

(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**

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**

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 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 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® 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, 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 hiporammonemia, 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.

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.

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).

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 desimininas aisladas de varios organismos. Ni Y. et al., (2011) Appl Microbiol Biotechnol. 90(1):

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 epítopos de linfocitos T utilizando deriva neutra. En el documento US 2005/129706 se describe arginina desiminasa modificada con polietilenglicol.

5

### Breve sumario

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 felifaicum*, *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 y everolimus.

- 5 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.
- 10 15 20 25 30
- 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.

### 35 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.

### 40 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.

55 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.

60 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.

65 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 pegilan para retardar la neutralización y eliminación debido a su propia inmunogenicidad. Estos factores permitirán su uso en lugar de ADI-PEG 20 o además de ADI-PEG 20 (p. ej., como fármaco de 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.

- 5 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.
- 10 15 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, 3<sup>a</sup> ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3<sup>a</sup> 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.
- 20 25 30 35 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.

- 40 45 50 55 60 65 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 espaciamiento de carga característicos del aminoácido de referencia. Por ejemplo, una estructura orgánica que imita a la arginina (Arg o R) tendrá 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

5 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.

10 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 vítreo 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.

15 25 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 inmunoadsorción 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.

20 30 35 40 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.

45 50 "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.

55 60 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".

65 "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., ADI<sub>r</sub>, ADI<sub>r</sub>-PEG) en una composición,

5 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.

10 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 15 descritas por nombre y las descritas en las tablas y el listado de secuencias.

15 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 20 ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

25 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 30 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 35 ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o menor en comparación con la secuencia de referencia (que no incluye adiciones ni delecciones) 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 40 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).

45 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 50 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 55 aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

60 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.

65 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-gapna.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.
- 5 10 El término "solubilidad" se refiere a la propiedad de la enzima ADI 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, molalidad, fracción molar u otras descripciones similares de concentración. La cantidad máxima en 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 ADI 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.
- 15 20 25 "Sustancialmente" o "esencialmente" significa casi total o completamente, por ejemplo, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor de alguna cantidad dada.
- 30 35 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.
- 40 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 primatum*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma lipofaciens*, *Mycoplasma felifaicum*, *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 amoníaco). Dichas enzimas ADI pueden prepararse o sintetizarse utilizando técnicas conocidas.
- 45 50 55 60 65 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.

- 5 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.

10 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.

15 25 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.

20 30 35 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.

40 45 50 55 60 65 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 s<sup>-1</sup> a aproximadamente 15 s<sup>-1</sup>, 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 o 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 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 7,2 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 7,5 s<sup>-1</sup>, 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>.

65 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 ADI tiene una Km que es aproximadamente o al menos aproximadamente un 100 %, 105 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %,
- 5 180 %, 200 %, 220 %, 240 % o 250 % de la Km de ADI-PEG 20. En realizaciones particulares, una ADI, 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
- 10 aproximadamente 1,5  $\mu$ M a aproximadamente 7  $\mu$ M. En determinadas realizaciones, la ADI o ADI-PEG en una composición tiene una Km de aproximadamente 1,5  $\mu$ M a aproximadamente 6,5  $\mu$ M. En algunas realizaciones, la ADI 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,
- 15 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,
- 20 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.
- 25 En determinadas realizaciones, una ADI actúa a un pH cercano al pH fisiológico de la sangre humana. Por tanto, en algunas realizaciones, una ADI 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 ADI tiene buena actividad enzimática a un pH de aproximadamente 7,4.
- 30 En determinadas realizaciones, una ADI tiene estabilidad durante almacenamiento a largo plazo y estabilidad de temperatura y proteolítica durante el tratamiento en el cuerpo humano. En algunas realizaciones, una ADI no necesita iones o cofactores para su actividad que no estén ya presentes en la sangre.
- 35 En determinadas realizaciones, una ADI 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 eliminan sitios antigenicos 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 ADI 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 ADI como se describe en el presente documento, tiene una identidad de secuencia de 20 % - 85 %
- 40 con una ADI de *M. hominis* como se expone en la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, una ADI 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 ADI 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 %,
- 45 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.
- 50 En determinadas realizaciones, una ADI 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 ADI 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).
- 60 En algunas realizaciones, una ADI 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 delecciones) 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 ADI 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 ADI con su porcentaje de identidad de secuencia en relación con la ADI de *M. hominis*.

En determinadas realizaciones, las enzimas ADI 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 ADI 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.

15 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 ADI 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 20 "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, 25 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 ADI descritas en el presente documento, o secuencias que tienen delecciones de, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de las proteínas ADI. En 30 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.

35 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 40 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).

45 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.

55 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 hidróflica 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 así obtener una molécula funcional que codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables.

