República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) BR 112020024227-6 A2**

**(22) Data do Depósito:** 31/05/2019

**(43) Data da Publicação Nacional:** 16/03/2021

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO E APLICAÇÃO DE AGENTES DEPLETORES DE ARGININA PARA CÂNCER, OBESIDADE, DISTÚRBIOS METABÓLICOS E COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES RELACIONADAS

**(51) Int. Cl.:** C07K 19/00; A61K 38/16; A61P 3/00; A61P 35/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 31/05/2018 US 62/678,300.

**(71) Depositante(es):** THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY; THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG.

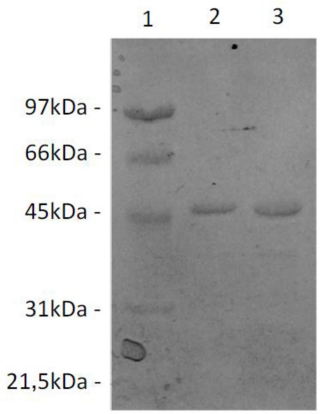
**(72) Inventor(es):** LEUNG, YUN CHUNG; SHUM, ALISA SAU-WUN.

**(86) Pedido PCT:** PCT CN2019089583 de 31/05/2019

**(87) Publicação PCT:** WO 2019/228510 de 05/12/2019

**(85) Data da Fase Nacional:** 27/11/2020

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO E APLICAÇÃO DE AGENTES DEPLETORES DE ARGININA PARA CÂNCER, OBESIDADE, DISTÚRBIOS METABÓLICOS E COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES RELACIONADAS. A presente revelação refere-se a proteínas de fusão de domínio de ligação de albumina de arginase (ABD) e métodos de preparação e uso das mesmas. Também são fornecidos métodos que envolvem depleção de arginina para o tratamento de obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas.



# RELATÓRIO DESCRITIVO

# COMPOSIÇÃO E APLICAÇÃO DE AGENTES DEPLETORES DE ARGININA PARA CÂNCER, OBESIDADE, DISTÚRBIOS METABÓLICOS E COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES RELACIONADAS

## REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório nº US 62/678.300, depositado em 31 de maio de 2018, cujos conteúdos estão aqui incorporados a título de referência em sua totalidade para todos os fins.

## CAMPO DA TÉCNICA

[002] A presente revelação refere-se a proteínas de fusão de domínio de ligação de albumina de arginase (ABD) e métodos de preparação e uso das mesmas. Também são fornecidos métodos que envolvem depleção de arginina para o tratamento de obesidade, distúrbios metabólicos e/ou complicações e/ou comorbidades relacionadas.

## ANTECEDENTES

[003] A arginase é uma hidrolase que catalisa o catabolismo da arginina em ornitina e ureia e está presente na maioria dos organismos vivos. Em seres humanos, existem duas isoformas de arginase, arginase tipo I e tipo II, que diferem na distribuição nos tecidos e nas características moleculares.

[004] A arginase I é encontrada principalmente no citoplasma do fígado e é uma proteína de 35 kD que existe como um trímero. A arginase II, uma proteína de ~ 38,5 kD, está tipicamente localizada na mitocôndria das células e acredita-se que esteja envolvida na regulação das concentrações de arginina/ornitina na célula.

[005] Vários tipos de tumores carecem ou produzem baixos níveis de argininosuccinato sintetase (ASS) e/ou ornitina transcarbamoilase (OTC) que são necessários para a síntese de arginina e, portanto, são auxotróficos para arginina. A privação de arginina explora uma vulnerabilidade significativa dessas células tumorais e leva ao seu rápido desaparecimento. Consequentemente, a

depleção de arginina mediada por enzimas foi explorada como uma estratégia potencial para destruição seletiva de células tumorais.

[006] Um grande impedimento para o desenvolvimento de depleção de arginina mediada por enzimas como tratamento para o câncer é a meia-vida de circulação curta (de vários minutos a algumas horas) da arginase devido ao seu baixo peso molecular (<50 kDa) e, portanto, é rapidamente eliminada por depuração renal. A fim de manter uma concentração terapêutica eficaz na circulação sistêmica, um esquema de dosagem frequente pode ser necessário, o que pode levantar questões de adesão do paciente.

[007] Diante desse problema, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar as propriedades farmacocinéticas de proteínas terapêuticas. A conjugação de polietilenoglicol (PEG) com diferentes proteínas terapêuticas, isto é, a PEGuilação, mostrou aumentar seu raio hidrodinâmico e, portanto, retardar sua eliminação por depuração renal. Estratégias de proteína de fusão com base nos mecanismos de reciclagem do receptor Fc neonatal (FcRn) também foram exploradas, em que a fusão da região cristalizável do fragmento (Fc) de imunoglobulina, albumina ou peptídeo de ligação de albumina a proteínas mostrou aumentar sua meia-vida de circulação. No entanto, ainda existe a necessidade de desenvolver proteínas depletoras de arginina com farmacocinética melhorada.

[008] Obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas são considerados alguns dos problemas de saúde pública global mais sérios no século 21, impondo um enorme fardo socioeconômico. Além disso, as consequências metabólicas da obesidade são impulsionadoras de outras doenças, como diabetes mellitus tipo 2, intolerância à glicose, resistência à insulina, hipercolesterolemia, dislipidemia, hipertensão, doenças cardiovasculares e câncer. Assim, métodos seguros e eficazes para prevenção e/ou tratamento da obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas são muito necessários. A obesidade é o resultado

de um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia. As intervenções no estilo de vida por si só podem ser ineficazes para que alguns indivíduos percam peso suficiente ou mantenham a perda de peso sustentada para melhorar a saúde. Medicamentos antiobesidade, incluindo orlistat (Xenical), lorcaserin (Belviq) e uma combinação de fentermina e topiramato (Qsymia), podem ser tomados para atingir a perda de peso através da redução do apetite ou diminuição da absorção de gordura. No entanto, esses medicamentos têm vários efeitos colaterais, como diminuição da absorção de vitaminas lipossolúveis, dor de cabeça, fadiga, tontura, diarreia e incontinência fecal. Cirurgia bariátrica, por exemplo, a bandagem gástrica pode ser usada para tratar a obesidade grave para obter perda de peso a longo prazo, e a lipoaspiração para remover depósitos de gordura focais indesejados ganhou popularidade por razões cosméticas. No entanto, esses tipos de procedimentos invasivos também apresentam riscos substanciais. Portanto, é necessário desenvolver métodos aprimorados de tratamento da obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas.

**SUMÁRIO**

[009] A fim de abordar uma ou mais das necessidades acima mencionadas aqui fornecidas, existem as proteínas de fusão arginase ABD com meia-vida *in vivo* melhorada e atividade catabólica da arginina. As proteínas de fusão aqui descritas são úteis para o tratamento de doenças ou afecções em que a depleção de arginina tem um efeito terapêutico, como no tratamento de câncer, infecções virais, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças autoimunes, hiperargininemia congênita, doença do enxerto-versus-hospedeiro (GvHD), inflamação, obesidade e distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas. As proteínas de fusão podem ser rapidamente produzidas e purificadas a partir de proteínas brutas. A proteína de fusão pode ser usada sozinha ou em combinação com pelo menos um outro agente para dar um efeito sinérgico no tratamento ou prevenção de doenças.

[010] Também são fornecidos métodos de tratamento de obesidade, distúrbios metabólicos e/ou complicações e/ou comorbidades relacionadas ao esgotamento dos níveis de arginina em um indivíduo, como por administração de um agente de esgotamento de arginina a um indivíduo.

[011] Em um primeiro aspecto, é fornecida no presente documento uma proteína de fusão que compreende um polipeptídeo de domínio de ligação de albumina (ABD) e um polipeptídeo de arginase.

[012] Em uma primeira modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão do primeiro aspecto, em que o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 ou SEQ ID NO: 68.

[013] Em uma segunda modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão do primeiro aspecto, em que o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72.

[014] Em uma terceira modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão do primeiro aspecto, em que o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 ou SEQ ID NO: 68 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia com a SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72.

[015] Em uma terceira modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão da terceira modalidade do primeiro aspecto, em que o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 66 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 69.

[016] Em uma quinta modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão da quarta modalidade do primeiro aspecto que compreende ainda um ligante peptídico conectando o terminal C do polipeptídeo ABD e o terminal N do polipeptídeo arginase, em que o ligante peptídico é um polipeptídeo linear que tem entre 1 a 20 aminoácidos.

[017] Em uma sexta modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão da quinta modalidade do primeiro aspecto, em que o ligante de peptídeo compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 90% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 73 ou SEQ ID NO: 74.

[018] Em uma sétima modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão da sexta modalidade do primeiro aspecto, em que o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 67 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia com a SEQ ID NO: **72.**

[019] Em uma oitava modalidade do primeiro aspecto, é fornecida presente documento a proteína de fusão da sétima modalidade do primeiro aspecto, em que o ligante de peptídeo é um ligante de poli-histidina que tem entre 4 a 8 aminoácidos de histidina.

[020] Em uma nona modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão do primeiro aspecto, em que a proteína de fusão compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 98% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 75 ou SEQ ID NO: 76.

[021] Em uma décima modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão do primeiro aspecto, em que a proteína de fusão compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 98% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 75 e SEQ ID

NO: 76.

[022] Em uma décima primeira modalidade do primeiro aspecto, é fornecida neste documento a proteína de fusão do primeiro aspecto, em que a proteína de fusão compreende um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 75 e SEQ ID NO: 76.

[023] Em um segundo aspecto, é fornecida neste documento uma composição farmacêutica que compreende a proteína de fusão do primeiro aspecto e um carreador, excipiente ou combinação dos mesmos farmaceuticamente aceitável.

[024] Em um terceiro aspecto, é fornecido neste documento um método de tratamento de câncer em um indivíduo em necessidade disso que compreende a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão do primeiro aspecto ao indivíduo.

[025] Em um quarto aspecto, é fornecido neste documento um método de tratamento de pelo menos uma afecção selecionada do grupo que consiste em obesidade, um distúrbio metabólico e uma complicação relacionada em um indivíduo em necessidade disso que compreende a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma arginina agente de esgotamento ao um indivíduo.

[026] Em uma primeira modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método, em que o distúrbio metabólico é selecionado do grupo que consiste em obesidade, intolerância à glicose, hiperglicemia e diabetes mellitus e a complicação relacionada é uma ou mais afecções selecionadas do grupo que consiste de nefropatia diabética, retinopatia diabética, vasculopatia diabética, neuropatia diabética, hipercolesterolemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, hiperleptinemia, esteatose, esteatohepatite, fibrose, cirrose, inflamação crônica de baixo grau, hipertensão, doença cardiovascular e clareamento da gordura marrom.

[027] Em uma segunda modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método, em que o distúrbio metabólico é a resistência à insulina.

[028] Em uma terceira modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método, em que o tratamento da obesidade compreende pelo menos um dentre prevenir o ganho de massa gorda e reduzir a massa gorda.

[029] Em uma quarta modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método, em que o distúrbio metabólico é selecionado do grupo que consiste em esteatose hepática, esteatose renal, esteatose pancreática e esteatose cardíaca.

[030] Em uma quinta modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método, em que a concentração de arginina no soro do indivíduo é mantida abaixo de 50 μM.

[031] Em uma sexta modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método, em que o agente de depleção de arginina é uma enzima catabólica de arginina.

[032] Em uma sétima modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método da sexta modalidade do quarto aspecto, em que a enzima catabólica da arginina é uma proteína arginase, uma proteína arginina desiminase ou uma proteína arginina descarboxilase.

[033] Em uma oitava modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método da sétima modalidade do quarto aspecto, em que a proteína arginase, proteína arginina desiminase ou proteína arginina descarboxilase compreende ainda um ou mais grupos de polietilenoglicol (PEG).

[034] Em uma nona modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método da oitava modalidade do quarto aspecto, em que a proteína arginase compreende um polipeptídeo tendo SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 ou SEQ ID NO: 104.

[035] Em uma décima modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método da sétima modalidade do quarto aspecto, em que a proteína arginase, proteína arginina desiminase ou proteína arginina descarboxilase compreende ainda um domínio de ligação de albumina ou

albumina de soro humano, ou um domínio Fc de IgG humana.

[036] Em uma décima primeira modalidade do quarto aspecto, é fornecido neste documento o método da décima modalidade do quarto aspecto, em que a enzima catabólica da arginina é uma proteína de fusão compreendendo um polipeptídeo ABD e um polipeptídeo arginase; um polipeptídeo ABD e um polipeptídeo arginina desiminase; ou um polipeptídeo ABD e um polipeptídeo arginina descarboxilase.

[037] Em uma décima segunda modalidade do quarto aspecto, é fornecido no presente documento o método da décima primeira modalidade do quarto aspecto, em que a enzima catabólica de arginina é a proteína de fusão do primeiro aspecto.

[038] Em uma décima terceira modalidade do quarto aspecto, é fornecido no presente documento o método da décima segunda modalidade do quarto aspecto, em que a enzima catabólica de arginina compreende um polipeptídeo com pelo menos 98% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 75 ou SEQ ID NO: 76.

