasma arthritidis*

5

<400> 27

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

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

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

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

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

10

ES 2 909 664 T3

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

Glu Phe Leu Asp Asp Ser Val Pro Val Leu Ser Asp Glu His Arg Ala
 100 105 110

Ala Val Lys Lys Phe Leu Gln Ser Gln Lys Ser Thr Arg Ser Leu Val
 115 120 125

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

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

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

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

Asn His Pro Lys Leu Val Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Glu
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Gln Pro Val Asp Asn Gly Leu Pro Leu Glu Asp Leu Leu Lys
 305 310 315 320

Ser Ile Ile Gly Lys Lys Pro Thr Leu Ile Pro Ile Ala Gly Ala Gly

ES 2 909 664 T3

325 330 335

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

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

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

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

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys
405

<210> 28
<211> 409
5 <212> PRT
<213> *Mycoplasma hominis*

<400> 28
Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu

10

ES 2 909 664 T3

130 135 140

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

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

Ile Val Arg Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Arg Phe Val Phe Arg Asn
 180 185 190

His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

Pro Gln Pro Gln Leu Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Ala Ser
 305 310 315 320

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

Thr Glu Met Glu Ile Ala Arg Glu Thr Asn Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
 340 345 350

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

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

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

Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405

5 <210> 29
 <211> 411

ES 2 909 664 T3

<212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

ES 2 909 664 T3

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

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

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

Asp Ala Ala Ser Ile Glu Lys Leu Leu Val Asn Ile Phe Lys Gln Asn
245 250 255

Leu Gly Phe Lys Lys Val Leu Ala Phe Glu Phe Ala Asn Asn Arg Lys
260 265 270

Phe Met His Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Val Asp Tyr Asp Lys Phe
275 280 285

Thr Ile His Pro Glu Ile Glu Gly Asp Leu Arg Val Tyr Ser Val Thr
290 295 300

Tyr Asp Asn Glu Glu Leu His Ile Val Glu Glu Lys Gly Asp Leu Ala
305 310 315 320

Asp Leu Leu Ala Ala Asn Leu Gly Val Glu Lys Val Asp Leu Ile Arg
325 330 335

Cys Gly Gly Asp Asn Leu Val Ala Ala Gly Arg Glu Gln Trp Asn Asp
340 345 350

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

Arg Asn Thr Ile Thr Asn Ala Ile Leu Glu Ser Lys Gly Leu Lys Leu
370 375 380

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

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

<210> 30
<211> 409
<212> PRT
<213> *Streptococcus pneumonia*

5

ES 2 909 664 T3

<400> 30

Met Ser Ser His Pro Ile Gln Val Phe Ser Glu Ile Gly Lys Leu Lys
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ile Arg Asp Arg Gln Thr Lys Val Ala Ile Arg Glu Leu Leu His Gly
 100 105 110

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

Lys Val Glu Leu Pro Glu Ile Pro Asp Glu Ala Lys Asp Leu Thr Asp
 130 135 140

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

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

Asn His Met Phe Ala Asp Thr Arg Asn Arg Glu Thr Leu Tyr Gly Lys
 180 185 190

Tyr Ile Phe Lys Tyr His Pro Ile Tyr Gly Gly Lys Val Asp Leu Val
 195 200 205

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

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

Ala Ser Ile Glu Lys Leu Leu Val Asn Ile Phe Lys Lys Asn Val Gly
 245 250 255

ES 2 909 664 T3

Phe Lys Lys Val Leu Ala Phe Glu Phe Ala Asn Asn Arg Lys Phe Met
260 265 270

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

His Pro Glu Ile Glu Gly Asp Leu His Val Tyr Ser Val Thr Tyr Glu
290 295 300

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

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

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

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

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

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

Ser Met Pro Phe Glu Arg Glu Glu Val
405

<210> 31
<211> 402
<212> PRT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 31
Met Gly Val Glu Leu Gly Ser Asn Ser Glu Val Gly Ala Leu Arg Val
1 5 10 15

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

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

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

5

10

ES 2 909 664 T3

Glu Val Leu Leu Leu Ser Asp Leu Leu Thr Glu Ala Leu His His Ser
 65 70 75 80
 Gly Ala Ala Arg Met Gln Gly Ile Ala Ala Ala Val Asp Ala Pro Arg
 85 90 95
 Leu Gly Leu Pro Leu Ala Gln Glu Leu Ser Ala Tyr Leu Arg Ser Leu
 100 105 110
 Asp Pro Gly Arg Leu Ala His Val Leu Thr Ala Gly Met Thr Phe Asn
 115 120 125
 Glu Leu Pro Ser Asp Thr Arg Thr Asp Val Ser Leu Val Leu Arg Met
 130 135 140
 His His Gly Gly Asp Phe Val Ile Glu Pro Leu Pro Asn Leu Val Phe
 145 150 155 160
 Thr Arg Asp Ser Ser Ile Trp Ile Gly Pro Arg Val Val Ile Pro Ser
 165 170 175
 Leu Ala Leu Arg Ala Arg Val Arg Glu Ala Ser Leu Thr Asp Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Ala His His Pro Arg Phe Thr Gly Val Arg Arg Ala Tyr Glu Ser
 195 200 205
 Arg Thr Ala Pro Val Glu Gly Gly Asp Val Leu Leu Leu Ala Pro Gly
 210 215 220
 Val Val Ala Val Gly Val Gly Glu Arg Thr Thr Pro Ala Gly Ala Glu
 225 230 235 240
 Ala Leu Ala Arg Ser Leu Phe Asp Asp Asp Leu Ala His Thr Val Leu
 245 250 255
 Ala Val Pro Ile Ala Gln Gln Arg Ala Gln Met His Leu Asp Thr Val
 260 265 270
 Cys Thr Met Val Asp Thr Asp Thr Met Val Met Tyr Ala Asn Val Val
 275 280 285
 Asp Thr Leu Glu Ala Phe Thr Ile Gln Arg Thr Pro Asp Gly Val Thr
 290 295 300
 Ile Gly Asp Ala Ala Pro Phe Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala Met Gly
 305 310 315 320

ES 2 909 664 T3

Ile Asp Lys Leu Arg Val Ile His Thr Gly Met Asp Pro Val Val Ala
 325 330 335

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

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

Gln Asp Ala Gly Ile Glu Val Leu Thr Ile Ala Gly Ser Glu Leu Gly
 370 375 380

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

Pro Leu

<210> 32

<211> 417

<212> PRT

<213> *Pseudomonas plecoglossicida*

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Asp Pro Arg His Leu Ala Glu Phe Leu Ile Gly Gly Val Ala
 115 120 125

5

10

ES 2 909 664 T3

Gly Gln Asp Leu Pro Gln Ser Glu Gly Ala Asp Val Val Lys Met Tyr
 130 135 140

Asn Asp Tyr Leu Gly His Ser Ser Phe Ile Leu Pro Pro Leu Pro Asn
 145 150 155 160

Thr Gln Phe Thr Arg Asp Thr Thr Cys Trp Ile Tyr Gly Gly Val Thr
 165 170 175

Leu Asn Pro Met Tyr Trp Pro Ala Arg Arg Gln Glu Thr Leu Leu Thr
 180 185 190

Thr Ala Ile Tyr Lys Phe His Lys Glu Phe Thr Asn Ala Glu Phe Glu
 195 200 205

Val Trp Tyr Gly Asp Pro Asp Lys Glu His Gly Ser Ser Thr Leu Glu
 210 215 220

Gly Gly Asp Val Met Pro Ile Gly Lys Gly Ile Val Leu Ile Gly Met
 225 230 235 240

Gly Glu Arg Thr Ser Arg Gln Ala Ile Gly Gln Leu Ala Arg Asn Leu
 245 250 255

Phe Glu Lys Gly Ala Ala Thr Glu Val Ile Val Ala Gly Leu Pro Lys
 260 265 270

Ser Arg Ala Ala Met His Leu Asp Thr Val Phe Ser Phe Cys Asp Arg
 275 280 285

Asp Leu Val Thr Val Phe Pro Glu Val Val Asn Glu Ile Val Pro Phe
 290 295 300

Ile Ile Arg Pro Asp Glu Lys Lys Pro Tyr Gly Met Asp Val Arg Arg
 305 310 315 320

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

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

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

Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Thr Tyr Thr Asn Thr Leu Leu Arg Lys Ala

ES 2 909 664 T3

370

375

380

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

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

Tyr

<210> 33

<211> 420

<212> PRT

<213> *Pseudomonas putida*

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Glu Pro Arg His Leu Ala Glu Phe Leu Ile Gly Gly Val Ala
115 120 125

Gly Gln Asp Leu Pro Val Ser Glu Gly Ala Glu Val Ile Lys Met Tyr
130 135 140

Asn Lys Tyr Leu Gly His Ser Ser Phe Ile Leu Pro Pro Leu Pro Asn
145 150 155 160

Thr Gln Phe Thr Arg Asp Thr Thr Cys Trp Ile Tyr Gly Gly Val Thr

5

10

ES 2 909 664 T3

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Glu Pro Arg Lys Leu Ala Glu Tyr Leu Ile Gly Gly Val Ala
115 120 125

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

Arg Glu Tyr Leu Gly His Ser Ser Phe Leu Leu Pro Pro Leu Pro Asn
145 150 155 160

Thr Gln Phe Thr Arg Asp Thr Thr Cys Trp Ile Tyr Gly Gly Val Thr
165 170 175

Leu Asn Pro Met Tyr Trp Pro Ala Arg Arg Gln Glu Thr Leu Leu Thr
180 185 190

Thr Ala Ile Tyr Lys Phe His Pro Glu Phe Ala Asn Ala Glu Phe Glu
195 200 205

ES 2 909 664 T3

Ile Trp Tyr Gly Asp Pro Asp Lys Asp His Gly Ser Ser Thr Leu Glu
 210 215 220

Gly Gly Asp Val Met Pro Ile Gly Asn Gly Val Val Leu Ile Gly Met
 225 230 235 240

Gly Glu Arg Ser Ser Arg Gln Ala Ile Gly Gln Val Ala Gln Ser Leu
 245 250 255

Phe Ala Lys Gly Ala Ala Glu Arg Val Ile Val Ala Gly Leu Pro Lys
 260 265 270

Ser Arg Ala Ala Met His Leu Asp Thr Val Phe Ser Phe Cys Asp Arg
 275 280 285

Asp Leu Val Thr Val Phe Pro Glu Val Val Lys Glu Ile Val Pro Phe
 290 295 300

Ser Leu Arg Pro Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Gly Met Asn Ile Arg Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Lys Thr Phe Leu Glu Val Val Ala Glu Ser Leu Gly Leu Lys
 325 330 335

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

Glu Gln Trp Asp Asp Gly Asn Asn Val Val Cys Leu Glu Pro Gly Val
 355 360 365

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

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

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

Asp Tyr

<210> 35
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

5

ES 2 909 664 T3

<400> 35

Met Ser Ser His Pro Ile Gln Val Phe Ser Glu Ile Gly Lys Leu Lys
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ile Arg Asp Arg Gln Thr Lys Val Ala Ile Arg Glu Leu Leu His Gly
 100 105 110