60 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 65 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 aún 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 ADI tendrá una longitud de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 aminoácidos, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios. En realizaciones específicas, la ADI 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 aminoterinal, 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 ADI descrita en el presente documento. En el caso de una ADI, los fragmentos útiles incluyen, pero sin limitación, el dominio catalítico y el dominio α-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 antigenicos. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, las enzimas ADI 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 antigenicos de los anticuerpos del paciente.

En determinadas realizaciones, la enzima ADI 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 ADI, pueden proporcionar una enzima que se renaturalice y formule más fácilmente, mejorando de este modo la fabricación de la ADI y de las composiciones terapéuticas que la comprendan. En algunas realizaciones, la enzima ADI 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 ADI 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 ADI 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 ADI 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 ADI 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 ADI 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 ADI 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 ADI 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 ADI para crear una enzima "ADI modificada". Por tanto, determinadas realizaciones incluyen una enzima ADI que comprende un "agente modificador", ejemplos de los cuales incluyen, pero sin limitación, polímeros, proteínas, péptidos, polisacáridos y otros compuestos macromoleculares. La enzima ADI 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 ADI modificada conserva la actividad biológica de una ADI no modificada correspondiente (p. ej. de la misma secuencia o similar) y tiene mayor semivida *in vivo* y menor antigenicidad que la ADI no modificada correspondiente. En determinadas realizaciones, la ADI 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 ADI no modificada correspondiente. En general, la ADI 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 ADI en la sangre. El agente modificador puede acoplarse químicamente a ADI o, cuando corresponda, unirse a ADI 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-etylenglicol y sus derivados, copolímeros de poli-alquil-etylenglicol y sus derivados, poli(éter viniletílico), a,P-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida], policarboxilatos, polioxietilen-oximetilenos, poliacriloil morfolinas, copolímero de compuestos amino y oxiolefina, ácido polihialurónico, polioxiranos, copolímero de ácido etanodioico y ácido malónico, polí(1,3-dioxolano), copolímero de etileno e hidracida maleica, ácido polisiálico, 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 ( $\text{HO}((\text{CH}_2)_2\text{O})\text{H}$ ), 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 ADI 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 ADI. 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 ADI 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 ADI 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 ADI 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 ADI se modifica por unión covalente a una o más moléculas de PEG. La ADI modificada de manera covalente con PEG (con o sin un enlazador) puede denominarse en lo sucesivo en el presente documento "ADI-PEG". Cuando se compara con ADI sin modificar, ADI-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 ADI. 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 ADI 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 cáncer de esófago, entre otros cánceres descritos en el presente documento.

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 maleimidas (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 ADI se conjuga con una cualquiera o más de las moléculas de PEG reactivas con tiol, sulfhidrilo o cisteína descritas en el presente documento.

La ADI se puede unir de manera covalente a un agente modificador, tal como PEG, con o sin un enlazador, aunque en una realización preferida se utiliza un enlazador. ADI se puede unir 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, ADI se puede acoplar 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 ADI 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 se puede unir 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 ADI 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 succinimidil, 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 succinimid (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>- , -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>- , -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>-CH<sub>2</sub>-O-

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-  
 5 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>-  
 -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>-  
 10 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(R6)-, R6 es H o  
 un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido,  
 15 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 cualesquier 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 ADI<sub>r</sub> comprende una o más moléculas de PEG y/o enlazadores como se describe en el presente documento (p. ej., en la Tabla A).

25 La unión de PEG a ADI<sub>r</sub> aumenta la semivida en circulación de ADI<sub>r</sub>. En general, el PEG se une a una amina primaria de ADI<sub>r</sub>. Como sabrá un experto en la técnica, la selección del sitio de unión de PEG, o de otro agente modificador, en la ADI<sub>r</sub>, 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 ADI<sub>r</sub> sin pérdida sustancial de actividad enzimática. Por ejemplo, los restos de lisina presentes en ADI<sub>r</sub> son todos posibles puntos en los que la ADI<sub>r</sub> como se describe en el presente documento se  
30 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 ADI<sub>r</sub>, 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 ADI<sub>r</sub>. En determinadas realizaciones, ADI<sub>r</sub> se modifica con (es decir, comprende) una molécula de PEG. En algunas realizaciones, la ADI<sub>r</sub> se modifica con más de una molécula de PEG. En realizaciones particulares, la ADI<sub>r</sub> se modifica con de aproximadamente 5 1 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 moléculas de PEG, o de aproximadamente 10 2 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 moléculas de PEG. En algunas realizaciones, la ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> se modifica con 4,5 - 5,5 moléculas de PEG por ADI<sub>r</sub>. En alguna realización, la ADI<sub>r</sub> se modifica con 5 ± 1,5 moléculas de PEG.
- En determinadas realizaciones, de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 70 % de los grupos amino primarios en la ADI<sub>r</sub> 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 10 15 20 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 ADI<sub>r</sub>, puede ser deseable tener que utilizar solo 1 molécula de PEG. Al aumentar el número de unidades de PEG en la ADI<sub>r</sub> aumenta la semivida en circulación de la enzima. Sin embargo, al aumentar el número de unidades de PEG en la ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub>, 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 ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> 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 30 35 40 45 50 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 ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub>. Estas sustituciones de aminoácidos proporcionan una ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> 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, fosfona, fosfina, heterocíclico, piridilo, naftilo, benzofenona, un anillo restringido tal como un ciclooctino, tioéster, enona, imina, aldehído, éster,

