

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 382**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/50** (2006.01)  
**A61K 47/60** (2007.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**C12N 9/78** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2015** **PCT/US2015/050354**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016** **WO16044376**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2015** **E 15842576 (9)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022** **EP 3193913**

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

30 Prioridad:

**16.09.2014 US 201462051182 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.06.2022**

73 Titular/es:

**POLARIS GROUP (100.0%)**  
**P.O. Box 309 Ugland House**  
**Grand Cayman, KY1-1104, KY**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 915 382 T3

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

## DESCRIPCIÓN

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

## 5 Antecedentes

## Campo técnico

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

## Descripción de la técnica relacionada

15 La terapia de privación de aminoácidos puede ser un tratamiento eficaz de algunas formas de cáncer. Hasta la fecha, existe un ejemplo clínico conocido relevante para este enfoque que utiliza asparaginasa para reducir los niveles en circulación de asparagina e inhibir la síntesis de proteínas. Este tratamiento es particularmente eficaz para la leucemia linfoblástica aguda (Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004). Las células de leucemia linfoblástica aguda requieren el aminoácido asparagina para su crecimiento y proliferación. En cambio, la mayoría de las células humanas normales  
20 son capaces de sintetizar asparagina y no se ven afectadas por el empobrecimiento de la misma. Por lo tanto, la disminución de asparagina sérica con asparaginasa, puede destruir selectivamente las células cancerosas sin dañar a las células, a los tejidos y a los hospedadores normales. Una forma de asparaginasa procedente de *E. coli* ha sido aprobada para uso humano. Sin embargo, la asparaginasa se encuentra solo en microbios; lo que la hace muy inmunogénica en seres humanos y también tiene una semivida corta en suero después de su inyección (Avramis  
25 2005). Para hacer que la asparaginasa sea un fármaco más eficaz, estos inconvenientes se minimizaron formulando la asparaginasa procedente de *E. coli* con polietilenglicol (PEG) para reducir la antigenicidad de esta enzima y las reacciones alérgicas asociadas. Además, el PEG prolonga en gran medida la semivida en circulación de la asparaginasa, lo que reduce tanto la frecuencia del tratamiento como el coste total de la terapia. La asparaginasa formulada con PEG está aprobada para su uso y se comercializa con el nombre comercial Oncaspar® (Oncaspar®  
30 2011, Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004, Fu 2007, Zeidan 2008).

La arginina es otro aminoácido no esencial para seres humanos y ratones (para revisión, véase Rogers 1994). En los seres humanos, se puede sintetizar arginina a partir de citrulina en dos etapas a través de las enzimas del ciclo de Krebs (urea), argininosuccinato sintetasa (ASS, L-citrulina: L-aspartato ligasa [formación de AMP], EC 6.3.4.5) y argininosuccinato liasa (ASL, L-argininosuccinato arginina-liasa, EC 4.3.2.) (Haines 2011, Wu 2009, Morris 2006,  
35 Husson 2003, Tapiero 2002, Rogers 1994). La ASS cataliza la conversión de citrulina y ácido aspártico en argininosuccinato, que después a través de la ASL, se convierte en arginina y ácido fumárico. Una dieta deficiente en arginina en seres humanos no provoca hiperamonemia, aciduria orótica, ni altera la tasa de síntesis de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) de todo el cuerpo en seres humanos adultos (Tapiero 2002, Castillo 1995, Rogers 1994, Carey 1987, Barbul 1986, Snyderman 1959, Rose 1949). Aunque los recién nacidos prematuros parecen necesitar arginina (Wu 2004), los niveles de ésta no se correlacionan con la edad entre los bebés, niños y adultos jóvenes (Lucke 2007). En 1992, Takaku y Sugimura informaron, por separado, de que las líneas celulares humanas de melanoma y carcinoma hepatocelular (CHC) parecían necesitar arginina para su crecimiento. Otros estudios mostraron que la ADI pegilada fue eficaz para el tratamiento de melanomas y hepatomas con pocos efectos adversos.  
40

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

Referencias: Avramis VI, Panosyan EH. 2005. Clin Pharmacokinet 44:367-393; Barbul A. 1986. J Parenteral Enteral Nutr 10:227-238; Carey GP, *et al.* 1987. J Nutr 117:1734-1739; Castillo L, *et al.* 1995. Am J Physiol 268 (Endocrinol Metab 31):E360-367; Fu CH, Sakamoto KM. 2007. Expert Opin Pharmacother 8:1977-1984; Haines RJ, *et al.* 2011. Int J Biochem Mol Biol 2:8-23; Husson A, *et al.* 2003. Eur J Biochem 270:1887-1899; Lucke T, *et al.* 2007. Clin Chem Lab Med 45:1525-1530; Morris SM Jr. 2006. Am J Clin Nutr 83(Suppl):598S-512S; Rogers QR. 1994. En Proceedings from a Symposium Honoring Willard J. Visek - from Ammonia to Cancer and Gene Expression. Publicación especial 86 - abril de 1994, Estación Experimental de Agricultura, Universidad de Illinois, 211 Mumford Hall, Urbana, IL 61801, págs. 9-21; Tapiero H, *et al.* 2002. Biomed Pharmacother 56:439-445, 2002; Viera Pinheiro JP, Boos J. 2004. Br J Haematol 125: 117-127; Wu G, *et al.* 2009. Amino Acids 37:153-168; Wu G, *et al.* 2004. J Nutr Biochem 15:442-451; Zeidan A, *et al.* 2008. Expert Opin Biol Ther 9:111-119.  
55

En el documento WO 2014/151982 se describen proteínas de arginina desiminasa (ADI), incluyendo proteínas ADI que tienen reactividad cruzada reducida con anticuerpos ADI-PEG 20. En el documento US 2012/148559 se describe una L-asparaginasa mutante que tiene inmunogenicidad reducida. Sugimura K. *et al.*, (1993) Infect Immun. 61(1): 329-331 describen arginina desiminasas aisladas de varios organismos. Ni Y. *et al.*, (2011) Appl Microbiol Biotechnol. 90(1):  
65

193-201 describen las propiedades enzimáticas de la arginina desiminasa. Cantor J.R. *et al.*, (2011) Proc Natl Acad Sci USA. 108(4): 1272-7 describen la reducción de la inmunogenicidad de enzimas heterólogas mediante la eliminación combinatoria de epítomos de linfocitos T utilizando deriva neutra. En el documento US 2005/129706 se describe arginina desiminasa modificada con polietilenglicol.

5

## Breve resumen

La invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Determinados aspectos se refieren a una arginina desiminasa aislada, en donde la arginina desiminasa aislada tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente. También se incluyen composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden una arginina desiminasa aislada o un fragmento de la misma que tiene actividad ADI y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinados aspectos, la composición es estéril y/o está sustancialmente exenta de pirógenos tales como endotoxinas. En algunos aspectos, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente no es de *M. hominis*. En algunos aspectos, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente es de un organismo enumerado en la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente tiene una o más propiedades comparables con, o mejores que, las de ADI-PEG 20. En este sentido, la una o más propiedades incluyen, pero sin limitación, Kcat, Km, pH óptimo, estabilidad, estabilidad proteolítica *in vivo* o ninguna necesidad de iones o cofactores que no estén ya presentes en la sangre, o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, tiene al menos 5, 10, 15 o 20 cambios de restos de superficie en comparación con la arginina desiminasa de *M. hominis*. En determinados aspectos, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente tiene entre aproximadamente 20 y 135 cambios de restos de superficie, entre aproximadamente 40 y 100 cambios de restos de superficie, entre aproximadamente 30 y 60 cambios de restos de superficie, entre aproximadamente 80 y 100 cambios de restos de superficie o entre aproximadamente 100 y 120 cambios de restos de superficie, en comparación con la arginina desiminasa de *M. hominis*.

En determinados aspectos, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente es de *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma spumans*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma auris*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma cloacale*, *Mycoplasma anseris*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma iners*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma alvi*, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma primatum*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma lipofaciens*, *Mycoplasma felifaucium*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma opalescens*, *Mycoplasma moatsii*, *Mycoplasma elephantis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma testudinis*, *Mycoplasma sp. CAG:877* o *Mycoplasma sp. CAG:472*. La arginina desiminasa ilustrativa que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente comprende una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO:2-28.

En algunas realizaciones, la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente se ha modificado para eliminar al menos un sitio de pegilación. En determinadas realizaciones de la arginina desiminasa que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, al menos un resto de lisina se ha modificado por una sustitución de aminoácido. En este sentido, en determinadas realizaciones, al menos aproximadamente de 5 restos de lisina, al menos 10 restos de lisina o al menos 20 restos de lisina, se han modificados por una sustitución de aminoácidos.

La arginina desiminasa que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente se une de manera covalente, a través de un enlazador, a una molécula de PEG. En este sentido, la arginina desiminasa que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente puede unirse de manera covalente a una o más moléculas de PEG, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 moléculas de PEG. Las moléculas de PEG pueden ser moléculas de PEG de cadena lineal o cadena ramificada y pueden tener un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 40.000 o un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 30.000. En algunas realizaciones, cuando el PEG está unido de manera covalente a una ADI descrita en el presente documento a través de un enlazador, el enlazador puede comprender un grupo succinilo, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo éster, un grupo epoxi, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un hidrato de carbono, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina, un grupo metileno o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones específicas, la fuente del grupo succinilo es succinimidil succinato.

También se describen polinucleótidos que codifican una arginina desiminasa aislada descrita en el presente documento, vectores que comprenden el polinucleótido y células hospedadoras aisladas que comprenden los vectores.

65

Determinadas realizaciones se refieren a composiciones que comprenden una arginina desiminasa aislada que tiene

reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente como se describe en el presente documento, y un vehículo fisiológicamente aceptable. En determinadas realizaciones, las composiciones comprenden además un agente quimioterápico. Los agentes quimioterápicos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, docetaxel, carboplatino, ciclofosfamida, gemcitabina, cisplatino, sorafenib, sunitinib y everolimus.

También se incluyen composiciones, como las descritas en el presente documento, para su uso en métodos de tratamiento, alivio de los síntomas de un cáncer o inhibición de su progresión, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente como se describe en el presente documento y un vehículo fisiológicamente aceptable, de este modo tratando, aliviando los síntomas del cáncer o inhibiendo su progresión. En determinadas realizaciones, se ha determinado que el paciente que lo necesita tiene anticuerpos anti-ADI-PEG 20. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, melanoma, incluyendo melanoma metastásico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma, leucemia linfocítica, leucemia mielógena crónica, linfoma, hepatoma, sarcoma, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide aguda recidivante, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello, cáncer cervicouterino, cáncer de testículo y cáncer de estómago.

Algunas realizaciones incluyen la arginina desiminasa aislada o la composición como se describe en el presente documento, para su uso en métodos de tratamiento, alivio de los síntomas o inhibición de la progresión de un cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprenda ADI-PEG 20 y, después de un periodo de tiempo, administrar al paciente una composición que comprenda la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente como se describe en el presente documento y un vehículo fisiológicamente aceptable, de este modo tratando, aliviando los síntomas o inhibiendo la progresión del cáncer. El periodo de tiempo puede determinarse, por ejemplo, detectando un nivel predeterminado de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en el paciente y/o midiendo u observando de otro modo la actividad de ADI en el paciente, en donde la composición que comprende la arginina desiminasa aislada que tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, se administra después de la detección del nivel predeterminado de dichos anticuerpos anti-ADI-PEG 20 y/o de la medición u observación de un nivel predeterminado de actividad de ADI en el paciente.

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

### Breve descripción de los dibujos

Las **figuras 1A-1D** ilustran una variedad de moléculas de PEG reactivas con cisteína que pueden conjugarse con las enzimas ADI descritas en el presente documento.

### Descripción detallada

Las realizaciones de la presente invención se refieren a enzimas ADI seleccionadas, que, en algunas realizaciones, se conjugan con PEG a través de un enlazador, p. ej., un enlazador estable. En algunas realizaciones, las enzimas ADI se diseñan o se seleccionan para que tengan un número pequeño o reducido de restos de lisina de superficie, por ejemplo, en relación con una secuencia de tipo silvestre o una secuencia de referencia (véase la Tabla 1). Las enzimas ADI seleccionadas se eligen entre una gran cantidad de enzimas ADI, de diferentes organismos, en función de sus propiedades beneficiosas. Estas propiedades incluyen la capacidad de la enzima para establecer y mantener bajas concentraciones de arginina en sangre humana a través de conversión por ADI de arginina a citrulina y amoníaco. En algunas realizaciones, las moléculas de ADI seleccionadas tienen reactividad cruzada reducida hacia anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en comparación con ADI-PEG 20, resultando dichos anticuerpos posiblemente del tratamiento previo de un paciente con ADI-PEG 20.

En determinadas realizaciones, las enzimas ADI se pegilan para que proporcionen protección contra el aclaramiento renal y la proteólisis, así como menor inmunogenicidad o antigenicidad. Para aumentar la eficacia de la pegilación, pueden diseñarse modificaciones en las enzimas para reducir el número de restos de lisina de superficie y, por lo tanto, limitar el número de sitios de unión a PEG disponibles. En algunos casos, la reducción del número de restos de lisina proporciona una pegilación más completa y uniforme a los restos de unión de lisina restantes.

En algunas realizaciones, el enlazador de PEG seleccionado para unir metoxi-PEG a ADI proporciona un enlace químicamente estable. Se espera que un enlazador estable aumente el tiempo de vida bioactivo de la molécula. Un enlazador químicamente estable también eliminará la hidrólisis y reducirá una respuesta inmunitaria que podría producirse contra un enlazador despegilado unido a la superficie de la enzima.

Estas especificaciones acumuladas dan lugar a una o más moléculas que eliminan eficazmente la arginina de la sangre de un paciente y no se neutralizan o depuran por anticuerpos anti-ADI-PEG 20 de la terapia anterior de

empobrecimiento de arginina. Las moléculas se pegan para retardar la neutralización y eliminación debido a su propia inmunogenicidad. Estos factores permitirán su uso en lugar de ADI-PEG 20 o además de ADI-PEG 20 (p. ej., como fármaco de imitación) para prolongar la terapia de empobrecimiento de arginina y, por lo tanto, aumentar la eficacia del tratamiento de empobrecimiento de arginina como un producto terapéutico antineoplásico.

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

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" incluye aminoácidos tanto naturales como no naturales, así como análogos y miméticos de aminoácidos. Los aminoácidos naturales incluyen los 20 (L)-aminoácidos utilizados durante la biosíntesis de proteínas, así como otros tales como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina, por ejemplo. Los aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina, y similares, conocidos por un experto en la materia. Los análogos de aminoácidos incluyen formas modificadas de aminoácidos naturales y no naturales. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, sustitución o reemplazo de grupos y residuos químicos en el aminoácido o por derivatización del aminoácido. Los miméticos de aminoácidos incluyen, por ejemplo, estructuras orgánicas que exhiben propiedades funcionalmente similares tales como carga y espaciado de carga característicos del aminoácido de referencia. Por ejemplo, una estructura orgánica que imita a la arginina (Arg o R) tendría un residuo de carga positiva ubicado en un espacio molecular similar y con el mismo grado de movilidad que el grupo e-amino de la cadena lateral del aminoácido Arg de origen natural. Los miméticos también incluyen estructuras restringidas para mantener un espaciado óptimo y las interacciones de carga del aminoácido o de los grupos funcionales de aminoácidos. Los expertos en la materia conocen o pueden determinar qué estructuras constituyen análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos funcionalmente equivalentes.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

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

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

Las expresiones "exento(a) de endotoxinas" y "sustancialmente exento(a) de endotoxinas", se refieren generalmente a composiciones, disolventes y/o recipientes que a lo sumo contienen cantidades mínimas (p. ej., cantidades que no tienen efectos fisiológicos clínicamente adversos para un sujeto) de endotoxina, y preferentemente cantidades indetectables de endotoxina. Las endotoxinas son toxinas asociadas a determinadas bacterias, normalmente bacterias gramnegativas, aunque se pueden encontrar endotoxinas en bacterias grampositivas, tales como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más frecuentes son los lipopolisacáridos (LPS) o los lipooligosacáridos (LOS) que se encuentran en la membrana externa de varias bacterias Gram-negativas y que representan una característica patógena principal en la capacidad de estas bacterias para causar enfermedades. Pequeñas cantidades de endotoxina en seres humanos pueden producir fiebre, una disminución de la presión arterial y la activación de la inflamación y la coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos.

Por lo tanto, en la producción farmacéutica, a menudo es deseable eliminar la mayoría o todos los rastros de endotoxina de los medicamentos y/o envases de medicamentos, ya que incluso pequeñas cantidades pueden causar efectos adversos en los seres humanos. Se puede utilizar un horno de despirogenización para este propósito, ya que normalmente se requieren temperaturas superiores a 300 °C para descomponer la mayoría de las endotoxinas. Por ejemplo, en función del material de acondicionamiento primario, tal como jeringas o viales, la combinación de una temperatura vítrea de 250 °C y un tiempo de mantenimiento de 30 minutos suele ser suficiente para lograr una reducción de 3 log en los niveles de endotoxinas. Se contemplan otros métodos de eliminación de endotoxinas, incluyendo, por ejemplo, métodos de cromatografía y filtración, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. También se incluyen métodos para producir polipéptidos y aislarlos de células eucariotas tales como células de mamíferos para reducir, si no eliminar, el riesgo de que las endotoxinas estén presentes en una composición de la invención. Se incluyen métodos para producir polipéptidos y aislarlos de células exentas de suero.

Las endotoxinas pueden detectarse utilizando técnicas habituales conocidas en la materia. Por ejemplo, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*, que utiliza sangre del cangrejo herradura, es un ensayo sumamente sensible para detectar la presencia de endotoxinas. En este ensayo, niveles muy bajos de LPS pueden causar una coagulación detectable del lisado de *Limulus* debido a una poderosa cascada enzimática que amplifica esta reacción. Las endotoxinas también pueden cuantificarse mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Para estar sustancialmente exento de endotoxinas, los niveles de endotoxinas pueden ser inferiores a 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 UE/ml (unidades de endotoxina por mililitro). Normalmente, 1 ng de lipopolisacárido (LPS) corresponde a aproximadamente 1-10 UE.