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

Lys Val Glu Leu Pro Glu Ile Pro Asp Glu Ala Lys Asp Leu Thr Asp
 130 135 140

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

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

Asn His Met Phe Ala Asp Thr Arg Asn Arg Glu Thr Leu Tyr Gly Lys
 180 185 190

Tyr Ile Phe Lys Tyr His Pro Ile Tyr Gly Gly Lys Val Asp Leu Val
 195 200 205

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

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

Ala Ser Ile Glu Lys Leu Leu Val Asn Ile Phe Lys Lys Asn Val Gly
 245 250 255

ES 2 909 664 T3

Phe Lys Lys Val Leu Ala Phe Glu Phe Ala Asn Asn Arg Lys Phe Met
 260 265 270

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

His Pro Glu Ile Glu Gly Asp Leu His Val Tyr Ser Val Thr Tyr Glu
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

Ser Met Pro Phe Glu Arg Glu Glu Val
 405

- 5 <210> 36
- <211> 467
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> ABD1: dominio de unión a albúmina de afinidad elevada

<400> 36
 Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15

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

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

ES 2 909 664 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 909 664 T3

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

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

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

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

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

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

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp Gly Ser His His His His
405 410 415

His His Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu
420 425 430

Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys
435 440 445

Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala
450 455 460

Ala Leu Pro
465

<210> 37

<211> 467

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ABD: dominio de unión a albúmina

10

<400> 37

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

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

ES 2 909 664 T3

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

ES 2 909 664 T3

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

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

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

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

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

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

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

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp Ala Gln His Asp Glu Ala
 405 410 415

Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu
 420 425 430

Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn
 435 440 445

Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala
 450 455 460

Ala Leu Pro
 465

<210> 38
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ABD: dominio de unión a albúmina

<400> 38
 Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15

5

10

ES 2 909 664 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 909 664 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp His His His His His His
 405 410 415

Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys
 420 425 430

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
 435 440 445

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
 450 455 460

Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 465 470

<210> 39

<211> 473

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ABD: dominio de unión a albúmina

5

10

ES 2 909 664 T3

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 909 664 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp Ala Gln His Asp Glu Ala
405 410 415

Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu
420 425 430

Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn
435 440 445

Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala
450 455 460

Ala Leu Pro His His His His His His
465 470

5 <210> 40
<211> 483
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> ABD: dominio de unión a albúmina

ES 2 909 664 T3

<400> 40

Met His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu
1 5 10 15

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
20 25 30

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly
35 40 45

Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Ser Val Phe Asp Ser Lys
65 70 75 80

Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val
85 90 95

Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg
100 105 110

Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg
115 120 125

Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn
130 135 140

Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu
165 170 175

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

Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val Glu Ile Met Met Ala Gly Ile
195 200 205

Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp
210 215 220

Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly
225 230 235 240

ES 2 909 664 T3

Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu
245 250 255

Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser Asn His Pro Lys Leu Ile Asn
260 265 270

Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly
275 280 285

Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu
290 295 300

Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala
305 310 315 320

Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Lys
325 330 335

Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys
340 345 350

Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp
355 360 365

Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn
370 375 380

Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro
385 390 395 400

Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu
405 410 415

Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly
420 425 430

Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu
435 440 445

Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe His Gly Asn Gln Leu Ser Leu
450 455 460

Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp
465 470 475 480

Val Lys Trp

5 <210> 41
<211> 484
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> His-ABD-PolyN-bcADI

ES 2 909 664 T3

<400> 41

Met Gly His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 20 25 30

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
 35 40 45

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly
 50 55 60

Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Lys His Pro Ile His
 65 70 75 80

Val Thr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Gln Thr Val Leu Leu Lys Arg Pro
 85 90 95

Gly Lys Glu Val Glu Asn Leu Thr Pro Asp Tyr Leu Gln Gln Leu Leu
 100 105 110

Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Pro Ile Ile Gln Lys Glu His Asp Tyr
 115 120 125

Phe Ala Gln Thr Leu Arg Asn Arg Gly Val Glu Val Leu Tyr Leu Glu
 130 135 140

Lys Leu Ala Ala Glu Ala Leu Val Asp Lys Lys Leu Arg Glu Glu Phe
 145 150 155 160

Val Asp Arg Ile Leu Lys Glu Gly Gln Ala Asp Val Asn Val Ala His
 165 170 175

Gln Thr Leu Lys Glu Tyr Leu Leu Ser Phe Ser Asn Glu Glu Leu Ile
 180 185 190

Gln Lys Ile Met Gly Gly Val Arg Lys Asn Glu Ile Glu Thr Ser Lys
 195 200 205

ES 2 909 664 T3

Lys Thr His Leu Tyr Glu Leu Met Glu Asp His Tyr Pro Phe Tyr Leu
 210 215 220

Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Ala Ala Ser Val
 225 230 235 240

Gly Asp Gly Leu Thr Ile Asn Lys Met Arg Glu Pro Ala Arg Arg Arg
 245 250 255

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

Lys His Asn Val Pro Ile Trp Leu Asp Arg Asp Tyr Lys Phe Pro Ile
 275 280 285

Glu Gly Gly Asp Glu Leu Ile Leu Asn Glu Glu Thr Ile Ala Ile Gly
 290 295 300

Val Ser Ala Arg Thr Ser Ala Lys Ala Ile Glu Arg Leu Ala Lys Asn
 305 310 315 320

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

Pro Lys Cys Arg Ala Phe Met His Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Val
 340 345 350

Asp Tyr Asp Lys Phe Thr Ile His Pro Ala Ile Gln Gly Pro Lys Gly
 355 360 365

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

Lys Ile Thr His Arg Thr Ser Leu Met Glu Ala Leu Lys Glu Val Leu
 385 390 395 400

Asp Leu Ser Glu Leu Val Leu Ile Pro Cys Gly Gly Gly Asp Val Ile
 405 410 415

Ala Ser Ala Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly Ser Asn Thr Leu Ala Ile
 420 425 430

Ala Pro Gly Val Val Val Thr Tyr Asp Arg Asn Tyr Val Ser Asn Thr
 435 440 445

Leu Leu Arg Glu His Gly Ile Glu Val Ile Glu Val Leu Ser Ser Glu
 450 455 460

Leu Ser Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met Ser Met Pro Ile Val
 465 470 475 480

Arg Lys Asp Ile

5 <210> 42
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 909 664 T3

<220>

<223> ABD-Inteína-CBD

5

<400> 42

Met Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
 35 40 45

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

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

Val Arg Ile Ala Asp Ile Val Pro Gly Ala Arg Pro Asn Ser Asp Asn
 85 90 95

Ala Ile Asp Leu Lys Val Leu Asp Arg His Gly Asn Pro Val Leu Ala
 100 105 110

Asp Arg Leu Phe His Ser Gly Glu His Pro Val Tyr Thr Val Arg Thr
 115 120 125

Val Glu Gly Leu Arg Val Thr Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Leu Cys
 130 135 140

Leu Val Asp Val Ala Gly Val Pro Thr Leu Leu Trp Lys Leu Ile Asp
 145 150 155 160

Glu Ile Lys Pro Gly Asp Tyr Ala Val Ile Gln Arg Ser Ala Phe Ser
 165 170 175

ES 2 909 664 T3

Val Asp Cys Ala Gly Phe Ala Arg Gly Lys Pro Glu Phe Ala Pro Thr
 180 185 190

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

His Arg Asp Pro Asp Ala Gln Ala Ile Ala Asp Glu Leu Thr Asp Gly
 210 215 220

Arg Phe Tyr Tyr Ala Lys Val Ala Ser Val Thr Asp Ala Gly Val Gln
 225 230 235 240

Pro Val Tyr Ser Leu Arg Val Asp Thr Ala Asp His Ala Phe Ile Thr
 245 250 255

Asn Gly Phe Val Ser His Ala Thr Gly Leu Thr Gly Leu Asn Ser Gly
 260 265 270

Leu Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr
 275 280 285

Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu
 290 295 300

Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala
 305 310 315 320

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

5 <210> 43
 <211> 636
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CBD-Inteína-ADI

<400> 43
 Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp
 1 5 10 15

Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly
 20 25 30

Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu
 35 40 45

ES 2 909 664 T3

Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln Asn Asn Gly Asn Asn
 50 55 60

Gly Leu Glu Leu Arg Glu Ser Gly Ala Ile Ser Gly Asp Ser Leu Ile
 65 70 75 80

Ser Leu Ala Ser Thr Gly Lys Arg Val Ser Ile Lys Asp Leu Leu Asp
 85 90 95

Glu Lys Asp Phe Glu Ile Trp Ala Ile Asn Glu Gln Thr Met Lys Leu
 100 105 110

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

Tyr Ile Leu Lys Thr Arg Leu Gly Arg Thr Ile Lys Ala Thr Ala Asn
 130 135 140

His Arg Phe Leu Thr Ile Asp Gly Trp Lys Arg Leu Asp Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Leu Lys Glu His Ile Ala Leu Pro Arg Lys Leu Glu Ser Ser Ser Leu
 165 170 175

Gln Leu Ser Pro Glu Ile Glu Lys Leu Ser Gln Ser Asp Ile Tyr Trp
 180 185 190

Asp Ser Ile Val Ser Ile Thr Glu Thr Gly Val Glu Glu Val Phe Asp
 195 200 205

Leu Thr Val Pro Gly Pro His Asn Phe Val Ala Asn Asp Ile Ile Val
 210 215 220

His Asn Cys Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr
 225 230 235 240

Ser Glu Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg
 245 250 255

Glu Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser
 260 265 270

Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val
 275 280 285

Ala Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu
 290 295 300

ES 2 909 664 T3

Val Ala Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu
 305 310 315 320

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

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

Leu Val Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile
 355 360 365

Glu Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe
 370 375 380

Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr
 385 390 395 400

Met Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val
 405 410 415

Phe Ser Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro
 420 425 430

Ser Leu Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn
 435 440 445

Asp Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val
 450 455 460

Thr Leu Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys
 465 470 475 480

Arg Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu
 485 490 495

Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro
 500 505 510

Ile Ala Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly
 515 520 525

Gly Ala Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu
 530 535 540

Leu Gln Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly
 545 550 555 560

ES 2 909 664 T3

Glu Gly Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly
565 570 575

Thr Asn Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg
580 585 590

Asn Glu Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu
595 600 605

Pro Phe His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys
610 615 620

Met Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
625 630 635

<210> 44
<211> 1452
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> His-ABD-PolyN-ADI (ADN)

<400> 44
atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa 60
gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc 120
aacaatgcca aaactgttga aggtgtaaaa gcactgatag atgaaatfff agctgcatta 180
ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gttctgtatt tgacagtaaa 240
tttaaaggaa ttcacgttta ttcagaaatt ggtgaattag aatcagttct agttcacgaa 300
ccaggacgcg aaattgacta tattacacca gctagactag atgaattatg cttctcagct 360
atcttagaaa gccacgatgc tagaaaagaa cacaacaat tcgtagcaga attaaaagca 420
aacgacatca atggttgtga attaattgat ttagttgctg aaacatatga tttagcatca 480
caagaagcta aagacaaatt aatcgaagaa tttttagaag actcagaacc agttctatca 540
gaagaacaca aagtagttgt aagaaacttc ttaaaagcta aaaaaacatc aagagaatta 600
gtagaaatca tgatggcagg gatcacaanaa tacgatttag gtatcgaagc agatcacgaa 660
ttaatcgttg acccaatgcc aaacatac ttcacacgtg acccatttgc atcagtaggt 720
aatggtgtaa caatccacta catgcgttac aaagtttagac aacgtgaaac attattctca 780
agatttgtat tctcaaatca ccctaaacta attaactc catggtacta cgacccttca 840
ctaaaattat caatcgcagg tggggacgta tttatctaca acaatgacac attagtagtt 900
ggtgtttctg aaagaactga cttacaanaa gttactttat tagctaaaaa cattgttgct 960