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

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

15 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*.

20 30 Por tanto, algunas realizaciones proporcionan determinadas sustituciones de aminoácidos en la cadena polipeptídica de las argininas desiminadas 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 40 45 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.

50 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.

55 60 65 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 ADI $r$  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 ADI $r$ , p. ej., ADI $r$ -PEG, ADI $r$ -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 ADI<sub>r</sub> (p. ej., ADI<sub>r</sub>-PEG, ADI<sub>r</sub>-PEG 20) se puede administrar por vía oral, intranasal, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intralinfática, intratumoral, intramuscular, intersticial, intraarterial, subcutánea, intraocular, intrasinovial, 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 ADI<sub>r</sub> del presente documento aumentan la mediana del tiempo de supervivencia de los pacientes en una cantidad estadísticamente significativa. En algunas realizaciones, los tratamientos con ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> 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, 3<sup>a</sup> 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 ADI<sub>r</sub>-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 ADI<sub>r</sub> (p. ej., ADI<sub>r</sub>-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 ADI<sub>r</sub> también pueden administrarse solas o junto con terapia de ADI-PEG 20. En determinadas realizaciones, la ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub> 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 ADI<sub>r</sub>. Un "nivel umbral predeterminado" (también denominado "nivel predeterminado" o "valor límite predeterminado"), o en ocasiones denominado límite predeterminado, de anticuerpos anti-ADI-PEG 20,

5 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.

10 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 15 determinará cuándo finalizar el tratamiento con ADI-PEG 20 y comenzar el tratamiento con una ADIr-PEG del presente documento.

20 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.

25 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, 20<sup>a</sup> 30 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.

35 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 40 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.

45 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 desengranadores tales como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o 50 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.

55 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.