La "semivida" de un polipéptido puede referirse al tiempo que tarda el polipéptido en perder la mitad de sus propiedades farmacológicas, fisiológicas u otra actividad, en relación con dicha actividad en el momento de la administración en el suero o tejido de un organismo, o en relación con cualquier otro punto temporal definido. La "semivida" también puede referirse al tiempo que tarda la cantidad o la concentración de un polipéptido en reducirse a la mitad de una cantidad inicial administrada en el suero o tejido de un organismo, en relación con dicha cantidad o concentración en el momento de la administración en el suero o tejido de un organismo, o en relación con cualquier otro punto temporal definido. La semivida puede medirse en suero y/o uno en o más tejidos seleccionados.

"Homología" se refiere al número porcentual de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología puede determinarse utilizando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux *et al.*, Nucleic Acids Research. 12, 387-395, 1984). De esta manera, las secuencias que tienen una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en el presente documento, podrían compararse mediante la inserción de huecos en la alineación, determinándose dichos huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

Los términos "modular" y "alterar" incluyen "aumentar", "mejorar" o "estimular", así como "disminuir" o "reducir", normalmente en una cantidad o grado estadísticamente significativo o fisiológicamente significativo con respecto a un control. Una cantidad "aumentada", "estimulada" o "mejorada" es normalmente una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir un aumento que sea de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (p. ej., 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros e intervalos intermedios, p. ej., 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por ninguna composición (p. ej., la ausencia de agente) o una composición de control. Una cantidad "disminuida" o "reducida" es, normalmente, una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de disminución (incluidos todos los números enteros e intervalos intermedios) en la cantidad producida por ninguna composición (p. ej., la ausencia de un agente) o una composición de control. En el presente documento se describen ejemplos de comparaciones y cantidades "estadísticamente significativas".

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

En determinadas realizaciones, la "pureza" de cualquier agente dado (p. ej., ADIr, ADIr-PEG) en una composición,

puede definirse específicamente. Por ejemplo, determinadas composiciones pueden comprender un agente que tenga una pureza de al menos 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %, incluyendo todos los decimales e intervalos intermedios, como se mide, por ejemplo y en modo alguno limitativo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), una forma bien conocida de cromatografía en columna utilizada con frecuencia en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos.

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

Las expresiones "identidad de secuencia", o por ejemplo, que comprende una "secuencia 50 % idéntica a", como se usa en el presente documento, se refieren a la medida en que las secuencias son idénticas nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido en una ventana de comparación. Por tanto, comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en la ventana de comparación, se puede calcular un "porcentaje de identidad de secuencia", determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (p. ej., A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (p. ej., Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) se produce en ambas secuencias, para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Las expresiones utilizadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" puede tener una longitud de al menos 12, pero con frecuencia de 15 a 18 y, a menudo, de al menos 25 unidades monoméricas, incluyendo nucleótidos y restos de aminoácido. Dado que dos polipéptidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una parte de la secuencia polipeptídica completa) que sea similar entre los dos polipéptidos, y (2) una secuencia que sea divergente entre los dos polipéptidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polipéptidos, se realizan normalmente comparando las secuencias de los dos polipéptidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más normalmente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en donde una vez alineadas las dos secuencias de manera óptima, se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o menor en comparación con la secuencia de referencia (que no incluye adiciones ni deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA del paquete del programa informático Wisconsin Genetics Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) o por inspección y la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como, por ejemplo, la divulgada por Altschul *et al.* (Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997). Se puede encontrar una exposición detallada sobre el análisis de secuencias en la Unidad 19.3 de Ausubel *et al.* ("Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15).

Los cálculos de similitud o de identidad de secuencia entre secuencias (los términos se utilizan indistintamente en el presente documento) pueden realizarse de la siguiente manera. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias pueden alinearse con fines comparativos óptimos (p. ej., pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas se pueden descartar con fines comparativos). En determinadas realizaciones, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es de al menos 30 %, preferentemente de al menos 40 %, más preferentemente de al menos 50 %, 60 %, y aún más preferentemente de al menos 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después, se comparan los restos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias depende del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden llevarse a cabo con un algoritmo matemático. En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse con el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP del paquete del programa informático GCG, utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2,

3, 4, 5 o 6. En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina con el programa GAP del paquete del programa informático GCG, utilizando una matriz NWS-gapdna.CMP y una ponderación por hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Otro conjunto de parámetros ilustrativo (y el que debe utilizarse a menos que se especifique lo contrario) incluye una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por hueco del marco de lectura de 5. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos también puede determinarse con el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Cabios. 4:11-17 (1989) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de restos ponderados PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

El término "solubilidad" se refiere a la propiedad de la enzima ADIr proporcionada en el presente documento para disolverse en un disolvente líquido y formar una solución homogénea. La solubilidad se expresa normalmente como una concentración, ya sea por masa de soluto por unidad de volumen de solvente (g de soluto por kg de solvente, g por dl (100 ml), mg/ml, etc.), molaridad, molaridad, fracción molar u otras descripciones similares de concentración. La cantidad máxima en el equilibrio de soluto que puede disolverse por cantidad de disolvente, es la solubilidad de ese soluto en ese disolvente en las condiciones especificadas, incluyendo la temperatura, la presión, el pH y la naturaleza del disolvente. En determinadas realizaciones, la solubilidad se mide a pH fisiológico, u otro pH, por ejemplo, a pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, pH 7,2, pH 7,4, pH 7,6, pH 7,8 o pH 8,0. En determinadas realizaciones, la solubilidad se mide en agua o en un tampón fisiológico tal como PBS o NaCl (con o sin NaP) u otro tampón/composición descrito en el presente documento. En realizaciones específicas, la solubilidad se mide a un pH relativamente más bajo (p. ej., pH 6,0) y a una salinidad relativamente más alta (p. ej., NaCl 500 mM y NaP 10 mM). En determinadas realizaciones, la solubilidad se mide en un líquido biológico (disolvente) tal como la sangre o el suero. En determinadas realizaciones, la temperatura puede aproximadamente la temperatura ambiente (p. ej., 20, 21, 22, 23, 24, 25 °C) o aproximadamente la temperatura corporal (37 °C). En determinadas realizaciones, una enzima ADIr tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30 mg/ml a temperatura ambiente o a 37 °C.

"Sustancialmente" o "esencialmente" significa casi total o completamente, por ejemplo, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor de alguna cantidad dada.

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

Cada una de las realizaciones de esta memoria descriptiva debe aplicarse realizando los cambios necesarios en cualquier otra realización salvo que se indique expresamente otra cosa.

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

Un polinucleótido que codifica una enzima ADI se puede obtener, clonar, aislar, sintetizar o producir a partir de cualquier fuente, incluyendo, por ejemplo, microorganismos, biotecnología recombinante o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la arginina desiminasa puede clonarse a partir de microorganismos de los géneros *Mycoplasma*. En determinadas realizaciones, la arginina desiminasa se clona a partir de *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma spumans*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma auris*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma cloacale*, *Mycoplasma anseris*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma iners*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma alvi*, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma primum*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma lipofaciens*, *Mycoplasma felifaucium*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma opalescens*, *Mycoplasma moatsii*, *Mycoplasma elephantis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma testudinis*, *Mycoplasma sp. CAG:877* o *Mycoplasma sp. CAG:472*, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la arginina desiminasa se clona a partir de una especie enumerada en la Tabla 1. En realizaciones particulares, la ADI comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 2-28, o una variante o fragmento o extensión de la misma que tiene actividad ADI (p. ej., es capaz de metabolizar la arginina en citrulina y amoniaco). Dichas enzimas ADI pueden prepararse o sintetizarse utilizando técnicas conocidas.

En determinadas realizaciones, las enzimas ADI, como las descritas en el presente documento, se comparan con la molécula de referencia ADI-PEG 20 procedente de *M. hominis*. Como se usa en el presente documento, "ADI-PEG 20" se refiere a la molécula de ADI conocida en la técnica y descrita, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 6.183.738 y 6.635.462; véase también Ascierto *et al.*, 2005. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. *J Clin Oncol* 23 (30): 7660-7668; Izzo F, *et al.* (2004) Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol* 22 (10): 1815-1822; Holtsberg FW, *et al.* (2002), Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine



deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. J Control Release 80 (1-3): 259-271; Kelly *et al.*, (2012) British Journal of Cancer 106, 324 - 332. Como reconocería el experto en la materia, esta molécula es una enzima ADI pegilada (PEG 20.000) procedente de *M. hominis* y tiene dos sustituciones (K112E; P210S) en relación con la enzima ADI de *M. hominis* de tipo silvestre.

Las enzimas arginina desiminasa, como las descritas en el presente documento, se seleccionan de un gran número de enzimas ADI y se cree que tienen un nivel reducido de reactividad con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 de pacientes y/u otras propiedades beneficiosas. Los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 pueden aparecer en sujetos tratados con ADI-PEG 20 y pueden medirse utilizando metodologías conocidas. La reactividad con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 puede determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo ELISA u otros ensayos similares conocidos por el experto en la materia.

En este sentido, se puede utilizar ADI-PEG 20 como una comparación para evaluar el nivel de reactividad cruzada con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente. Un nivel de reactividad cruzada que sea estadísticamente significativo menor que el de ADI-PEG 20 con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, puede ser útil en el presente documento. En determinadas realizaciones, las enzimas arginina desiminasa, como las descritas en el presente documento, tienen baja o ninguna reactividad cruzada con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20. En determinadas realizaciones, cualquier reducción de la reactividad con anticuerpos anti-ADI-PEG 20, en comparación con la reactividad con ADI-PEG 20, puede ser beneficiosa ya que una enzima ADI de este tipo mejoraría las opciones de tratamiento para pacientes que necesiten terapia de empobrecimiento de arginina. Por tanto, en algunas realizaciones, las enzimas arginina desiminasa, como las descritas en el presente documento, tienen reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente en comparación con la reactividad de ADI-PEG 20 con dichos anticuerpos.

En el presente documento se usa "ADIr" para referirse a una enzima ADI de la presente invención que tiene reactividad cruzada reducida con anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en comparación con la reactividad de ADI-PEG 20 con dichos anticuerpos. La nomenclatura "ADIr" se usa para distinguir las moléculas identificadas en el presente documento de ADI y ADI-PEG 20 como se conoce en la técnica. Los ejemplos de enzimas ADIr incluyen las SEQ ID NO: 2-28 y variantes de las mismas que difieren en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o de ADI-PEG 20.

En algunas realizaciones, las enzimas ADIr de la divulgación tienen características o propiedades similares a las de ADI-PEG 20, o mejores que las de esta, para reducir y mantener bajos niveles de arginina en sangre para un tratamiento eficaz contra el cáncer. Ejemplos de dichas propiedades incluyen Kcat, Km, pH óptimo, estabilidad, estabilidad proteolítica *in vivo* y falta de necesidad de iones o cofactores que no estén ya presentes en la sangre, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, una ADIr como se describe en el presente documento tiene propiedades que son aproximadamente o al menos un 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor, que las propiedades comparables de ADI-PEG 20. En algunas realizaciones, una ADIr descrita en el presente documento tiene propiedades que son aproximadamente o al menos aproximadamente un 100 %, 105 %, 110 %, 120 %, 140 %, 150 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 250 %, 260 %, 280 %, 300 %, 320 %, 340 %, 350 %, 360 %, 400 %, 420 %, 450 %, 460 %, 500 %, 520 %, 550 % o mayor que la propiedad específica de ADI-PEG 20 que se compara.

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

En determinadas realizaciones, una ADIr tiene una Km que es aproximadamente o al menos aproximadamente un

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

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

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

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

En determinadas realizaciones, una ADIr como se describe en el presente documento tiene de aproximadamente 10-140, 15-140 o 25-140 cambios de restos de superficie en comparación con una ADI de *M. hominis*. A partir de la estructura cristalina de ADI de *M. hominis*, se pueden identificar restos de superficie y mediante homología de secuencia se pueden determinar restos de superficie para ADI de otros organismos. Una ADIr como se describe en el presente documento puede tener aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 o aproximadamente 140 cambios de restos de superficie en comparación con una ADI de *M. hominis* (véase la SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, una ADIr como se describe en el presente documento tiene aproximadamente 10-140, 15-140 o 25-140 cambios de restos en comparación con una ADI de *M. hominis*. No es necesario que dichos cambios de restos sean solo de restos de aminoácidos de superficie. Dichos cambios (o adiciones o deleciones) de restos pueden estar en cualquier extremo de la molécula o en cualquier resto de la ADI, de modo que la ADI modificada tenga la actividad de ADI deseada como se describe en el presente documento. Los restos que deben cambiarse pueden identificarse a partir de la estructura cristalina de la ADI de *M. hominis* y los restos de ADI de otros organismos pueden determinarse por homología de secuencia. Una ADIr como se describe en el presente documento puede tener aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99,

100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 o aproximadamente 140 cambios de restos de aminoácidos en comparación con una ADI de *M. hominis* (véase la SEQ ID NO: 1).

- 5 De una gran cantidad de enzimas ADI, en la Tabla 1 se enumeran 27 enzimas ADIr con su porcentaje de identidad de secuencia en relación con la ADI de *M. hominis*.

En determinadas realizaciones, las enzimas ADIr identificadas en el presente documento, procedentes de diversas especies seleccionadas, tienen un número definido de restos de lisina de superficie (en determinadas realizaciones, p. ej., de hasta 30 o más). Algunas de las enzimas ADIr identificadas en el presente documento que tienen una reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20, tienen aproximadamente, al menos aproximadamente, o no más de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 restos de lisina de superficie, incluyendo todos los intervalos intermedios.

Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido" se usan indistintamente y significan un polímero de aminoácidos no limitado a ninguna longitud particular. El término "enzima" incluye catalizadores polipeptídicos o proteicos, y con respecto a ADIr se usa indistintamente con proteína, polipéptido o péptido. Los términos incluyen modificaciones tales como miristoilación, sulfatación, glucosilación, fosforilación y adición o delección de secuencias señal. Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una o más cadenas de aminoácidos, en donde cada cadena comprende aminoácidos unidos de manera covalente por enlaces peptídicos, y en donde dicho polipéptido o proteína puede comprender una pluralidad de cadenas unidas entre sí de manera no covalente y/o de manera covalente mediante enlaces peptídicos, que tienen la secuencia de las proteínas nativas, es decir, de las proteínas producidas por células de origen natural y específicamente no recombinantes o células modificadas por ingeniería genética o recombinantes, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen delecciones de, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente las enzimas/proteínas ADIr descritas en el presente documento, o secuencias que tienen delecciones de, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de las proteínas ADIr. En determinadas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido "recombinante", producido por una célula recombinante que comprende una o más moléculas de ADN recombinante, que normalmente están formadas por secuencias polinucleotídicas o combinaciones de secuencias polinucleotídicas heterólogas que de otro modo no se encontrarían en la célula.

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

El término "variante" incluye un polipéptido que difiere de un polipéptido de referencia desvelado de manera específica en el presente documento (p. ej., SEQ ID NO: 1-28) en una o más sustituciones, delecciones, adiciones y/o inserciones. Los polipéptidos variantes son biológicamente activos, es decir, continúan poseyendo la actividad enzimática o de unión de un polipéptido de referencia. Dichas variantes pueden ser el resultado, por ejemplo, de un polimorfismo genético y/o de una manipulación humana.

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

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

ADN correspondientes que codifican dichos péptidos, sin pérdida apreciable de su utilidad.

Al realizar dichos cambios, puede tenerse en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. Se entiende en general en la técnica la importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína (Kyte y Doolittle, 1982).

Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo que, a su vez, define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobia y de carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan una puntuación o un índice hidropático similar y aun así dar lugar a una proteína con actividad biológica similar, es decir, obtener aun una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén en un intervalo de  $\pm 2$ , se prefieren en particular los que estén en un intervalo de  $\pm 1$  e incluso se prefieren más en particular los que estén en un intervalo de  $\pm 0,5$ .

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

Como se ha esbozado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan, por lo tanto, en general, en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Los expertos en la materia conocen bien sustituciones ilustrativas que toman en consideración varias de las características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

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

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

En general, las variantes presentarán aproximadamente o al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de similitud o identidad de secuencia u homología de secuencia con una secuencia polipeptídica de referencia (p. ej. SEQ ID NO: 1-28). Por otro lado, se contemplan secuencias que difieren de las secuencias nativas o precursoras por la adición (p. ej. adición C-terminal, adición N-terminal, ambas), delección, truncamiento, inserción o sustitución de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos, pero que conservan las propiedades o actividades de una secuencia polipeptídica precursora o de referencia.

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

En algunas realizaciones, una ADIr tendrá una longitud de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 aminoácidos, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios. En realizaciones específicas, la ADIr tendrá una longitud de aproximadamente 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495 o 500 aminoácidos, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios.

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

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

En determinadas realizaciones, la enzima ADIr se modifica como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6 635 462. En particular, las modificaciones de uno o más de los restos de aminoácidos de origen natural de una ADIr, pueden proporcionar una enzima que se renaturalice y formule más fácilmente, mejorando de este modo la fabricación de la ADIr y de las composiciones terapéuticas que la comprendan. En algunas realizaciones, la enzima ADIr se modifica para eliminar uno o más restos de lisina (p. ej., la lisina puede sustituirse por otro aminoácido o por análogos del mismo, o por un aminoácido no natural). En particular, en algunas realizaciones, la enzima ADIr se modifica para que esté exenta de lisina en una posición equivalente a 112, 374, 405 o 408 de la SEQ ID NO: 1 (ADI de *M. hominis*) o una combinación de una o más de estas posiciones. En algunas realizaciones, la enzima ADIr se modifica para que esté exenta de una o más lisinas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más restos de lisina, si estuvieran presentes, pueden sustituirse por otro aminoácido o por análogos del mismo, o por un aminoácido no natural. En realizaciones específicas, una enzima ADIr tiene 5 restos de lisina sustituidos, por ejemplo, en una posición equivalente a la posición 7, 88, 137, 209 y 380 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una enzima ADIr tiene 10 restos de lisina sustituidos, por ejemplo, en posiciones equivalentes a las posiciones 7, 9, 59, 88, 115, 116, 137, 178, 209 y 380 de la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, una enzima ADIr tiene 15 restos de lisina sustituidos, por ejemplo, en posiciones equivalentes a las posiciones 7, 9, 59, 66, 88, 91, 93, 115, 116, 137, 141, 178, 209, 279 y en la posición 380 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una enzima ADIr tiene 21 restos de lisina sustituidos, por ejemplo, en posiciones equivalentes a las posiciones 7, 9, 56, 59, 66, 88, 91, 93, 96, 115, 116, 137, 141, 178, 209, 254, 279, 325, 326, 380 y 406 de la SEQ ID NO: 1.