ES 2 909 664 T3

aataaagaat ctgaattcaa acgtattggt gcaattaacg ttccaaaatg gacaaactta 1020
atgcacttag acacatggct aacaatgtta gacaaggaca aattcctata ctcaccaatc 1080
gctaattgacg tattaatatt ctgggattat gacttagtaa acggtggagc agaaccacaa 1140
ccagttgaaa acggattacc tctagaagga ttattacaat caatcattaa caaaaaacca 1200
gttttaattc ctatcgagg tgaaggtgct tcacaaatgg aaatcgaaag agaaacacac 1260
ttcgatggta caaactactt agcaattaga ccaggtgttg taattgggta ctcacgtaac 1320
gaaaaaacia acgctgctct agaagctgca ggcattaaag ttcttccatt ccacggtaac 1380
caattatcat taggtatggg taacgctcgt tgtatgtcaa tgcctttatc acgtaaagat 1440
gttaagtggg aa 1452

5

<210> 45
<211> 1455
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> His-ABD-PolyN-bcADI (ADN)

<400> 45
atgggtcatc atcaccatca ccatgatgaa gccgtggatg cgaacagctt agctgaagct 60
aaagtcttag ctaacagaga acttgacaaa tatggagtaa gtgactatta caagaacctt 120
atcaacaatg ccaaaactgt tgaaggtgta aaagcactga tagatgaaat tttagctgca 180
ttaccttcgg gtagtaacaa caataataac aatggtagcg gcggtaaaca tccgatacat 240
gttacttcag aaattgggga attacaaacg gttttattaa aacgaccggg taaagaagtg 300
gaaaacttga cgccagatta tttgcagcaa ttattatttg acgatattcc atacctacca 360
attattcaaa aagagcatga ttattttgca caaacgttac gcaatcgggg tgttgaagtt 420
ctttatttag aaaaactagc cgctgaggcg ttagtagata aaaaacttcg agaagaattt 480
gttgatcgta ttttaaaaga aggacaggcc gacgtaaagtg ttgcacatca aactttaaaa 540
gaatatttac tttccttttc aaatgaagaa ttaattcaaa aaattatggg cgggtgacgg 600
aaaaacgaaa ttgaaacaag taagaagaca catttatatg aattaatgga agatcattat 660
ccgttttact tagatccaat gcctaattta tattttactc gtgatccagc agctagcgtg 720
ggcgatggct taacgataaa taagatgaga gaaccagcgc gtagacgtga atcattattc 780
atggagtaca tcattaaata tcatccaaga tttgaaaaac ataatgtacc aatctgggta 840
gatcgtgatt ataaatttcc aattgaaggt ggcgacgagc taattttaaa tgaagaaca 900
attgcgattg gagtatctgc tcgtacttca gctaaagcaa ttgaacgttt agcaaaaaat 960
ctcttttagcc gacaaaataa aattaagaaa gtggttagcaa tagaaattcc aaaatgccga 1020
gcatttatgc atttagatag agtatttaca atgggtgatt atgataagtt tacaattcac 1080

ES 2 909 664 T3

```

ccagctattc aagggccaaa agggaatatg aatatttata ttttagaaaa aggatcagat      1140
gaggaaactc ttaaaattac acatcgtact tctttaatgg aagcattaaa agaggtatta      1200
ggcttaagtg aattagttct tattccatgt ggaggaggag atgtaattgc ttctgctcgt      1260
gaacaatgga atgatggctc gaacacatta gcaatcgcgc caggtgtagt tgttacatat      1320
gatcgcaact atgtatccaa tacgttatta cggaacacg gtatagaagt gattgaggtg      1380
ctaagttcag aattatctcg tggtcgtggg ggtccacggt gcatgagtat gcccaattggt      1440
cgtaaagata tttaa                                                         1455

<210> 46
5 <211> 46
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> ABD sin conector

<400> 46
  Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
  1                5                10                15

  Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
                20                25                30

  Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
                35                40                45

15 <210> 47
  <211> 57
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

20 <220>
  <223> ABD con conector

<400> 47
  Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys
  1                5                10                15

  Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
                20                25                30

  Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
                35                40                45

  Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
                50                55

25 <210> 48
  <211> 46
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

30 <220>
  <223> ABD1 sin conector

```

ES 2 909 664 T3

<400> 48

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 49
<211> 57
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> ABD1 con conector

<400> 49

Gly Ser His His His His His His Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys
1 5 10 15

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr
20 25 30

Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu
35 40 45

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
50 55

15 <210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Conector 1

<400> 50

Gly Ser His His His His His His Ala Asn Ser
1 5 10

25 <210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Conector 2

<400> 51

Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser
1 5 10

35 <210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Conector 3

ES 2 909 664 T3

<400> 52
Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser
1 5

5
<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

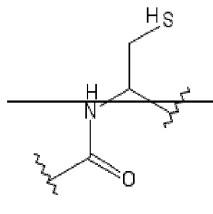
10
<220>
<223> Conector 5

<400> 53
Gly Ser Gly Gly
1

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina, comprendiendo la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 40 y 41.

5



2. Método de preparación de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina según la reivindicación 1, que comprende construir un gen de fusión que codifica la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina, insertar el gen de fusión en un vector, insertar el vector en un organismo hospedador y expresar una proteína que incluye la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina según la reivindicación 1.

10

3. Método de preparación de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina según la reivindicación 2, que comprende además purificar la proteína de fusión.

15

4. Método de preparación de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina según la reivindicación 3, en el que la purificación se lleva a cabo mediante cromatografía.

20

5. Método de preparación de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina según la reivindicación 3, en la que la purificación se lleva a cabo a partir de fracciones solubles de proteínas en bruto.

6. Método de preparación de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina según la reivindicación 3, en la que la purificación se lleva a cabo a partir de fracciones insolubles de proteínas en bruto.

25

7. Método de preparación de la proteína de fusión de desiminasa de unión a albúmina según la reivindicación 1 mediante ligadura de proteína mediada por inteína entre el dominio de unión a albúmina, el péptido de unión a albúmina o la(s) proteína(s) de unión a albúmina y la segunda parte que comprende arginina desiminasa.

30

8. Composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de un cáncer en un paciente, comprendiendo dicha composición una cantidad clínicamente eficaz de la proteína de fusión de arginina desiminasa de unión a albúmina según la reivindicación 1 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 8, en la que la composición presenta un pH en un intervalo de 5.5 a 9.5.

35

10. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 8, en la que la composición presenta un pH de 7.4.

40

11. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 8, en la que la composición presenta un pH de 6.5.

12. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 8, en la que el cáncer es cáncer pancreático, melanoma, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer nasofaríngeo, cáncer esofágico, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer cervical o cáncer cerebral.

45

13. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 8, en la que el cáncer es negativo para la argininosuccinato sintetasa (ASS).

(A)

ADI nativa

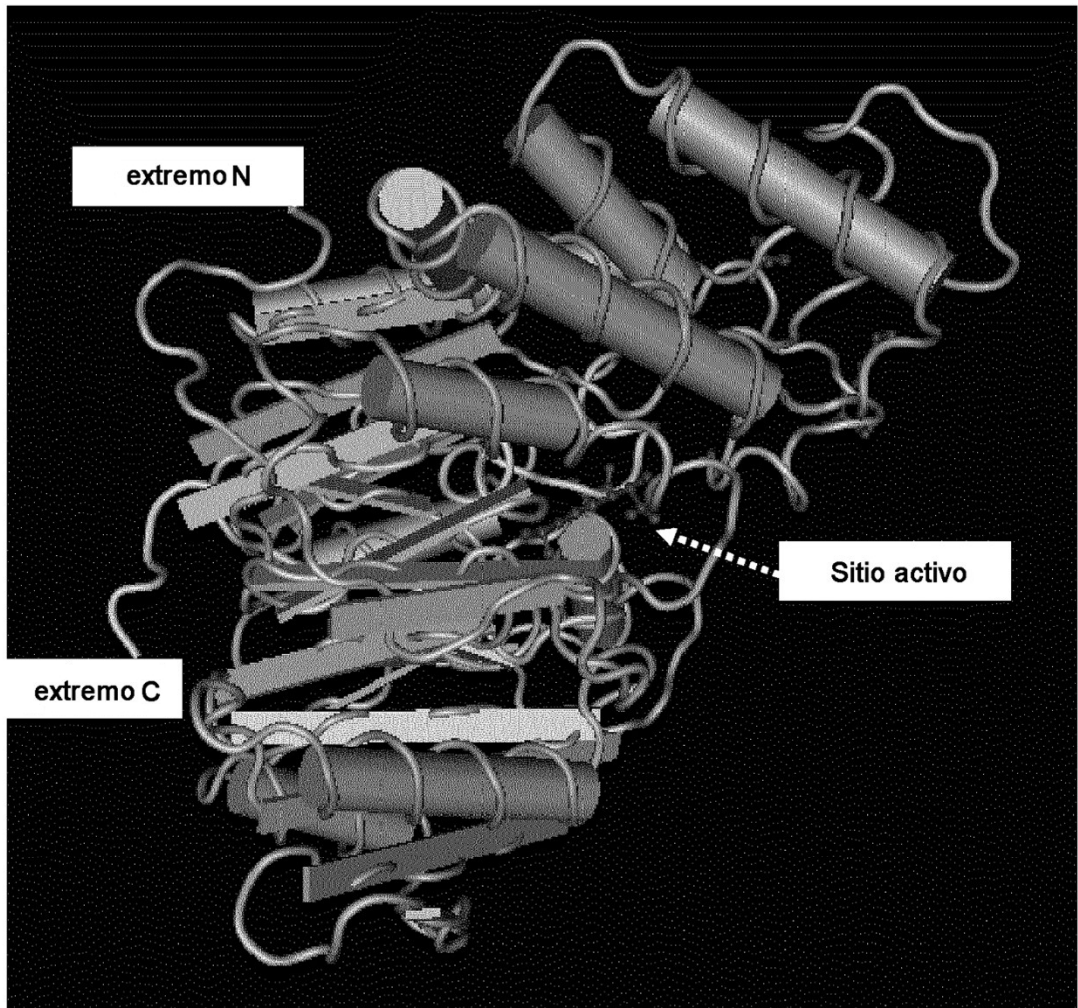
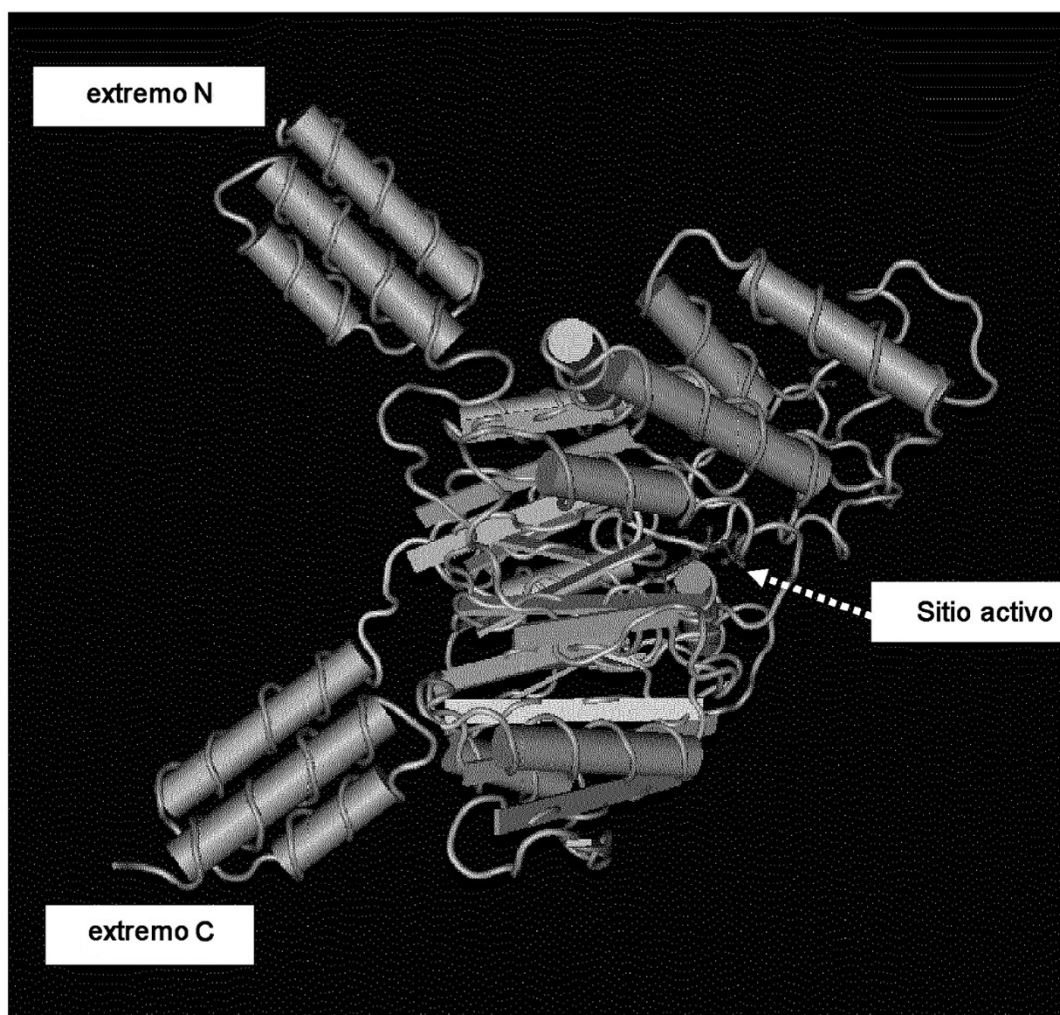