60 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, polietilenglicos, 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 etilendiaminotetraacético; 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 ADI<sub>r</sub> como se desvela en el presente documento (p. ej., ADI<sub>r</sub>-PEG, ADI<sub>r</sub>-PEG 20) de manera que se obtenga una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos 0,01 % de ADI<sub>r</sub> en la composición. Cuando se desea 10 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 ADI<sub>r</sub>. 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 ADI<sub>r</sub> 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 iontoporesis. La composición farmacéutica puede estar destinada a administración rectal, en forma, por ejemplo, de un suppositorio, 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 une a ADI<sub>r</sub> (p. ej., ADI<sub>r</sub>-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 presurizados. El suministro puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba 35 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 ADI<sub>r</sub> (p.ej., ADI<sub>r</sub>-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 ADI<sub>r</sub> (p. ej., ADI<sub>r</sub>-PEG) para facilitar la disolución o la suspensión homogénea de la ADI<sub>r</sub> (p. ej., ADI<sub>r</sub>-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., ADI<sub>r</sub>-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 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 de 60 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 deseé 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 ± 5 % de fosfato monobásico de sodio, USP; aproximadamente 3 mg ± 5 % de fosfato de sodio dibásico, USP; aproximadamente 7,6 mg ± 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 CIH-histidina (clorhidrato de histidina), y en determinadas realizaciones, el tampón de la composición es CIH-histidina de aproximadamente 0,0035 M a aproximadamente 0,35 M. En una realización particular, la composición se formula en un tampón que comprende CIH-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 ± 5 % de histidina, USP; aproximadamente 7,6 mg ± 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 ± 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, ≤ 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 μM o 0,5 μM a aproximadamente 15 μM o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 12 μM, de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM, de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 9 μM, de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 8 μM o de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 7 μM. En determinadas realizaciones, la ADIr (p. ej., la ADIr-PEG) en una composición, tiene una Km de aproximadamente 1,0 μM a aproximadamente 10 μM o de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 6,5 μM. 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 μM, aproximadamente 0,5 μM, aproximadamente 1,0 μM, aproximadamente 1,5 μM, aproximadamente 2 μM, aproximadamente 2,5 μM, aproximadamente 3 μM, aproximadamente 3,5 μM, aproximadamente 4 μM, aproximadamente 4,5 μM, aproximadamente 5 μM, aproximadamente 5,5 μM, aproximadamente 6 μM, aproximadamente 6,5 μM o aproximadamente 7 μM o aproximadamente 8 μM o aproximadamente 9 μM o aproximadamente 10 μM.
- 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 de 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 ADlr (p. ej., la ADlr-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 ADlr o ADlr-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 ADlr (p. ej., la ADlr-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 ADlr (p. ej., la ADlr-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 ADlr (p. ej., la ADlr-PEG) en una composición, tiene una conductividad de aproximadamente 13 mS/cm ± 1,0 mS/cm.
- En algunas realizaciones, la ADlr (p. ej., la ADlr-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 ADlr (p. ej., la ADlr-PEG) en una composición, tiene una osmolalidad de aproximadamente 300 ± 30 mOsm/kg.
- En algunas realizaciones, la concentración de proteína es de aproximadamente 11,0 ± 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 µmol de arginina en un µmol de citrulina y 1 µmol de amoníaco en un minuto a 37 °C y la potencia es de 100 ± 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 ± 2,0 UI/ml. En una realización particular, la actividad enzimática específica es 9 ± 2,0 UI/ml.
- Las composiciones que comprenden una ADlr (p. ej., ADlr-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 ADlr descrita en el presente documento (p. ej., ADlr-PEG) y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica distinta. Por ejemplo, la ADlr (p. ej., ADlr-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 ADlr (p. ej., ADlr-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 ADlr-PEG (p. ej., ADlr-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, esteroideos, 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, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; 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, daunorrubricina, detorrubricina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubricina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorrubricina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pterofterina, 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, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antisuprarrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diacuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; Iomidamina; mitoguazona; mitoxantrona; molidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbacin; PSK; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazine; 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 diftitox); 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, mabritinib, 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, hidroxicloroquina (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 fosfatases de tipo 2A o de tipo 1, análogos de AMPc y fármacos que elevan los niveles de AMPc, adenosina, N6-mercaptopurina ribósido, wortmannina 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 ADlr (p. ej., ADlr-PEG) esté ausente y/o cuando la ADlr (p. ej., ADlr-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 5 15 de enero de 2010, 70; 440).

Las composiciones que comprenden ADlr (p. ej., ADlr-PEG) y opcionalmente otros agentes terapéuticos, como se describe en el presente documento, pueden utilizar 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 10 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 ADlr como se describe en el presente 15 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 ADlr 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 20 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, leiromiosarcoma 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 25 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 ADlr (p. ej., ADlr-PEG), y 30 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 35 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.

40 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 delecciones, inserciones y similares) o una anomalía cromosómica que da lugar a la delección del gen. En 45 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 50 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 ADlr como se describe en el presente documento (p. ej., ADlr-PEG), en donde el cáncer presenta expresión o actividad reducida de 55 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, leiromiosarcoma 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 60 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 ADI-PEG o junto con otros tratamientos, incluyendo el tratamiento primero con ADI-PEG 20.

5 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 ADI-PEG como se describe en el presente documento, (p. ej., ADI-PEG, ADI-PEG 20), junto con un inhibidor de la autofagia. Algunas realizaciones incluyen  
10 métodos para tratar el cáncer en un paciente, que comprenden administrar al paciente, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende ADI-PEG 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.

15 Algunas realizaciones incluyen métodos de tratamiento donde la administración de las composiciones que comprenden ADI-PEG, 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 ADI-PEG, 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.

## 20 Ejemplos

### EJEMPLO 1

#### 25 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.

30 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 *M. hominis***

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</i> sp. CAG:877	39,28	gi 524101565	27
<i>Mycoplasma</i> sp. CAG:472	38,07	gi 524735679	28

Se caracterizó una serie de enzimas ADI de diversos organismos para determinar qué enzimas se esperaría 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.

- 5      10      15      20      **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 Hollendorf, 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.
- 25      30      **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      30      **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 µmol 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      40      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 ADI<sub>r</sub> 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 µM. 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 µM de citrulina, siendo el límite de cuantificación inferior de 2 µM. 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 (perfíles 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.