En algunos casos, una ADIr nativa puede encontrarse en microorganismos y, por tanto, es inmunogénica y se elimina rápidamente de la circulación en un paciente. Estos problemas pueden superarse modificando una ADIr para crear una enzima "ADIr modificada". Por tanto, determinadas realizaciones incluyen una enzima ADIr que comprende un "agente modificador", ejemplos de los cuales incluyen, pero sin limitación, polímeros, proteínas, péptidos, polisacáridos y otros compuestos macromoleculares. La enzima ADIr y el agente modificador pueden unirse mediante enlaces covalentes o interacción no covalente para formar un conjugado estable o una composición estable para obtener un efecto deseado. En determinadas realizaciones, la ADIr modificada conserva la actividad biológica de una ADIr no modificada correspondiente (p. ej. de la misma secuencia o similar) y tiene mayor semivida *in vivo* y menor antigenicidad que la ADIr no modificada correspondiente. En determinadas realizaciones, la ADIr modificada conserva al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de la actividad biológica de la ADIr no modificada correspondiente. En general, la ADIr modificada conserva suficiente actividad biológica para su uso terapéutico.

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

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

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

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

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

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

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

En realizaciones particulares, la ADIr se modifica por unión covalente a una o más moléculas de PEG. La ADIr modificada de manera covalente con PEG (con o sin un enlazador) puede denominarse en lo sucesivo en el presente documento "ADIr-PEG". Cuando se compara con ADIr sin modificar, ADIr-PEG conserva la mayor parte de su actividad enzimática, es mucho menos inmunogénica o antigénica, tiene una semivida en circulación enormemente prolongada, y es mucho más eficaz en el tratamiento de tumores.

"Polietilenglicol" o "PEG" se refiere a mezclas de polímeros de condensación de óxido de etileno y agua, en una cadena ramificada o lineal, representados por la fórmula general  $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ , en donde n es al menos 4. "Polietilenglicol" o "PEG" se usa junto con un sufijo numérico que indica el peso molecular promedio en peso aproximado del mismo. Por ejemplo, PEG5.000 se refiere a PEG que tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 5.000; PEG12.000 se refiere a PEG que tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 12.000; y PEG20.000 se refiere a PEG que tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 20.000.

En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000; de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 40.000; de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 30.000; de aproximadamente 8.000 a aproximadamente 30.000; de aproximadamente 11.000 a aproximadamente 30.000; de aproximadamente 12.000 a aproximadamente 28.000; de aproximadamente 16.000 a aproximadamente 24.000; de aproximadamente 18.000 a aproximadamente 22.000; o de aproximadamente 19.000 a aproximadamente 21.000. En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000; de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 30.000; de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 20.000; de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 12.000; de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 10.000; de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 8.000; de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 6.000; o de aproximadamente 5.000. En realizaciones específicas, el PEG tiene un peso molecular promedio en peso total de aproximadamente 20.000. En general, el PEG con un peso molecular de 30.000 o mayor es difícil de disolver y los rendimientos del producto formulado pueden reducirse. El PEG puede ser una cadena ramificada o lineal. En general, el aumento del peso molecular del PEG disminuye la inmunogenicidad de la ADIr. El PEG puede ser una cadena lineal o ramificada, y en determinadas realizaciones es una cadena lineal. El PEG que tiene un peso molecular descrito en el presente documento puede utilizarse junto con ADIr y, opcionalmente, un enlazador biocompatible, para tratar la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) o el

cáncer, incluyendo, por ejemplo, carcinoma hepatocelular, leucemia mieloide aguda, tal como leucemia mieloide aguda recidivante, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello, cáncer cervicouterino, cáncer de testículo, cáncer de estómago o

Determinadas realizaciones emplean PEG(s) reactivo(s) con tiol, sulfhidrilo o cisteína. En algunas realizaciones, el/los PEG(s) reactivo(s) con tiol, sulfhidrilo o cisteína se une(n) a uno o más restos de cisteína de origen natural, a uno o más restos de cisteína introducidos (p. ej., sustitución de uno o más restos de tipo silvestre por uno o más restos de cisteína), inserción de uno o más restos de cisteína), o cualquier combinación de los mismos (véase, p. ej., Doherty *et al.*, Bioconjug Chem. 16:1291-98, 2005). En determinadas realizaciones, algunos de los restos de cisteína de ADI de tipo silvestre pueden sustituirse primero por otro aminoácido para impedir la unión del polímero de PEG con cisteínas de tipo silvestre, por ejemplo, para impedir que el/los PEG(s) interrumpan una actividad biológica que de otro modo sería deseable. Algunas realizaciones emplean uno o más derivados de cisteína no naturales (p. ej., homocisteína) en lugar de cisteína.

Como ejemplos no limitativos de PEG reactivos con tiol, sulfhidrilo o cisteína se incluyen Metoxi PEG maleimidadas (M-PEG-MAL) (p. ej., PM 2000, PM 5000, PM 10000, PM 20000, PM 30000, PM 40000). Las M-PEG-MAL reaccionan con los grupos tiol en las cadenas laterales de cisteína en proteínas y péptidos para generar un enlace 3-tiosuccinimidil éter estable. Esta reacción es muy selectiva y puede tener lugar en condiciones suaves a un pH de aproximadamente 5,0-6,5 en presencia de otros grupos funcionales. En las figuras 1A-1D se ilustran ejemplos particulares de moléculas de PEG reactivas con tiol, sulfhidrilo o cisteína, disponibles en el comercio. Por tanto, en determinadas realizaciones, una enzima ADIr se conjuga con una cualquiera o más de las moléculas de PEG reactivas con tiol, sulfhidrilo o cisteína descritas en el presente documento.

La ADIr puede unirse de manera covalente a un agente modificador, tal como PEG, con o sin un enlazador, aunque en una realización preferida se utiliza un enlazador. ADIr puede unirse de manera covalente a PEG a través de un enlazador biocompatible utilizando métodos conocidos en la técnica, como describen, por ejemplo, Park *et al.*, Anticancer Res., 1:373-376 (1981); y Zaplinsky y Lee, Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, ed., Plenum Press, NY, capítulo 21 (1992).

En algunos casos, ADIr puede acoplarse directamente (es decir, sin un enlazador) a un agente modificador tal como PEG, por ejemplo, a través de un grupo amino, un grupo sulfhidrilo, un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, u otro grupo.

El enlazador utilizado para unir de manera covalente ADIr a un agente modificador (p. ej. PEG) puede ser cualquier enlazador biocompatible. Como se comentó anteriormente, "biocompatible" indica que el compuesto o grupo no es tóxico y que puede utilizarse *in vitro* o *in vivo* sin provocar lesiones, náuseas, enfermedad o muerte. Al enlazador puede unirse un agente modificador, tal como PEG, por ejemplo, a través de un enlace de éter, un enlace tiol, un enlace amida u otro enlace.

En algunas realizaciones, los enlazadores adecuados pueden tener una longitud de cadena total de aproximadamente 1-100 átomos, 1-80 átomos, 1-60 átomos, 1-40 átomos, 1-30 átomos, 1-20 átomos o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos, por ejemplo, en donde los átomos de la cadena comprenden C, S, N, P y/u O. En determinadas realizaciones, un enlazador es opcional, p. ej., una enzima ADIr conjugada con PEG no comprende un enlazador. En algunos casos, un grupo enlazador incluye, por ejemplo, un grupo succinilo, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo éster, un grupo epoxi, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un hidrato de carbono, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina, un grupo metileno y combinaciones de los mismos. Como ejemplos particulares de enlazadores estables se incluyen enlaces de succinimida, ácido propiónico, carboximetilato, éteres, carbamatos, amidas, aminas, carbamidas, imidas, enlaces C-C alifáticos y tioéteres. En determinadas realizaciones, el enlazador biocompatible es un grupo succinimidil succinato (SS).

Otros enlazadores adecuados incluyen un grupo oxicarbonilimidazol (incluyendo, por ejemplo, carbonildiimidazol (CDI)), un grupo nitrofenilo (incluyendo, por ejemplo, carbonato de nitrofenilo (NCP) o carbonato de triclorofenilo (TCP)), un grupo trisilato, un grupo aldehído, un grupo isocianato, un grupo vinilsulfona o una amina primaria. En determinadas realizaciones, el enlazador procede de SS, SPA, SCM o NHS; en determinadas realizaciones, se utiliza SS, SPA o NHS, y en algunas realizaciones, se utiliza SS o SPA. Por tanto, en determinadas realizaciones, pueden formarse posibles enlazadores a partir de metoxi-PEG succinimidil succinato (SS), metoxi-PEG succinimidil glutarato (SG), metoxi-PEG succinimidil carbonato (SC), metoxi-PEG succinimidil carboximetil éster (SCM), metoxi-PEG2 N-hidroxi succinimida (NHS), metoxi-PEG succinimidil butanoato (SBA), metoxi-PEG succinimidil propionato (SPA), metoxi-PEG succinimidil glutaramida y/o metoxi-PEG succinimidil succinamida.

Como ejemplos adicionales de enlazadores se incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: -O-, -NH-, -S-, -C(O)-, C(O)-NH, NH-C(O)-NH, O-C(O)-NH, -C(S)-, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-

CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, grupo cicloalquilo bivalente, -N(R<sub>6</sub>)-, R<sub>6</sub> es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido. Adicionalmente, cualquiera de los residuos enlazadores descritos en el presente documento, puede incluir además una cadena oligomérica de óxido de etileno que comprenda de 1 a 20 unidades monoméricas de óxido de etileno [es decir, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-20</sub>]. Es decir, la cadena oligomérica de óxido de etileno puede aparecer antes o después del enlazador y, opcionalmente, entre dos átomos cualesquiera de un residuo enlazador compuesto por dos o más átomos. Asimismo, la cadena oligomérica no se consideraría parte del residuo enlazador si el oligómero es adyacente a un segmento de polímero y simplemente representa una extensión del segmento de polímero.

En la Tabla A a continuación se describen ejemplos específicos de enlazadores y moléculas de PEG.

Tabla A. PEG y enlazadores		
PEG	Enlazador	Comentarios
Metoxi-PEG succinimidil hexanoato	amida	pH 7-8, menor reactividad
Metoxi-PEG succinimidil butanoato (SBA)	amida	pH 7-8, mayor tiempo de hidrólisis que SPA (aprox. 23 min)
Metoxi-PEG succinimidil propionato (SPA)	amida	Tan, 1998, Metase; Basu, IFN; Games, Phe Am. Lyase; mejor que SCM (aprox. 16 min)
Metoxi-PEG succinimidil carboximetil éster (SCM)	amida	pH 7-8, TA, tiempo de ejecución de 1 h, extremadamente reactivo, 0,75 min a pH 8, 25 °C, arginasa
Metoxi-PEG succinimidil glutaramida	amida	pH 7-8, TA, 90 % completo
Metoxi-PEG succinimidil succinamida	amida	pH 7-8, TA, 95 % completo
MetoxiPEG2 NHS		Gamez, Phe Am. Lyase; Basu, IFNa2a40K, Nulasta (G-CSF), pegfilgrastim (G-CSF)
Metoxi-PEG succinimidil carbonato (SC)	uretano	Hidrólisis ½ más prolongada que la de SCM, Wang, 2006, M. art. ADI, Basu, IFNa2b, liberación lenta
Metoxi-PEG succinimidil glutarato (SG)	éster	Yang, 2004, Metase
Metoxi-PEG succinimidil succinato (SS)	éster	Adenosina desaminasa, asparginasa, ADI-PEG 20
PEG-maleimida		
PEG-vinilsulfona		
PEG-yodoacetamida		
ortopiridil-disulfuro-PEG		

En determinadas realizaciones, la enzima ADIr comprende una o más moléculas de PEG y/o enlazadores como se describe en el presente documento (p. ej., en la Tabla A).

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



De 1 a aproximadamente 30 moléculas de PEG pueden unirse de manera covalente a ADIr. En determinadas realizaciones, ADIr se modifica con (es decir, comprende) una molécula de PEG. En algunas realizaciones, la ADIr se modifica con más de una molécula de PEG. En realizaciones particulares, la ADIr se modifica con de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 moléculas de PEG, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 moléculas de PEG. En algunas realizaciones, la ADIr se modifica con aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 moléculas de PEG. En realizaciones específicas, la ADIr se modifica con 4,5 - 5,5 moléculas de PEG por ADIr. En alguna realización, la ADIr se modifica con  $5 \pm 1,5$  moléculas de PEG.

En determinadas realizaciones, de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 70 % de los grupos amino primarios en la ADIr se modifican con PEG, en algunas realizaciones de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 65 %, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 60 %, o en determinadas realizaciones, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 55 %, o del 45 % a aproximadamente el 50 %, o en algunas realizaciones, aproximadamente el 50 % de los grupos amino primarios en la arginina desiminasa se modifican con PEG. Cuando el PEG está unido de manera covalente al extremo terminal de ADIr, puede ser deseable tener que utilizar solo 1 molécula de PEG. Al aumentar el número de unidades de PEG en la ADIr aumenta la semivida en circulación de la enzima. Sin embargo, al aumentar el número de unidades de PEG en la ADIr disminuye la actividad específica de la enzima. Por tanto, es necesario obtener un equilibrio entre los dos, como resultaría evidente para un experto en la técnica a la vista de la presente divulgación.

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

El PEG que se une a la proteína puede ser una cadena lineal, como con SS-PEG, SPA-PEG y SC-PEG, o puede utilizarse una cadena ramificada de PEG, como con PEG2-NHS.

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

Debe entenderse que la ADIr procedente de otros organismos también puede tener sitios de pegilación correspondientes a la posición 112 de ADI de *Mycoplasma hominis*. Además, la ADI de algunos organismos puede tener restos de lisina correspondientes a la misma ubicación general que la posición 112 de la ADI de *Mycoplasma hominis*. El experto en la materia conoce la ubicación de lisina en la ADI de dichos organismos y se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.635.462.

Por tanto, en algunas realizaciones se proporcionan determinadas sustituciones de aminoácidos en la cadena polipeptídica de ADIr. Estas sustituciones de aminoácidos proporcionan una ADIr modificada que pierde menos actividad que cuando la modifica un agente modificador, p. ej., después de la pegilación. Al eliminar sitios de pegilación, u otros sitios de modificación conocidos, en la región catalítica de la enzima, o adyacentes a ella, se puede obtener una modificación óptima, p. ej., pegilación, sin pérdida de actividad.

En algunas realizaciones, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos emplean aminoácidos no naturales para la conjugación con PEG u otro agente modificador (véase, p. ej., de Graaf *et al.*, Bioconjug Chem. 20:1281-95, 2009). Por tanto, determinadas realizaciones incluyen, una enzima ADIr que se conjuga con uno o más PEG a través de uno o más aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende una cadena lateral que tiene un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en: un alquilo, arilo, haluro de arilo, haluro de vinilo, haluro de alquilo, acetilo, cetona, aziridina, nitrilo, nitro, haluro, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidrazina, ciano, halo, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, tio éter, epóxido, sulfona, ácido borónico, éster de boronato, borano, ácido fenilborónico, tiol, seleno, sulfonilo, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, piridilo, naftilo, benzofenona, un anillo restringido tal como un ciclooctino, tioéster, enona, imina, aldehído, éster,

tioácido, hidroxilamina, amino, ácido carboxílico, ácido alfa-cetocarboxílico, ácidos alfa o beta insaturados y amidas, glioxil amida y un grupo organosilano. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se selecciona del grupo que consiste en: p-acetil-L-fenilalanina, O-metil-tirosina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-L-tirosina, homocisteína, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAc $\beta$ -serina,  $\beta$ -O-Glc-NAc-L-serina, tri-O-acetil-GalNAc- $\alpha$ -treonina,  $\alpha$ -GalNAc-L-treonina, L-Dopa, una fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, p-yodo-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina e isopropil-L-fenilalanina.

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

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

Por tanto, algunas realizaciones proporcionan determinadas sustituciones de aminoácidos en la cadena polipeptídica de las arginina desiminasa de tipo silvestre. Los ejemplos incluyen sustituciones que eliminan las características estructurales problemáticas en la cadena peptídica de la arginina desiminasa. También se incluyen sustituciones que proporcionan una renaturalización mejorada de la arginina desiminasa modificada. Estas sustituciones de aminoácidos hacen posible la renaturalización rápida de la arginina desiminasa modificada utilizando cantidades reducidas de tampón. Estas sustituciones de aminoácidos también pueden proporcionar mayores rendimientos de arginina desiminasa modificada renaturalizada. En algunas realizaciones, la arginina desiminasa modificada tiene una sustitución de aminoácidos en P210 o en el resto equivalente. Como se ha mencionado anteriormente, la arginina desiminasa procedente de *Mycoplasma hominis* tiene el aminoácido prolina ubicado en la posición 210. Aunque no se pretende limitar la presente invención, se cree que la presencia del aminoácido prolina en la posición 210 da como resultado una curvatura o pliegue en la cadena polipeptídica normal que aumenta la dificultad de renaturalizar (es decir, replegar) la arginina desiminasa. Las sustituciones de prolina en la posición 210 hacen posible la renaturalización rápida de la arginina desiminasa modificada utilizando cantidades reducidas de tampón. Las sustituciones de prolina en la posición 210 (o en el resto equivalente) también pueden proporcionar mayores rendimientos de arginina desiminasa modificada renaturalizada. En algunas realizaciones, la prolina en la posición 210 (o el resto equivalente) se sustituye por serina. Como ejemplos no limitativos de otras sustituciones se incluyen Pro210 por Thr210, Pro210 por Arg210, Pro210 por Asn210, Pro210 por Gln210 o Pro210 por Met210. Al eliminar esas características estructurales asociadas al aminoácido de la posición 210 de la arginina desiminasa de tipo silvestre, se puede lograr el replegamiento óptimo de la enzima.

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

Los medios de administración *in vivo* de los compuestos o de las composiciones que se describen en el presente documento variarán dependiendo de la aplicación prevista. La administración de las composiciones de ADIr descritas en el presente documento, en forma pura o en una composición farmacéutica adecuada, puede realizarse mediante cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes que sirven para utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar combinando ADIr, p. ej., ADIr-PEG, ADIr-PEG 20, con un vehículo, diluyente o excipiente apropiado, fisiológicamente aceptable, y puede formularse en preparaciones en estado sólido, semisólido, líquido o gaseoso, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Además, otros principios farmacéuticamente activos (incluyendo otros agentes antineoplásicos como los que se describen en cualquier otra parte del presente documento) y/o excipientes adecuados tales como sales, tampones y estabilizantes pueden, pero no necesariamente, estar presentes en la composición.