FIG. 1

(B)

proteína de fusión de AAD con dos ABD / ABD1



SEC ID nº 46

ABD sin conector:

LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEC ID nº 47

ABD con conector:

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILA

SEC ID nº 48

ABD1 sin conector:

LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

SEC ID nº 49

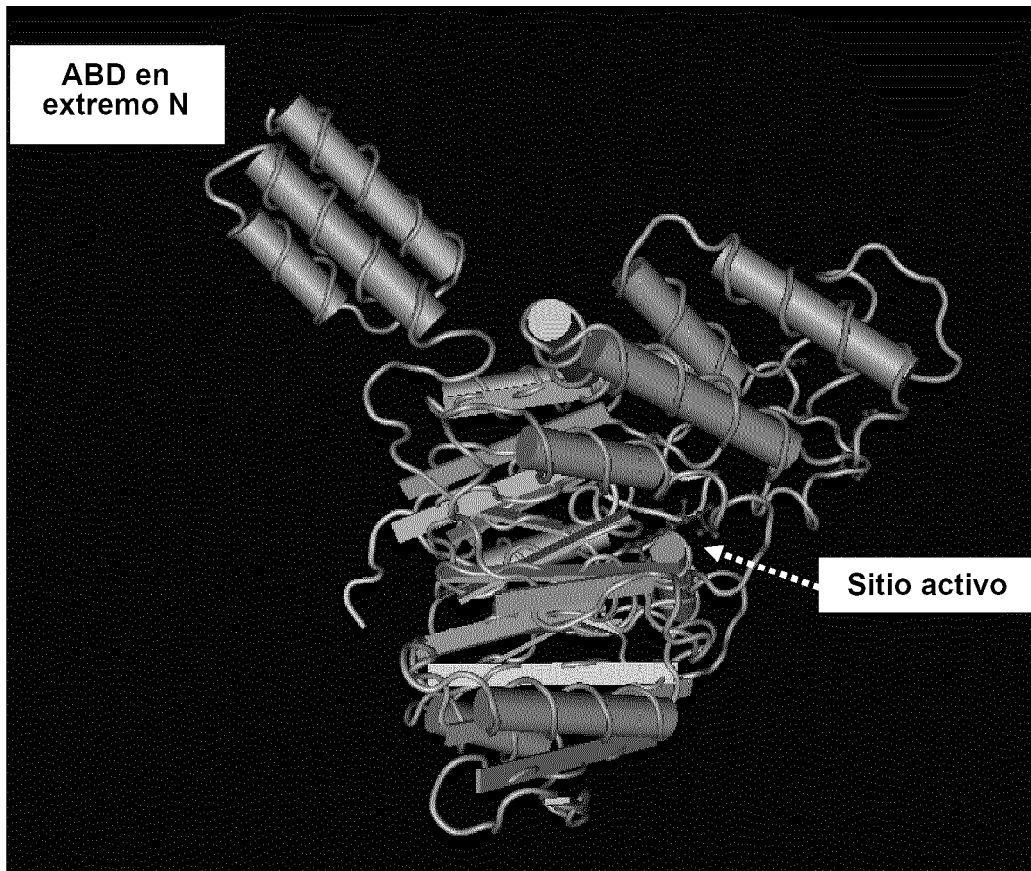
ABD1 con conector:

GSHHHHHHANS�AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

FIG. 1 (continuación)

(C)

**Proteína de fusión de AAD con un AD/ABD1
en el extremo N**



SEC ID N°: 46

ABD sin conector:

LAEAKVLANRELDKYGVSDDYKLNINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEC ID N°: 47

ABD con conector:

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDDYKLNINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEC ID N°: 48

ABD1 sin conector:

LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALHILAALP

SEC ID N°: 49

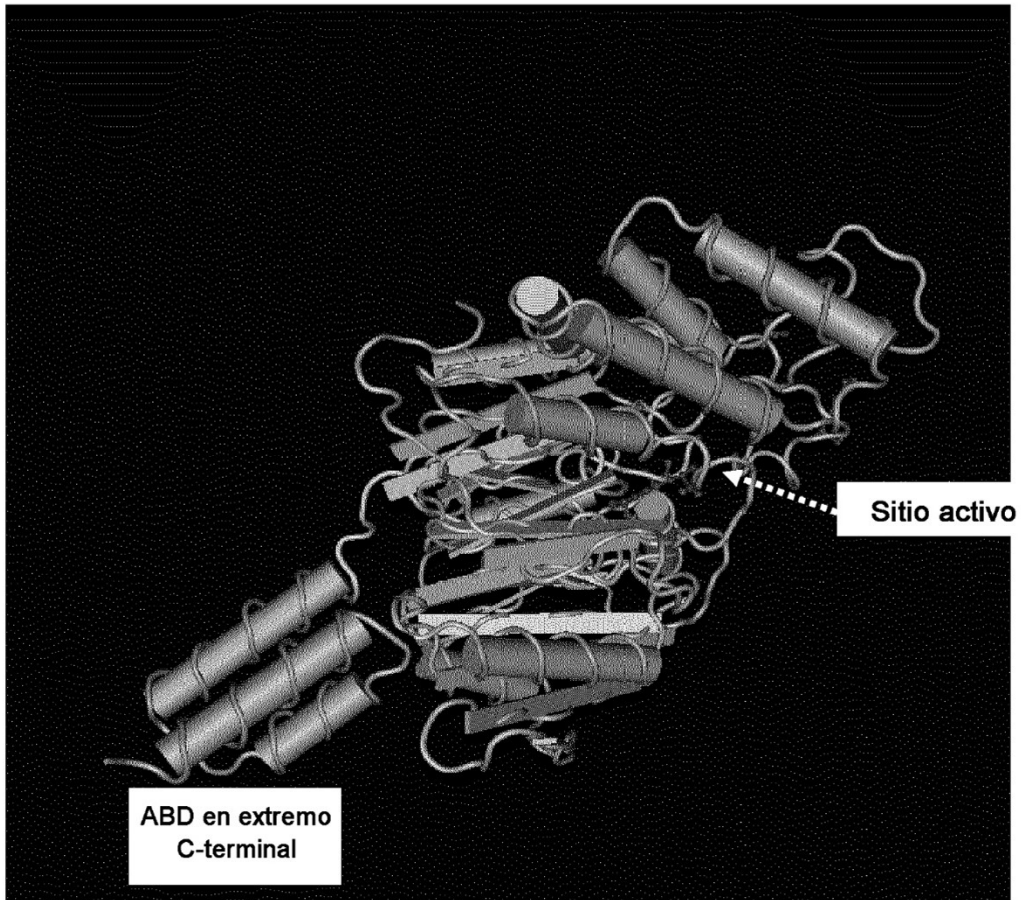
ABD1 sin conector:

GSHHHHHHANS�AEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALHILAALP

FIG. 1 (continuación)

(D)

proteína de fusión de ADD con un ABD / ABD1
en el extremo C-terminal



SEC ID nº 46

ABD sin conector: AEAQVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEC ID nº 47

ABD con conector:

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEC ID nº 48

ABD1 sin conector:

LAEAQVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALHILAALP

SEC ID nº 49

ABD1 con conector:

GSHHHHHHANSLSAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALHILAALP

FIG 1 (continuación)

(A) SEC ID nº 36

ADI-conector-ABD 1

MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQ
FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVVRNFLKA
KKTRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVGTIHYMRYKVR
QRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLMLDKDKFLYSP IANDVFKFWDYDLV
NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLIP IAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMPLSRKDVKWGSHHHHHHAN
SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

(ABD 1: dominio de unión a albúmina de alta afinidad; el conector está subrayado)

Conector 1 (SEC ID nº 50): GSHHHHHHANS

(B) SEC ID nº 37

ADI-conector-ABD

MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQ
FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVVRNFLKA
KKTRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVGTIHYMRYKVR
QRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLMLDKDKFLYSP IANDVFKFWDYDLV
NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLIP IAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMPLSRKDVKWAQHDEAVDAN
SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

(ABD: dominio de unión a albúmina; el conector está subrayado)

Conector 2 (SEC ID nº 51): AQHDEAVDANS

FIG. 3

(C) SEC ID nº 38



MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQ
 FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVVRNFLKA
 KKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVGTIHYMRYKVR
 QRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
 LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLMLDKDKFLYSPIANDVEKFWDYDLV
 NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSI INKKPVLIPIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGV
 VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMPLSRKDVKWHHHHHHAQH
EAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