**Tabla 2. Secuencias y propiedades de ADI nativas seleccionadas**

Organismo	Actividad Específica (UI/mg)	Kcat (s-1)	Km (uM)
<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 primatum</i>	+++	+++	+
<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	-	ND
<i>Mycoplasma lipofaciens</i>	-	-	ND
<i>Mycoplasma opalescens</i>	++	++	-
<i>Mycoplasma imitans</i>	-	ND	ND
<i>Mycoplasma</i> sp. CAG:877	-	ND	ND
<i>Mycoplasma</i> sp. CAG:472	-	ND	ND

**Tabla 3. Secuencias y propiedades de PEG-ADI seleccionadas**

Organismo	Actividad Específica (UI/mg)	Kcat (s-1)	Km (uM)
<i>Mycoplasma hominis</i>	+	+	+
<i>Mycoplasma salivarium</i>	++	++	+
<i>Mycoplasma spumans</i>	+++	+++	+
<i>Mycoplasma canadense</i>	++	++	-
<i>Mycoplasma cloacale</i>	++	++	+

(continuación)

**Tabla 3. Secuencias y propiedades de PEG-ADI seleccionadas**

Organismo	Actividad Específica (UI/mg)	Kcat (s-1)	Km (uM)
<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

**Tabla 4. Secuencias y propiedades de ADI nativas seleccionadas**

Organismo	Actividad específica a la concentración de Ab indicada contra $\alpha$ -ADI (nM)*							
	640	320	160	80	40	20	10	0
<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)

**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 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

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
<i>Mycoplasma spumans</i>	1	1	1	58	117	119	108	84	44	62	45	10
<i>Mycoplasma canadense</i>	0	1	1	67	148	149	144	96	47	67	49	20
<i>Mycoplasma cloacale</i>	0	0	0	43	126	130	113	86	46	64	46	13
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	0	1	1	22	124	132	117	85	41	39	26	6
<i>Mycoplasma anseris</i>	0	0	1	51	159	171	135	108	55	82	59	22
<i>Mycoplasma auris</i>	0	1	1	1	87	92	98	87	50	69	48	4
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	0	0	0	38	113	123	106	78	38	53	35	7
<i>Mycoplasma iners</i>	0	1	15	32	76	83	84	78	45	66	55	26
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	0	3	3	6	84	90	103	98	46	55	40	5
<i>Mycoplasma penetrans</i>	0	0	7	41	123	130	129	100	42	64	51	14
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	0	1	18	36	91	90	104	92	50	69	56	26
<i>Mycoplasma primatum</i>	0	1	0	27	81	94	99	92	50	76	60	17
<i>Mycoplasma opalescens</i>	0	1	1	2	83	97	115	93	51	84	65	23

\* 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.

## 10 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

5 <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  
225 230 235 240

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 Ala  
290 295 300

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

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  
385 390 395 400

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

<210> 3  
<211> 411  
<212> PRT  
<213> *Mycoplasma spumans*

<400> 3

ES 2915 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 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*

5

<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

10

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

5 <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 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

5 <212> PRT

<213> *Mycoplasma cloacale*

<400> 6

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 Lys Leu Val Ser Thr Pro Ile Tyr Tyr His Pro Ser Gln  
 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 Lys 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 Ala  
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

Met Pro Leu Tyr Arg Lys Asp Val Lys  
 405

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 412

&lt;212&gt; 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

5 <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

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

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
320			
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
400			
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 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

5 <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 80

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

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

5 <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

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  
5 <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

ES 2 915 382 T3

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

5 <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 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

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 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

5                   <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 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 2915 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

5 <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

ES 2915 382 T3

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

340

345

350

Tyr Leu Ala Ile Ala 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

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

Met Pro Leu Tyr Arg Lys Asp Val Lys  
405

<210> 22

<211> 401

<212> PRT

<213> *Mycoplasma meleagridis*

5

<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

## ES 2 915 382 T3

Lys

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 404

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Mycoplasma alvi*

&lt;400&gt; 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	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			

ES 2 915 382 T3

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 2915 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

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

5 <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

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

5 <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 Asn Thr Ile Asn Gly  
130 135 140

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

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 414

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Mycoplasma sp.*

&lt;400&gt; 27

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

5

10

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

20

25

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

35

40

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

50

55

Val	Val	Tyr	Leu	Glu	Asn	Leu	Met	Ala	Asp	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp
															80

65

70

75

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

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

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 408

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycoplasma sp.*

&lt;400&gt; 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

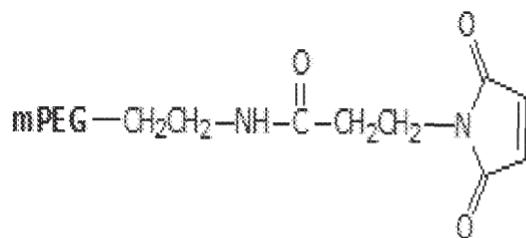
Met Asn Ser Ala Glu Leu Ser Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met  
385 390 395 400

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.
- 5        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.
- 10      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;
- 15      (b) la arginina desiminasa aislada se ha modificado para eliminar al menos un sitio de pegilación; y/o
- 20      (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.
- 25      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;
- 30      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.
- 35      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.
- 40      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.
- 45      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.
- 50      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.
- 55      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
- 60      (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.
- 65      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.