La administración puede realizarse mediante diversas vías diferentes, incluyendo la oral, parenteral, nasal, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica. Los modos de administración dependen de la naturaleza de la afección que se va a tratar o prevenir. Por tanto, una enzima ADIr (p. ej., ADIr-PEG, ADIr-PEG 20) se puede administrar por vía oral, intranasal, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intralinfática, intratumoral, intramuscular, intersticial, intraarterial, subcutánea, intraocular, intrasinoval, transepitelial y transdérmica. Una cantidad que, después de la administración, reduce, inhibe, impide o retrasa la progresión y/o metástasis de un cáncer, se considera eficaz. En una realización determinada, las composiciones de ADIr del presente documento aumentan la mediana del tiempo de supervivencia de los pacientes en una cantidad estadísticamente significativa. En algunas realizaciones, los tratamientos con ADIr descritos en el presente documento aumentan la mediana del tiempo de supervivencia de un paciente en 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 15 semanas, 20 semanas, 25 semanas, 30 semanas, 40 semanas o más. En determinadas realizaciones, los tratamientos con ADIr aumentan la mediana del tiempo de supervivencia de un paciente en 1 año, 2 años, 3 años o más. En algunas realizaciones, los tratamientos con ADIr descritos en el presente documento aumentan la supervivencia sin progresión en 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas o más. En determinadas realizaciones, los tratamientos con ADIr descritos en el presente documento aumentan la supervivencia sin progresión en 1 año, 2 años, 3 años o más.

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

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

La dosificación y duración exactas del tratamiento dependen de la enfermedad que se esté tratando y pueden determinarse empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o probando las composiciones en sistemas modelo conocidos en la técnica y extrapolándolas de los mismos. También se pueden realizar ensayos clínicos controlados. Las dosis también pueden variar según la gravedad de la afección que se va a aliviar. Una composición farmacéutica generalmente se formula y administra para que ejerza un efecto terapéuticamente útil minimizando al mismo tiempo efectos secundarios no deseados. La composición puede administrarse de una vez o puede dividirse en diversas dosis más pequeñas para administrarla a intervalos de tiempo. Para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual.

Las composiciones de ADIr (p. ej., ADIr-PEG) pueden administrarse solas o junto con otros tratamientos conocidos contra el cáncer, tales como radioterapia, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse junto con antibióticos.

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

En algunos aspectos, el periodo de tiempo se determina detectando un nivel predeterminado de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en el paciente, en donde la composición que comprende una ADIr se administra después de la detección del nivel predeterminado de dichos anticuerpos anti-ADI-PEG 20. En determinadas realizaciones, se puede establecer un nivel o niveles umbral o niveles predeterminados de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en pacientes que se van a tratar con ADI-PEG 20 y una enzima ADIr. Un "nivel umbral predeterminado" (también denominado "nivel predeterminado" o "valor límite predeterminado"), o en ocasiones denominado límite predeterminado, de anticuerpos anti-ADI-PEG 20,

puede establecerse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando curvas de eficacia diagnóstica (*Receiver Operator Characteristic*) o curvas "ROC". En algunas realizaciones, incluso niveles muy bajos de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 se consideran suficientes para garantizar el cambio de tratamiento de ADI-PEG 20 a una ADIr-PEG descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones, un médico experto puede determinar un nivel adecuado de anti-ADI-PEG 20 que determinará cuándo finalizar el tratamiento con ADI-PEG 20 y comenzar el tratamiento con una composición de ADIr descrita en el presente documento.

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

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

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

Una composición farmacéutica puede estar en forma de un sólido o líquido. En algunas realizaciones, el/los vehículo(s) está/n en partículas, de modo que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvo. El/los vehículos puede/n ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un aceite oral, un líquido inyectable o un aerosol, que es útil, por ejemplo, para la administración por inhalación. Cuando se desea la administración oral, la composición farmacéutica generalmente está en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel, se incluyen dentro de las formas contempladas en el presente documento como un sólido o líquido.

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

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

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, en determinadas realizaciones, solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden actuar como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o

metil parabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminetetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido.

5 Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

Una composición farmacéutica líquida destinada a administración parenteral u oral debe contener una cantidad de ADlr como se desvela en el presente documento (p. ej., ADlr-PEG, ADlr-PEG 20) de manera que se obtenga una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos 0,01 % de ADlr en la composición. Cuando se desea la administración oral, esta cantidad puede variar entre el 0,1 y aproximadamente el 70 % del peso de la composición. Determinadas composiciones farmacéuticas orales contienen entre aproximadamente 4 % y aproximadamente 75 % de ADlr. En determinadas realizaciones, las composiciones y preparaciones farmacéuticas se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga entre 0,01 y 10 % en peso de ADlr antes de la dilución.

15 La composición farmacéutica puede estar destinada a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede comprender convenientemente una solución, emulsión, pomada o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizantes. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica para la administración tópica. Si está destinada a administración transdérmica, la  
20 composición puede incluir un parche transdérmico o dispositivo de iontoforesis. La composición farmacéutica puede estar destinada a administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio, que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para la administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.

25 La composición farmacéutica puede incluir diversos materiales, que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una capa de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la capa de recubrimiento son normalmente inertes y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entérico. De manera alternativa, los principios activos se pueden encerrar en una cápsula de gelatina. La composición  
30 farmacéutica en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se una a ADlr (p. ej., ADlr-PEG) y, de este modo, ayude a suministrar el compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar con esta función incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales, una o más proteínas o un liposoma. La composición farmacéutica puede consistir esencialmente en unidades de dosificación que pueden administrarse como un aerosol. El término aerosol se usa para indicar diversos sistemas que varían desde los de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases  
35 presurizados. El suministro puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que distribuya los principios activos. Los aerosoles se pueden administrar en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos para administrar el principio o principios activos. El suministro del aerosol incluye el recipiente necesario, los activadores, las válvulas, los recipientes secundarios, y similares, que juntos pueden formar un kit. Un experto habitual en la técnica, puede determinar sin experimentación indebida los aerosoles preferidos.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica destinada a su administración mediante inyección puede prepararse combinando una composición que comprende ADlr (p.ej., ADlr-PEG) como se describe en el presente documento y, opcionalmente, una o más de sales, tampones y/o estabilizadores, con estéril, agua destilada hasta formar una  
45 solución. Se puede añadir un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interaccionan de manera no covalente con la composición de ADlr (p. ej., ADlr-PEG) para facilitar la disolución o la suspensión homogénea de la ADlr (p. ej., ADlr-PEG) en el sistema de suministro acuoso.

50 Las composiciones pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará dependiendo de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico (p. ej., ADlr-PEG) empleado; la estabilidad metabólica y duración de acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el momento de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la afección particular; y el sujeto que se somete a terapia.

55 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en el presente documento es una cantidad que es eficaz para inhibir el crecimiento tumoral. En general, el tratamiento se inicia con pequeñas dosis que pueden aumentarse en pequeños incrementos hasta que se logre el efecto óptimo según las circunstancias. En general, una dosis terapéutica de los compuestos puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg de dos veces  
60 a la semana a aproximadamente una vez cada dos semanas. Por ejemplo, la dosis puede ser de aproximadamente 1 mg/kg una vez a la semana como una inyección intravenosa de 2 ml a aproximadamente 20 mg/kg una vez cada 3 días. En algunas realizaciones, la dosis puede ser de aproximadamente 50 UI/m<sup>2</sup> a aproximadamente 700 UI/m<sup>2</sup>, administrada aproximadamente una vez cada 3 días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente dos veces a la semana o aproximadamente una vez cada 2 semanas. En determinadas realizaciones, la dosis puede ser  
65 de aproximadamente 50 UI/m<sup>2</sup>, 60 UI/m<sup>2</sup>, 70 UI/m<sup>2</sup>, 80 UI/m<sup>2</sup>, 90 UI/m<sup>2</sup>, 100 UI/m<sup>2</sup>, 110 UI/m<sup>2</sup>, 120 UI/m<sup>2</sup>, 130 UI/m<sup>2</sup>, 140 UI/m<sup>2</sup>, 150 UI/m<sup>2</sup>, 160 UI/m<sup>2</sup>, 170 UI/m<sup>2</sup>, 180 UI/m<sup>2</sup>, 190 UI/m<sup>2</sup>, 200 UI/m<sup>2</sup>, 210 UI/m<sup>2</sup>, 220 UI/m<sup>2</sup>, 230 UI/m<sup>2</sup>,

- 240 UI/m<sup>2</sup>, 250 UI/m<sup>2</sup>, 260 UI/m<sup>2</sup>, 270 UI/m<sup>2</sup>, 280 UI/m<sup>2</sup>, 290 UI/m<sup>2</sup>, 300 UI/m<sup>2</sup>, 310 UI/m<sup>2</sup>, aproximadamente 320 UI/m<sup>2</sup>, aproximadamente 330 UI/m<sup>2</sup>, 340 UI/m<sup>2</sup>, aproximadamente 350 UI/m<sup>2</sup>, 360 UI/m<sup>2</sup>, 370 UI/m<sup>2</sup>, 380 UI/m<sup>2</sup>, 390 UI/m<sup>2</sup>, 400 UI/m<sup>2</sup>, 410 UI/m<sup>2</sup>, 420 UI/m<sup>2</sup>, 430 UI/m<sup>2</sup>, 440 UI/m<sup>2</sup>, 450 UI/m<sup>2</sup>, 500 UI/m<sup>2</sup>, 550 UI/m<sup>2</sup>, 600 UI/m<sup>2</sup>, 620 UI/m<sup>2</sup>, 630 UI/m<sup>2</sup>, 640 UI/m<sup>2</sup>, 650 UI/m<sup>2</sup>, 660 UI/m<sup>2</sup>, 670 UI/m<sup>2</sup>, 680 UI/m<sup>2</sup>, 690 UI/m<sup>2</sup>, o aproximadamente 700 UI/m<sup>2</sup> administrada aproximadamente una vez cada 3 días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente dos veces a la semana o aproximadamente una vez cada 2 semanas. En determinadas realizaciones, la dosis puede modificarse según lo desee el médico experto.
- En algunos casos, la dosis óptima de ADIr-SS-PEG5.000 puede ser de aproximadamente dos veces a la semana, mientras que la dosis óptima de ADIr-SS-PEG20.000 puede ser de aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente una vez cada dos semanas. En determinadas realizaciones, la dosis óptima de ADIr-SS-PEG20.000 puede ser de aproximadamente dos veces a la semana.
- La ADIr-PEG puede mezclarse con una solución salina tamponada con fosfato, o con cualquier otra solución adecuada conocida por los expertos en la materia, antes de la inyección. En algunas realizaciones, una composición líquida que comprende ADIr-PEG, comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 mg de ADIr, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mg de polietilenglicol, aproximadamente 1,27 mg  $\pm$  5 % de fosfato monobásico de sodio, USP; aproximadamente 3 mg  $\pm$  5 % de fosfato de sodio dibásico, USP; aproximadamente 7,6 mg  $\pm$  5 % de cloruro de sodio, USP; a un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7; en una cantidad adecuada de agua para inyección (p. ej., de aproximadamente 1 ml o aproximadamente 2 ml).
- En algunas realizaciones, una composición líquida que comprende una ADIr-PEG, comprende ClH-histidina (clorhidrato de histidina), y en determinadas realizaciones, el tampón de la composición es ClH-histidina de aproximadamente 0,0035 M a aproximadamente 0,35 M. En una realización particular, la composición se formula en un tampón que comprende ClH-histidina 0,035 M a pH 6,8 con cloruro de sodio 0,13 M. En determinadas realizaciones, la composición se formula en un tampón que comprende tampón de fosfato de sodio 0,02 M a pH 6,8 con cloruro de sodio 0,13 M. En algunas realizaciones, una composición líquida que comprende ADIr-PEG, comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 mg de ADIr, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mg de polietilenglicol, aproximadamente 5,4 mg  $\pm$  5 % de histidina, USP; aproximadamente 7,6 mg  $\pm$  5 % de cloruro de sodio, USP; a un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7; en una cantidad adecuada de agua para inyección (p. ej., de aproximadamente 1 ml o aproximadamente 2 ml).
- En algunas realizaciones, una composición que comprende ADIr (p. ej., ADIr-PEG) tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, la composición que comprende ADIr tiene un pH de aproximadamente 6,8  $\pm$  1,0.
- En algunas realizaciones, el PEG libre en una composición que comprende ADIr (por ejemplo, ADIr-PEG) está entre 1 y 10 %. En algunas realizaciones, es menor del 7 %, menor del 6 %, menor del 5 %, menor del 4 %, menor del 3 %, menor del 2 % o menor del 1 % del PEG total. En determinadas realizaciones, la ADIr no modificada en una composición que comprende ADIr (p. ej., ADIr-PEG) es menos de aproximadamente 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o menos de 0,1 %. En general, las composiciones que comprenden ADIr-PEG tienen impurezas totales menores o iguales a aproximadamente 4 %, 3 %, 2 %, 1,5 %, 1 % o 0,5 %. En algunas realizaciones, el límite de endotoxina cumple los requisitos establecidos en la USP, es decir,  $\leq$  50 UE/ml.
- En algunas realizaciones, el sulfhidrilo libre en una composición que comprende ADIr (p. ej., ADIr-PEG) es mayor que aproximadamente 90 %. En algunas realizaciones, el sulfhidrilo libre en una composición que comprende ADIr o ADIr-PEG es de aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 % o aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o mayor.
- En algunas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una Km de aproximadamente 0,1  $\mu$ M o 0,5  $\mu$ M a aproximadamente 15  $\mu$ M o de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 12  $\mu$ M, de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 10  $\mu$ M, de aproximadamente 1,5  $\mu$ M a aproximadamente 9  $\mu$ M, de aproximadamente 1,5  $\mu$ M a aproximadamente 8  $\mu$ M o de aproximadamente 1,5  $\mu$ M a aproximadamente 7  $\mu$ M. En determinadas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una Km de aproximadamente 1,0  $\mu$ M a aproximadamente 10  $\mu$ M o de aproximadamente 1,5  $\mu$ M a aproximadamente 6,5  $\mu$ M. En algunas realizaciones, la ADIr o ADIr-PEG en una composición tiene una Km de aproximadamente, de al menos aproximadamente o menos de aproximadamente 0,1  $\mu$ M, aproximadamente 0,5  $\mu$ M, aproximadamente 1,0  $\mu$ M, aproximadamente 1,5  $\mu$ M, aproximadamente 2  $\mu$ M, aproximadamente 2,5  $\mu$ M, aproximadamente 3  $\mu$ M, aproximadamente 3,5  $\mu$ M, aproximadamente 4  $\mu$ M, aproximadamente 4,5  $\mu$ M, aproximadamente 5  $\mu$ M, aproximadamente 5,5  $\mu$ M, aproximadamente 6  $\mu$ M, aproximadamente 6,5  $\mu$ M o aproximadamente 7  $\mu$ M o aproximadamente 8  $\mu$ M o aproximadamente 9  $\mu$ M o aproximadamente 10  $\mu$ M.
- En algunas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una Kcat de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 70 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 60 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 50 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> a aproximadamente 40 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 30 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 20 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 15 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 1 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 10 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 20 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 30 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 40 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 50 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 60 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 70 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, o de aproximadamente 1 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 12 s<sup>-1</sup>, de aproximadamente 1 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 10 s<sup>-1</sup>, de aproximadamente 1,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 9 s<sup>-1</sup>, de aproximadamente 2 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 8 s<sup>-1</sup> o de aproximadamente 2,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 7 s<sup>-1</sup>. En determinadas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una Kcat de aproximadamente 2,5 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 7,5 s<sup>-1</sup>. En algunas realizaciones, la ADIr o ADIr-PEG en una composición, tiene una Kcat de aproximadamente o de al menos aproximadamente 2,5 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 3 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 3,5 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 4 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 4,5 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 5 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 5,5 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 6 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 6,5 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 7 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 7,5 s<sup>-1</sup> o aproximadamente 8 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 10 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 15 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 20 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 25 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 30 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 35 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 40 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 45 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 50 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 55 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 60 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 65 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 70 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 75 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 80 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 85 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 90 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 95 s<sup>-1</sup> o aproximadamente 100 s<sup>-1</sup>.

En algunas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una conductividad (también conocida en la técnica como conductancia específica) de aproximadamente de 5 mS/cm a aproximadamente de 20 mS/cm, o de aproximadamente 5 mS/cm a aproximadamente 15 mS/cm, de aproximadamente 7 mS/cm a aproximadamente 15 mS/cm, de aproximadamente 9 mS/cm a aproximadamente 15 mS/cm, o de aproximadamente 10 mS/cm a aproximadamente 15 mS/cm. En algunas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una conductividad de aproximadamente 9 mS/cm, aproximadamente 10 mS/cm, aproximadamente 11 mS/cm, aproximadamente 12 mS/cm o aproximadamente 13 mS/cm, aproximadamente 14 mS/cm o aproximadamente 15 mS/cm. En determinadas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una conductividad de aproximadamente 13 mS/cm  $\pm$  1,0 mS/cm.

En algunas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una osmolalidad de aproximadamente 50 mOsm/kg a aproximadamente 500 mOsm/kg, de aproximadamente 100 mOsm/kg a aproximadamente 400 mOsm/kg, de aproximadamente 150 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, de aproximadamente 200 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, o de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. En determinadas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una osmolalidad de aproximadamente 300  $\pm$  30 mOsm/kg.

En algunas realizaciones, la concentración de proteína es de aproximadamente 11,0  $\pm$  1,0 mg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de proteína está entre aproximadamente 8 y aproximadamente 15 mg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de proteína es de aproximadamente 8, 9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14 o 15 mg/ml.

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

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

combinada incluye todos estos regímenes.

Por tanto, en determinadas realizaciones, también se contempla la administración de las composiciones de ADIr de la presente divulgación junto con uno o más agentes terapéuticos distintos. Dichos agentes terapéuticos pueden estar aceptados en la técnica como un tratamiento de referencia para una patología en particular como se describe en el presente documento, tal como un cáncer en particular o la EICH. Los agentes terapéuticos ilustrativos contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, los AINE, los FARME, antiinflamatorios, quimioterápicos, radioterápicos, inhibidores de la autofagia u otros agentes activos y auxiliares.