[039] Em um quinto aspecto, é fornecido neste documento um método de tratamento de pelo menos uma afecção selecionada do grupo que consiste em infecções virais, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças autoimunes, hiperargininemia congênita, doença do enxerto contra hospedeiro (GvHD) e inflamação em um indivíduo em necessidade disso que compreende a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão do primeiro aspecto ao indivíduo.

**BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[040] Os objetos e características acima e outros objetos e características da presente revelação se tornarão aparentes a partir da seguinte descrição da invenção, quando considerada em conjunto com os desenhos anexos, nos quais:

[041] **A FIGURA 1** ilustra a purificação da proteína de fusão N-ABD094-rhArg

da arginase humana recombinante (rhArg) do domínio de ligação à albumina (ABD) (SEQ ID NO: 50) por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Coluna 1: Marcador de baixo alcance SDS-PAGE (Bio-rad); Pista 2: N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) 20x de diluição; Pista 3: N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) 10x de diluição.

[042] **FIGURA 2A** ilustra um gene N-ABD094-rhArg exemplificador (SEQ ID NO: 38) com os locais de ligação dos iniciadores anotados.

[043] **A FIGURA 2B** ilustra a sequência de proteínas da proteína de fusão N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) com um pI/Mw teórico de 6,07/42555,38.

[044] **A FIGURA 3** ilustra a sequência de proteínas da *Bacillus caldovelox* arginase BCA manipulada (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) com um único sítio de mutação de serina para cisteína e um marcador de histidina C-terminal. O resíduo de cisteína na posição 161 e 6xHis-tag estão destacados.

[045] **A FIGURA 4** ilustra o alinhamento da sequência de proteínas de BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89), a proteína de fusão BCA-6xHis-ABD BHA (SEQ ID NO: 75) e a proteína de fusão BCA-ABD-6xHis BAH (SEQ ID NO: 76) por CLUSTALW. Classificação de alinhamento: BCA versus BHA: 99.6721; BCA versus BAH: 98.0328; BHA versus BAH: 97.5138.

[046] **A FIGURA 5A** ilustra o perfil de eluição da purificação de BHA (SEQ ID NO: 75) de *E. coli* cultivada em 500 ml de cultura em frasco de agitação por uma única etapa de cromatografia em coluna HP quelante HiTrap de 5 ml carregada com níquel. mAU, unidade de absorção de mili; 100% B = imidazol 0,5 M.

[047] **A FIGURA 5B** ilustra a análise SDS-PAGE das frações da coluna de cromatografia de afinidade de níquel para BHA (SEQ ID NO: 75). M, marcadores de peso molecular SDS-PAGE, baixo alcance (Bio-Rad); FT, fluxo atravessante; F2-F10, frações eluídas da coluna.

[048] **A FIGURA 5C** ilustra o perfil de eluição da purificação de BAH (SEQ ID NO: 76) de células de *E. coli* cultivadas em 500 ml de cultura em frasco de agitação por uma única etapa de cromatografia em coluna HP quelante HiTrap

de 5 ml carregada com níquel. mAU, unidade de absorção de mili; 100% B = imidazol 0,5 M.

[049] **A FIGURA 5D** ilustra a análise SDS-PAGE das frações da coluna de cromatografia de afinidade de níquel para BAH (SEQ ID NO: 76). M, marcadores de peso molecular SDS-PAGE, baixo alcance (Bio-Rad); FT, fluxo atravessante; F2-F14, frações eluídas da coluna.

[050] **A FIGURA 6A** ilustra o cromatograma que mostra a purificação em grande escala de BCA manipulado (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) com o uso de coluna de afinidade de níquel XK50 com volume de leito de 196 ml. Similar à purificação em pequena escala, um gradiente de eluição de quatro segmentos foi adotado e o perfil de eluição foi monitorado por absorvância a 280 nm.

[051] **A FIGURA 6B** ilustra a análise de SDS-PAGE das frações selecionadas da purificação em grande escala de BCA manipulado (S161C)-His (SEQ ID NO: 89). A pista 1 é o marcador de baixo peso molecular. A pista 2 é a proteína total do lisado celular. A pista 3 representa as proteínas solúveis coletadas após o tratamento térmico. A pista 4 mostra o fluxo de proteína através da coluna de afinidade de níquel XK50. A pista 5 são as proteínas ligadas não específicas (frações agrupadas de A6-C3). As pistas 6 a 10 representam a fração E2, E3, F7, G3 e A’5, respectivamente.

[052] **A FIGURA 7** ilustra a ligação entre a proteína de fusão N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) e HSA em PAGE não desnaturante. Trinta picomoles de HSA foram misturados com 7,5, 15, 30, 60 e 120 picomoles de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) como mostrado nas pistas 5 a 9, respectivamente. A mobilidade de 30 picomoles de HSA e N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) no PAGE não desnaturante são mostrados nas Pistas 2 e 3, respectivamente. A pista 1 está vazia ou em branco. A pista 10 mostra 120 picomoles de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49).

[053] **A FIGURA 8** ilustra a ligação entre a proteína de fusão BHA (SEQ ID NO: 75) e HSA em PAGE não desnaturante. Sessenta picomoles de HSA foram misturados com 6, 12, 60, 300 e 600 picomoles de proteína de fusão BHA (SEQ

ID NO: 75) como mostrado nas pistas 1 a 5, respectivamente. A mobilidade de 60 picomoles de HSA e proteína de fusão BHA (SEQ ID NO: 75) no PAGE não desnaturante são mostrados nas Pistas 6 e 7, respectivamente. A banda identificada como “BCA-ABD” é BHA (SEQ ID NO: 75).

[054] **A FIGURA 9** ilustra a farmacodinâmica de BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) e da proteína de fusão BHA (SEQ ID NO: 75) na arginina plasmática em camundongos. Cada camundongo BALB/c foi administrado via injeção intravenosa (i.v.) ou injeção intraperitoneal (i.p.) com 250 U BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) ou proteína de fusão BHA (SEQ ID NO: 75). O plasma foi coletado nos pontos de tempo indicados após a injeção. O tempo 0 se refere à amostra de plasma coletada antes da injeção. A quantidade de arginina em cada amostra é determinada pelo Analisador de Aminoácidos Biochrom 30. As concentrações de arginina abaixo do limite de detecção (3 µM) são consideradas 0 µM nesses gráficos. Cada ponto representa a média ± SD de três camundongos.

[055] **A FIGURA 10** ilustra as concentrações de arginina no plasma, medidas com o uso do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30, de camundongos BALB/c após receber injeção intraperitoneal de uma dose única de (A) 125U; (B) 250U; e (C) 500U de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49). N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) foi injetado no dia 0.

[056] **A FIGURA 11** ilustra a análise SDS-PAGE da produção de His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101). Pistas 1 e 8: Marcador de baixo peso molecular SDS-PAGE (Bio-rad); Pistas 2 e 3: His-rhArg (SEQ ID NO: 101); Pistas 4 e 5: 60% de eluição; Pistas 6 e 7: 30% de eluição; Pistas 9 e 10: His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101). O peso molecular do PEG é 5.000. O PEG usado é metoxipolietilenoglicol-succinimidil propionato (mPEG-SPA 5.000). Os resíduos de lisina da superfície da proteína de His-rhArg (SEQ ID NO: 101) são covalentemente ligados por meio de um ligante de propionamidil (SPA) a PEG (5.000 amu) descrito no documento U.S. 8.679.810, que está aqui incorporado a

título de referência.

[057] **A FIGURA 12** ilustra os resultados de uma preparação de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50). Coluna 1: Marcador de peso molecular SDS-PAGE; Pista 2: lisado celular; Pista 3: após tratamento térmico; Pista 4: fluxo atravessante; Pista 5: 30% de eluição; Pista 6: 60% de eluição; Pista 7: Após filtração de fluxo tangencial (TFF). A principal banda de proteína na pista 6 ou pista 7 é N-ABD094-rhArg purificada (SEQ ID NO: 50).

[058] **A FIGURA 13** ilustra as concentrações de arginina plasmática em camundongos C57BL/6J machos alimentados com uma dieta alimentar, medida com o uso do espectrômetro de massa triplo quadrupolo de ionização por eletropulverização/cromatografia líquida Agilent 6460 com um limite de detecção de arginina 0,3 µM, em diferentes pontos de tempo após receber injeção intraperitoneal de um único dose de 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em solução salina demonstrou que as concentrações plasmáticas de arginina podem ser reduzidas a <1 µM durante 10 dias. Cada ponto representa a média ± SEM de 5 camundongos.

[059] **A FIGURA 14** ilustra as concentrações plasmáticas de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em pontos de tempo diferentes após serem injetados em camundongos machos C57BL/6J em uma dose única de 500U, medida por ELISA para detectar arginase humana (n = 5). A meia-vida circulatória do fármaco é de cerca de 4 dias. Cada ponto representa a média ± SEM de 5 camundongos.

[060] **A FIGURA 15** ilustra uma perda significativa de gordura em camundongos machos C57BL/6J magros normais alimentados com uma dieta alimentar e tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo Chow(rhArg)]. (**A**) Redução significativa na massa de gordura visceral e subcutânea após o tratamento com 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em intervalos de 10 dias por 4 semanas em comparação com o controle tratado com veículo (solução salina) [grupo Chow(veículo)]. *$P$ < 0,05, t-teste independente. Os dados são

expressos como ± SEM, n = 5 para cada grupo. (**B**) Seções de parafina manchadas com hematoxilina e eosina (H&E) de tecido adiposo branco visceral (WAT) em camundongos tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) mostraram uma redução proeminente no tamanho dos adipócitos.

[061] **A FIGURA 16** ilustra os níveis de expressão de vários genes relacionados à lipogênese cruciais em vários tecidos medidos com o uso de qRT-PCR em tempo real. Regulação negativa significativa de genes relacionados à lipogênese em (A) tecido adiposo branco visceral (WAT) e (B) fígado após tratamento com 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo Chow(rhArg)] em intervalos de 10 dias por 4 semanas em comparação com o controle tratado com veículo [grupo Chow(veículo)]. Os níveis de expressão gênica são expressos em relação aos camundongos tratados com veículo [grupo Chow (veículo)], que é definido como 1. **P* <0,05, t-teste independente. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[062] **A FIGURA 17** mostra que o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) melhora significativamente a sensibilidade à insulina. (**A**) O teste de tolerância à insulina mostrou que camundongos injetados com 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo Chow(rhArg)] em intervalos de 10 dias, demonstraram um aumento significativo na sensibilidade ao efeito de redução da glicose no sangue da insulina assim que 2 semanas após o tratamento em comparação com o controle tratado com veículo [grupo Chow (veículo)]. **P* < 0,05 vs. grupo Chow(rhArg), t-teste independente. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo. (**B**) O ensaio de MTT mostrou que o tratamento de hepatócitos primários de camundongo com 5U/ml de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) por 48 horas não afetou a viabilidade celular em comparação com o controle sem qualquer tratamento (con). (**C**) Análise de Western blot dos níveis de proteína de Akt fosforilado (pAkt) (marcador de sinalização de insulina) em hepatócitos primários de camundongo submetidos à depleção de arginina com 5U/ml de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) por 24

horas antes da exposição a 100 nM de insulina por 20 minutos. Hepatócitos tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) mostraram um nível mais alto de fosforilação de Akt após estimulação pela insulina, sugerindo um aumento na sinalização da insulina. Pista 1: con; Pista 2: 5U/ml de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50); Pista 3: insulina 100 nM; Pista 4: 5U/ml de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) + insulina 100 nM.