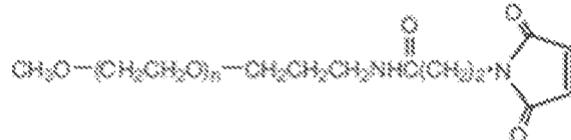


CÓDIGO DE PRODUCTO	NÚMERO DE PRODUCTO	DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO
A3073-1	M-MAL-2000, 1g	Metoxi PEG maleimida, PM 2000
A3073-10	M-MAL-2000, 10g	Metoxi PEG maleimida, PM 2000
A3014-1	M-MAL-5000, 1g	Metoxi PEG maleimida, PM 5000
A3014-10	M-MAL-5000, 10g	Metoxi PEG maleimida, PM 5000
A3045-1	M-MAL-10K, 1g	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

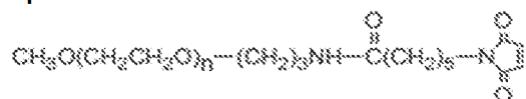
 Serie SUNBRIGHT®MA (Maleimida PEG)

## Tipo C2



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



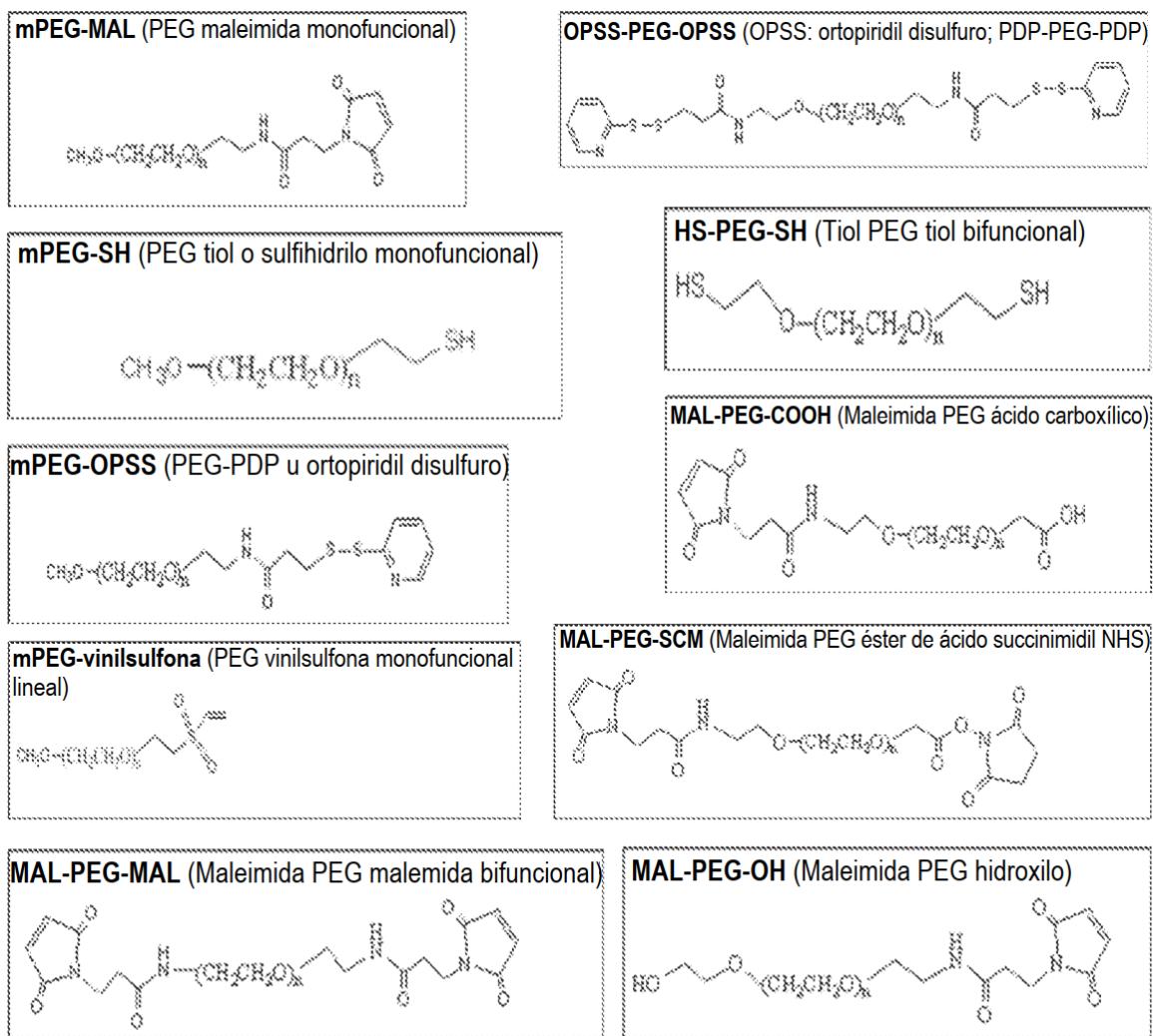
Nombre del producto	Grupo funcional	PM
SUNBRIGHT ME-050MA3 Nuevo		5,000
SUNBRIGHT ME-120MA3 Nuevo	Maleimida	12,000
SUNBRIGHT ME-200MA3 Nuevo	-<(CH2)>-NHCO-<(CH2)>-Maleimida	20,000
SUNBRIGHT ME-400MA3 Nuevo		40,000