En determinadas realizaciones, las composiciones de ADIr (p. ej., ADIr-PEG) desveladas en el presente documento, pueden administrarse junto con cualquier cantidad de agentes quimioterápicos. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aciridinas, tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptoizocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antipararrenales, tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diacicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbacin; PSK; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados del ácido retinoico, tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina diftotox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales tales como antiestrógenos, que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal en tumores, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina. Como agentes quimioterápicos adicionales se incluyen sorafenib y otros inhibidores de proteína cinasa, tales como afatinib, axitinib, bevacizumab, cetuximab, crizotinib, dasatinib, erlotinib, fostamatinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, mubritinib, nilotinib, panitumumab, pazopanib, pegaptanib, ranibizumab, ruxolitinib, trastuzumab, vandetanib, vemurafenib y sunitinib; sirolimus (rapamicina), everolimus y otros inhibidores de mTOR. También se contemplan para su uso en el presente documento sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

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

En algunas realizaciones, la combinación de ADIr (p. ej., ADIr-PEG) con uno o más agentes terapéuticos actúa de manera complementaria, aditiva o sinérgica. En este sentido, en el presente documento se describen agentes complementarios o sinergizantes, que incluyen un agente terapéutico (p. ej., un agente quimioterápico, un inhibidor de la autofagia, un inhibidor de mTOR o cualquier otro agente terapéutico utilizado para el tratamiento del cáncer, de la EICH o de la enfermedad inflamatoria intestinal, como se describe en el presente documento) que es capaz de actuar de manera complementaria o sinérgica con la ADIr-PEG proporcionada en el presente documento, donde dicha complementariedad o sinergia se manifiesta como un efecto detectable que es mayor (es decir, de manera



estadísticamente significativa en relación con una condición de control adecuada) en cuanto a su magnitud, que el efecto que puede detectarse cuando el agente quimioterápico está presente aunque la composición de ADIr (p. ej., ADIr-PEG) esté ausente y/o cuando la ADIr (p. ej., ADIr-PEG) está presente aunque el agente quimioterápico esté ausente. En la técnica se conocen métodos para medir la sinergia y la complementariedad (véase, p. ej., Cancer Res 15 de enero de 2010, 70; 440).

Las composiciones que comprenden ADIr (p. ej., ADIr-PEG) y opcionalmente otros agentes terapéuticos, como se describe en el presente documento, pueden utilizarse en métodos terapéuticos para tratar el cáncer y en métodos para prevenir la metástasis de un cáncer. Por tanto, algunas realizaciones incluyen métodos para tratar, aliviar los síntomas de una variedad de diferentes cánceres o inhibir o prevenir su progresión. Algunas realizaciones incluyen métodos para tratar, aliviar los síntomas de la EICH o inhibir su progresión. Las realizaciones particulares incluyen métodos para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer o de la EICH en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de composición de ADIr como se describe en el presente documento, opcionalmente, después del tratamiento con ADI-PEG 20, en particular, cuando un paciente desarrolla anticuerpos anti-ADI-PEG 20, de este modo tratando, aliviando los síntomas o inhibiendo la progresión del cáncer o de la EICH. Por tanto, las composiciones de ADIr descritas en el presente documento pueden administrarse a un individuo aquejado de enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej. enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa), EICH o un cáncer, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular, leucemia (p. ej., leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide aguda recidivante), melanoma, incluyendo melanoma metastásico, sarcomas (incluyendo, pero sin limitación, sarcomas metastásicos, leiomiomas uterino), cáncer de páncreas, cáncer de próstata (tal como, pero sin limitación, cáncer de próstata resistente a hormonas), mesotelioma, leucemia linfática, leucemia mielógena crónica, linfoma, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico (incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma gástrico), glioma, glioblastoma multiforme, retinoblastoma, neuroblastoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón (incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células renales), cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello (incluyendo, pero sin limitación, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello; cáncer de lengua), cáncer cervicouterino, cáncer de testículo, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma y cáncer de estómago.

También se incluyen métodos de tratamiento, alivio de los síntomas o inhibición de la progresión de un cáncer en un paciente, que comprenden administrar al paciente una composición que comprende ADIr (p. ej., ADIr-PEG), y opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales, como se describe en el presente documento, en donde el cáncer es deficiente en ASS, ASL o ambas. En este sentido, la deficiencia de ASS o ASL puede ser una reducción de la expresión, medida por la expresión de ARNm o expresión de proteína, o puede ser una reducción de la actividad de la proteína, y en general comprende una reducción estadísticamente significativa de la expresión o actividad, según determine el experto en la técnica. La expresión o actividad reducida de ASS o ASL puede ser una reducción de la expresión o actividad de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o mayor, en comparación con la expresión o actividad en una muestra de control adecuada que se sabe que no tiene cáncer. En determinadas realizaciones, la expresión o actividad de ASS o ASL se reduce al menos dos veces en comparación con la expresión o actividad en una muestra de control sin cáncer.

En determinadas realizaciones, la expresión o actividad reducida de ASS o ASL es el resultado de la metilación del promotor de ASS o ASL o de la inhibición del promotor de ASS o ASL. En algunas realizaciones, la reducción de la expresión o actividad de ASS o ASL es resultado de una mutación de ADN (p. ej., una o más mutaciones puntuales, pequeñas deleciones, inserciones y similares) o una anomalía cromosómica que da lugar a la deleción del gen. En algunas realizaciones, el cáncer es negativo para ASS o ASL, lo que significa que no se observa expresión ni actividad.

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

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

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

También se incluyen métodos para tratar, aliviar los síntomas o inhibir la progresión de un cáncer en un paciente, que comprenden administrar al paciente una composición que comprende ADIr como se describe en el presente documento, (p. ej., ADIr-PEG, ADIr-PEG 20), junto con un inhibidor de la autofagia. Algunas realizaciones incluyen métodos para tratar el cáncer en un paciente, que comprenden administrar al paciente, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende ADIr como se describe en el presente documento junto con un inhibidor de la autofagia, en donde el cáncer es cáncer de páncreas o cáncer de pulmón microcítico.

Algunas realizaciones incluyen métodos de tratamiento donde la administración de las composiciones que comprenden ADIr, descritas en el presente documento, empobrecen la arginina en el plasma durante al menos un mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más. Determinadas realizaciones incluyen métodos de tratamiento donde la administración de las composiciones que comprenden ADIr, descritas en el presente documento, empobrecen la arginina en el plasma durante al menos un mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más, tras finalizar el tratamiento con ADI-PEG 20 después de la detección de anticuerpos anti-ADI-PEG 20.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1

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

En este ejemplo se describe la exploración y la selección de enzimas ADI que tienen baja reactividad cruzada con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente.

De una gran cantidad de enzimas ADI, en la tabla 1 se indican 27 de ellas, que se seleccionan con respecto a su porcentaje de identidad de secuencia en relación con la enzima ADI de *M. hominis*.

<b>Tabla 1. Secuencias de ADI seleccionadas con diversos grados de similitud respecto a la ADI de <i>M. hominis</i></b>			
ORGANISMO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD	NÚMERO DE REGISTRO DE SECUENCIA	SEQ ID NO:
<i>Mycoplasma hominis</i>	100,0	gi 728876	1
<i>Mycoplasma salivarium</i>	81,95	gi 639205998	2
<i>Mycoplasma spumans</i>	81,51	gi 652844751	3
<i>Mycoplasma canadense</i>	81,22	gi 780004832	20
<i>Mycoplasma auris</i>	78,54	gi 490558584	4
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	78,78	gi 738491959	5
<i>Mycoplasma cloacale</i>	78,97	gi 657216914	6
<i>Mycoplasma anseris</i>	78,73	gi 697347301	21
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	77,67	gi 488970417	7
<i>Mycoplasma orale</i>	79,27	gi 551316378	8
<i>Mycoplasma iners</i>	60,20	gi 657715567	9
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	59,1	gi 803632330	22
<i>Mycoplasma alvi</i>	58,46	gi 697091625	23
<i>Mycoplasma penetrans</i>	58,1	gi 768722109	24
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	58,06	gi 653082428	10
<i>Mycoplasma pirum</i>	56,05	gi 652846075	11

(continuación)

Tabla 1. Secuencias de ADI seleccionadas con diversos grados de similitud respecto a la ADI de <i>M. hominis</i>			
ORGANISMO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD	NÚMERO DE REGISTRO DE SECUENCIA	SEQ ID NO:
<i>Mycoplasma primatum</i>	56,86	gi 657716867	12
<i>Mycoplasma fermentans</i>	56,11	gi 753838319	25
<i>Mycoplasma lipofaciens</i>	55,64	gi 652840093	13
<i>Mycoplasma felifaucium</i>	55,85	gi 653084388	14
<i>Mycoplasma imitans</i>	53,85	gi 652843200	15
<i>Mycoplasma opalescens</i>	54,25	gi 659858924	16
<i>Mycoplasma moatsii</i>	50,24	gi 551314758	17
<i>Mycoplasma elephantis</i>	52,63	gi 653084064	18
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	51,97	gi 12643471	26
<i>Mycoplasma testudinis</i>	49,50	gi 652838532	19
<i>Mycoplasma sp. CAG:877</i>	39,28	gi 524101565	27
<i>Mycoplasma sp. CAG:472</i>	38,07	gi 524735679	28

Se caracterizó una serie de enzimas ADI de diversos organismos para determinar qué enzimas se esperaba que eliminaran y mantuvieran bajas concentraciones de arginina en la sangre de los pacientes, incluso en presencia de anticuerpos anti-ADI-PEG 20. Como se detalla a continuación, estos estudios muestran que la ADI de diversas especies, que están estrechamente relacionadas con *M. hominis*, en función de su identidad de secuencia, tienen propiedades catalíticas enzimáticas suficientemente buenas, medidas a diferentes temperaturas y pH, y también muestran una reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20.

10 Preparación de ADI. Las enzimas ADI recombinantes se clonaron, expresaron y purificaron para análisis según protocolos convencionales, como describen, por ejemplo, Gallego *et al.*, PLOS One, 7(10):e47886, 2012; Monstadt y Holldorf, Biochem. J. 273: 739-745, 1990; Joo Noh *et al.*, Molecules and Cells. 13:137-143, 2002; y Sugimura *et al.*, Infection and Immunity. 58:2510-2515, 1990.

15 Purificación de anticuerpos humanos anti-ADI-PEG20. El anticuerpo anti-ADI-PEG20 se purificó de muestras de plasma de pacientes que habían recibido ADI-PEG20 durante un estudio clínico. Por ejemplo, se agrupó un total de 60 ml de plasma de 8 pacientes diferentes que habían alcanzado un título alto (título  $\geq 4$ ) contra ADI-PEG20, determinado con un ensayo ELISA. Se utilizó una purificación de dos etapas, una cromatografía de proteína "A" (GE Healthcare) seguida de una cromatografía de afinidad de ADI. Se obtuvieron aproximadamente 20 mg de anticuerpo purificado y se conservaron a -80 °C en alícuotas hasta que se necesitó.

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

35 Los valores de Km y Kcat se determinaron utilizando una variación del ensayo de actividad descrito anteriormente. Al igual que con el ensayo de actividad (o a menos que se indique lo contrario), todas las reacciones se procesaron a 37 °C en PHB más BSA al 0,1 %. La concentración de enzima, el tiempo de reacción y el intervalo de concentración del sustrato, se ajustaron para cada una de las construcciones de ADI o ADIr con objeto de representar sus diferencias de actividad. En general, como condiciones de partida, se utilizó enzima 2 nM, tiempo de reacción de 5 minutos y arginina 0-160  $\mu$ M. Al optimizar las condiciones, se prestó especial atención a la cantidad de sustrato consumido como un porcentaje del sustrato total añadido a la reacción. Normalmente, el límite de detección inferior era de aproximadamente 1  $\mu$ M de citrulina, siendo el límite de cuantificación inferior de 2  $\mu$ M. Se procesó una curva patrón de citrulina en cada placa y se utilizó para cuantificar la citrulina producida por la reacción enzimática.

También se realizaron ensayos de actividad para evaluar la actividad enzimática en presencia de anti-ADI-PEG20 (perfiles de neutralización de anticuerpos). Estos ensayos se realizaron como se ha descrito anteriormente y en presencia de 640 nM, 320 nM, 160 nM, 80 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM y 0 nM de anticuerpos anti-ADI-PEG20.

- 5 Cálculos. La concentración de citrulina ( $\mu\text{M}$ ) producida en cada pocillo de reacción se calculó y se promedió utilizando la curva patrón de citrulina. La velocidad de cada reacción se calculó después en  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ADI}$  50 nM. La actividad específica (UI/mg o  $\mu\text{moles de producto}/\text{min}/\text{mg de ADI}$ ) se calculó multiplicando este valor por el factor "UI" (el factor UI se calculó a partir del peso molecular de la ADI y del volumen de reacción).

- 10 Los datos se muestran más adelante en las Tablas 2-7.

<b>Tabla 2. Secuencias y propiedades de ADI nativas seleccionadas</b>			
<b>Organismo</b>	<b>Actividad Específica (UI/mg)</b>	<b>Kcat (s-1)</b>	<b>Km (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<i>Mycoplasma hominis</i>	+	+	+
<i>Mycoplasma salivarium</i>	++	++	+
<i>Mycoplasma spumans</i>	+++	+++	+
<i>Mycoplasma canadense</i>	+	+	+
<i>Mycoplasma cloacale</i>	++	+	+
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	-	-	+
<i>Mycoplasma anseris</i>	+	-	+
<i>Mycoplasma auris</i>	+	-	+
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	++	++	-
<i>Mycoplasma iners</i>	++++	++++	+
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	+++	++	+
<i>Mycoplasma penetrans</i>	++	++	-
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	++++	+++	+
<i>Mycoplasma primum</i>	+++	+++	+
<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	-	ND
<i>Mycoplasma lipofaciens</i>	-	-	ND
<i>Mycoplasma opalescens</i>	++	++	-
<i>Mycoplasma imitans</i>	-	ND	ND
<i>Mycoplasma sp. CAG:877</i>	-	ND	ND
<i>Mycoplasma sp. CAG:472</i>	-	ND	ND

<b>Tabla 3. Secuencias y propiedades de PEG-ADI seleccionadas</b>			
<b>Organismo</b>	<b>Actividad Específica (UI/mg)</b>	<b>Kcat (s-1)</b>	<b>Km (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<i>Mycoplasma hominis</i>	+	+	+
<i>Mycoplasma salivarium</i>	++	++	+
<i>Mycoplasma spumans</i>	+++	+++	+
<i>Mycoplasma canadense</i>	++	++	-
<i>Mycoplasma cloacale</i>	++	++	+

(continuación)

<b>Tabla 3. Secuencias y propiedades de PEG-ADI seleccionadas</b>			
<b>Organismo</b>	<b>Actividad Específica (UI/mg)</b>	<b>Kcat (s-1)</b>	<b>Km (uM)</b>
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	-	+	ND
<i>Mycoplasma anseris</i>	++	++	-
<i>Mycoplasma auris</i>	++	++	-
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	-	+	ND
<i>Mycoplasma iners</i>	++++	++++	+
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	+++	++	+
<i>Mycoplasma penetrans</i>	+	+	-
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	++++	++++	+
<i>Mycoplasma primatum</i>	+++	+++	+
<i>Mycoplasma opalescens</i>	-	ND	ND

<b>Tabla 4. Secuencias y propiedades de ADI nativas seleccionadas</b>								
<b>Organismo</b>	<b>Actividad específica a la concentración de Ab indicada contra <math>\alpha</math>-ADI (nM)*</b>							
	<b>640</b>	<b>320</b>	<b>160</b>	<b>80</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
<i>Mycoplasma hominis</i>	ND	33	39	59	76	86	94	100
<i>Mycoplasma salivarium</i>	25	49	69	84	92	96	96	100
<i>Mycoplasma spumans</i>	42	59	76	87	95	96	98	100
<i>Mycoplasma canadense</i>	27	56	89	104	121	122	113	100
<i>Mycoplasma cloacale</i>	24	50	72	85	95	98	98	100
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	22	47	72	83	101	100	91	100
<i>Mycoplasma anseris</i>	39	60	90	99	109	106	106	100
<i>Mycoplasma auris</i>	45	64	81	90	95	99	100	100
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	27	48	71	83	92	94	95	100
<i>Mycoplasma iners</i>	63	80	89	93	96	98	99	100
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	64	90	104	101	110	101	112	100
<i>Mycoplasma penetrans</i>	67	86	91	90	89	106	100	100
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	67	82	89	94	96	96	97	100
<i>Mycoplasma primatum</i>	64	79	89	94	98	99	99	100
<i>Mycoplasma opalescens</i>	66	91	95	102	106	106	104	100

\*Indicado como porcentaje (%) de actividad específica (UI/mg) en relación con la actividad sin anticuerpo (0 nM)

<b>Tabla 5. Secuencias y propiedades de PEG-ADI seleccionadas</b>								
<b>Organismo</b>	<b>Actividad específica a la concentración de Ab indicada contra <math>\alpha</math>-ADI (nM)*</b>							
	<b>640</b>	<b>320</b>	<b>160</b>	<b>80</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
<i>Mycoplasma hominis</i>	ND	53	64	77	89	93	94	100
<i>Mycoplasma salivarium</i>	43	59	77	85	91	94	95	100

(continuación)

Tabla 5. Secuencias y propiedades de PEG-ADI seleccionadas								
Organismo	Actividad específica a la concentración de Ab indicada contra $\alpha$ -ADI (nM)*							
	640	320	160	80	40	20	10	0
<i>Mycoplasma spumans</i>	58	72	83	91	97	97	99	100
<i>Mycoplasma canadense</i>	42	62	79	94	91	92	95	100
<i>Mycoplasma cloacale</i>	31	52	72	82	93	95	95	100
<i>Mycoplasma anseris</i>	41	59	71	91	93	93	99	100
<i>Mycoplasma auris</i>	56	70	82	88	93	95	96	100
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	42	59	78	87	92	97	98	100
<i>Mycoplasma iners</i>	65	84	92	94	98	99	94	100
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	56	79	93	101	106	105	107	100
<i>Mycoplasma penetrans</i>	69	85	93	101	104	104	105	100
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	62	77	87	91	94	99	100	100
<i>Mycoplasma primatum</i>	65	80	86	91	93	96	98	100
* Se indica como porcentaje (%) de actividad específica (UI/mg) en relación con la actividad sin anticuerpo (0 nM)								