[063] **A FIGURA 18** ilustra que, embora camundongos machos C57BL/6J tratados com veículo alimentados com uma dieta rica em gordura (HFD) contendo 60 kcal% de gordura (de 8 semanas de idade a 12 semanas) [grupo HFD (veículo)] mostrou ganho proeminente em (A) peso corporal e (B) tamanho, tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD (de 8 semanas de idade por 12 semanas) com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana pode prevenir efetivamente o ganho de peso. Seu peso corporal permaneceu similar ao dos camundongos de controle magros tratados com veículo alimentados com uma dieta com baixo teor de gordura (LFD) correspondente contendo 10 kcal% de gordura [grupo LFD (veículo)]. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[064] **A FIGURA 19** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas poderia prevenir eficazmente a expansão induzida por HFD do tecido adiposo branco (WAT). (**A**) Peso do coxim adiposo nos depósitos viscerais principais (perigonadal, perirrenal e mesentérico) e subcutâneos (inguinais). (**B**) As seções manchadas de H&E de WAT visceral mostraram que o tratamento concomitante com N-ABD094-rhArg preveniu a hipertrofia induzida por HFD de adipócitos brancos. (**C**) Os níveis de expressão de vários genes relacionados à lipogênese cruciais em WAT expressos em relação ao controle magro [grupo LFD (veículo)], que é definido como 1. Esses genes foram drasticamente regulados para baixo em camundongos alimentados com HFD e tratados com N-ABD094-rhArg. *$P$ <

0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[065] **A FIGURA 20** ilustra a supressão da regulação positiva induzida por HFD de reguladores transcricionais da lipogênese (*Pparg* e *Srebp1c*), com regulação negativa concomitante de enzimas lipogênicas cruciais (*Acc1* e *Scd1*) no músculo esquelético de camundongos tratados com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD(rhArg)] uma vez por semana por 12 semanas. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[066] **A FIGURA 21** ilustra esse tratamento simultâneo com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD(rhArg)] uma vez por semana pode prevenir eficazmente a obesidade induzida por HFD em camundongos fêmeas C57BL/6J. (**A**) Peso corporal de camundongos alimentados com um HFD de 8 semanas de idade por 12 semanas, e atualmente tratados com N-ABD094-rhArg ou veículo. Camundongos fêmeas tratados com veículo alimentados com um LFD serviram como controle magro [grupo LFD (veículo)]. (**B**) Peso da almofada de gordura nos depósitos viscerais principais (perigonadal, perirrenal e mesentérico) e subcutâneos (inguinais). **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[067] **A FIGURA 22** ilustra esse tratamento simultâneo com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana pode prevenir eficazmente a resistência à insulina induzida por HFD e intolerância à glicose em camundongos fêmeas C57BL/6J. (**A**) Teste de tolerância à insulina (ITT) realizado 7 semanas após a alimentação de um HFD. (**B**) Teste de tolerância à glicose (GTT) realizado 11 semanas após a alimentação de um HFD. Os resultados de ITT e GTT são expressos como área sob a curva (AUC). **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[068] **A FIGURA 23** ilustra que a depleção de arginina pela adição de N-

ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (rhArg), arginase bovina ou arginina desiminase nativa (ADI) para o meio de cultura, ou com o uso de meio sem arginina inibiu a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongo em adipócitos. A adição do produto metabólico da arginase L-ornitina ou ureia, ou do produto metabólico ADI L-citrulina ao meio de cultura não teve efeitos inibitórios na adipogênese e na lipogênese. (*O meio de cultura contém L-arginina 0,4 mM e pode ser convertido em L-ornitina 0,4 mM e ureia 0,4 mM por arginase, ou L-citrulina 0,4 mM por ADI.). As células cultivadas em meio de cultura sem adição de agentes depletores de arginina ou produtos metabólicos de arginase/ADI serviram como controle. Os lipídios nas células foram manchados com red oil O 6 dias após a exposição a fatores indutores de diferenciação específicos adicionados ao meio.

[069] **A FIGURA 24** ilustra que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia suprimir genes adipogênicos e lipogênicos em pré-adipócitos 3T3-L1. Os pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongo foram cultivados por 6 dias em meio suplementado com fatores específicos para induzir a diferenciação em adipócitos (diferenciados). As células cultivadas em meio sem esses fatores permaneceram indiferenciadas. O meio foi adicionado com 2U/ml de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (rhArg). As células cultivadas em meio sem adição de N-ABD094-rhArg serviram como controle. Os níveis de expressão de mRNA de vários reguladores transcricionais cruciais (**A**) da adipogênese e (**B**) enzimas nas vias lipogênicas foram determinados por qRT-PCR em tempo real e expressos em relação ao grupo indiferenciado (controle), que é definido como 1. *$P < 0,05$, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 3 para cada grupo.

[070] **A FIGURA 25** ilustra a resposta de pré-adipócitos 3T3-L1 a várias concentrações de arginina. Os pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongo foram cultivados em meio sem arginina com ou sem adição de concentrações variáveis de L-arginina por 6 dias. As células cultivadas em meio normal contendo arginina suplementado com fatores indutores de diferenciação serviram como controle

positivo (+ ve) da diferenciação, enquanto as células cultivadas em meio normal contendo arginina sem suplementação de fatores indutores de diferenciação serviram como controle negativo (-ve) de diferenciação. Um grupo de células foi cultivado em meio normal contendo arginina suplementado com fatores indutores de diferenciação e tratado com 5U/ml de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (rhArg) para inibir diferenciação. (**A**) As células foram manchadas para lipídios com red oil O, e a intensidade da coloração foi quantificada pela medição da densidade óptica, que é expressa como a porcentagem contra o grupo de controle + ve. (**B**) Os níveis de mRNA de vários genes cruciais relacionados à lipogênese são expressos em relação às células cultivadas em meio sem arginina, que é definido como 1. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 3 para cada grupo.

[071] **A FIGURA 26** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana pode prevenir eficazmente a resistência à insulina induzida por HFD. O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado em (**A**) 6 semanas e (**B**) 11 semanas após a alimentação de um HFD, e os resultados são expressos como área sob a curva (AUC). **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[072] **A FIGURA 27** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana pode prevenir eficazmente a intolerância à glicose induzida por HFD. O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado em (**A**) 5 semanas e (**B**) 10 semanas após a alimentação de um HFD, e os resultados são expressos como área sob a curva (AUC). **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[073] **A FIGURA 28** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos

machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana pode prevenir eficazmente a elevação induzida por HFD do jejum (A) glicose no sangue medida com o uso de um glicosímetro e (B) concentrações plasmáticas de insulina medidas com o uso de ELISA. (**C**) A classificação HOMA-IR, calculada pela fórmula padrão, como uma medida da resistência à insulina mostrou que o tratamento concomitante com N-ABD094-rhArg preveniu o desenvolvimento de resistência à insulina induzida por HFD. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[074] **A FIGURA 29** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana preveniu/melhorou a elevação induzida por HFD do plasma em jejum (**A**) leptina, (**B**) colesterol total, (**C**) triglicerídeos e (**D**) níveis de ácidos graxos livres. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[075] **A FIGURA 30** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas preveniu o aumento do fígado induzido por HFD. (**A**) Imagens representativas de fígado fresco inteiro. (**B**) Peso do fígado. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[076] **A FIGURA 31** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas pode prevenir eficazmente a esteatose hepática induzida por HFD. (**A**) O manchamento de seções de fígado com red oil O mostrou extensa acumulação de lipídios em camundongos tratados com veículo alimentados com um HFD [grupo HFD

(veículo)], que estava ausente em camundongos tratados com N-ABD094-rhArg. (**B**) O tratamento com N-ABD094-rhArg evitou a elevação nas concentrações de triglicerídeos no fígado de camundongos alimentados com HFD. (**C**) N-ABD094-rhArg suprimiu a regulação positiva induzida por HFD de genes relacionados à lipogênese no fígado. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[077] **A FIGURA 32** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas evitou a elevação induzida por HFD dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) comumente medida como biomarcador para dano hepático. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[078] **A FIGURA 33** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos alimentados com um HFD com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas preveniu o aumento induzido por HFD no peso de (**A**) rim, (**B**) pâncreas e (**C**) coração. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[079] **A FIGURA 34** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas poderia efetivamente (**A**) suprimir a suprarregulação induzida por HFD dos níveis de mRNA de adipocinas pró-inflamatórias em WAT visceral, expressa em relação aos camundongos de controle magros [grupo LFD (veículo)], que é definido como 1, e (**B**) suprime a elevação induzida por HFD nos níveis séricos de citocina pró-inflamatória. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[080] **A FIGURA 35** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos

machos com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas poderia prevenir eficazmente a branqueamento induzida por HFD do tecido adiposo branco (WAT). (**A**) Imagens representativas de BAT interescapular fresco inteiro. (**B**) Peso do BAT interescapular. (**C**) As seções de parafina manchadas com H&E revelaram que células com um único orifício grande (glóbulo lipídico), que são características histológicas típicas de adipócitos brancos, eram abundantes em BAT de camundongos alimentados com HFD tratados com veículo [grupo HFD (veículo)], mas raramente foram encontradas em BAT de camundongos alimentados com HFD tratados com N-ABD094-rhArg. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[081] **A FIGURA 36** ilustra que o tratamento simultâneo de camundongos machos com 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas regulou significativamente os níveis de mRNA dos principais reguladores da termogênese (*Ucp1* e *Pgc1a*) em BAT e suprimiu a regulação negativa induzida por HFD do gene de oxidação de ácidos graxos *Acox1* em BAT. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[082] **A FIGURA 37** ilustra que camundongos C57BL/6J machos com obesidade pré-existente induzida por alimentação com um HFD de 5 semanas de idade por 12 semanas mostraram redução proeminente no peso corporal após o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50). (**A**) Peso corporal de camundongos tratados com 600U N-ABD094-rhArg [grupo HFD (rhArg)] uma vez por semana durante 12 semanas. (**B**) Imagens representativas de camundongos após 12 semanas de tratamento. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[083] **A FIGURA 38** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos

machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia efetivamente reduzir o tecido adiposo branco. (**A**) O peso da almofada de gordura nos depósitos viscerais principais (perigonadal, perirrenal e mesentérico) e subcutâneos (inguinais) de camundongos obesos foi altamente similar aos camundongos de controle magros [grupo LFD (rhArg)] após o tratamento com N-ABD094-rhArg. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo. (**B**) Seções manchadas de H&E de WAT visceral mostraram que o tratamento com N-ABD094-rhArg reduziu significativamente o tamanho das células de adipócitos de camundongos obesos.

[084] **A FIGURA 39** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia efetivamente reverter a resistência à insulina. O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado antes e às 4, 8 e 12 semanas após o tratamento com N-ABD094-rhArg. Os resultados de ITT são expressos como área sob a curva (AUC). *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[085] **A FIGURA 40** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia efetivamente reverter a intolerância à glicose. O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado antes e às 3, 7 e 11 semanas após o tratamento com N-ABD094-rhArg. Os resultados de GTT são expressos como área sob a curva (AUC). *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[086] **A FIGURA 41** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reverter

efetivamente a hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina. (**A**) Glicose no sangue em jejum, (**B**) insulina no plasma em jejum e (**C**) classificação HOMA-IR de camundongos obesos foram corrigidos para níveis quase normais após o tratamento com N-ABD094-rhArg. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[087] **A FIGURA 42** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia efetivamente reverter a hiperleptinemia e hipercolesterolemia. (**A**) A leptina plasmática em jejum e (**B**) o colesterol total no plasma em jejum de camundongos obesos foram corrigidos para níveis quase normais após o tratamento com N-ABD094-rhArg. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[088] **A FIGURA 43** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia efetivamente reverter o aumento do fígado. (**A**) Imagens representativas de fígado fresco inteiro mostraram que o fígado de camundongos obesos voltou ao tamanho normal após o tratamento com N-ABD094-rhArg. (**B**) O peso do fígado de camundongos obesos foi drasticamente reduzido após o tratamento com N-ABD094-rhArg e foi similar àquele dos camundongos de controle magros [grupo LFD (rhArg)]. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[089] **A FIGURA 44** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia efetivamente reverter esteatose hepática. No fígado de camundongos obesos tratados com N-ABD094-rhArg, (**A**) o manchamento com red oil O de

seções do fígado mostrou uma depuração dramática de lipídios, e (**B**) as concentrações de triglicerídeos foram reduzidas a níveis comparáveis com os camundongos de controle magros [LFD ( veículo)] e (**C**) os níveis de mRNA de vários genes relacionados à lipogênese cruciais foram significativamente regulados para baixo. Os níveis de expressão são expressos em relação ao controle magro, que é definido como 1. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[090] **A FIGURA 45** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reduzir significativamente os níveis séricos de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), que são biomarcadores comuns de danos ao fígado. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[091] **A FIGURA 46** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reverter esteatose renal. Em camundongos obesos tratados com N-ABD094-rhArg: (**A**) o peso do rim; (**B**) concentrações de triglicerídeos no rim; (**C**) estruturas vacuoladas nos túbulos renais de seções renais manchadas com H&E e (D) acúmulo ectópico de gotículas de lipídios nos glomérulos das seções renais manchadas com red oil O foram significativamente reduzidas. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[092] **A FIGURA 47** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reverter esteatose pancreática. Em camundongos obesos tratados com

N-ABD094-rhArg: (**A**) o peso do pâncreas; (**B**) acúmulo interlobular e intralobular excessivo de tecido adiposo branco mostrado em seções do pâncreas manchadas com H&E; e (**C**) as concentrações de triglicerídeos no pâncreas foram significativamente reduzidas. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[093] **A FIGURA 48** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reverter esteatose cardíaca. Em camundongos obesos tratados com N-ABD094-rhArg: (**A**) o peso do coração; (**B**) acúmulo excessivo de gotículas de lipídios no coração; e (**C**) as concentrações de triglicerídeos no coração foram significativamente reduzidas. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[094] **A FIGURA 49** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reduzir significativamente as concentrações de triglicerídeos no músculo esquelético. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[095] **A FIGURA 50** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia diminuir significativamente (**A**) os níveis de mRNA de adipocina pró-inflamatória Mcp1 em WAT visceral, expressa em relação aos camundongos de controle magros [Grupo LFD (veículo)], que é definido como 1, e (**B**) reduzem a concentração sérica da citocina pró-inflamatória Mcp1. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[096] **A FIGURA 51** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reduzir a inflamação e fibrose no fígado. No fígado de camundongos obesos tratados com N-ABD094-rhArg, houve significativa (**A**) regulação negativa de genes pró-inflamatórios, e (**B**) genes profibróticos, mas (**C**) regulação positiva de genes anti-inflamatórios. Os níveis de mRNA são expressos em relação ao controle pobre [LFD (veículo)], que é definido como 1. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[097] **A FIGURA 52** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [HFD (rhArg)] poderia reduzir a inflamação e fibrose no rim. No rim de camundongos obesos tratados com N-ABD094-rhArg, houve significativa (**A**) regulação negativa de genes pró-inflamatórios e (**B**) genes profibróticos e (**C**) redução do depósito excessivo de fibras de colágeno ao redor dos túbulos renais e glomérulos. Os níveis de mRNA são expressos em relação ao controle pobre [grupo LFD (veículo)], que é definido como 1. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[098] **A FIGURA 53** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reduzir a inflamação e fibrose no pâncreas. No pâncreas de camundongos obesos tratados com N-ABD094-rhArg, houve significativa (**A**) regulação negativa do gene pró-inflamatório e (**B**) do gene profibrótico. Os níveis de mRNA são expressos em relação ao controle pobre [grupo LFD (veículo)]. **P* < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[099] **A FIGURA 54** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana durante 12 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia efetivamente reverter o branqueamento de gordura marrom (BAT). Nos camundongos obesos tratados com N-ABD094-rhArg, (**A**) o peso de BAT interescapular; (**B**) a morfologia e o tamanho do BAT interescapular; e (C) as características histológicas mostradas na seção de BAT corada com H&E eram semelhantes às dos camundongos de controle magros. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5 para cada grupo.