(ABD: dominio de unión a albúmina; el conector está subrayado)

(D) SEC ID nº 39

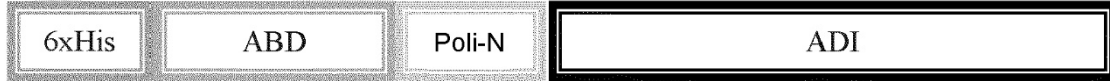


MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQ
 FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVVRNFLKA
 KKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVGTIHYMRYKVR
 QRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
 LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLMLDKDKFLYSPIANDVEKFWDYDLV
 NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSI INKKPVLIPIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGV
 VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMPLSRKDVKWAQHDEAVDAN
SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPHHHHHH

(ABD: dominio de unión a albúmina; el conector está subrayado)

FIG. 3 (continuación)

(E) SEC ID nº 40



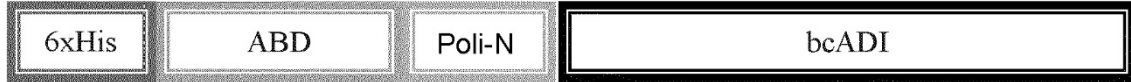
MHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
PSGSNNNNNNGSGGSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELFS
 ILESHDARKEHKQFVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLS
 EEHKVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPPNLYFTRDPFASVG
 NGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYDPSLKLSIEGGDVFIYNNDTLVV
 GVSERTDLQTVTLLAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMMLDKDKFLYSPI
 ANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLPIAGEGASQMEIERETH
 FDGTNYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGGMGNARCMSMPLSRKD
 VKW

(ABD: dominio de unión a albúmina; el conector entre His y ABD está subrayado con línea continua, mientras que el conector entre Poli-N y ADI está subrayado con línea de puntos).

Conector 3 (SEC ID nº 52): DEAVDANS; Conector 4: SGS; Conector 5 (SEC ID nº 53): GSGG

FIG. 3 (continuación)

(F) SEC ID nº 41



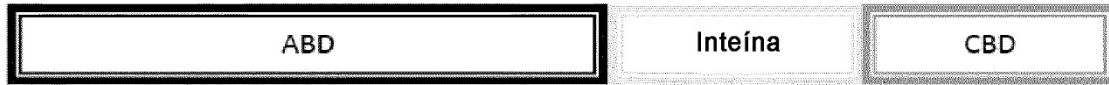
MGHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAALP
 SGSNNNNNNGSGGKHP IHVTSEIGELQTVLLKRPNGKEVENLTPDYLQQLLFDDIPYLPITIQK
 EHDYFAQTLRNRGVVEVLYLEKLAEEALVDKKLREEFVDRILKEGQADVNVAHQTLKEYLLSF
 SNEELIQKIMGGVRKNEIETSKKTHLYELMEDHYPPYLDPMPNLYFTRDPAASVGDGLTINK
 MREPARRRESLFMEYI IKYHPRFAKHNVP IWLDRDYKFPIEGGDELILNEETIAIGVSARTS
 AKAIERLAKNLF SRQNKIKKVLAI EIPKCR AFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPAIQGP KGNMNI
 YILEKGADEETLKITHRTSLMEALKEVLDLSELVLI PCGGGDVIASAREQWNDGSNTLAIAP
 GVVVTYDRNYVSNTLLREHGIEVIEVLSSSELSRGRGGPRC MSP I VRKDI

(ABD: dominio de unión a albúmina; el conector entre His y ABD está subrayado con línea continua, mientras que el conector entre Poli-N y bcADI está subrayado con línea de puntos).

Conector 3 (SEC ID nº 52): DEAVDANS; Conector 4: SGS; Conector 5 (SEC ID nº 53): GSGG

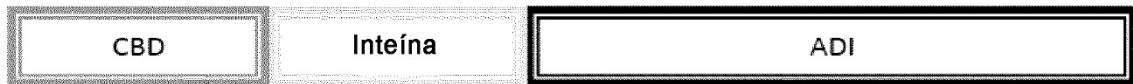
FIG 3 (continuación)

(A) SEC ID nº 42



MAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAALPEF
 LEGSSCITGDALVALPEGESVRIADIVPGARPNSDNAIDLKVLDRHGPNVLADRLFHSGE
 HPVYTVRTVEGLRVTGTANHPLLCLVDVAGVPTLLWKLIDEIKPGDYAVIQRSASFVSDCA
 GFARGKPEFAPTTYTVGVPGLVRFLEAHHRDPDAQIADELTDGRFYAKVASVTDAGVQ
 PVYSLRVDTADHAFITNGFVSHATGLTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKT
 YKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQGDPITITITK

(B) SEC ID nº 43

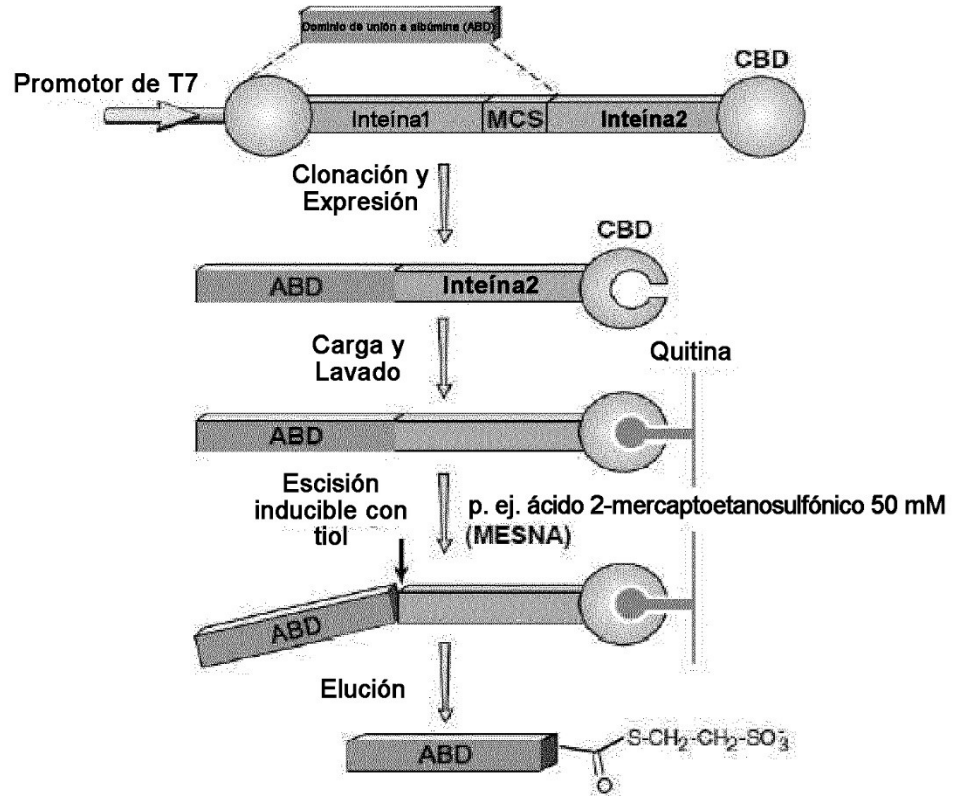


MKIEEGKLTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLONNGNN
 GLELRESGAI SGDSLISLASTGKRVS IKDLLDEKDFE IWAINEQTMKLES AKVSRVFCTGKKLV
 YILKTRLGRTIKATANHRFLTIDGWKRLDELSLKEHIALPRKLESSLQLSPEIEKLSQSDIYW
 DSIVSITETGVVEEFDLTVPGPHNFVANDI IVHNCVFDKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGR
 EIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQFVAELKANDINVELIDLVAETYDLASQEAKDKL
 IEEFLEDSEPVLSSEHKVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPLYF
 TRDPFASVGNVTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIEGGDVFIYNN
 DTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKECEBFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMKDKFLYSP
 IANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSI INKKPVLIPIAGEGASQMEIERETHFDG
 TNYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMPLSRKDVKW

FIG. 4

(C)

Fusión de extremo C-terminal



(D)

Fusión de extremo N-terminal

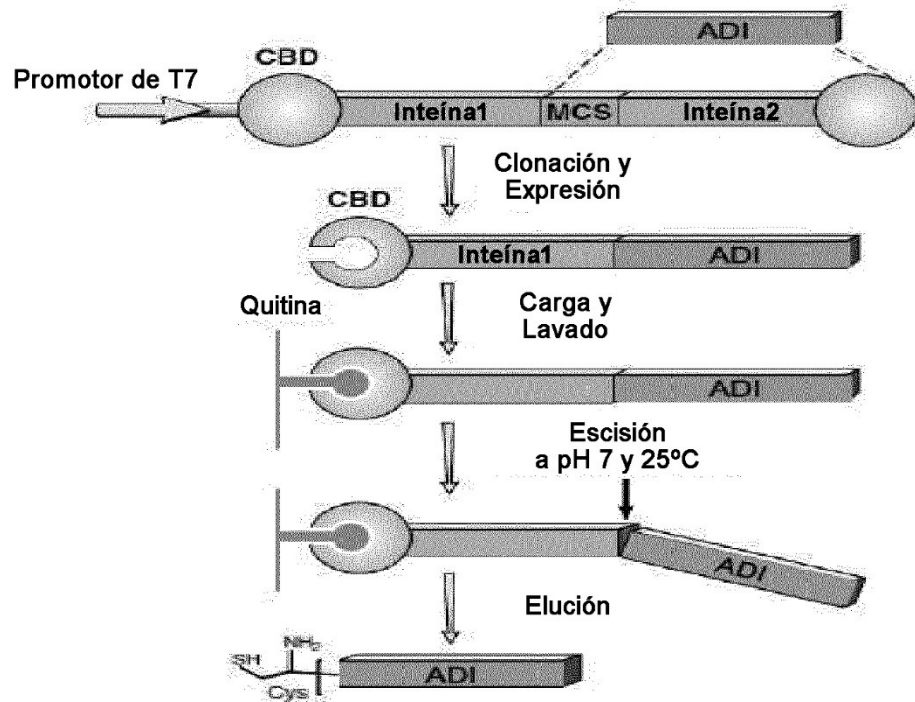


FIG. 4 (continuación)

(E)