Tabla 6. Secuencias y propiedades de ADI nativas seleccionadas								
Organismo	Actividad específica* a la temperatura indicada							
	20 °C	24 °C	28 °C	32 °C	37 °C	40 °C	44 °C	48 °C
<i>Mycoplasma hominis</i>	37	50	66	85	100	105	103	80
<i>Mycoplasma salivarium</i>	20	32	46	69	100	120	147	168
<i>Mycoplasma spumans</i>	25	38	53	75	100	118	135	135
<i>Mycoplasma canadense</i>	21	32	43	74	100	127	160	185
<i>Mycoplasma cloacale</i>	17	28	44	65	100	124	147	180
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	16	26	41	64	100	104	126	124
<i>Mycoplasma anseris</i>	17	23	44	60	100	128	159	179
<i>Mycoplasma auris</i>	18	29	44	67	100	122	157	174
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	20	31	45	67	100	119	146	160
<i>Mycoplasma iners</i>	36	52	63	78	100	125	142	191
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	40	49	60	75	100	95	58	20
<i>Mycoplasma penetrans</i>	53	52	67	74	100	108	118	114
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	41	51	67	81	100	119	145	171
<i>Mycoplasma primatum</i>	31	46	60	79	100	116	124	128
<i>Mycoplasma opalescens</i>	29	35	47	66	100	106	135	132
* Se indica como porcentaje (%) de actividad específica (UI/mg) en relación con la actividad a 37 °C								

Tabla 7. Secuencias y propiedades de ADI nativas seleccionadas												
Organismo	Actividad Específica* al pH Indicado											
	2,4	3,2	4	4,8	5,6	6,4	7	7,6	8,4	9,2	10	10,4
<i>Mycoplasma hominis</i>	5	6	17	66	94	71	88	58	17	26	18	5
<i>Mycoplasma salivarium</i>	1	1	1	55	124	132	114	82	46	59	40	10
<b><i>Mycoplasma spumans</i></b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>58</b>	<b>117</b>	<b>119</b>	<b>108</b>	<b>84</b>	<b>44</b>	<b>62</b>	<b>45</b>	<b>10</b>
<b><i>Mycoplasma canadense</i></b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>67</b>	<b>148</b>	<b>149</b>	<b>144</b>	<b>96</b>	<b>47</b>	<b>67</b>	<b>49</b>	<b>20</b>
<b><i>Mycoplasma cloacale</i></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>43</b>	<b>126</b>	<b>130</b>	<b>113</b>	<b>86</b>	<b>46</b>	<b>64</b>	<b>46</b>	<b>13</b>
<b><i>Mycoplasma hyosynoviae</i></b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>22</b>	<b>124</b>	<b>132</b>	<b>117</b>	<b>85</b>	<b>41</b>	<b>39</b>	<b>26</b>	<b>6</b>
<b><i>Mycoplasma anseris</i></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>51</b>	<b>159</b>	<b>171</b>	<b>135</b>	<b>108</b>	<b>55</b>	<b>82</b>	<b>59</b>	<b>22</b>
<b><i>Mycoplasma auris</i></b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>87</b>	<b>92</b>	<b>98</b>	<b>87</b>	<b>50</b>	<b>69</b>	<b>48</b>	<b>4</b>
<b><i>Mycoplasma alkalescens</i></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>38</b>	<b>113</b>	<b>123</b>	<b>106</b>	<b>78</b>	<b>38</b>	<b>53</b>	<b>35</b>	<b>7</b>
<b><i>Mycoplasma iners</i></b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>32</b>	<b>76</b>	<b>83</b>	<b>84</b>	<b>78</b>	<b>45</b>	<b>66</b>	<b>55</b>	<b>26</b>
<b><i>Mycoplasma meleagridis</i></b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>84</b>	<b>90</b>	<b>103</b>	<b>98</b>	<b>46</b>	<b>55</b>	<b>40</b>	<b>5</b>
<b><i>Mycoplasma penetrans</i></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>41</b>	<b>123</b>	<b>130</b>	<b>129</b>	<b>100</b>	<b>42</b>	<b>64</b>	<b>51</b>	<b>14</b>
<b><i>Mycoplasma gallinarum</i></b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>18</b>	<b>36</b>	<b>91</b>	<b>90</b>	<b>104</b>	<b>92</b>	<b>50</b>	<b>69</b>	<b>56</b>	<b>26</b>
<b><i>Mycoplasma primum</i></b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>27</b>	<b>81</b>	<b>94</b>	<b>99</b>	<b>92</b>	<b>50</b>	<b>76</b>	<b>60</b>	<b>17</b>
<b><i>Mycoplasma opalescens</i></b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>83</b>	<b>97</b>	<b>115</b>	<b>93</b>	<b>51</b>	<b>84</b>	<b>65</b>	<b>23</b>
* Indicado como porcentaje (%) de actividad específica (UI/mg) en relación con la actividad a pH 7,4												

Estos datos muestran, entre otras cosas, que las enzimas ADI nativas y PEGiladas, que son sumamente homólogas a las ADI de *M. hominis* (aproximadamente un 50-100 por ciento de identidad), conservaron una excelente actividad catalítica (Tablas 2-4), incluso a varias condiciones definidas de pH (Tabla 6) y temperatura (Tabla 7). También mostraron una afinidad reducida hacia los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, medida por la actividad enzimática (aumentada) en presencia de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 (Tablas 4-5), por ejemplo, en relación con la de *Mycoplasma hominis*. En consecuencia, estas enzimas ADI pueden tener utilidad terapéutica para su uso en terapia para el tratamiento del cáncer, ya sean solas o después de tratamiento con ADI-PEG 20, para prolongar y/o aumentar la eficacia de la terapia de empobrecimiento de arginina.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Polaris Group Showalter, Richard E. Almassy, Robert Thomson, James A. Sisson, Wes Shia, Wei-Jong Chen, Li-Chang Lee, Yang

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

<130> POLA-005/01WO

<150> US 62.051.182

<151> 16/09/2014

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 409

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hominis*

<400> 1

# ES 2 915 382 T3

Met	Ser	Val	Phe	Asp	Ser	Lys	Phe	Asn	Gly	Ile	His	Val	Tyr	Ser	Glu
1				5					10					15	
Ile	Gly	Glu	Leu	Glu	Thr	Val	Leu	Val	His	Glu	Pro	Gly	Arg	Glu	Ile
			20					25					30		
Asp	Tyr	Ile	Thr	Pro	Ala	Arg	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Phe	Ser	Ala	Ile
		35					40					45			
Leu	Glu	Ser	His	Asp	Ala	Arg	Lys	Glu	His	Gln	Ser	Phe	Val	Lys	Ile
	50					55					60				
Met	Lys	Asp	Arg	Gly	Ile	Asn	Val	Val	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Ala
65					70					75					80
Glu	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ala	Ser	Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Phe	Ile	Glu
				85					90					95	
Thr	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Val	Pro	Val	Leu	Thr	Glu	Ala	Asn	Lys	Lys
			100					105					110		
Ala	Val	Arg	Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Lys	Pro	Thr	His	Glu	Met	Val	Glu
		115					120					125			
Phe	Met	Met	Ser	Gly	Ile	Thr	Lys	Tyr	Glu	Leu	Gly	Val	Glu	Ser	Glu



# ES 2 915 382 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 Pro Ile Glu Gly	Gly Asp Val Phe Ile	Tyr Asn Asn Glu Thr	Leu	
	210	215	220	
Val Val Gly Val Ser	Glu Arg Thr Asp Leu	Asp Thr Ile Thr Leu	Leu	
	225	230	235	240
Ala Lys Asn Ile Lys	Ala Asn Lys Glu Val	Glu Phe Lys Arg Ile	Val	
	245	250	255	
Ala Ile Asn Val Pro	Lys Trp Thr Asn Leu	Met His Leu Asp Thr	Trp	
	260	265	270	
Leu Thr Met Leu Asp	Lys Asn Lys Phe Leu	Tyr Ser Pro Ile Ala	Asn	
	275	280	285	
Asp Val Phe Lys Phe	Trp Asp Tyr Asp Leu	Val Asn Gly Gly Ala	Glu	
	290	295	300	
Pro Gln Pro Gln Leu	Asn Gly Leu Pro Leu	Asp Lys Leu Leu Ala	Ser	
	305	310	315	320
Ile Ile Asn Lys Glu	Pro Val Leu Ile Pro	Ile Gly Gly Ala Gly	Ala	
	325	330	335	
Thr Glu Met Glu Ile	Ala Arg Glu Thr Asn	Phe Asp Gly Thr Asn	Tyr	
	340	345	350	
Leu Ala Ile Lys Pro	Gly Leu Val Ile Gly	Tyr Asp Arg Asn Glu	Lys	
	355	360	365	
Thr Asn Ala Ala Leu	Lys Ala Ala Gly Ile	Thr Val Leu Pro Phe	His	
	370	375	380	

# ES 2 915 382 T3

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

<210> 2  
<211> 410  
<212> PRT  
<213> *Mycoplasma salivarium*  
<400> 2

Met Ser Val Phe Ser 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 Lys Glu Ile  
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Asp Arg 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 Ile Phe Asn  
180 185 190

# ES 2 915 382 T3

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

<210> 3

<211> 411

<212> PRT

<213> *Mycoplasma spumans*

<400> 3

# ES 2 915 382 T3

Met	Ser	Val	Phe	Asp	Ser	Lys	Phe	Lys	Gly	Ile	His	Val	Tyr	Ser	Glu	1	5	10	15
Ile	Gly	Glu	Leu	Glu	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	Gly	Phe	Val	Ala	Glu	50	55	60	
Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Val	Asn	Val	Ile	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Ala	65	70	75	80
Glu	Thr	Tyr	Glu	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Ala	Gln	Ala	Lys	Leu	Ile	Glu	85	90	95	
Asp	Phe	Ile	Glu	Asp	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	Asn	Ala	Glu	Glu	Ala	Gln	100	105	110	
Ala	Val	Arg	Lys	Phe	Leu	Ser	Glu	Arg	Lys	Ser	Thr	Arg	Glu	Met	Val	115	120	125	
Glu	Tyr	Met	Met	Ser	Gly	Leu	Thr	Lys	Tyr	Glu	Leu	Gly	Leu	Glu	Ser	130	135	140	
Ala	Asp	Arg	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	145	150	155	160
Arg	Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	His	Tyr	Met	165	170	175	
Lys	Tyr	Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Phe	Ala	Lys	Phe	Val	Phe	180	185	190	
Ser	Asn	His	Pro	Lys	Leu	Val	Asn	Thr	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ser	195	200	205	
Met	Lys	Leu	Pro	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Tyr	Asn	Asn	Glu	210	215	220	
Thr	Leu	Val	Val	Gly	Cys	Ser	Glu	Arg	Thr	Glu	Leu	Glu	Thr	Ile	Thr	225	230	235	240
Leu	Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	Phe	Lys	Arg	245	250	255	

# ES 2 915 382 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4  
<211> 410  
<212> PRT  
<213> *Mycoplasma auris*

<400> 4

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 Arg Glu Ile  
20 25 30

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

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

# ES 2 915 382 T3

Leu	Lys	Ala	Asn	Asp	Ile	Asn	Val	Val	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Ala	65	70	75	80
Glu	Thr	Tyr	Asp	Leu	Val	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Asp	Lys	Leu	Ile	Glu	85	90	95	
Glu	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Tyr	Pro	Val	Leu	Thr	Glu	Glu	His	Lys	Lys	100	105	110	
Ala	Val	Arg	Ser	Phe	Leu	Lys	Ser	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Glu	Leu	Ile	115	120	125	
Glu	Tyr	Met	Met	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	Tyr	Asp	Leu	Gly	Ile	Glu	Ala	130	135	140	
Glu	Gly	Asp	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	Ile	Phe	Asp	180	185	190	
Asn	His	Pro	Lys	Leu	Val	Asn	Thr	Pro	Arg	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	Met	Gly	Val	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	Leu	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	225	230	235	240
Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	Asn	Lys	Glu	Cys	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile	245	250	255	
Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	His	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	Tyr	Phe	Lys	Phe	Trp	Asp	Tyr	Asp	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Ala	290	295	300	
Glu	Pro	Gln	Pro	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Pro	Leu	Asp	Lys	Leu	Leu	Glu	305	310	315	320

# ES 2 915 382 T3

Ser Ile Ile His Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly  
325 330 335

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

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

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

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

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

<210> 5  
<211> 410  
<212> PRT  
<213> *Mycoplasma hyosynoviae*

<400> 5

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

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

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

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

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

Glu Thr Ile Asp Leu Val Asp Ala Lys Lys Lys Glu Ala Leu Ile Asp  
85 90 95

Glu Tyr Ile Glu Asp Ser Glu Pro Val Val Asp Ala Lys Val Lys Pro  
100 105 110

Leu Val Lys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Lys Asp Thr Lys Glu Leu Val  
115 120 125

# ES 2 915 382 T3

Lys Leu Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Glu Ile Glu Ser  
 130 135 140  
 Glu Lys Glu Leu Ile Ile 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 Arg  
 180 185 190  
 Asn His Pro Lys Leu Thr Ser Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met  
 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 Asp 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 Ile Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ser  
 290 295 300  
 Glu Pro Gln Pro Lys Asp Asn Gly Leu Pro Leu Glu Lys Leu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Ser Ile Ile Gly Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Cys Cys  
 325 330 335  
 Ala Ser Asp Ile Glu Ile Ala Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn  
 340 345 350  
 Tyr Leu Ala Ile Lys Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ala Arg Asn Glu  
 355 360 365  
 Lys Thr Asn Lys Ala Leu Glu Lys Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe



# ES 2 915 382 T3

370

375

380

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

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

<210> 6

<211> 409

<212> PRT

<213> *Mycoplasma cloacale*

<400> 6

5

# ES 2 915 382 T3

Met	Ser	Val	Phe	Asp	Lys	Arg	Phe	Lys	Gly	Ile	His	Val	Tyr	Ser	Glu
1				5					10					15	
Ile	Gly	Glu	Leu	Gln	Thr	Val	Leu	Val	His	Glu	Pro	Gly	Arg	Glu	Ile
			20					25					30		
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	Lys	Ile
	50					55					60				
Leu	Glu	Ser	Gln	Gly	Ile	Asn	Val	Val	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Ile	Ala
65					70					75					80
Glu	Thr	Tyr	Glu	Leu	Ala	Ser	Glu	Glu	Ala	Lys	Asp	Asn	Leu	Ile	Glu
				85					90					95	
Glu	Phe	Leu	Asp	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	Ser	Glu	Glu	His	Arg	Ile
			100					105					110		
Leu	Val	Arg	Asn	Phe	Leu	Lys	Gly	Ile	Thr	Lys	Thr	Lys	Glu	Leu	Val
		115					120					125			
Lys	Met	Met	Met	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	Tyr	Asp	Leu	Gly	Ile	Glu	Ala
	130					135					140				
Asp	Arg	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	Ile	Phe	Glu

ES 2 915 382 T3

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

<210> 7  
<211> 412  
<212> PRT  
<213> *Mycoplasma alkalescens*

# ES 2 915 382 T3

<400> 7

```

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 His Glu Ile
20           25           30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ser Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Met
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 Asn Val Asn Val Ile Glu Leu Thr 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 Asn Lys Ile
100          105          110

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

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

Cys Lys Cys Gln Asp Leu Val Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe
145          150          155          160

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

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

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

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

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

```

# ES 2 915 382 T3

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

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

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

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

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

Leu Glu Ser Ile Ile His Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Gly Gly  
325 330 335

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

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

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

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

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

<210> 8  
<211> 410  
5 <212> PRT  
<213> *Mycoplasma orale*  
<400> 8

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

Ile Gly Asp Leu Glu Ser 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

# ES 2 915 382 T3

Leu Glu Ser Thr Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Glu Ile  
 50 55 60  
 Leu Lys Lys Gln Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Val Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Tyr Asn Leu Val Asp Lys Lys Thr Gln Glu Lys Leu Leu Lys  
 85 90 95  
 Asp Phe Leu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Pro Glu His Arg Lys  
 100 105 110  
 Ala Val Glu Lys Phe Leu Lys Ser Leu Lys Ser Thr Lys Glu Leu Ile  
 115 120 125  
 Gln Tyr Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Lys Ala  
 130 135 140  
 Asp Lys 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 Lys Phe Ile Phe Thr  
 180 185 190  
 Asn His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met  
 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 Glu 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 Ser  
 290 295 300

# ES 2 915 382 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 401

<212> PRT

<213> *Mycoplasma iners*

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Val Leu Ser Lys Asp Met Arg Ala Lys Val Lys Asn Tyr Ile  
100 105 110

5

10

# ES 2 915 382 T3

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



# ES 2 915 382 T3

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

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

Lys

<210> 10

<211> 401

<212> PRT

<213> *Mycoplasma gallinarum*

<400> 10

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

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

Leu Glu Glu Leu Leu Phe Ser Ala Val Leu Glu Pro Asn Ala Ala Ile  
35 40 45

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

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

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

Thr Pro Ala Leu Ser Ala Glu Asn Arg Glu Arg Ala Lys Lys Tyr Ile  
100 105 110

Leu Ser Leu Glu Met Gln Pro Val Lys Met Ile Arg Thr Met Met Ala  
115 120 125

Gly Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Asn Val Glu Ser Asn Ile Glu Leu Ile  
130 135 140

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

Ala Gly Asn Gly Ile Ser Leu Asn Asn Met Lys Tyr Val Val Arg Lys  
165 170 175

5

10

# ES 2 915 382 T3

Arg Glu Thr Ile Phe Ala Glu Phe Ile Phe Ala Ile His Pro Glu Tyr  
180 185 190

Lys Glu Thr Pro His Trp Phe Asp Arg Leu Asp His Gly Ser Ile Glu  
195 200 205

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

Ser Glu Arg Thr Asn Lys Glu Ala Ile Ile Thr Ile Ala Lys His Ile  
225 230 235 240

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

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

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

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

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

Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly Ala Ser Gln Leu Asp Ile Asp Ile  
325 330 335

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

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

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

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

Lys

<210> 11  
<211> 405  
<212> PRT  
<213> *Mycoplasma pirum*  
<400> 11

# ES 2 915 382 T3

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

# ES 2 915 382 T3

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

<210> 12  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> *Mycoplasma primatum*

<400> 12

# ES 2 915 382 T3

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

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

Ser Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Pro Lys Ser

# ES 2 915 382 T3

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

# ES 2 915 382 T3

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

Glu Ile Ser Gly Ser Leu Glu Glu Ile Leu Thr Tyr Ile Ile Gly Lys  
305 310 315 320

Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Gly Ala Ser Gln Phe Glu  
325 330 335

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

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

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

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

Glu Asp Val Lys

<210> 13

<211> 401

<212> PRT

<213> *Mycoplasma lipofaciens*

<400> 13

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

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

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

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

Val Ile Gln Leu Asp Glu Leu Val Ser Glu Thr Trp Glu Lys Ala Thr  
65 70 75 80

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

5

10

# ES 2 915 382 T3

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

Ser Leu Asn Pro Val Lys Lys Met Val Arg Thr Met Met Ala Gly Ile  
 115 120 125

Asp Lys Lys Glu Leu Lys Ile Glu Leu Asp Arg Asp Leu Val Val Asp  
 130 135 140

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

Asn Gly Ile Ser Leu Asn Asn Met Lys Tyr Val Thr Arg Lys Arg Glu  
 165 170 175

Thr Ile Phe Ala Glu Phe Ile Phe Asn Ile His Pro Asp Tyr Lys Thr  
 180 185 190

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

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

Arg Thr Asn Lys Asp Ala Val Met Thr Ile Ala Lys His Ile Gln Ser  
 225 230 235 240

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

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

Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys Ile Trp  
 275 280 285

Glu Ile Asp Leu Thr Pro Gly Lys Glu Ile Glu Met Val Glu Ser Thr  
 290 295 300

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

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

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



# ES 2 915 382 T3

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

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

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

Lys

<210> 14

<211> 405

<212> PRT

<213> *Mycoplasma felifaucium*

<400> 14

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

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

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

Lys Glu His Thr Ala Phe Cys Glu Ile Leu Lys Glu Asn Gly Ile Lys  
50 55 60

Ala Ile Gln Leu Val Asp Leu Val Ser Asp Thr Trp Arg Ile Ala Ser  
65 70 75 80

Glu Lys Ala Lys Thr Glu Phe Ile Glu Arg Trp Leu Asp Glu Cys Glu  
85 90 95

Pro Lys Leu Asp Ser Asn Leu Arg Glu Ile Val Arg Lys His Ile Tyr  
100 105 110

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

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

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

5

10

# ES 2 915 382 T3

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

# ES 2 915 382 T3

<211> 404  
 <212> PRT  
 <213> *Mycoplasma imitans*

5 <400> 15

```

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

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

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

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

Glu Cys Val Gln Leu Thr Thr Leu Thr Ala Gln Thr Phe Gln Ser Ala
65           70           75           80

Thr Ser Glu Val Lys Glu Lys Phe Ile Asn Arg Trp Leu Asp Glu Cys
      85           90           95

Leu Pro Lys Leu Ser Asp Asp Asn Arg Ile Lys Val Tyr Ala Tyr Leu
      100          105          110

Lys Asp Leu Ser Ser Asp Pro Glu Val Met Ile Arg Lys Met Met Ser
      115          120          125

Gly Ile Leu Ala Lys Glu Val Asn Val Gln Ser Asp Val Glu Leu Ile
      130          135          140

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

Ile Gly Lys Gly Val Thr Leu His Ser Met Phe His Pro Thr Arg Lys
      165          170          175

Arg Glu Thr Ile Phe Ala Asp Phe Val Phe Ser His His Pro Glu Tyr
      180          185          190

Lys Gln Thr Pro Lys Tyr Tyr Ser Arg Leu Asn Glu Tyr Ser Ile Glu
      195          200          205

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

```

# ES 2 915 382 T3

Ser Glu Arg Thr Glu Lys Lys Ala Ile Gln Phe Leu Ala Glu Lys Leu  
225 230 235 240

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

Pro Lys Met Ser Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu  
260 265 270

Asp Tyr Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Met Gly Val Leu Lys  
275 280 285

Ile Trp Glu Ile Asp Leu Thr His Glu Gln Leu Ser Trp Arg Glu Leu  
290 295 300

Asn Glu Ser Leu Glu Glu Phe Leu Ser Met Val Ile Gly Lys Lys Ala  
305 310 315 320

Thr Thr Ile Pro Val Ala Gly Glu Asp Ser Thr Gln Ile Glu Ile Asp  
325 330 335

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

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

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

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

Ile Lys Lys Gly

<210> 16

<211> 401

<212> PRT

<213> *Mycoplasma opalescens*

<400> 16

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

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

ES 2 915 382 T3

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

# ES 2 915 382 T3

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

Lys

<210> 17  
 <211> 431  
 <212> PRT  
 <213> *Mycoplasma moatsii*  
 <400> 17

# ES 2 915 382 T3

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

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

Leu Lys Tyr Val Thr Pro Gln Arg Met Asp Glu Leu Leu Met Ser Ala  
35 40 45

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

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

Ala Glu Met Tyr Asp Ser Leu Thr Pro Ser Glu Lys Asp Ala Phe Leu

# ES 2 915 382 T3

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



Leu Ala Asp Ile Leu Ala Lys Ile Val Gly Lys Lys Val Arg Met Ile  
340 345 350

Pro Ile Gly Gly Lys Asp Gly Asn Gln Met Asp Ile Asp Ile Glu Thr  
355 360 365

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

Gly Tyr His Arg Asn Arg Lys Thr Gln Lys Ala Leu Glu Glu Ala Gly  
385 390 395 400

Val Lys Val Leu Ala Phe Gln Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly  
405 410 415

Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Glu Val Lys  
420 425 430

<210> 18

<211> 399

<212> PRT

<213> *Mycoplasma elephantis*

<400> 18

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

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

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

Lys Glu His Lys Ser Phe Val Lys Ile Leu Glu Glu Asn Asn Val Lys  
50 55 60

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

Lys Glu Ala Lys Asn Ile Phe Ile Asn Lys Trp Ile Glu Glu Ala Gln  
85 90 95

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

Lys Ser Lys Thr Pro Leu Glu Ile Ile Asp Ile Met Met Lys Gly Ile  
115 120 125

5

10

# ES 2 915 382 T3

Leu Lys Gln Glu Leu Gly Ile Glu Tyr Lys His Glu Leu Ile Ile Asp  
 130 135 140  
 Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Thr Ser Met Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ile Thr Ile Asn Asn Met Lys Tyr Gln Thr Arg Lys Arg Glu  
 165 170 175  
 Thr Ile Phe Ser Glu Phe Ile Phe Asn Asn His Pro Lys Tyr Lys Asn  
 180 185 190  
 Thr Pro Arg Trp Phe Asp Arg Phe Asp Ser Gly Asn Ile Glu Gly Gly  
 195 200 205  
 Asp Leu Phe Val Tyr Thr Lys Glu Thr Ile Val Val Gly Val Ser Glu  
 210 215 220  
 Arg Thr Lys Lys Lys Ala Ile Leu Lys Ile Ala Lys Asn Ile Gln Glu  
 225 230 235 240  
 Asn Asn Asn Ser Phe Lys Lys Ile Val Val Ile Lys Val Pro Ile Met  
 245 250 255  
 Gln Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Ile Val Met Val Asp Phe Asp  
 260 265 270  
 Lys Phe Ile Tyr Ser Pro Asn Val Thr Lys Ser Leu Lys Phe Trp Glu  
 275 280 285  
 Ile Asp Leu Thr Lys Lys Pro Lys Phe Ile Gln Leu Lys Asn Glu Thr  
 290 295 300  
 Leu Glu Asp Val Leu Tyr Arg Val Ile Gly Lys Lys Pro Ile Leu Ile  
 305 310 315 320  
 Pro Val Ala Gly Glu Asn Ala Asn Gln Ile Asp Ile Asp Val Glu Thr  
 325 330 335  
 His Phe Asp Ala Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Arg Pro Gly Val Val Val  
 340 345 350  
 Gly Tyr Ser Arg Asn Lys Lys Thr Glu Glu Ala Leu Ile Asn Ala Gly  
 355 360 365  
 Val Lys Val Tyr Ala Phe Glu Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly  
 370 375 380

# ES 2 915 382 T3

Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ile Arg Glu Asp Ile Ile  
385 390 395

<210> 19  
<211> 399  
<212> PRT  
<213> *Mycoplasma testudinis*  
<400> 19

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

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

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

Lys Glu His Leu Lys Phe Ile Lys Ile Leu Asn Asp Tyr Gly Val Lys  
50 55 60

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

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

Pro Lys Leu Thr Asp Lys Asn Arg Met Ile Leu Arg Asn Tyr Leu Thr  
100 105 110

Gln Phe Ser Thr Lys Ala Met Ile Arg Lys Met Ile Ser Gly Ile Arg  
115 120 125

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

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

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

Leu Leu Thr Glu Phe Ile Phe Gln Asn His Pro Lys Tyr Lys Asp Val  
180 185 190

Ile Lys Tyr Phe Asp Ser Lys Asn Ser Lys Ala Thr Ile Glu Gly Gly  
195 200 205

# ES 2 915 382 T3

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

<210> 20  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> *Mycoplasma canadense*

<400> 20

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 2 915 382 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 Ser Glu  
 50 55 60  
 Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Thr 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 Ala  
 100 105 110  
 Ile Val Arg Lys Tyr Leu Lys Gly Ile Gln Pro Thr Arg Lys Leu Ile  
 115 120 125  
 Glu Met Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala  
 130 135 140  
 Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg  
 165 170 175  
 Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser  
 180 185 190  
 Asn His Pro Lys Leu Val Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu  
 195 200 205  
 Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Val 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 2 915 382 T3

Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ser  
 290 295 300  
 Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly  
 325 330 335  
 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> 21  
 <211> 409  
 <212> PRT  
 <213> *Mycoplasma anseris*

<400> 21

Met Ser Val Phe Asp Lys Arg Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Glu Leu Gln Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile  
 20 25 30  
 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 Ala Glu His Lys Lys Phe Val Ala Thr  
 50 55 60  
 Leu Lys Glu Gln Gly Ile Asn Thr Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Arg Asp Asn Leu Leu Glu  
 85 90 95

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

Ile Val Arg Thr Tyr Leu Lys Gly Ile Lys Gly Thr Arg Lys Leu Ile  
 115 120 125

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

Glu Gln 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 Ile Phe Ser  
 180 185 190

Asn His Pro Gln Leu Val Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asn 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 Glu 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 Thr Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala  
 275 280 285

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

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

Ser Ile Ile Gly Glu Glu Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Asp Gly  
 325 330 335

Ala Thr Gln Ile Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn

ES 2 915 382 T3

[illegible]

<210> 22  
<211> 401  
<212> PRT  
<213> *Mycoplasma meleagridis*  
<400> 22



# ES 2 915 382 T3

Met	Ser	Lys	Ile	Asn	Val	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Val	Leu	Lys	Glu	Val
1				5					10					15	
Leu	Val	His	Thr	Pro	Gly	Asp	Glu	Ile	Arg	Arg	Ile	Ser	Pro	Ser	Arg
			20					25					30		
Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Phe	Ser	Ala	Ile	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Ala	Ile
		35					40					45			
Lys	Glu	His	Gln	Ser	Phe	Val	Lys	Ile	Leu	Gln	Asp	Arg	Gly	Ile	Lys
	50					55					60				
Val	Ile	Gln	Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ala	Glu	Thr	Tyr	Val	Lys	Tyr	Ala
65					70					75					80
Thr	Ser	Lys	Glu	Lys	Glu	Ser	Phe	Ile	Glu	Lys	Trp	Leu	Asp	Glu	Ala
				85					90					95	
Thr	Pro	Ala	Leu	Asn	Ser	Glu	Asn	Arg	Ala	Arg	Val	Lys	Asn	Tyr	Ile
			100					105					110		
Thr	Ala	Met	Gln	Gly	Gln	Pro	Val	Lys	Met	Val	Arg	Ala	Met	Met	Ala
		115					120					125			
Gly	Val	Ser	Lys	Gln	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Ser	Asp	Val	Glu	Leu	Ile
	130					135					140				
Val	Asp	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Asp	Pro	Phe	Ala	Ser

# ES 2 915 382 T3

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

## Lys

<210> 23  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> *Mycoplasma alvi*

<400> 23

```

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

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

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

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

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

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

Asn Glu Ala Thr Pro Lys Leu Thr Ser Glu Leu Ser Lys Lys Val Tyr
 100         105         110

Asp Phe Leu Thr Lys Gln Lys Ser Asn Arg Glu Met Val Asp Phe Met
 115         120         125

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

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

Ala Ser Val Gly Asn Gly Ala Thr Ile His Trp Met Lys His Asn Val
 165         170         175

Arg Arg Arg Glu Val Leu Phe Ala Asn Phe Ile Phe Lys Tyr Asn Glu
 180         185         190

Arg Phe Gln Asn Thr Pro Lys Tyr Ile Thr Pro Thr Lys Gly Leu Asp
 195         200         205

```

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

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

Asn Ile Ser Lys Asn Lys Glu Cys Thr Phe Thr Lys Ile Tyr Ala Ile  
245 250 255

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

Met Leu Asp Tyr Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val  
275 280 285

Leu Lys Val Trp Glu Ile Asn Ile Ser Asn Asn Lys Val Ser Ala Pro  
290 295 300

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

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

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

Glu Pro Gly Val Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Lys Lys Thr Glu Glu  
355 360 365

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

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

Arg Glu Asp Val

<210> 24

<211> 410

<212> PRT

<213> *Mycoplasma penetrans*

<400> 24

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

# ES 2 915 382 T3

Ser Glu Ile Gly Glu Leu Lys Glu Val Leu Val His Thr Pro Gly Asp  
 20 25 30  
 Glu Ile Arg Tyr Thr Ala Pro Ser Arg Leu Glu Glu Leu Leu Phe Ser  
 35 40 45  
 Ala Val Leu Lys Ala Asp Thr Ala Ile Glu Glu His Lys Gly Phe Val  
 50 55 60  
 Lys Ile Leu Gln Asn Asn Gly Ile Lys Val Ile Gln Leu Cys Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Val Ala Glu Thr Tyr Glu Leu Cys Ser Lys Glu Val Arg Asn Ser Phe  
 85 90 95  
 Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Glu Ala Leu Pro Val Leu Lys Lys Glu Ile  
 100 105 110  
 Arg Pro Val Val Lys Asp Tyr Leu Leu Ser Phe Pro Thr Val Gln Met  
 115 120 125  
 Val Arg Lys Met Met Ser Gly Ile Leu Ala Asn Glu Leu Asn Ile Lys  
 130 135 140  
 Gln Asp Asn Pro Leu Ile Ile Asp Gly Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr  
 145 150 155 160  
 Arg Asp Pro Phe Ala Ser Met Gly Asn Gly Val Ser Ile Asn Cys Met  
 165 170 175  
 Lys Tyr Pro Thr Arg Lys Arg Glu Val Ile Phe Ser Arg Phe Val Phe  
 180 185 190  
 Thr Asn Asn Pro Lys Tyr Lys Asn Thr Pro Arg Tyr Phe Asp Ile Val  
 195 200 205  
 Gly Asn Asn Gly Thr Ile Glu Gly Gly Asp Ile Phe Ile Tyr Asn Ser  
 210 215 220  
 Lys Thr Leu Val Ile Gly Asn Ser Glu Arg Thr Asn Phe Ala Ala Ile  
 225 230 235 240  
 Glu Ser Val Ala Lys Asn Ile Gln Ala Asn Lys Asp Cys Thr Phe Glu  
 245 250 255  
 Arg Ile Val Val Ile Asn Val Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu  
 260 265 270

# ES 2 915 382 T3

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

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

Pro Val Lys Phe Val Glu Lys Lys Gly Thr Leu Glu Glu Val Leu Tyr  
305 310 315 320

Ser Ile Ile Asp Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Gly  
325 330 335

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

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

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

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

Met Pro Leu Ile Arg Glu Asn Leu Lys Lys  
405 410

<210> 25

<211> 404

<212> PRT

<213> *Mycoplasma fermentans*

<400> 25

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

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

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

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

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

5

10

# ES 2 915 382 T3

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



# ES 2 915 382 T3

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

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

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

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

Ile Lys Lys Lys

<210> 26

<211> 404

<212> PRT

<213> *Mycoplasma pneumoniae*

<400> 26

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

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

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

Ile Gln Glu His Gln Thr Phe Cys Gln Leu Leu Gln Glu Gln Asn Ile  
50 55 60

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

Asn Ala Thr Ala Gln Asn Gln Phe Ile Glu Thr Trp Leu Asp Gln Ala  
85 90 95

Glu Pro Lys Leu Thr Pro Glu His Arg Lys Val Ala Lys Gln Tyr Leu  
100 105 110

Leu Glu Gln Lys Ala Lys Ser Thr Leu Ser Met Val Arg Ser Met Met  
115 120 125

Gly Gly Ile Asp Lys Arg Lys Val Ala Ala Ala Asn Thr Ile Asn Gly  
130 135 140

5

10



# ES 2 915 382 T3

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

# ES 2 915 382 T3

385 390 395 400

Arg Lys Pro Leu

<210> 27

<211> 414

<212> PRT

<213> *Mycoplasma sp.*

<400> 27

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

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

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

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

Val Val Tyr Leu Glu Asn Leu Met Ala Asp Val Leu Asp Leu Ser Asp  
65 70 75 80

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

Arg Thr Pro Lys Tyr Lys Tyr Leu Val Phe Asp Tyr Leu Asp Gln Ile  
100 105 110

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

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

Leu Ile Glu Thr Glu Asp Glu Phe Ile Ala Asp Pro Met Pro Asn Leu  
145 150 155 160