[100] **A FIGURA 55** ilustra que a administração de 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) uma vez por semana para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (rhArg)] poderia reduzir significativamente (**A**) a pressão arterial sistólica e diastólica e (B) a frequência cardíaca de camundongos obesos a um nível similar aos camundongos de controle magros [grupo LFD (veículo)] por 5 semanas após o tratamento com o fármaco. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 10 para cada grupo.

[101] **A FIGURA 56** ilustra que camundongos machos C57BL/6J alimentaram um LFD e receberam uma injeção intraperitoneal de 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [grupo LFD (rhArg)] uma vez por semana durante 8 meses a partir das 5 semanas de idade desenvolveu anticorpo antifármaco não neutralizante. (**A**) Por meio do uso de um ensaio ELISA, os anticorpos anti-rhArg, com uma titulação média de anticorpos de $10^8$, puderam ser detectados no plasma de camundongos alimentados com LFD tratados com N-ABD094-rhArg. (**B**) O plasma foi incubado com 1.000 U/ml de N-ABD094-rhArg (rhArg *) por 1 hora seguido pela medição da atividade da arginase. Não houve redução da atividade da arginase, mostrando que os anticorpos gerados no animal contra o fármaco não eram anticorpos neutralizantes. Os dados são expressos como

média ± SEM, n = 3 para cada grupo.

[102] **A FIGURA 57** ilustra que a administração de 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) a camundongos machos C57BL/6J alimentados com um grupo LFD [LFD (rhArg)] uma vez por semana por 8 meses a partir de 5 semanas de idade não induziu efeitos adversos no fígado e rim. Camundongos alimentados com LFD tratados com N-ABD094-rhArg não mostraram nenhuma diferença significativa dos camundongos alimentados com LFD tratados com veículo [grupo LFD (veículo)] em (**A**) concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), comumente usado como biomarcadores para avaliar funções ou doenças hepáticas; e (**B**) concentrações séricas de creatinina e albumina/creatinina na urina, comumente usados como biomarcadores para avaliar funções ou doenças renais. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 3 para cada grupo.

[103] **A FIGURA 58** ilustra que a administração de 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) a camundongos machos C57BL/6J alimentados com um grupo LFD [LFD (rhArg)] uma vez por semana por 8 meses a partir de 5 semanas de idade não induziu efeitos vasculares adversos. Camundongos alimentados com LFD tratados com N-ABD094-rhArg não mostraram qualquer diferença significativa de camundongos alimentados com LFD tratados com veículo [grupo LFD (veículo)] em (**A**) contração do músculo liso vascular evocada por fenilefrina; (**B**) relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina; e (**C**) relaxamento independente do endotélio em resposta ao nitroprussiato de sódio doador de óxido nítrico. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 3 para cada grupo.

[104] **A FIGURA 59** ilustra que a administração de 300U de His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) uma vez por semana durante 4 semanas para camundongos C57BL/6J machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (PEG-rhArg)] poderia efetivamente reduzir o peso corporal de camundongos a um peso similar àquele de camundongos de controle magros

tratados com veículo alimentados com ração dieta [grupo Chow(veículo)]. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 6 para cada grupo.

[105] **A FIGURA 60** ilustra que a administração de 300U de His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) uma vez por semana durante 4 semanas para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (PEG-rhArg)] poderia efetivamente reduzir a massa de gordura nos depósitos viscerais principais (perigondal, perirrenal, mesentérico) e subcutâneos (inguinais), e reduzir o peso do fígado, rim, pâncreas e coração. *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 4 para cada grupo.

[106] **A FIGURA 61** ilustra que a administração de 300U de His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) uma vez por semana para camundongos machos com obesidade induzida por HFD pré-existente [grupo HFD (PEG-rhArg)] poderia reduzir significativamente (**A**) a glicose no sangue em jejum e (**B**) aumentar a sensibilidade à insulina no teste de tolerância à insulina (ITT) conduzido em 2 semanas após o tratamento com fármacos. Os resultados de ITT são expressos como área sob a curva (AUC). *$P$ < 0,05, ANOVA unidirecional seguido de LSD de Fisher. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 6 para cada grupo.

[107] **A FIGURA 62** ilustra que a administração de 25-100U N-ABD094-rhArg-$Co^{2+}$ [SEQ ID NO: 50 (substituído por cobalto)] uma vez por semana durante 5 semanas para camundongos machos C57BL/6J com obesidade induzida por HFD pré-existente poderia efetivamente reduzir o peso corporal dos camundongos. Os dados são expressos como média ± SEM, n = 3.

[108] **A FIGURA 63** ilustra o efeito anticâncer da proteína de fusão BHA (SEQ ID NO: 75) na linha celular de câncer gástrico MKN45. O crescimento de MKN45 foi inibido de maneira dependente da dose. A viabilidade foi determinada por ensaio colorimétrico de ponto final MTT. Dados expressos como média ± SD, n = 3.

[109] **A FIGURA 64** ilustra o efeito de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) no volume do tumor em camundongos nus de xenoenxerto de câncer de mama 4T1. A curva para “Grupo Experimental” representa o grupo experimental que recebeu injeção de 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana; a curva para “Grupo de Controle” representa o grupo de controle que recebeu injeção de PBS uma vez por semana. *$P$ <0,05, **$P$ <0,01 vs Grupo Experimental, t-teste, n = 4-6.

[110] **A FIGURA 65** ilustra o efeito de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) no volume do tumor relativo em camundongos nus de xenoenxerto de câncer de mama 4T1. A curva para “Grupo Experimental” representa o grupo experimental que recebeu injeção de 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana. A curva para “Grupo de Controle” representa o grupo de controle que recebeu PBS uma vez por semana. * $P$ < 0,05 vs Grupo Experimental, t-teste, n = 4-6.

[111] **A FIGURA 66** ilustra as diferenças significativas de peso do tumor entre o grupo experimental e o grupo de controle. O grupo experimental recebeu injeção de 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana. O grupo controle recebeu injeção de PBS uma vez por semana. *$P$ < 0,05 vs Grupo Experimental, t-teste, n = 4-6.

[112] **A FIGURA 67** ilustra a fotografia dos tumores coletados dos camundongos nus do grupo de controle e do grupo tratado com N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49).

[113] **A FIGURA 68** ilustra o efeito de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) no volume do tumor relativo em camundongos nus de aloenxertos de câncer de mama 4T1. A curva para “500U ABD-rhArg” representa o grupo experimental que recebeu injeção de 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana. A curva para “250U ABD-rhArg” representa o grupo experimental que recebeu injeção de 250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana. A curva para “500U PEG-rhArg” representa o grupo experimental que recebeu injeção de 500U His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) uma vez por semana. A curva para “Grupo

de Controle" representa o grupo de controle que recebeu PBS uma vez por semana. ***P* < 0,01, ****P* < 0,001 vs Grupo Experimental, t-teste, n = 6-8.

[114] **A FIGURA 69** ilustra as diferenças significativas de peso do tumor entre os grupos experimentais e o grupo de controle. Os dados para "500U ABD-rhArg" representam o grupo que recebeu injeção de 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana. Os dados para "250U ABD-rhArg" representam o grupo que recebeu injeção de 250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana. Os dados para "500U PEG-rhArg" representam o grupo que recebeu injeção de 500U His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) uma vez por semana. Os dados para "Grupo de Controle" representam o grupo de controle que recebeu PBS uma vez por semana. **P* <0,05, ***P* <0,01 vs Grupo Experimental, t-teste, n = 6-8.

[115] **A FIGURA 70** ilustra a fotografia dos tumores coletados dos camundongos nus do grupo de controle e do N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: (**A**) Os dados para "500U ABD-rhArg" representam o grupo que recebeu injeção de 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana. Os dados "250U ABD-rhArg" representam o grupo que recebeu injeção de 250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) uma vez por semana. Os dados para "500U PEG-rhArg" representam o grupo que recebeu injeção de 500U His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) uma vez por semana. Os dados para "Grupo de Controle" representam o grupo de controle que recebeu PBS uma vez por semana. **P* <0,05, ***P* <0,01 vs Grupo Experimental, t-teste, n = 6-8. (**B**) Gráfico de dispersão do número de nódulos metastáticos dos pulmões de aloenxertos 4T1 mostrados na Figura 70A.

**DESCRIÇÃO DETALHADA**

[116] A presente revelação geralmente se refere a proteínas de fusão que compreendem um polipeptídeo de arginase e um polipeptídeo ABD e métodos de uso e preparação dos mesmos. As proteínas de fusão fornecidas aqui são agentes de depleção de arginina altamente eficazes e, devido à fusão com um

polipeptídeo ABD, exibem uma meia-vida amplamente estendida em comparação com arginase e derivados de arginase conhecidos. As proteínas de fusão reveladas são úteis para o tratamento de doenças e afecções em que a depleção de arginina resulta em um efeito terapêutico, como no tratamento de câncer, vírus, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças autoimunes, hiperargininemia congênita, doença do enxerto contra hospedeiro (GvHD), inflamação, obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas.

[117] A presente revelação também se refere geralmente a métodos de tratamento de obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas em um indivíduo em necessidade disso, esgotando o nível de arginina no indivíduo. A depleção de arginina no indivíduo resulta em redução de peso e massa gorda, melhora da tolerância à glicose e responsividade à insulina, normalização dos níveis de glicose no sangue, perfis endócrinos e metabólicos e alívio da inflamação, esteatose e fibrose. Qualquer agente com capacidade de esgotar a arginina em um indivíduo pode ser usado nos métodos de tratamento de obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas aqui descritas.

**DEFINIÇÃO DE TERMOS**

[118] As definições dos termos usados neste documento têm o objetivo de incorporar as definições atuais do estado da técnica reconhecidas para cada termo no campo da biotecnologia. Quando apropriado, exemplificação é fornecida. As definições se aplicam aos termos conforme são usados ao longo deste relatório descritivo, a menos que de outra forma limitada em casos específicos, individualmente ou como parte de um grupo maior.

[119] Conforme usado neste documento, o termo “meia-vida” ou “½-vida” se refere ao tempo que seria necessário para a concentração de um agente, por exemplo, uma proteína de fusão ou agente de depleção de arginina, conforme descrito neste documento, cair pela metade *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, após

a injeção em um mamífero. Em certos casos, a concentração de arginina plasmática, após a injeção, é usada neste documento como um indicador proxy da meia-vida do agente. Em tais casos, o termo “duração terapêutica” é usado para se referir ao período de tempo que uma dosagem especificada do agente de depleção de arginina tem a capacidade de manter a concentração plasmática de arginina abaixo de uma concentração limite especificada em que um efeito terapêutico desejado é observado. Em certas modalidades, a concentração limite de arginina plasmática está abaixo de 50 μM, abaixo de 40 μM, abaixo de 30 μM, abaixo de 20 μM, abaixo de 10 μM, abaixo de 5 μM, abaixo de 3 μM ou em uma concentração abaixo do limite de detecção do analítico convencional instrumentação. Por exemplo, o esgotamento da arginina plasmática para concentrações abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (o limite de detecção é 3 μM) por 7 dias após a injeção de uma enzima catabólica de arginina aqui descrita indica uma duração terapêutica de 7 dias e uma meia-vida, por exemplo, da ordem de cerca de 7 dias.

[120] O termo “anexar” ou “anexado”, conforme usado neste documento, se refere a conectar ou unir por uma ligação ou interação de não ligação, a fim de manter dois ou mais compostos juntos, o que abrange a ligação direta ou indireta de modo que, por exemplo, onde um primeiro o polipeptídeo está diretamente ligado a um segundo polipeptídeo ou outra molécula, e as modalidades em que um ou mais compostos intermediários (por exemplo, um ligante), como um polipeptídeo, está disposto entre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo ou outra molécula.