Ligación de proteína mediada por inteína

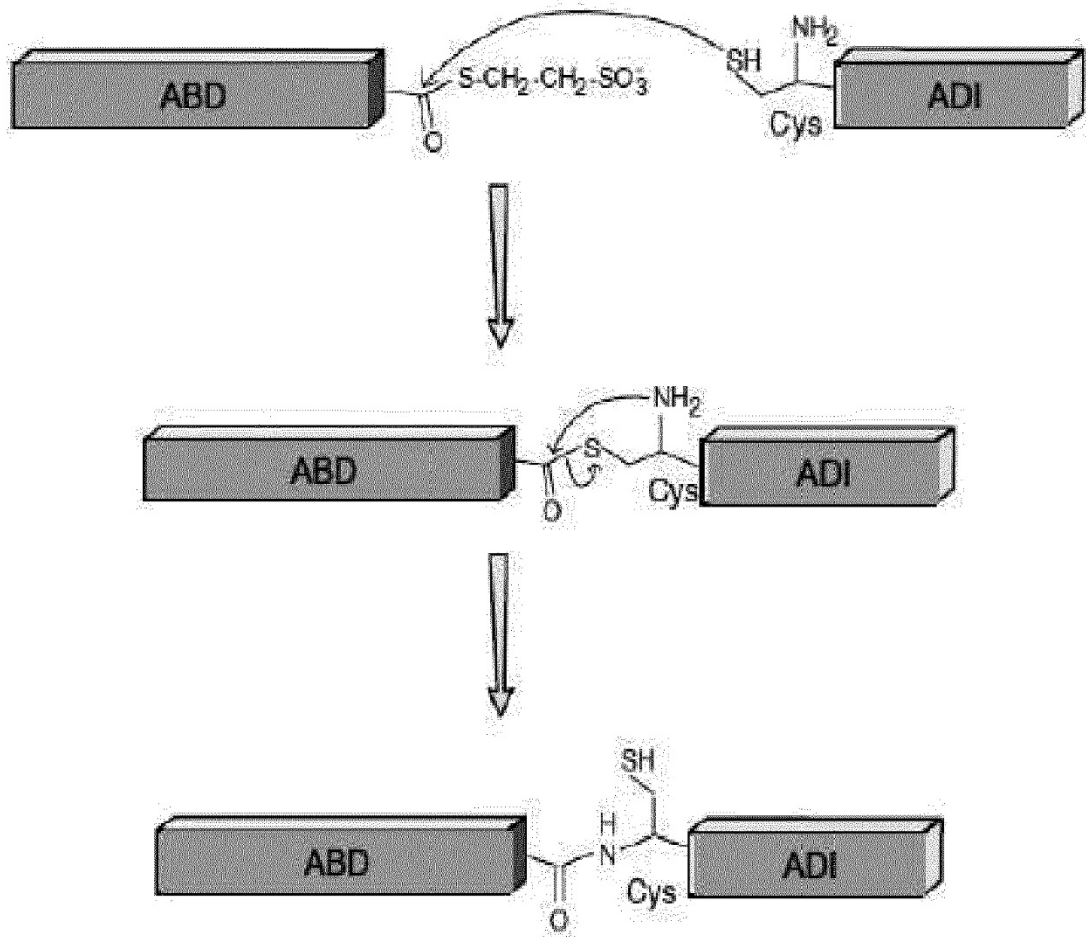


FIG. 4 (continuación)

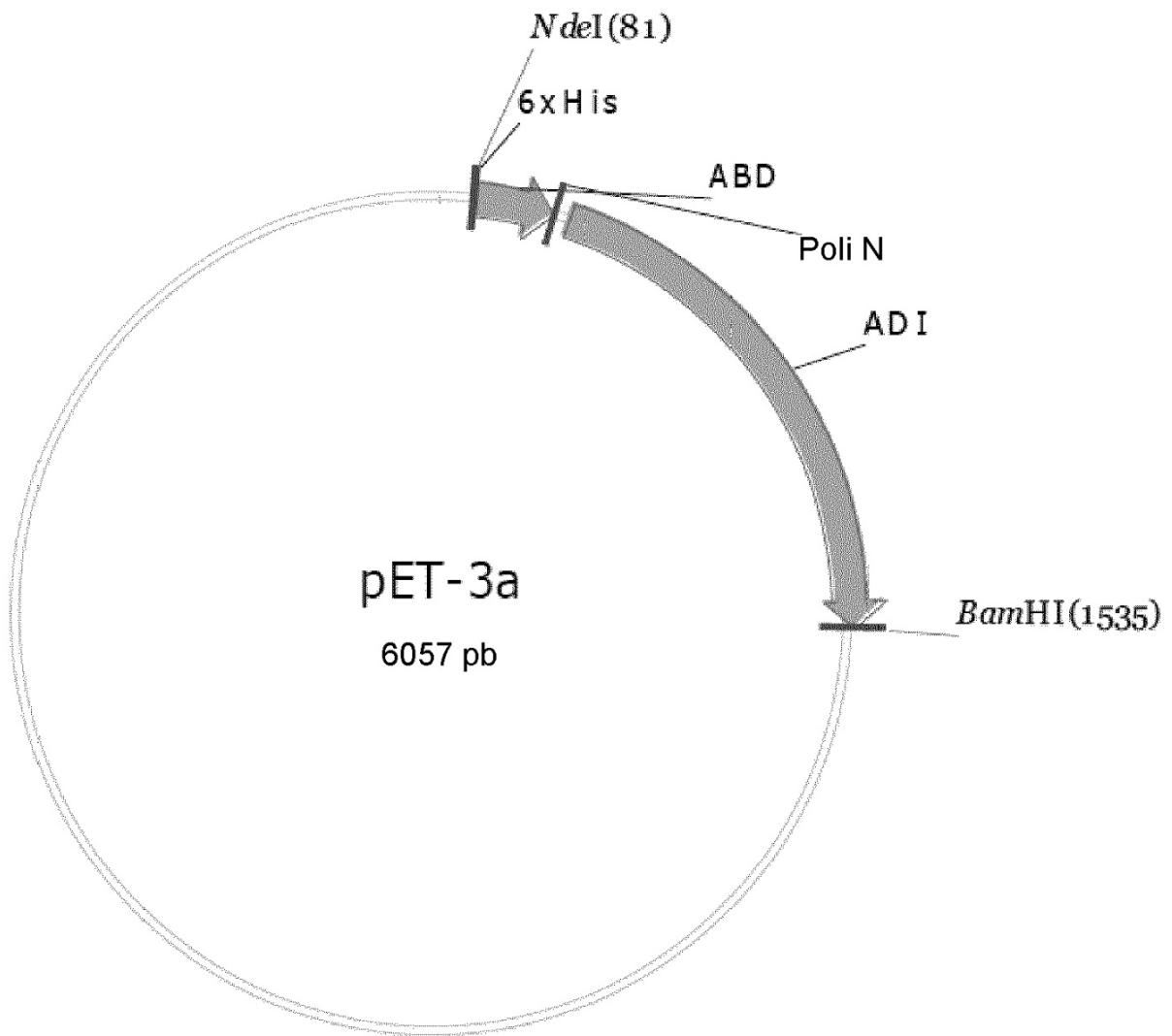
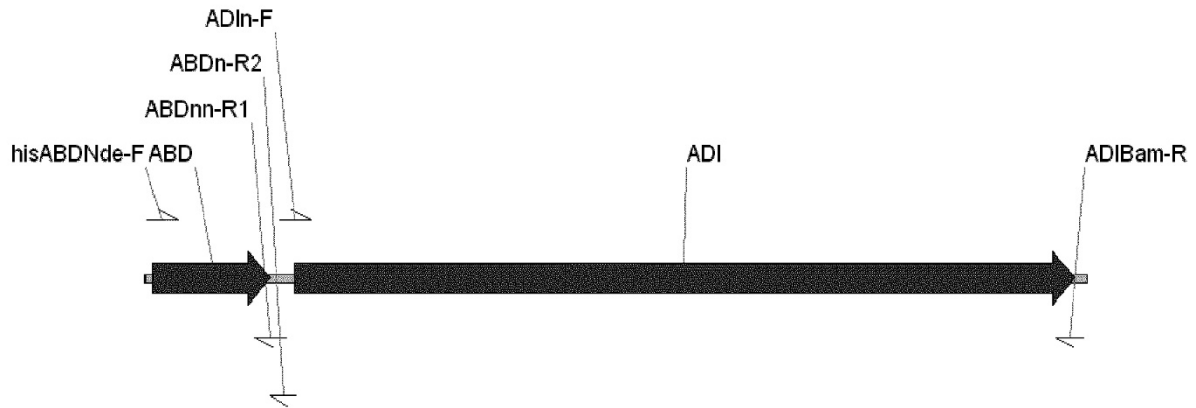


FIG. 5

(A) MAPA GÉNICO



(B) Secuencia de nucleótidos de His-ABD-PolyN-ADI (1484 pb):

(SEC ID nº 44)

5' -
 ATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCT
 TAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTACTATTACAAGAACCTAATCAACAATGC
 CAAAAGTGTGAAGGTGTAAGCACTGATAGATGAAATTTAGCTGCATTACCTTCGGGTAGT
 AACAAATAATAACAATGGTAGCGGGTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGGAATTCACG
 TTTATTCAGAAATTGGTGAATTAGAATCAGTTCCTAGTTCACGAACCAGGACGCGAAATTGACTA
 TATTACACCAGCTAGACTAGATGAATTATGCTTCTCAGCTATCTTAGAAAGCCACGATGCTAGA
 AAAGAACACAAACAATTCGTAGCAGAATTAAGCAAAACGACATCAATGTTGTTGAATTAATTG
 ATTTAGTTGCTGAAACATATGATTTAGCATCACAAGAAGCTAAAGACAAATTAATCGAAGAATT
 TTTAGAAGACTCAGAACCAGTTCATCAGAAGAACACAAAGTAGTTGTAAGAACTTCTTAAAA
 GCTAAAAAACATCAAGAGAATTAGTAGAAATCATGATGGCAGGGATCAGAAAATACGATTTAG
 GTATCGAAGCAGATCACGAATTAATCGTTGACCCAATGCCAAACCTATACTTCACACGTGACCC
 ATTTGCATCAGTAGGTAATGGTGTAAACAATCCACTACATGCGTTACAAAGTTAGACAACGTGAA
 ACATTATTCTCAAGATTTGTATTCTCAAATCACCTAAACTAATTAACACTCCATGGTACTACG
 ACCCTTCACTAAAATTATCAATCGCAGGTGGGGACGTATTTATCTACAACAATGACACATTAGT
 AGTTGGTGTCTGAAAGAAGTACTTACAAACAGTTACTTTATTAGCTAAAAACATTGTTGCT
 AATAAAGAATCTGAATTCAAACGTATTGTTGCAATTAACGTTCCAAAATGGACAAACTTAATGC
 ACTTAGACACATGGCTAACAATGTTAGACAAGGACAAATTCCTATACTCACCAATCGCTAATGA
 CGTATTTAAATTCTGGGATTATGACTTAGTAAACGGTGGAGCAGAACCACAACCAGTTGAAAAC
 GGATTACCTCTAGAAGGATTATTACAATCAATCATTAACAAAAACCAGTTTTAATTCCTATCG
 CAGGTGAAGGTGCTTCACAAATGGAAATCGAAAGAGAAACACACTTCGATGGTACAAACTACTT
 AGCAATTAGACCAGGTGTTGTAATTGGTTACTCACGTAACGAAAAACAAACGCTGCTCTAGAA
 GCTGCAGGCATTAAAGTTCCTCCATTCCACGGTAACCAATTATCATTAGGTATGGGTAACGCTC
 GTTGTATGTCAATGCCTTTATCACGTAAAGATGTTAAGTGGTAA - 3'

FIG. 6

(C) Secuencia de aminoácidos de **His-ABD-PoliN-ADI**:

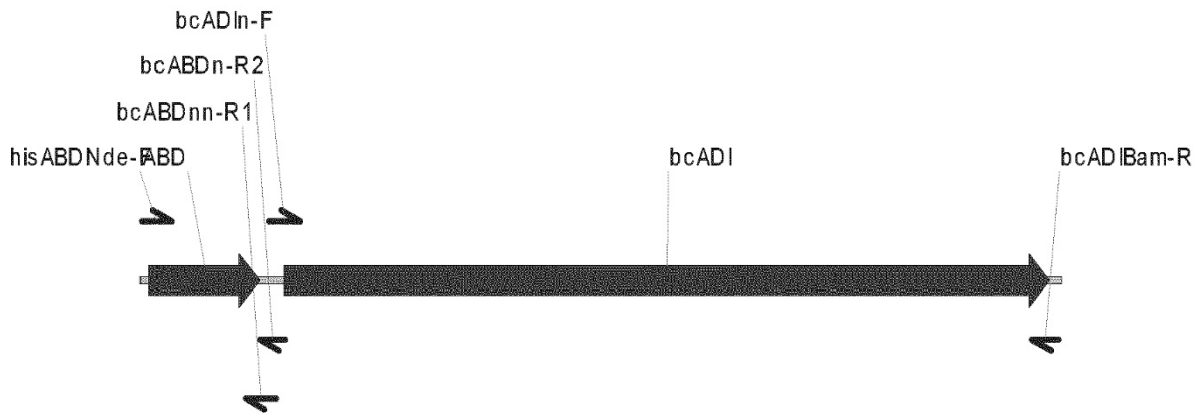
(SEC ID nº 40)

MHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNL INNAKTVEGVKALIDEILAALPSGSNNNNNGSGGSVF
DSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESH DARKEHKQFVAELKANDINVVELIDLVAET
YDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTR
DPFASVGNVVTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTV
TLLAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSP IANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLE
GLLQSI INKKPVLIP IAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMG
NARCMSMPLSRKDVKW

(PoliN con conector: SGSNNNNNGSGG)

FIG. 6 (continuación)

(A) MAPA GÉNICO



(B) La secuencia de nucleótidos de His-ABD-PoliN-bcADI (1512 pb):

(SEC ID nº 45)

5' -
 ATGGGTCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAACAGCTTAGCTGAAGCTAAAG
 TCTTAGCTAACAGAGAAGCTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAA
 TGCCAAAACCTGTTGAAGGTGTAAAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTTCGGGT
 AGTAACAACAATAATAACAATGGTAGCGGCGGTAAACATCCGATACATGTTACTTCAGAAATTG
 GGGAATTACAAACGGTTTTATTAAAACGACCGGGTAAAGAAGTGGAAAACCTTGACGCCAGATTA
 TTTGCAGCAATTATTATTTGACGATATTCCATACCTACCAATTATTCAAAAAGAGCATGATTAT
 TTTGCACAAACGTTACGCAATCGGGGTGTTGAAGTTCCTTTATTTAGAAAACTAGCCGCTGAGG
 CGTTAGTAGATAAAAACTTCGAGAAGAATTTGTTGATCGTATTTTAAAAGAAGGACAGGCCGA
 CGTAAATGTTGCACATCAAACCTTAAAAGAATATTTACTTTCTTTTCAAATGAAGAATTAATT
 CAAAAAATTATGGGCGGTGTACGGAAAAACGAAATTGAAACAAGTAAGAAGACACATTTATATG
 AATTAATGGAAGATCATTATCCGTTTTACTTAGATCCAATGCCTAATTTATATTTTACTCGTGA
 TCCAGCAGCTAGCGTGGGCGATGGCTTAACGATAAATAAGATGAGAGAACCAGCGCGTAGACGT
 GAATCATTATTATCATGGAGTACATCATTAATATCATCCAAGATTTGAAAAACATAATGTACCAA
 TCTGGTTAGATCGTGATTATAAATTTCCAATTGAAGGTGGCGACGAGCTAATTTTAAATGAAGA
 AACAATTGCGATTGGAGTATCTGCTCGTACTTCAGCTAAAGCAATTGAACGTTTAGCAAAAAAT
 CTCTTTAGCCGACAAAATAAATAAAGAAAGTGTAGCAATAGAAATTCCAAAATGCCGAGCAT
 TTATGCATTTAGATACAGTATTTACAATGGTTGATTATGATAAGTTTACAATTCACCCAGCTAT
 TCAAGGGCCAAAAGGGAATATGAATATTTATATTTTAGAAAAAGGATCAGATGAGGAAACTCTT
 AAAATTACACATCGTACTTCTTTAATGGAAGCATTAAAAGAGGTATTAGGCTTAAGTGAATTAG
 TTCTTATTCATGTGGAGGAGGAGATGTAATTGCTTCTGCTCGTGAACAATGGAATGATGGCTC
 GAACACATTAGCAATCGCGCCAGGTGTAGTTGTTACATATGATCGCAACTATGTATCCAATACG
 TTATTACGGGAACACGGTATAGAAGTGATTGAGGTGCTAAGTTCAGAATTATCTCGTGGTCTGTG
 GGGTCCACGTTGCATGAGTATGCCAATTGTTTCGTAAGATATTTAA - 3'

FIG. 7

(C) La secuencia de aminoácidos de **His-ABD- PoliN –bcADI**:

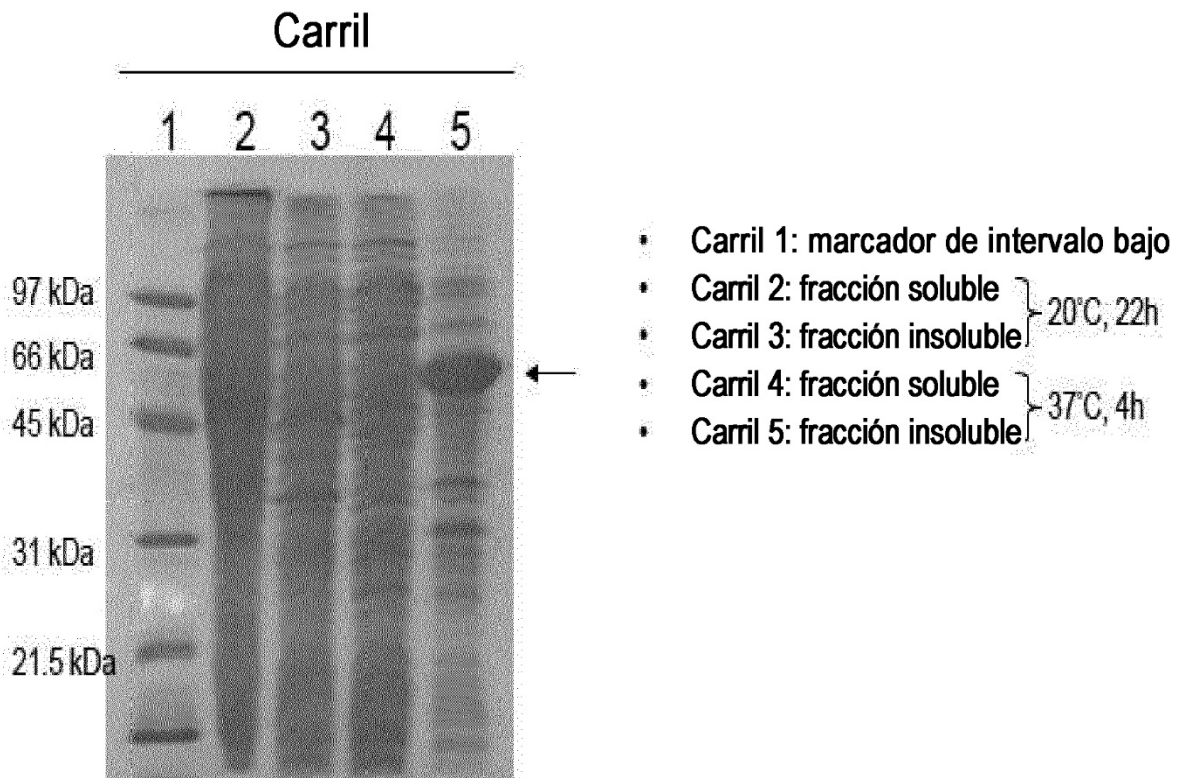
(SEC ID nº 41)

MGHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAALPSGSNNNNNGSGGKH
PIHVTSEIGELQTVLLKRPQKEVENLTPDYLLQQLFDDIPYLPPIIQKEHDYFAQTLRNRGVEVLYLEKLAEEALVDKK
LREEFVDRILKEGQADVNVVAHQTLKEYLLSFSNEELIQKIMGGVRKNEIETSCKTHLYELMEDHYPFYLDPMPNLYFT
RDPAASVGDGLTINKMREPARRRESLFMEYI IKYHPRFAKHNVPIWLDRDYKFP IEGGDELILNEETIAIGVSARTSA
KAIERLAKNLF SRQNKIKKVLAI EIPKCR AFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPAIQGPKGNMNIYILEKGADEETLKI THR
TSLMEALKEVLDLSELVL IPCGGGDV IASAREQWNDGSNTLAIAPGVVVTYDRNYVSNLTLREHGIEVIEVLSSELSR
GRGGPRC MSP I VRKDI

(PoliN con conector: SGSNNNNNGSGG)

FIG. 7 (continuación)

(A)



(B)