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

Asn Lys Met Tyr Ser Val Thr Arg Asn Arg Glu Thr Ile Tyr Ala Glu  
180 185 190

Tyr Ile Phe Lys Tyr His Pro Asp Tyr Lys Asp Gln Ala Arg Leu Tyr

# ES 2 915 382 T3

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

<210> 28

<211> 408

<212> PRT

<213> *Mycoplasma sp.*

<400> 28

Met His Val Thr Ser Glu Ile Lys Lys Leu Lys Lys Val Leu Val His

# ES 2 915 382 T3

1		5		10		15													
Arg	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Asp	Thr	Leu	Gly	Arg				
			20					25					30						
Leu	Leu	Phe	Asp	Asp	Ile	Pro	Tyr	Leu	Lys	Asp	Ala	Ile	Leu	Glu	His				
		35					40					45							
Asp	Glu	Phe	Cys	Gln	Ile	Leu	Arg	Asp	Asn	Asp	Val	Glu	Val	Val	Tyr				
	50					55					60								
Leu	Glu	Asp	Leu	Met	Ala	Glu	Thr	Leu	Asp	Glu	Asn	Pro	Gln	Val	Lys				
65					70					75					80				
Pro	Ser	Phe	Ile	Arg	Gln	Phe	Ile	Tyr	Glu	Ala	Gly	Val	Arg	Thr	Pro				
				85					90						95				
Lys	Tyr	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Asp	Tyr	Leu	Met	Ser	Tyr	Thr	Asn	Asn				
			100					105					110						
Lys	Glu	Leu	Val	Leu	Lys	Thr	Met	Glu	Gly	Ile	Lys	Val	Ser	Glu	Val				
		115					120					125							
His	Arg	Asn	Lys	Gln	Asp	Ser	Glu	Tyr	Ser	Leu	Val	Asp	Gln	Ile	Ser				
	130					135					140								
Glu	Glu	Thr	Lys	Phe	Leu	Ala	Glu	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr				
145					150					155					160				
Arg	Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Gly	Ile	Ile	Leu	Asn	Lys	Met				
				165					170					175					
His	Ser	Val	Thr	Arg	Ser	Arg	Glu	Thr	Ile	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Phe				
			180					185					190						
Asn	Tyr	His	Pro	Asp	Tyr	Met	Asp	Lys	Val	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Asp	Arg				
		195					200					205							
Glu	Asn	Pro	Phe	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Leu	Asn	Leu	Asn	Glu				
	210					215					220								
His	Thr	Leu	Ala	Ile	Gly	Ile	Ser	Gln	Arg	Thr	Ser	Ala	Glu	Ala	Ile				
225					230					235					240				
Asp	Leu	Val	Ala	Lys	Asn	Met	Phe	Asn	Asp	Glu	Lys	Cys	Asn	Ile	Asp				
				245					250					255					

# ES 2 915 382 T3

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

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

Gly Ile Met Asp Thr Leu Glu Val Phe Glu Ile Thr Lys Asn Glu Asp  
290 295 300

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

Ile Leu Glu Glu Tyr Leu Gly Ile Asp Ile Thr Leu Ile Pro Cys Ala  
325 330 335

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

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

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

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

Ser Met Pro Leu Glu Arg Glu Asp  
405

## REIVINDICACIONES

1. Una arginina desiminasa aislada, o un fragmento de la misma que tiene actividad ADI, en donde la arginina desiminasa aislada tiene reactividad cruzada reducida con los anticuerpos anti-ADI-PEG 20 del paciente, en donde la arginina desiminasa aislada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 9, o una variante que muestra al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 9, y en donde la arginina desiminasa está unida de manera covalente a través de un enlazador a una molécula de PEG.
2. La arginina desiminasa aislada de la reivindicación 1, en donde la arginina desiminasa aislada tiene una o más propiedades comparables a o mejores que las de ADI-PEG 20; opcionalmente en donde la una o más propiedades es Kcat, Km, pH óptimo, estabilidad, estabilidad proteolítica *in vivo* o ninguna necesidad de iones o cofactores que no estén ya presentes en la sangre, o cualquier combinación de los mismos.
3. La arginina desiminasa aislada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde
  - (a) la arginina desiminasa aislada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 9;
  - (b) la arginina desiminasa aislada se ha modificado para eliminar al menos un sitio de pegilación; y/o
  - (c) al menos un resto de lisina se ha modificado por una sustitución de aminoácidos, opcionalmente en donde al menos 5, 10, 15 o 20 restos de lisina se han modificado por una sustitución de aminoácidos.
4. La arginina desiminasa aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la arginina desiminasa está unida de manera covalente a más de una molécula de PEG, de 1 a 10 moléculas de PEG o de 2 a 8 moléculas de PEG;
 

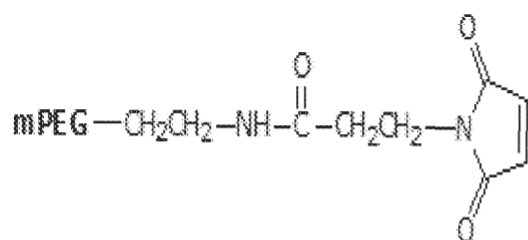
opcionalmente en donde las moléculas de PEG son moléculas de PEG de cadena lineal o de cadena ramificada; opcionalmente en donde el PEG tiene un peso molecular promedio en peso total de 1.000 a 40.000 o de 10.000 a 30.000.
5. La arginina desiminasa aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el enlazador es un grupo succinilo, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo éster, un grupo epoxi, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un hidrato de carbono, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina, un grupo metileno o cualquier combinación de los mismos; opcionalmente en donde la fuente del grupo succinilo es succinimidil succinato.
6. Una composición terapéutica que comprende la arginina desiminasa aislada, o un fragmento de la misma, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La composición terapéutica de la reivindicación 6, que comprende además un agente quimioterápico, opcionalmente en donde el agente quimioterápico se selecciona del grupo que consiste en docetaxel, carboplatino, ciclofosfamida, gemcitabina, cisplatino, sorafenib, sunitinib y everolimus.
8. La arginina desiminasa aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición terapéutica de las reivindicaciones 6 o 7, para su uso en un método de tratamiento, alivio de los síntomas o inhibición de la progresión de un cáncer.
9. La arginina desiminasa aislada o la composición terapéutica para su uso según la reivindicación 8, en donde
  - (a) se ha determinado que el paciente que lo necesita tiene anticuerpos anti-ADI-PEG 20; y/o
  - (b) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, melanoma, melanoma metastásico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma, leucemia linfocítica, leucemia mielógena crónica, linfoma, hepatoma, sarcoma, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide aguda recidivante, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cánceres de cabeza y cuello, cáncer cervicouterino, cáncer de testículo y cáncer de estómago.
10. La arginina desiminasa aislada o la composición terapéutica para su uso según la reivindicación 8, en donde el método de tratamiento comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende ADI-PEG 20, y después de un período de tiempo, administrar al paciente la composición terapéutica o la arginina desiminasa, de este modo tratando, aliviando los síntomas del cáncer o inhibiendo su progresión opcionalmente en donde el período de tiempo se determina:
 

detectando un nivel predeterminado de anticuerpos anti-ADI-PEG 20 en el paciente, en donde la composición terapéutica se administra después de la detección del nivel predeterminado de dichos anticuerpos anti-ADI-PEG

20; o

detectando la actividad de ADI en el paciente, en donde la composición terapéutica se administra después de la detección de un nivel predeterminado o reducido de actividad de ADI.





CÓDIGO DE PRODUCTO	NÚMERO DE PRODUCTO	DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO
A3073-1	M-MAL-2000, 1g	Metoxi PEG maleimida, PM 2000
A3073-10	M-MAL-2000, 10g	Metoxi PEG maleimida, PM 2000
A3014-1	M-MAL-5000, 1g	Metoxi PEG maleimida, PM 5000
A3014-10	M-MAL-5000, 10g	Metoxi PEG maleimida, PM 5000
A3045-1	M-MAL-10K, 1g	Metoxi PEG maleimida, PM 10000
A3045-10	M-MAL-10K, 10g	Metoxi PEG maleimida, PM 10000
A3002-1	M-MAL-20K, 1g	Metoxi PEG maleimida, PM 20000
A3002-10	M-MAL-20K, 10g	Metoxi PEG maleimida, PM 20000
A3046-1	M-MAL-30K, 1g	Metoxi PEG maleimida, PM 30000
A3046-10	M-MAL-30K, 10g	Metoxi PEG maleimida, PM 30000
A3042-1	M-MAL-40K, 1g	Metoxi PEG maleimida, PM 40000
A3042-10	M-MAL-40K, 10g	Metoxi PEG maleimida, PM 40000

FIG. 1A






Serie SUNBRIGHT®MA (Maleimida PEG)		
Tipo C2		
$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{CH}_2)_2\text{N}$ 		
Nombre del producto		PM
SUNBRIGHT ME-020MA		2,000
SUNBRIGHT ME-050MA		5,000
SUNBRIGHT ME-100MA	Nuevo	10,000
SUNBRIGHT ME-120MA		12,000
SUNBRIGHT ME-200MA		20,000
SUNBRIGHT ME-300MA		30,000
SUNBRIGHT ME-400MA		40,000
Tipo C5		
$\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_3\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{N}$ 		
Nombre del producto	Grupo funcional	PM
SUNBRIGHT ME-050MA3	Nuevo	5,000
SUNBRIGHT ME-120MA3	Nuevo	12,000
SUNBRIGHT ME-200MA3	Nuevo	20,000
SUNBRIGHT ME-400MA3	Nuevo	40,000
Serie SUNBRIGHT®IA (Yodoacetamida- PEG)		
$\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})\text{O}-\text{CH}_2\text{I}$ 		
Nombre del producto		PM
SUNBRIGHT ME-200IA		20,000
SUNBRIGHT ME-300IA		30,000
SUNBRIGHT ME-400IA		40,000

FIG. 1B

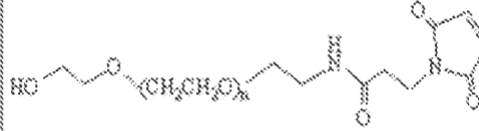
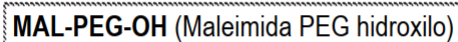
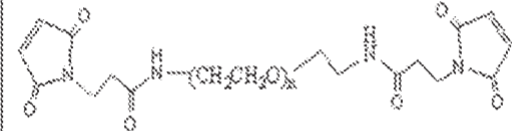
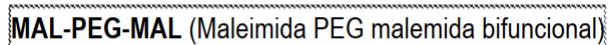
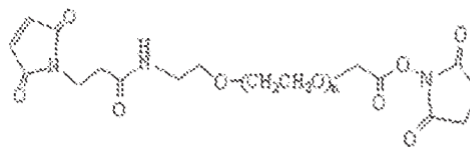
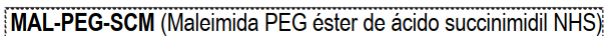
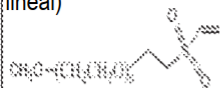
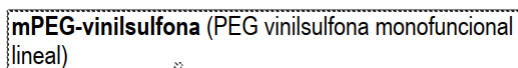
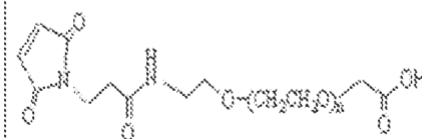
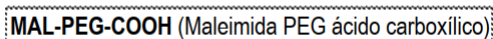
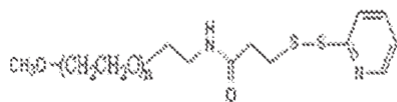
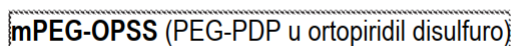
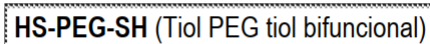
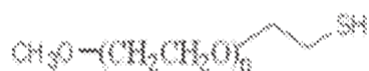
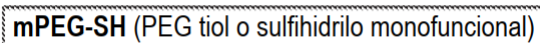
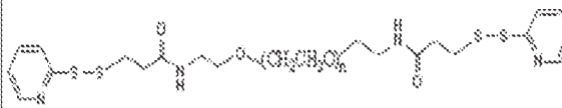
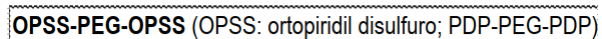
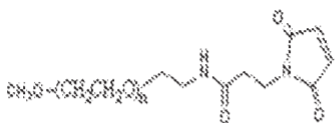
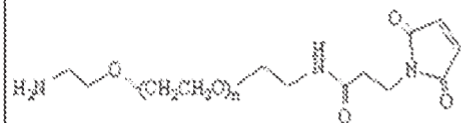
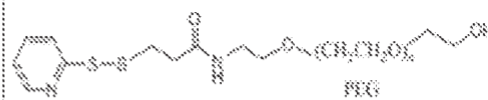
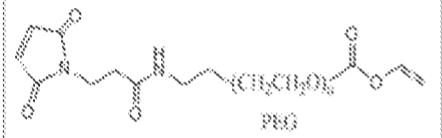
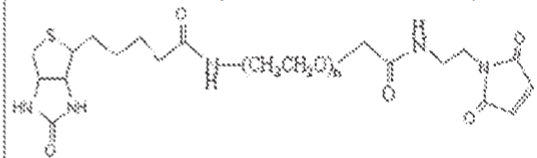
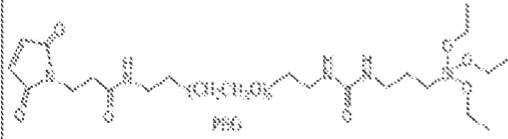
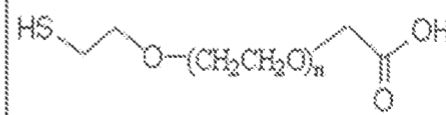
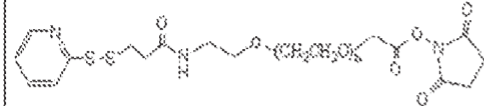
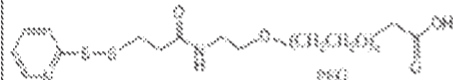
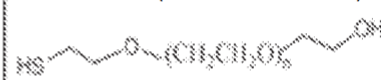


FIG. 1C

**MAL-PEG-NH<sub>2</sub>** (Maleimida PEG amina)**OPSS-PEG-OH** (Ortopiridil disulfuro (PDP) PEG hidroxilo)**MAL-PEG-AC** (Maleimida PEG acrilato)**Biotina-PEG-MAL** (Biotina PEG maleimida)**MAL-PEG-Silano** (Maleimida PEG silano)**HS-PEG-COOH** (Tiol PEG ácido carboxílico)**OPSS-PEG-NHS** (Ortopiridil disulfuro PDP PEG succinimidil éster)**HS-PEG-NH<sub>2</sub>** (Tiol PEG amina)**OPSS-PEG-COOH** (Ortopiridil disulfuro (PDP) PEG ácido carboxílico)**HS-PEG-OH** (Tiol PEG hidroxilo)**FIG. 1C (Cont.)**

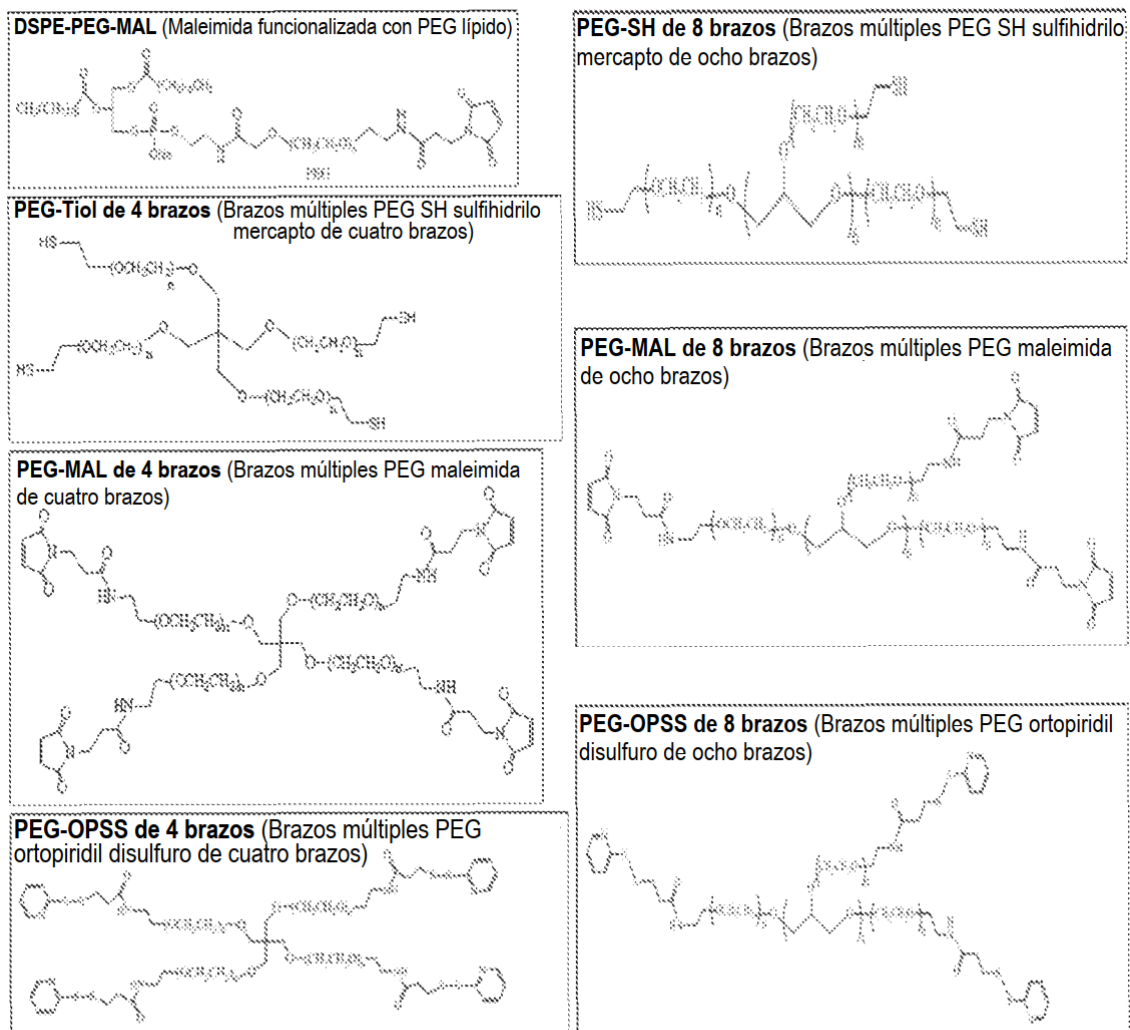


FIG. 1C (Cont.)

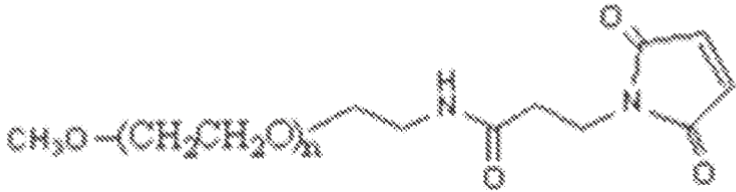
<b>mPEG-MAL (PEG maleimida monofuncional)</b> 	
PSB-230	mPEG-MAL, PM 30 k
PJK-231	mPEG-MAL, PM 20 k
PSB-233	mPEG-MAL, PM 10 k
PLS-234	mPEG-MAL, PM 5 k
PSB-235	mPEG-MAL, PM 2 k
PSB-236	mPEG-MAL, PM 1 k
PSB-237	mPEG-MAL, PM 550

FIG.1D