[121] O termo “proteína” ou “polipeptídeo”, como usado no presente documento, indica um polímero orgânico composto por dois ou mais monômeros de aminoácidos e/ou análogos dos mesmos. O termo “polipeptídeo” inclui polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento, incluindo proteínas e peptídeos de comprimento total, bem como análogos e fragmentos dos mesmos. Um polipeptídeo de três ou mais aminoácidos também é chamado de oligopeptídeo.

Conforme usado neste documento, o termo “aminoácido”, “monômero de aminoácido” ou “resíduo de aminoácido” se refere a qualquer um dos vinte aminoácidos de ocorrência natural, incluindo aminoácidos sintéticos com cadeias laterais não naturais e incluindo ambos os isômeros ópticos D e L. O termo “análogo de aminoácido” se refere a um aminoácido no qual um ou mais átomos individuais foram substituídos, por um átomo diferente, isótopo ou por um grupo funcional diferente, mas de outra forma é idêntico ao seu análogo de aminoácido natural.

[122] Como usado no presente documento, o termo “aminoácido não natural” se refere a qualquer aminoácido, aminoácido modificado e/ou análogo de aminoácido que não seja um dos 20 aminoácidos comuns de ocorrência natural, seleno cisteína ou pirrolisina.

[123] Como usado no presente documento, o termo “proteína de fusão” se refere a uma proteína quimérica contendo proteínas ou fragmentos de proteínas funcionais (por exemplo, arginase ou variantes das mesmas) que tem diferentes origens que são ligadas covalentemente, por exemplo, por uma amida, éster, ureia, carbamato, éter e/ou ligação dissulfeto.

[124] Como usado no presente documento, o termo “variante” se refere a um polinucleotídeo ou ácido nucleico que difere de um ácido nucleico ou polipeptídeo de referência, mas retendo propriedades essenciais do mesmo. Geralmente, as variantes são em geral muito semelhantes e, em muitas regiões, idênticas ao ácido nucleico ou polipeptídeo de referência.

[125] Uma variante pode, por exemplo, compreender a sequência de aminoácidos da sequência polipeptídica parental com pelo menos uma substituição conservativa de aminoácidos. Alternativa ou adicionalmente, a variante pode compreender a sequência de aminoácidos da sequência polipeptídica parental com pelo menos uma substituição de aminoácido não conservativa. Nesse caso, é preferencial que a substituição não conservativa de aminoácidos não interfira ou iniba a atividade biológica da variante funcional. A

substituição não conservativa de aminoácidos pode aumentar a atividade biológica da variante, de modo que a atividade biológica da variante seja aumentada em comparação com o polipeptídeo parental.

[126] O termo “fragmento funcional”, quando usado em referência a um polipeptídeo, se refere a qualquer parte ou porção do polipeptídeo em questão, cuja parte ou porção retém a atividade biológica do polipeptídeo do qual faz parte (o polipeptídeo parental). O fragmento funcional pode ser qualquer fragmento que compreende aminoácidos contíguos do polipeptídeo do qual faz parte, desde que o fragmento funcional ainda exiba pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% ou tem substancialmente a mesma ou ainda maior atividade biológica do polipeptídeo parental. Em referência ao polipeptídeo parental, o fragmento funcional pode compreender, por exemplo, cerca de 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou mais, do polipeptídeo parental.

[127] O fragmento funcional pode compreender aminoácidos adicionais no terminal amino ou carboxi, ou em ambos os terminais, por exemplo, aminoácidos não encontrados na sequência de aminoácidos do polipeptídeo parental.

[128] As substituições de aminoácidos dos polipeptídeos descritos podem ser substituições de aminoácidos conservativas. As substituições conservativas de aminoácidos são conhecidas na técnica e incluem substituições de aminoácidos em que um aminoácido com certas propriedades físicas e/ou químicas é trocado por outro aminoácido que tem propriedades químicas ou físicas iguais ou similares. Por exemplo, a substituição conservativa de aminoácidos pode ser um aminoácido polar ácido/carregado negativamente substituído por outro aminoácido polar ácido/carregado negativamente (por exemplo, Asp ou Glu), um aminoácido com uma cadeia lateral não polar substituído por outro aminoácido com uma cadeia lateral não polar (por exemplo, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, etc.), um aminoácido polar básico/carregado positivamente substituído por outro amino polar carregado positivamente/básico ácido (por

exemplo, Lys, His, Arg, etc.), um aminoácido não carregado com uma cadeia lateral polar substituído por outro aminoácido não carregado com uma cadeia lateral polar (por exemplo, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), um aminoácido com uma cadeia lateral ramificada beta substituído por outro aminoácido com uma cadeia lateral ramificada beta (por exemplo, Ile, Thr e Val), um aminoácido com uma cadeia lateral aromática substituída por outro aminoácido com uma cadeia lateral aromática (por exemplo, His, Phe, Trp e Tyr), etc.

[129] Os termos “porcentagem de homologia” e “porcentagem de identidade de sequência”, quando usados em referência a um polipeptídeo ou sequência de polinucleotídeo, são usados de forma intercambiável aqui para se referir a comparações entre polinucleotídeos e polipeptídeos e são determinados pela comparação de duas sequências alinhadas de forma otimizada em uma janela de comparação, em que a porção do polinucleotídeo ou sequência polipeptídica na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, lacunas) em comparação com a sequência de referência (que não compreende adições ou deleções) para o alinhamento ótimo das duas sequências. A porcentagem é calculada determinando-se a quantidade de posições em que ocorre o resíduo de base de ácido nucleico ou de aminoácido idênticos em ambas as sequências para render a quantidade de posições correspondentes, dividindo-se a quantidade de posições correspondentes pela quantidade total de posições na janela de comparação e multiplicando-se o resultado por 100 para render a porcentagem de identidade de sequência. A homologia é avaliada com o uso de qualquer um dos vários algoritmos e programas de comparação de sequência conhecidos na técnica. Esses algoritmos e programas incluem, mas de forma alguma estão limitados a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA e CLUSTALW [Pearson e Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2.444 a 2.448; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403 a 410; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22(2):4.673 a 4.680; Higgins et al. 1996, Methods Enzymol. 266:383 a 402; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403 a 410; Altschul et

al., 1993, Nature Genetics 3:266 a 272]. Em certas modalidades, as homologias de sequência de proteína e ácido nucleico são avaliadas com o uso da Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (“BLAST”) que é bem conhecida na técnica (consulte, por exemplo, Karlin e Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2.267 a 2.268; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403 a 410; Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266 a 272; Altschul et al., 1997, Nuc. Acids Res. 25:3.389 a 3.402).

[130] Como usado no presente documento, os termos “tratar”, “que trata”, “tratamento” e similares se referem a reduzir ou melhorar um distúrbio/doença e/ou sintomas associados aos mesmos. Será apreciado, embora não impedido, o tratamento de um distúrbio ou afecção não requer que o distúrbio, afecção ou sintomas associados sejam completamente eliminados. Em certas modalidades, o tratamento inclui a prevenção de um distúrbio ou afecção e/ou sintomas associados aos mesmos. O termo “prevenção” ou “prevenir”, como usado no presente documento, se refere a qualquer ação que inibe ou pelo menos retarda o desenvolvimento de um distúrbio, afecção ou sintomas associados aos mesmos. A prevenção pode incluir níveis de prevenção primária, secundária e terciária, em que: a) a prevenção primária evita o desenvolvimento de uma doença; b) as atividades de prevenção secundária visam ao tratamento precoce da doença, aumentando assim as oportunidades de intervenções para prevenir a progressão da doença e o surgimento de sintomas; e c) a prevenção terciária reduz o impacto negativo de uma doença já estabelecida, restaurando a função e reduzindo as complicações relacionadas à doença.

[131] Como usado no presente documento, o termo “catabolismo” ou “catabólico” se refere à reação química de uma molécula em outras, por exemplo, moléculas menores. Por exemplo, as enzimas catabólicas da arginina se referem a qualquer enzima com capacidade de reagir com a arginina, transformando-a em outras moléculas, como ornitina, citrulina e agmatina.

[132] Conforme usado neste documento, o termo “indivíduo” se refere a

qualquer animal (por exemplo, um mamífero), incluindo, sem limitação, seres humanos, primatas não humanos, caninos, felinos e roedores.

[133] Conforme usado neste documento, o termo “índice de massa corporal” ou “BMI” significa a razão de peso em Kg dividido pela altura em metros, ao quadrado.

[134] Conforme usado neste documento, o termo “excesso de peso” se refere a um IMC entre 25 e 30 em seres humanos adultos. Para pessoas com menos de 20 anos, “excesso de peso” é definido como um IMC entre o percentil 85 e 95 em comparação com pessoas da mesma idade.

[135] Conforme usado neste documento, o termo “obesidade” se refere a um IMC entre 30 e 40 em seres humanos adultos. Para pessoas com menos de 20 anos, a “obesidade” é definida como um IMC acima do percentil 95 em comparação com pessoas da mesma idade. Como usado no presente documento, o termo pode incluir obesidade e obesidade mórbida.

[136] Como usado no presente documento, o termo “obesidade mórbida” se refere a um IMC superior a 40 em seres humanos adultos.

[137] Como usado no presente documento, o termo “esteatose” se refere à afecção na qual a gordura se acumula nos tecidos, como tecido do fígado, tecido renal, tecido do pâncreas, tecido do músculo cardíaco ou outros tecidos musculares.

[138] Como usado no presente documento, o termo “fibrose” se refere à afecção em que há excesso de deposição de tecido conjuntivo fibroso, incluindo colágeno, em um órgão ou tecido, como tecido hepático, tecido renal, tecido pancreático ou tecido cardíaco.

[139] O termo “hipercolesterolemia”, como usado no presente documento, se refere a uma afecção em que os níveis de colesterol no sangue são elevados em comparação com o nível médio normal de colesterol no sangue em um respectivo indivíduo de referência da mesma origem étnica, idade e gênero. No que diz respeito a seres humanos, o termo em particular se refere a níveis

sanguíneos de colesterol total acima de cerca de 200, em particular acima de cerca de 240 mg/dl.

[140] Os termos “dislipidemia” e “hiperlipidemia”, como usado no presente documento, se referem a uma afecção em que o nível de lipídios/gorduras incluindo colesterol, ésteres de colesterol, fosfolipídios, triglicerídeos e/ou lipoproteínas na corrente sanguínea são respectivamente anormais e elevados em comparação com o nível médio normal de lipídios / gorduras no sangue em um respectivo sujeito de referência da mesma origem étnica, idade e gênero.

[141] As proteínas de fusão aqui fornecidas compreendem um polipeptídeo arginase. O polipeptídeo arginase pode ser derivado de uma proteína arginase expressa por qualquer organismo que expressa arginase. Arginases exemplificativas incluem aquelas que são produzidas por bactérias, como bacilos, agrobactérias, cianobactérias e micobactérias, e mamíferos, como bovinos, suínos, ovinos, caprinos, roedores e seres humanos. Quando o polipeptídeo arginase é derivado da arginase humana, o mesmo pode ser arginase tipo 1 (ARG1) ou arginase tipo 2 (ARG2).

[142] O polipeptídeo arginase pode compreender um polipeptídeo arginase de comprimento total ou um fragmento funcional e/ou variante do mesmo.

[143] A arginase é uma enzima que contém manganês. Conforme demonstrado no Exemplo 32, quando um ou mais dos íons manganês presentes nas proteínas de fusão aqui descritas são substituídos por um ou mais metais catiônicos divalentes, como $Co^{2+}$ ou $Ni^{2+}$, a atividade catalítica da proteína de fusão pode aumentar. Consequentemente, em certas modalidades, as proteínas de fusão aqui descritas compreendem um ou mais metais divalentes, além do manganês, como $Co^{2+}$ ou $Ni^{2+}$. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende um ou mais metais selecionados de $Co^{2+}$ e $Ni^{2+}$. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende dois íons $Co^{2+}$ ou dois íons $Ni^{2+}$. Em outras modalidades, a proteína de fusão compreende dois íons $Mn^{2+}$.

[144] Em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase é ARG1 humano de

tipo selvagem. Em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência com pelo menos 95% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 69. Por exemplo, o polipeptídeo de arginase pode compreender uma sequência polipeptídica com pelo menos 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,4% ou 99,7% de homologia com SEQ ID NO: 69. Em certas modalidades, a sequência do polipeptídeo de arginase pode diferir da SEQ ID NO: 69 em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 30 modificações de aminoácidos (por exemplo, inserção, substituição, deleção, etc.). Em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase compreende um polipeptídeo com substituições de aminoácidos conservativas, substituições de aminoácidos não conservativas ou uma combinação das mesmas.

[145] Em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase é *Bacillus caldovelox* arginase (BCA). Em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência com pelo menos 95% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 70. Por exemplo, o polipeptídeo de arginase pode compreender uma sequência polipeptídica com pelo menos 96%, 97%, 98%, 99%, 99,3% ou 99,7% de homologia com SEQ ID NO: 70. Em certas modalidades, a sequência do polipeptídeo de arginase pode diferir da SEQ ID NO: 70 em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 30 modificações de aminoácidos (por exemplo, inserção, substituição, deleção, etc.). Em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase compreende um polipeptídeo com substituições de aminoácidos conservativas, substituições de aminoácidos não conservativas ou uma combinação das mesmas.