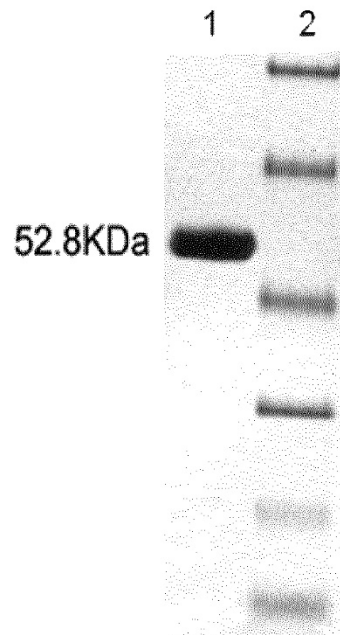


FIG. 8

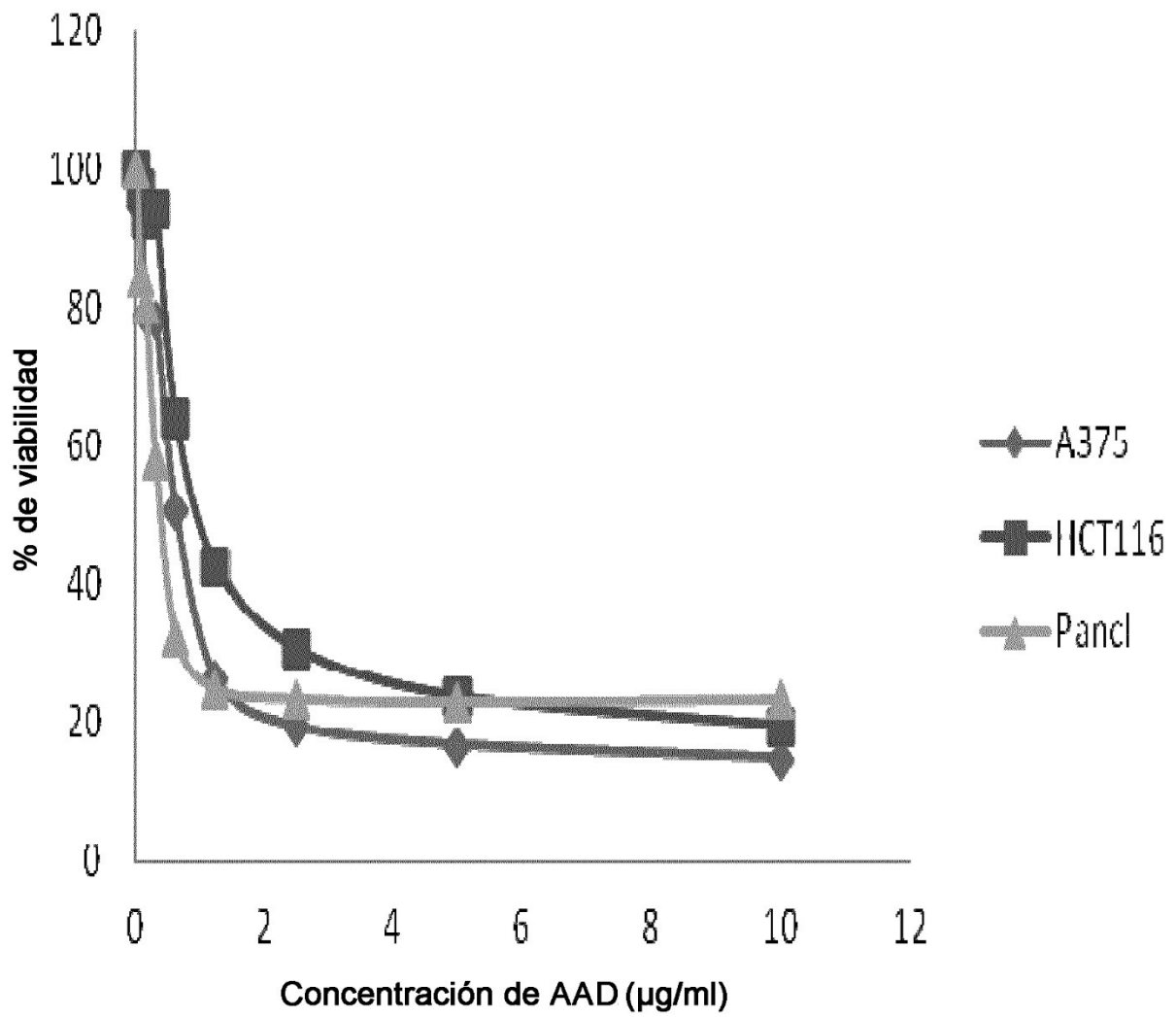


FIG. 9

(A)

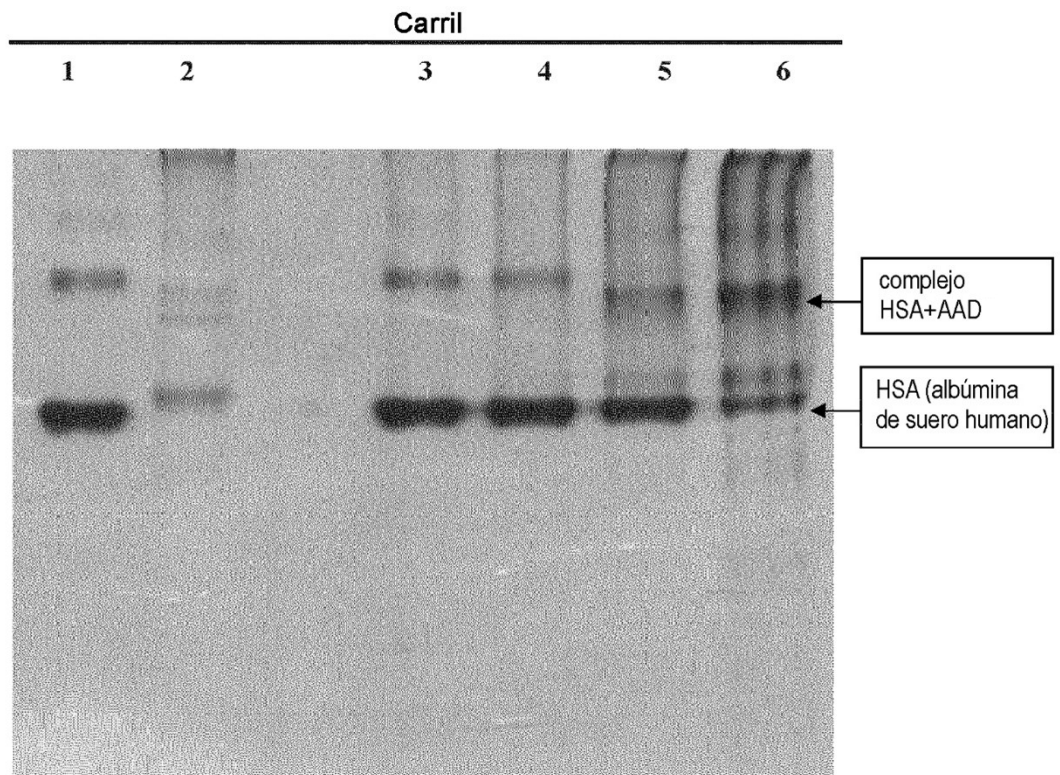


FIG. 10

(B)

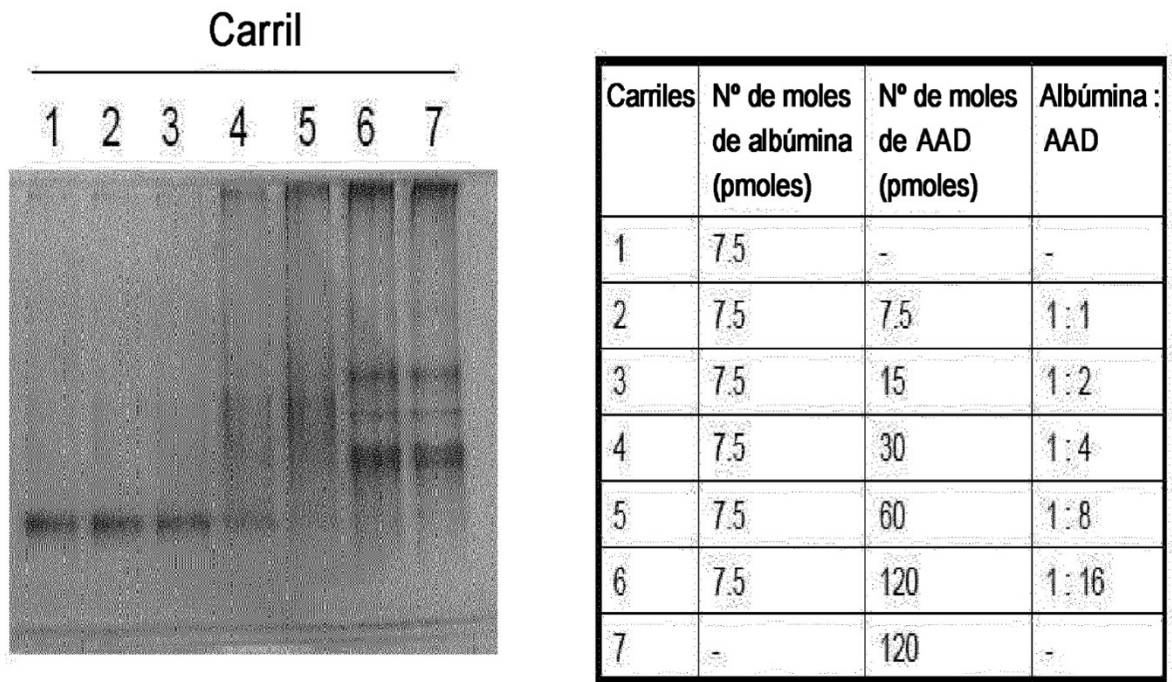


FIG. 10 (continuación)

Efecto de AAD sobre los niveles plasmáticos de arginina en ratones (n=3)

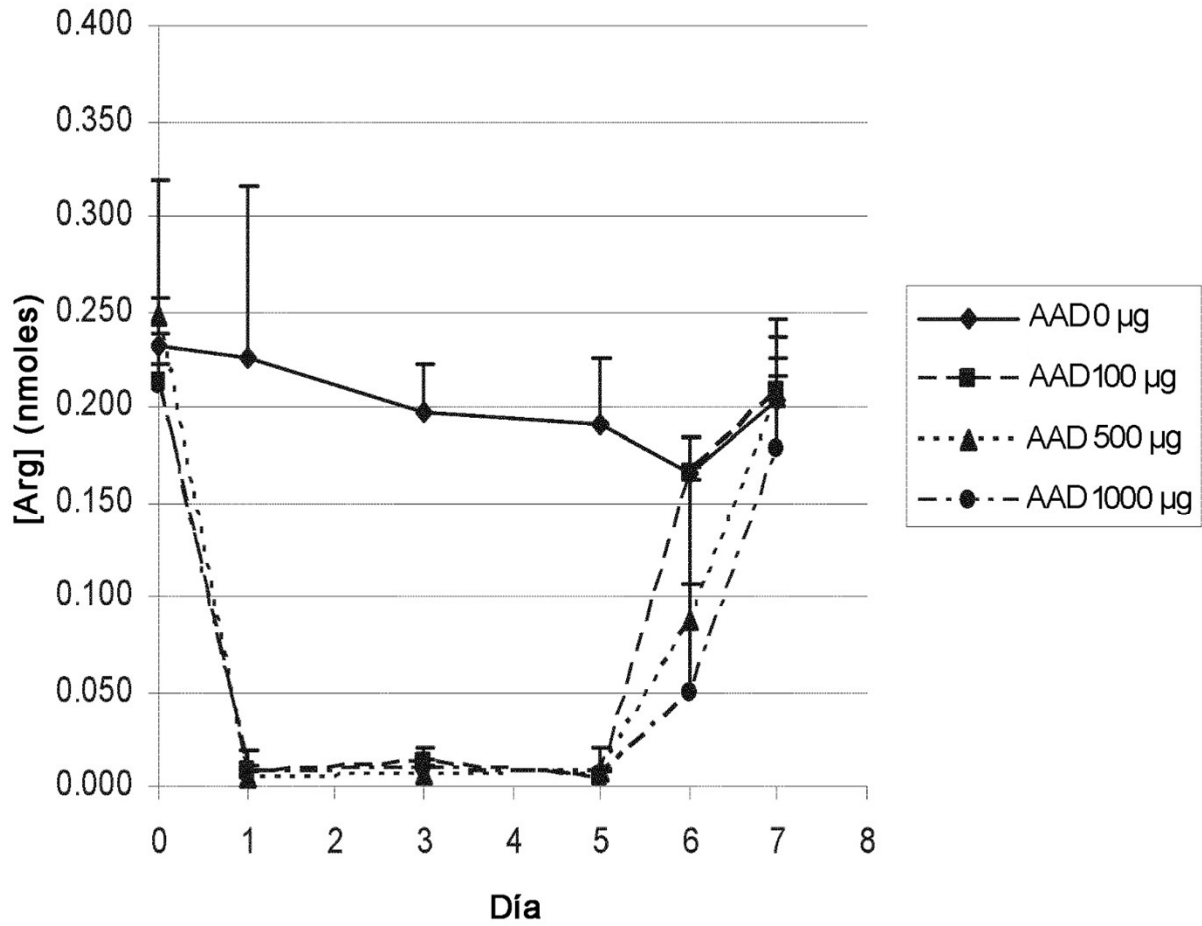


FIG. 11