 Serie SUNBRIGHT®IA (Yodoacetamida- PEG)

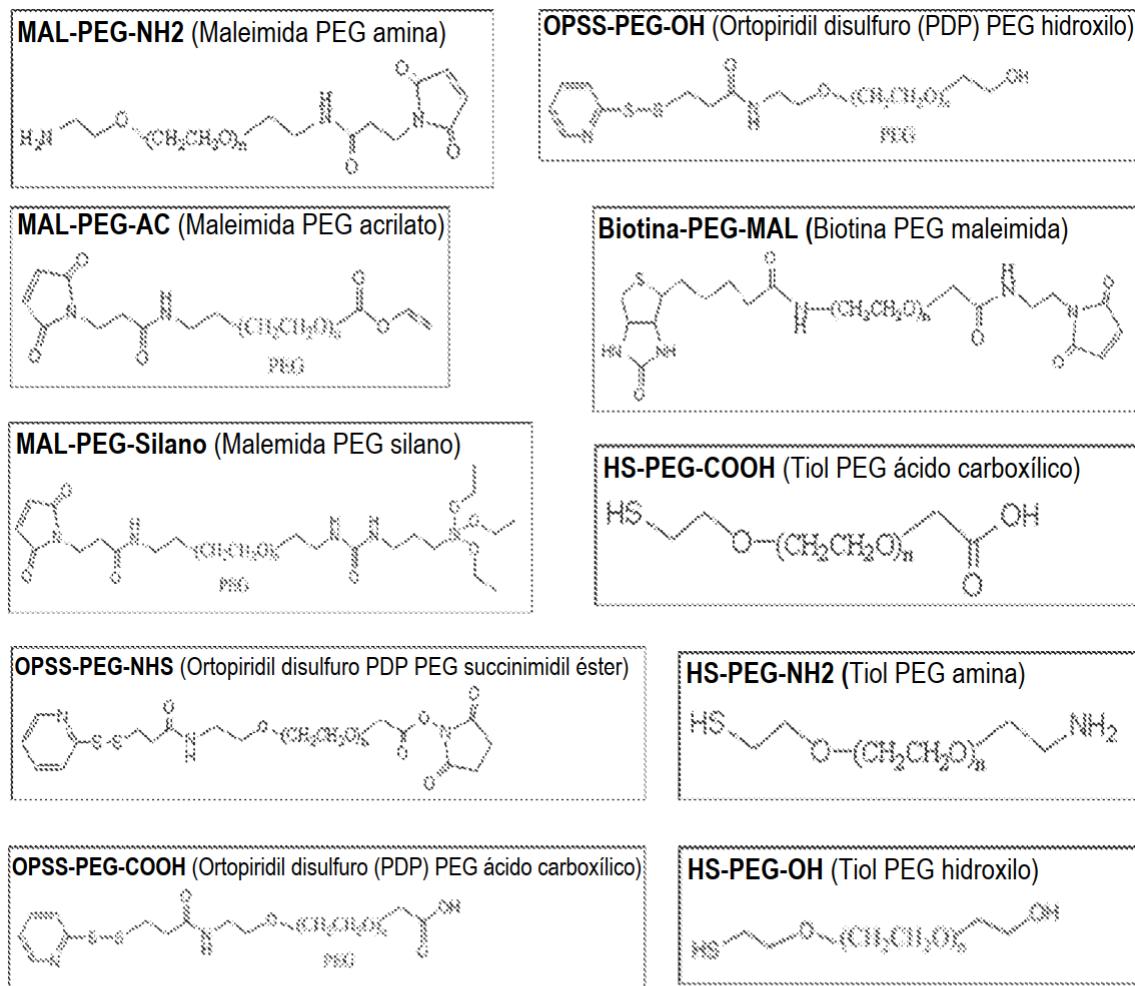


Nombre del producto	PM
SUNBRIGHT ME-200IA	20,000
SUNBRIGHT ME-300IA	30,000
SUNBRIGHT ME-400IA	40,000