[146] Em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase é BCA, em que a serina 161 é substituída por uma cisteína conforme apresentado na SEQ ID NO: 71 e SEQ ID NO: 72. A substituição de serina por uma cisteína permite a incorporação direcionada localizada de frações químicas que podem melhorar ainda mais as propriedades da proteína de fusão. Por exemplo, a cadeia lateral da cisteína 161 pode ser reagida com uma porção PEG ativada apropriadamente

formando assim uma arginase PEGuilada, que pode ser incorporada na proteína de fusão resultante. A PEGuilação da proteína de fusão tem a capacidade de aumentar ainda mais o tempo de retenção das proteínas de fusão aqui descritas, protegendo as mesmas ainda mais contra vários mecanismos de degradação ativos dentro de um tecido ou célula, o que consequentemente melhora seu potencial terapêutico. Consequentemente, em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência com pelo menos 95% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72. Por exemplo, o polipeptídeo de arginase pode compreender uma sequência polipeptídica com pelo menos 96%, 97%, 98%, 99%, 99,3% ou 99,7% de homologia com SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: **72.** Em certas modalidades, a sequência do polipeptídeo de arginase pode diferir da SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72 em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 30 modificações de aminoácidos (por exemplo, inserção, substituição, deleção, etc.). Em certas modalidades, o polipeptídeo de arginase compreende um polipeptídeo com substituições de aminoácidos conservativas, substituições de aminoácidos não conservativas ou uma combinação das mesmas.

[147] Nos casos em que as proteínas de fusão aqui descritas são PEGuiladas, o grupo PEG pode ter um peso molecular de cerca de 5.000 a cerca de 20.000 amu, cerca de 5.000 a cerca de 15.000 amu, cerca de 5.000 a cerca de 12.000 amu, cerca de 7.000 a cerca de 12.000 amu, ou cerca de 7.000 a cerca de 10.000 amu. Em certas modalidades, o grupo PEG tem um peso molecular de cerca de 4.000 amu a 10.000 amu. Em certas modalidades, o grupo PEG é PEG4.000 ou PEG7.000.

[148] O grupo PEG pode ser covalentemente ligado diretamente à proteína de fusão ou através de um ligante. O grupo PEG pode ser covalentemente ligado à proteína de fusão por reação de uma cadeia lateral de cisteína ou lisina presente na proteína com um reagente de PEGuilação. Alternativamente, o grupo PEG pode ser covalentemente ligado à amina N-terminal da proteína.

[149] Em certas modalidades, a proteína de fusão é covalentemente ligada por meio de um ligante de ácido propiônico ao PEG. Em outras modalidades, a proteína de fusão é covalentemente ligada por meio de um ligante de ácido carboxílico C2-C10, C2-C9, C2-C8, C2-C7, C2-C6, C2-C5 ou C2-C4 de cadeia linear ou ramificada ao PEG. Em certas modalidades, o grupo PEG é anexado ao polipeptídeo arginase.

[150] As proteínas de fusão aqui descritas também compreendem um polipeptídeo de domínio de ligação de albumina (ABD). Vários estudos demonstraram o potencial da ligação da albumina para atingir meia-vida mais longa das proteínas terapêuticas. No entanto, o projeto de proteínas de fusão incluindo polipeptídeos ABD pode ser desafiador, devido ao fato de que a fusão do polipeptídeo ABD com a proteína terapêutica tem o potencial de afetar tanto a eficácia da proteína terapêutica, a afinidade de ligação do polipeptídeo ABD e a solubilidade da proteína de fusão. Consequentemente, a seleção do polipeptídeo ABD, seu sítio de fixação e a construção de quaisquer ligantes necessários não é um processo direto e muitas vezes requer tentativa e erro para chegar a uma propriedade de fusão com as propriedades desejadas. Por exemplo, as Figuras 9, 10 e 13 demonstram que a duração terapêutica (e meia-vida) de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) é inesperadamente muito mais longo do que BHA e BAH. Embora todos os BHA, BAH e N-ABD094-rhArg exibam duração terapêutica surpreendentemente alta (e meia-vida), não poderia ter sido previsto que N-ABD094-rhArg teria uma duração terapêutica tão longa (e meia-vida).

[151] A ação mais longa de um medicamento é geralmente desejável. O tipo de ligante, comprimento, flexibilidade e fusão do peptídeo bioativo ou proteína ao terminal C ou N do módulo de extensão de meia-vida, podem ter efeitos profundos na atividade de uma proteína de fusão. Na presente revelação, várias arginases foram fundidas a moléculas ABD por meio de um ligante adequado, de modo que tanto a atividade enzimática da arginase quanto a capacidade de

ligação à albumina de ABD possam ser retidas. Boa estabilidade e solubilidade também são essenciais. Isso é muito difícil e desafiador de conseguir. Ao contrário das fusões HSA ou Fc comuns, muito pouco se sabe sobre as fusões ABD. A presente revelação fornece exemplos do projeto de ligante que pode ser usado para gerar fusões arginase-ABD funcionais. A atividade das proteínas de fusão de arginase projetadas (N-ABD094-rhArg, N-ABD-rhArg, etc) foi otimizada na presente divulgação por meio de engenharia de ligante ou a posição da proteína bioativa (arginase) em relação à metade módulo de extensão de vida (ABD), ou ambos.

[152] Em muitos casos, a manipulação de proteínas pode ser usada para superar a perda de atividade. Em um exemplo, a manipulação do ligante foi usada para recuperar a atividade perdida após a fusão de IFN-α2b com HSA [Prot Exp Purif. 2008; 61:73–7]. Uma fusão direta de IFN-α2b com HSA resultou em uma proteína instável com muito pouca atividade biológica. Em um formato de fusão, os efeitos de vários ligantes na atividade de IFN-α2b foram testados. Os ligantes peptídicos são conhecidos por terem uma influência na expressão, atividade e farmacocinética das proteínas de fusão [Adv Drug Deliv Rev. 2013; 65:1357–69]. Os dois principais tipos de ligantes peptídicos são: (i) ligantes flexíveis (por exemplo, (G4S) n, onde n = 1–4); (ii) ligantes rígidos, como o ligante α-helicoidal [A (EAAAK) nA] x (onde n = 2–4 e x = 1 ou 2) e XPn (onde X é A, K ou E). Para ligantes flexíveis, uma vantagem é que a flexibilidade pode ser necessária para obter a orientação adequada da porção bioativa da molécula em relação ao seu receptor cognato. No entanto, os ligantes flexíveis não dão muito espaço entre o parceiro de fusão e a proteína bioativa. Por outro lado, os ligantes rígidos fornecem mais espaço, mas não têm flexibilidade. No caso da proteína de fusão IFN-α2b-HSA, o ligante flexível resultou em aproximadamente 39% da atividade em comparação com o IFN-α2b nativo, enquanto o ligante XP rígido e o ligante α-helicoidal resultaram em 68 e 115% de a atividade do IFN-α2b nativo, respectivamente [Prot Exp Purif. 2008;61:73–7].

[153] Certos ligantes podem ter um impacto negativo nas propriedades da proteína de fusão. Por exemplo, o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) foi fundido à transferrina (Tf). O uso de um ligante curto de leucina-glutamato (LE) resultou em apenas aproximadamente 10% da atividade do G-CSF nativo. A inserção de um ligante (G4S) 3 ou α-helicoidal [A (EAAAK) nA] m (n = 2–4, m = 1 ou 2) aumentou significativamente a atividade das proteínas de fusão sobre a de G-CSF-LE-Tf. A proteína de fusão construída com o ligante (A (EAAAK) 4ALEA- (EAAAK) 4A) resultou em atividade biológica próxima da do G-CSF nativo [Pharm Res. 2006;23:2116–21]. Em outro exemplo, enquanto o terminal C da porção Fc pode ser diretamente ligado ao terminal N da porção IFN-β por meio de uma ligação peptídica, Gillies et al. [US 7.670.595 B2] conecta adicionalmente a porção Fc e a porção IFN-β por meio de um peptídeo ligante. O peptídeo ligante está localizado entre o terminal C da porção Fc e o terminal N da porção IFN-β maduro. Nesse caso, o peptídeo de ligação é preferencialmente composto por resíduos de serina e glicina, como a sequência de aminoácidos G4SG4SG3SG. Todas essas revelações demonstram a importância de testar a tecnologia de ligante para o sucesso dos programas de pesquisa e desenvolvimento de proteínas de fusão.

[154] Com o uso de uma abordagem diferente, a importância da posição de fusão para a atividade foi demonstrada [Curr Pharmaceut Biotechnol. 2014;15:856–63]. O peptídeo natriurético cerebral (BNP) foi fundido ao terminal N ou C de HSA em vários formatos. Os resultados mostraram que BNP-HSA, BNP2-HSA (duas cópias de BNP) e BNP4-HSA, todos fundidos ao terminal N de HSA, não estavam ativos. No entanto, o HSA-BNP2, fundido ao terminal C de HSA, era tão ativo quanto o BNP nativo e de longa duração.

[155] Esses exemplos demonstram a importância de ter um esforço significativo na otimização de liderança de proteínas de fusão para otimizar a atividade por meio de engenharia de ligante, a posição da proteína bioativa ou peptídeo com relação ao módulo de extensão de meia-vida, ou ambos. É importante ressaltar

que a presente invenção usou uma nova abordagem de fusão ABD para unir um ABD e uma arginase de modo que a atividade da arginase possa ser retida. Moléculas de fusão arginase-ABD estáveis e solúveis que podem se ligar ao FcRn de uma maneira dependente do pH foram geradas com sucesso, permitindo a reciclagem endossômica eficiente. Por exemplo, a presente revelação surpreendentemente constatou que para o rhArg fundido a ABD, a meia-vida terminal na circulação da proteína aumentou dramaticamente de alguns minutos para 4 dias em camundongos. Tomadas em conjunto, uma variedade de abordagens diferentes estão disponíveis para o ajuste fino das propriedades farmacocinéticas das arginases, garantindo o tempo de residência adequado em circulação para diferentes condições de doença. Outra questão importante no desenvolvimento de qualquer proteína terapêutica é minimizar a imunogenicidade para evitar efeitos adversos. Assim, a baixa imunogenicidade observada de arginase humana e a desimunização bem-sucedida de ABD (por exemplo, ABD094), que também foi usada na presente revelação como parceiro de fusão gênica para estender a meia-vida *in vivo*, são importantes.

[156] A proteína de ligação à albumina é um domínio de proteína de três hélices encontrado em várias proteínas de superfície expressas por bactérias Gram positivas. A proteína de ligação à albumina derivada da proteína G estreptocócica tem 214 aminoácidos e contém três domínios de ligação à albumina (ABD1-3), que são usados para se ligar à albumina do soro humano e escapar do sistema imunológico de um hospedeiro. ABD3 corresponde a uma sequência de 46 aminoácidos, que demonstrou se ligar à albumina de soro humano e tem sido o assunto de uma série de estudos e maturação de afinidade para albumina de soro humano para desenvolver polipeptídeos ABD com propriedades diferentes, como afinidade de ligação e ligação seletividade. Esses estudos geraram um número substancial de polipeptídeos ABD com propriedades amplamente variáveis.

[157] As proteínas de ligação à albumina são encontradas em outras bactérias.

Por exemplo, proteínas de ligação à albumina de ocorrência natural incluem certas proteínas de superfície de bactérias Gram positivas, como proteínas M de estreptococos (por exemplo, Ml/Emml, M3 Emm3, M12/Emml2, EmmL55/Emm55, Emm49/EmmL49 e Proteína H), proteínas estreptocócicas G , MAG e ZAG, e PPL e PAB de certas cepas de *Finegoldia magna*.

[158] Em certas modalidades, as proteínas de fusão aqui descritas compreendem um polipeptídeo ABD que é derivado de um domínio de ligação à albumina da proteína G estreptocócica. Em certas modalidades, o polipeptídeo ABD é o domínio 3 de ligação à albumina da proteína G estreptocócica completo ou um fragmento funcional e/ou variante do mesmo.

[159] Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende um polipeptídeo ABD que compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 66. Por exemplo, o polipeptídeo ABD pode compreender uma sequência polipeptídica com pelo menos 94%, 96% ou 98% de homologia com a SEQ ID NO: 66. Em certas modalidades, a sequência do polipeptídeo de ABD pode diferir da SEQ ID NO: 66 em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 modificações de aminoácidos (por exemplo, inserção, substituição, deleção, etc.). Em certas modalidades, o polipeptídeo de ABD compreende um polipeptídeo com substituições de aminoácidos conservativas, substituições de aminoácidos não conservativas ou uma combinação das mesmas.

[160] Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende um polipeptídeo ABD que compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 67. Por exemplo, o polipeptídeo ABD pode compreender uma sequência polipeptídica com pelo menos 94%, 96% ou 98% de homologia com a SEQ ID NO: 67. Em certas modalidades, a sequência do polipeptídeo de ABD pode diferir da SEQ ID NO: 67 em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 modificações de aminoácidos (por exemplo, inserção, substituição, deleção, etc.). Em certas modalidades, o polipeptídeo de ABD compreende um polipeptídeo com substituições de aminoácidos conservativas, substituições de

aminoácidos não conservativas ou uma combinação das mesmas.

[161] Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende um polipeptídeo ABD que compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 68. Por exemplo, o polipeptídeo ABD pode compreender uma sequência polipeptídica com pelo menos 93%, 95% ou 97% de homologia com a SEQ ID NO: 68. Em certas modalidades, a sequência do polipeptídeo de ABD pode diferir da SEQ ID NO: 68 em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 modificações de aminoácidos (por exemplo, inserção, substituição, deleção, etc.). Em certas modalidades, o polipeptídeo de ABD compreende um polipeptídeo com substituições de aminoácidos conservativas, substituições de aminoácidos não conservativas ou uma combinação das mesmas.

[162] A posição relativa do polipeptídeo ABD e do polipeptídeo arginase pode variar. Por exemplo, o polipeptídeo ABD pode preceder o polipeptídeo arginase (por exemplo, o polipeptídeo arginase pode ser ligado direta ou indiretamente do C-terminal do polipeptídeo ABD) ou o polipeptídeo arginase pode preceder o polipeptídeo ABD (por exemplo, o polipeptídeo ABD pode ser ligado direta ou indiretamente a partir do C-terminal do polipeptídeo arginase).

[163] Em certas modalidades, a proteína de fusão pode incluir um ou mais polipeptídeos de arginase e/ou um ou mais polipeptídeos ABD. Por exemplo, a proteína de fusão pode ter a estrutura geral ABD-rhArg-ABD, ABD094-rhArg-ABD094, ABD-BCA-ABD, ABD094-BCA-ABD094, rhArg-ABD-rhArg, rhArg-ABD094-rhArg, BCA-ABD-BCA ou BCA-ABD094-BCA.

[164] O polipeptídeo ABD e o polipeptídeo arginase podem ser ligados por ligação covalente direta ou indiretamente ligados por meio de um ligante peptídico.

[165] O ligante de peptídeo ou ligante é um polipeptídeo que varia tipicamente de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais aminoácidos de comprimento, que é projetado para facilitar a conexão funcional do polipeptídeo ABD e do polipeptídeo arginase em uma proteína de

fusão ligada. O termo conexão funcional denota uma conexão que facilita o dobramento adequado dos polipeptídeos em uma estrutura tridimensional que permite que a proteína de fusão ligada exiba alguns ou todos os aspectos funcionais ou atividades biológicas da proteína (ou proteínas) da qual seus constituintes polipeptídicos são derivados.

[166] O ligante polipeptídico pode ser disposto entre o terminal N do polipeptídeo ABD e o terminal C do polipeptídeo arginase ou alternativamente disposto entre o terminal N do polipeptídeo arginase e o terminal C do polipeptídeo ABD.

[167] O ligante de peptídeo pode compreender aminoácidos de ocorrência natural, aminoácidos não naturais e combinações dos mesmos.

[168] Em certas modalidades, o ligante peptídico pode compreender glicina, serina, asparagina ou uma combinação das mesmas. Ligantes peptídicos exemplares incluem ligantes contendo poliglicina, $(GS)_n$ e $(GGS)_n$, em que n é 1 a 30. Ligantes peptídicos exemplificadores adicionais incluem ligantes flexíveis (por exemplo, $(G4S)_n$, em que n = 1 a 4), ou ligantes rígidos (por exemplo, o ligante alfa-helicoidal $[A(EAAAK)_nA]_x$, em que n = 2 a 4 e x = 1 ou 2; e XPn, em que X é A, K ou E e n = 1 a 10). Em certas modalidades, o ligante peptídico é $(A(EAAAK)_4ALEA-(EAAAK)_4A)$ (SEQ ID NO: 105), $G_4SG_4SG_3SG$ (SEQ ID NO: 106), $GS(N)_nGSG$, em que n = 1 a 10, e $GS(Q)_nGSG$, em que n = 1 a 10, e similares. Em certas modalidades, o ligante peptídico compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 90% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 73. Por exemplo, o ligante peptídico pode compreender um polipeptídeo com pelo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de sequência ou é idêntico à SEQ ID NO: 73.

[169] Em certas modalidades, o ligante peptídico pode compreender glicina, serina, asparagina ou uma combinação das mesmas. Em certas modalidades, o ligante peptídico compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 90% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 74. Por exemplo, o ligante

peptídico pode compreender um polipeptídeo com pelo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de sequência ou é idêntico à SEQ ID NO: 74.

[170] Os marcadores de purificação podem ser usados para melhorar a facilidade de purificação da proteína de fusão, como por cromatografia de afinidade. Uma etiqueta de purificação bem conhecida é a etiqueta hexa-histidina (6x His), que é uma sequência de seis resíduos de histidina. Assim, em certas modalidades, a proteína de fusão compreende ainda uma poli-histidina que compreende 4 a 8 aminoácidos de histidina, por exemplo, a etiqueta 6x His. A poli-histidina pode estar presente no terminal C da proteína de fusão, no terminal N da proteína de fusão ou disposta entre o polipeptídeo ABD e o polipeptídeo arginase.

[171] Quando a poli-histidina está disposta entre o polipeptídeo ABD e o polipeptídeo arginase, a mesma pode atuar como um ligante peptídico ou pode ser incluída além do ligante peptídico. Por exemplo, a proteína de fusão da SEQ ID NO 75 inclui um ligante polipeptídico de seis histidinas na posição 300-305, que serve para ligar o polipeptídeo ABD e o polipeptídeo arginase e vantajosamente pode ser usado para purificar a proteína de fusão por cromatografia de afinidade.

[172] A etiqueta de poli-histidina pode ser opcionalmente removida após a purificação estar completa por meio do uso de técnicas geralmente conhecidas na técnica. Por exemplo, as exopeptidases podem ser usadas para remover as etiquetas de poli-histidina do terminal N (por exemplo, Qiagen TAGZyme) e as etiquetas de poli-histidina do terminal C podem ser precedidos por uma sequência de aminoácidos adequada que facilita a remoção da etiqueta de poli-histidina com o uso de endopeptidases. Assim, as proteínas de fusão excluindo o marcador de poli-histidina N-terminal e/ou C-terminal estão englobadas no escopo desta revelação.

[173] Em certas modalidades, o polipeptídeo ABD compreende uma sequência

polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 ou SEQ ID NO: 68 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia com a SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72. Por exemplo, o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de sequência ou é idêntico à SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 ou SEQ ID NO: 68 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de sequência ou é idêntica à SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72.

[174] Em certas modalidades, o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de sequência ou é idêntico à SEQ ID NO: 66 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de sequência ou é idêntica à SEQ ID NO: 69.

[175] Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende ainda um ligante peptídico que compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da sequência homologia ou idêntica à SEQ ID NO: 73 ou SEQ ID NO: 74.

[176] Proteínas de fusão exemplares incluem proteínas de fusão com pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia ou são idênticas à SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 75 e SEQ ID NO: **76.**

[177] A duração terapêutica do efeito da proteína de fusão na concentração de arginina plasmática é dependente da quantidade da proteína de fusão administrada e pode ser cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8 , cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 13, cerca de 14 ou cerca de 15 dias ou mais. Em certas modalidades, a duração terapêutica da proteína de fusão é entre cerca de 5 dias

a cerca de 20 dias, cerca de 5 dias a cerca de 19 dias, cerca de 5 dias a cerca de 18 dias, cerca de 5 dias a cerca de 17 dias, cerca de 5 dias a cerca de 16 dias, cerca de 5 dias a cerca de 15 dias, cerca de 6 dias a cerca de 15 dias, cerca de 7 dias a cerca de 15 dias, cerca de 7 dias a cerca de 14 dias, cerca de 7 dias a cerca de 13 dias, cerca de 7 dias a cerca de 12 dias , cerca de 7 dias a cerca de 11 dias, ou cerca de 8 dias a cerca de 11 dias.

[178] Em certas modalidades, a meia-vida da proteína de fusão é de cerca de 1 dia a cerca de 10 dias, cerca de 1 dia a cerca de 9 dias, cerca de 1 dia a cerca de 8 dias, cerca de 1 dia a cerca de 7 dias, cerca de 1 dia a cerca de 6 dias, cerca de 1 dia a cerca de 5 dias, cerca de 1 dia a cerca de 4 dias, cerca de 1 dia a cerca de 3 dias, ou cerca de 1 dia a cerca de 2 dias. Nas outras modalidades, a meia-vida da proteína de fusão é de cerca de 6 horas a cerca de 30 horas.

[179] A atividade da arginase das proteínas de fusão aqui descritas pode ser substancialmente a mesma, inferior ou superior à atividade do polipeptídeo de arginase do qual é derivado. Uma unidade de atividade de arginase é definida como a quantidade de proteína de fusão [por exemplo, BHA (SEQ ID NO: 75), BAH (SEQ ID NO: 76), N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) ou N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)] ou arginase [por exemplo, BCA (SEQ ID NO: 70)] que catalisa a produção de 1 μmol de ureia por minuto em condições de ensaio padrão. A atividade específica da enzima é expressa em unidades de atividade por mg de proteína. Sob condições de ensaio de diacetilmonoxima (DAMO) padrão (37 °C, pH 7,4), as proteínas de fusão podem ter uma atividade específica que é cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25% cerca de 30%, cerca de 35% ou cerca de 40% mais baixo ou mais alto do que o polipeptídeo arginase correspondente que incorpora. Em certas modalidades, as proteínas de fusão podem ter uma atividade específica que é cerca de 5% a cerca de 40%, cerca de 10% a cerca de 40%, cerca de 10% a cerca de 35%, cerca de 10% a cerca de 30%, cerca de 20% a cerca 30%, cerca de 20% a cerca de 35%, cerca de 15% a cerca de 30%, cerca de 15% a cerca de 25%, ou cerca de 10% a cerca

de 20% mais baixo ou mais alto do que o polipeptídeo de arginase correspondente que incorpora.

[180] Em certas modalidades, a atividade de arginase das proteínas de fusão não é substancialmente afetada pela presença de HSA. Isto é vantajoso devido ao fato de que a ligação das proteínas de fusão ABD a HSA pode ter um efeito deletério na atividade da proteína de fusão.

[181] Também são fornecidas sequências de polinucleotídeos que codificam as proteínas de fusão aqui descritas como polinucleotídeos isolados ou como porções de vetores de expressão ou como porções de sequências de DNA linear, incluindo sequências de DNA linear usadas para transcrição/tradução *in vitro*, vetores compatíveis com expressão procariótica ou eucariótica, secreção e/ou exibição das composições. Certos polinucleotídeos exemplificadores são revelados neste documento, no entanto, outros polinucleotídeos que, dada a degenerescência do código genético ou preferências de códon em um determinado sistema de expressão, codificam as proteínas de fusão aqui descritas também estão dentro do escopo desta revelação.

[182] Os polinucleotídeos aqui descritos podem ser produzidos por síntese química, como a síntese de polinucleotídeos em fase sólida em um sintetizador de polinucleotídeos automatizado e montados em moléculas completas de fita simples ou dupla. Alternativamente, os polinucleotídeos da invenção podem ser produzidos por outras técnicas, como uma PCR seguida por clonagem de rotina. As técnicas para produzir ou obter polinucleotídeos de uma dada sequência conhecida são bem conhecidas na técnica.

[183] Os polinucleotídeos aqui descritos podem compreender pelo menos uma sequência não codificante, como uma sequência promotora ou intensificadora, íntron, sinal de poliadenilação e similares. As sequências polinucleotídicas também podem compreender sequências adicionais que codificam aminoácidos adicionais que codificam, por exemplo, um marcador ou uma sequência de etiqueta, como uma poli-histidina (6 X His) ou uma etiqueta de HA para facilitar

a purificação ou detecção da proteína, uma sequência de sinal, um parceiro de proteína de fusão, como o cDNA que codifica um agente bioativo e similares.

[184] Em outra modalidade, é fornecido no presente documento um vetor que compreende pelo menos um dos polinucleotídeos aqui descritos. Tais vetores podem ser vetores plasmídicos, vetores virais, vetores para expressão de baculovírus, vetores baseados em transposons ou qualquer outro vetor adequado para introdução dos polinucleotídeos da invenção em um determinado organismo ou fundo genético por qualquer meio. Tais vetores podem ser vetores de expressão que compreendem elementos de sequência de ácido nucleico que podem controlar, regular, causar ou permitir a expressão de um polipeptídeo codificado por tal vetor. Tais elementos podem compreender sítios de ligação do intensificador da transcrição, sítios de iniciação da RNA polimerase, sítios de ligação ao ribossoma e outros sítios que facilitam a expressão de polipeptídeos codificados em um determinado sistema de expressão. Tais sistemas de expressão podem ser baseados em células ou sistemas livres de células bem conhecidos na técnica.