FIG. 1B



**FIG. 1C**

**FIG. 1C (Cont.)**

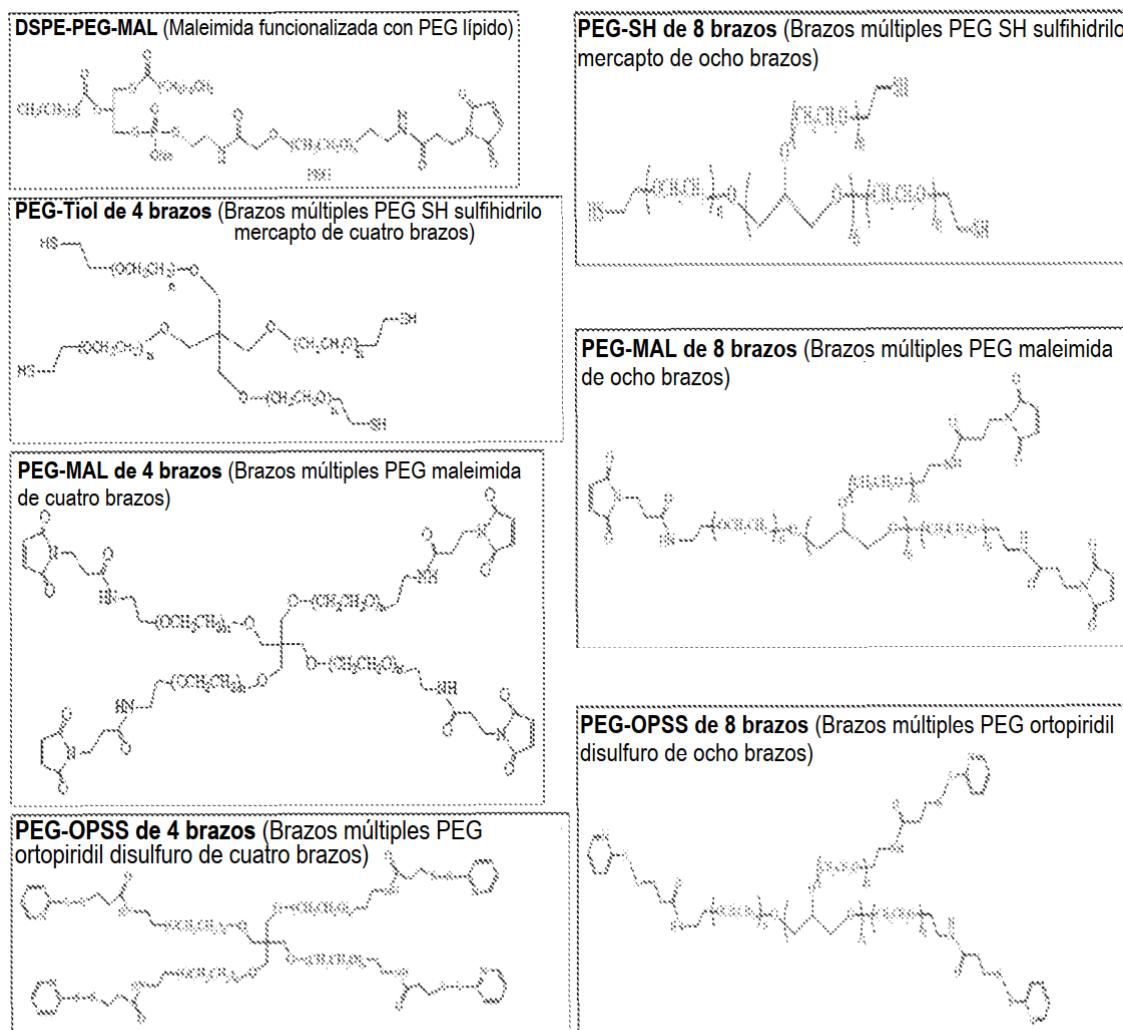
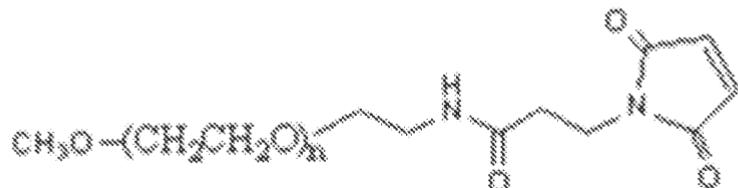


FIG. 1C (Cont.)

**mPEG-MAL (PEG malemida monofuncional)**

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**