[185] Em muitos sistemas de expressão bacteriana, o códon de início normalmente codifica a metionina, que consequentemente produz proteínas iniciadas com uma metionina N-terminal nesses sistemas de expressão. No entanto, é bem conhecido que certas enzimas bacterianas, como metionina aminopeptidase (MetAP) e similares, podem catalisar a clivagem hidrolítica da metionina N-terminal de polipeptídeos sintetizados recentemente. Isto é comumente observado em casos em que o próximo aminoácido é, por exemplo, Gly, Ala, Ser ou Thr [*In vivo* processing of N-terminal methionine in E. coli, FEBS Lett. 18 de Jun 1990;266(1-2):1-3]. Consequentemente, em certas modalidades das proteínas de fusão aqui descritas incluem variantes nas quais a metionina N-terminal da proteína não está presente.

[186] As proteínas de fusão aqui descritas podem ser isoladas com o uso de procedimentos de separação bem conhecidos na técnica para captura,

imobilização, partição ou sedimentação e purificadas na medida necessária para aplicabilidade comercial.

[187] Para uso terapêutico, as proteínas de fusão aqui descritas podem ser preparadas como composições farmacêuticas contendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão aqui descrita como um ingrediente ativo em um transportador farmaceuticamente aceitável. O termo “transportador” se refere a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o composto ativo é administrado. Esses veículos podem ser líquidos, como água e óleos, incluindo os de petróleo, animal, vegetal ou de origem sintética, como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similares. Por exemplo, solução salina 0,9% e glicina 0,3% podem ser usados. Essas soluções são estéreis e geralmente isentas de partículas. Os mesmos podem ser esterilizados por técnicas convencionais de esterilização bem conhecidas (por exemplo, filtração). As composições podem conter substâncias auxiliares farmaceuticamente aceitáveis, conforme necessário para aproximar as condições fisiológicas, como ajuste de pH e agentes tamponantes, agentes estabilizadores, espessantes, lubrificantes e corantes, etc. A concentração da proteína de fusão em tal formulação farmacêutica pode variar amplamente, por exemplo, de menos do que cerca de 0,5%, geralmente a ou pelo menos cerca de 1% a tanto quanto 15 ou 20% em peso e será selecionado principalmente com base na dose necessária, volumes de fluido, viscosidades, etc., de acordo com o modo particular de administração selecionado. Veículos e formulações adequados são descritos, por exemplo, em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21a Edição, Troy, D. B. ed., Lipincott Williams e Wilkins, Philadelphia, Pa. 2006, Parte 5, Pharmaceutical Manufacturing páginas 691 a 1.092, consulte especialmente páginas 958 a 989.

[188] O modo de administração para uso terapêutico da proteína de fusão aqui descrito pode ser qualquer via adequada que administre o agente ao hospedeiro, como administração parenteral, por exemplo, intradérmica, intramuscular,

intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, pulmonar; transmucosal (oral, intranasal, intravaginal, retal); com o uso de uma formulação em um comprimido, cápsula, solução, suspensão, pó, gel, partícula; e contido em uma seringa, um dispositivo implantado, bomba osmótica, cartucho, microbomba; ou outros meios apreciados pelos versados na técnica, como bem conhecidos na técnica. A administração específica do sítio pode ser alcançada, por exemplo, por entrega via intrarticular, intrabronquial, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitária, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intra-hepática, intracardíaca, intraóssea, intrapélvica, intrapericardíaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarretal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinhal, intrassinovial, intratorácica, intrauterina, intravascular, intravesical, intralesional, vaginal, retal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmica.

[189] As proteínas de fusão aqui descritas podem ser usadas como agentes de depleção de arginina. Tais agentes são úteis no tratamento de qualquer doença ou afecção em que a depleção de arginina em um indivíduo resulta em um efeito terapêutico, como no tratamento de câncer, certos vírus, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças autoimunes, hiperargininemia congênita, enxerto doença versus hospedeiro (GvHD) e, conforme descrito em detalhes aqui, obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas.

[190] Os tumores auxotróficos de arginina dependem da arginina extracelular, devido à regulação negativa de ASS ou OTC e dependem de fontes extracelulares de arginina para a sobrevivência. Os agentes depletores de arginina demonstraram ser citotóxicos para tumores auxotróficos de arginina e seu uso no tratamento do câncer está sendo investigado em ensaios clínicos.

[191] As proteínas de fusão aqui descritas podem, assim, ser usadas no tratamento de câncer, tal como câncer pancreático, leucemia, melanoma, câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de próstata, câncer cervical, câncer de fígado, câncer de nasofaringe,

câncer de esôfago, sarcoma, câncer de estômago, mesotelioma, linfoma, câncer de bexiga, câncer ósseo, câncer endometrial, câncer de ovário, câncer de rim, câncer de olho, neuroblastoma, glioblastoma, tumor maligno da bainha do nervo periférico (MPNST) e câncer cerebral. O câncer pode ser um câncer auxotrófico de arginina, por exemplo, um câncer caracterizado por regulação negativa de pelo menos um de ASS e OTC.

[192] As proteínas de fusão aqui descritas também podem ser usadas no tratamento de infecções virais, como vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus herpes simplex (HSV), vírus do papiloma humano (HPV ), Vírus Epstein-Barr (EBV), vírus herpes, vírus Varicella zoster e influenza.

[193] Conforme descrito em detalhes neste documento, as proteínas de fusão fornecidas neste documento também podem ser usadas no tratamento de pelo menos uma afecção selecionada do grupo que consiste em obesidade, um distúrbio metabólico e uma complicação e/ou comorbidade relacionada.

[194] Conforme demonstrado nas experiências abaixo, a depleção de arginina pode reduzir drasticamente a adiposidade. Aqui, investiga-se o potencial terapêutico da privação de arginina usando proteínas de fusão ABD arginase ou arginase PEGuilada, como N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) e N-ABD094-rhArg-$Co^{2+}$ [SEQ ID NO: 50 (substituído por cobalto)] no tratamento da obesidade e distúrbios metabólicos associados. Os dados aqui apresentados demonstram que a depleção de arginina com, por exemplo, N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), pode reduzir significativamente a massa gorda, suprimir a lipogênese e aumentar a sensibilidade à insulina em camundongos normais magros e camundongos obesos. Verificou-se que a privação de arginina, por exemplo, com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), pode prevenir e reduzir a obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas, incluindo resistência à insulina.

[195] Os efeitos da depleção de arginina aqui apresentados são surpreendentes e inesperados, devido ao fato de que vários estudos mostraram que aumentar a ingestão dietética de alguns aminoácidos (AAs), incluindo arginina, tem efeitos significativos no metabolismo de glicose e lipídios e a suplementação de AA pode ser usada para reduzir o peso corporal. Além disso, como a arginina é um aminoácido semiessencial, sua depleção não resulta em efeitos prejudiciais para o indivíduo.

[196] Foi utilizado o modelo de camundongo obesidade induzida por dieta rica em gordura (DIO). Camundongos magros iniciando uma dieta rica em gordura foram tratados simultaneamente com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) para testar sua eficácia na prevenção do desenvolvimento de DIO e distúrbios metabólicos associados. Camundongos com DIO pré-existente foram tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) para testar sua eficácia na redução da obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas.

[197] Conforme demonstrado nos exemplos abaixo, o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) resultou na redução de peso e massa gorda, melhora da tolerância à glicose e responsividade à insulina, normalização dos perfis endócrino e metabólico e alívio da inflamação, esteatose e fibrose e prevenção ou reversão do clareamento da gordura marrom.

[198] É fornecido neste documento um método para tratar obesidade e/ou um distúrbio metabólico em um indivíduo em necessidade disso que compreende a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de depleção de arginina ao indivíduo.

[199] O agente de depleção de arginina pode ser qualquer agente de depleção de arginina conhecido na técnica que tenha a capacidade de reduzir os níveis plasmáticos e/ou celulares de arginina em um indivíduo. O agente de depleção de arginina pode ser uma pequena molécula ou proteína.

[200] A proteína pode ser uma proteína de fusão e/ou uma proteína modificada quimicamente, como uma proteína PEGuilada. Proteínas exemplificadoras

incluem aquelas que têm a capacidade de catalisar o catabolismo de arginina para outros produtos, como proteínas tendo arginase, arginina desiminase, arginina descarboxilase ou atividade de arginina 2 mono-oxigenase.

[201] A arginase pode ser qualquer arginase conhecida na técnica, como aquelas produzidas por bactérias, fungos, peixes, humanos, bovinos, suínos, coelhos, roedores, primatas, ovelhas e cabras. Por exemplo, *Bacillus caldovelox* arginase, *Thermus thermophilus* arginase, *Capra hircus* arginase I, *Heterocephalus glaber* arginase I, *Bos taurus* arginase I, *Sus scrofa* arginase I, *Plecoglossus altivelis* arginase I, *Salmo salar* arginase I, *Oncorhynchus mykiss* arginase I, *Osmerus mordax* arginase I, *Hyriopsis cumingii* arginase I, *Rattus norvegicus* arginase I, *Mus musculus* arginase I, *Homo sapiens* (human) arginase I, *Pan troglodytes* arginase I, *Oryctolagus cuniculus* arginase I, *Rattus norvegicus* arginase II, *Mus musculus* arginase II, *Homo sapiens* (humana) arginase II, *Bostaurus* arginase II, *Heterocephalus glaber* arginase II, *Pan troglodytes* arginase II, *Oryctolagus cuniculus* arginase II, *Delftia* arginase, *Bacillus coagulans* arginase, *Hoeflea phototrophica* arginase e *Roseiflexus castenholzii* arginase. Outros exemplos incluem arginases de *Bacillus methanolicus, Bacillus sp. NRRL B-14911, Planococcus donghaensis, Paenibacillus dendritiformis, Desmospora sp., Methylobacter tundripaludum, Stenotrophomonas sp., Microbacterium laevaniformans, Porphyromonas uenonis, Agrobacterium sp., Octadecabacter arcticus, Agrobacterium tumefaciens, Anoxybacillus flavithermus, Bacillus pumilus, Geobacillus thermoglucosidasius, Geobacillus thermoglucosidans, Brevibacillus laterosporus, Desulfotomaculum ruminis, Geobacillus kaustophilus, Geobacillus thermoleovorans, Geobacillus thermodenitrificans, Staphylococcus aureus, Halophilic archaeon DL31, Halopigerxanaduensis, Natrialba magadii, Plasmodium falciparum, Helicobacter pylori* e similares.

[202] A arginina desiminase pode ser qualquer arginina desiminase conhecida na técnica, como os produzidos a partir de micro-organismos Mycoplasma,

Lactococcus, Pseudomonas, Steptococcus, Escherichia, Mycobacterium ou Bacillus. Arginina deiminase exemplificadora incluem, sem limitação, aquelas produzidas por *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma arthritidis*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus licheniformis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzellii*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis, Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Steptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus sake*, *Giardia intestinalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* e similares.

[203] A arginina descarboxilase pode ser qualquer arginina descarboxilase conhecida na técnica, como aquelas produzidas por *Escherichia coli.*, *Salmonella typhimurium*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Methanocaldococcus jannaschii, Paramecium bursaria Chlorella virus 1, Vibrio vulnificus YJ016, Campylobacter jejuni subsp., Trypanosoma cruzi, Sulfolobus solfataricus, Bacillus licheniformis, Bacillus cereus, Carica papaya, Nicotianatobacum, Glycine max, Lotus coniculata, Vibrio vulnificus, Vibrio cholerae, Mus musculus, Thermotoga, Rattus norvegicus, Homo sapiens, Bos taurus, Susscrofa, Thermus thermophiles, Thermus parvatiensis, Thermus aquaticus, Thermus thermophilus, Thermus islandicus, Arabidopsis thaliana, Avena sativa* e similares.

[204] A arginina 2-mono-oxigenase pode ser qualquer arginina 2-mono-oxigenase conhecida na técnica, como as produzidas a partir de *Arthrobacter globiformis* IFO 12137, *Arthrobacter simplex* IFO 12069, *Brevibacterium helvolum* IFO 12073, *Helicobacter cinaedi* CCUG 18818, *Streptomyces griseus* e similares.

[205] A arginina descarboxilase, arginina desiminase, arginina 2-mono-oxigenase e arginase podem ser a proteína completa ou um fragmento funcional e/ou variante da mesma. A arginina descarboxilase, arginina desiminase, arginina 2-mono-oxigenase e arginase podem ser modificadas para melhorar suas propriedades farmacocinéticas, como por fusão da proteína ou fragmento funcional e/ou variante da mesma com albumina sérica humana, um domínio de

ligação de albumina, uma região Fc de imunoglobulina, um grupo PEG ou uma combinação dos mesmos.

[206] As enzimas catabólicas da arginina aqui descritas podem ser manipuladas para incluir locais específicos na enzima onde o PEG pode ser ligado seletivamente. Os sítios de PEGuilação selecionados estão preferencialmente localizados em um sítio removido do sítio ativo da enzima e geralmente expostos ao solvente para permitir a reação com os reagentes de PEGuilação.

[207] Por exemplo, $Cys^{45}$-arginase I humana (HAI) e Cys161-*Bacillus caldovelox* arginase (BCA) podem ser produzidas para reagir com moléculas de PEG específicas de tiol. A conjugação entre o único resíduo de cisteína livre da arginase modificada e um grupo maleimida (MAL) ligado a um composto de PEG pode resultar em uma ligação covalente entre o composto de PEG e a cisteína livre da arginase modificada. SEQ ID NO: 102 e 104 incluem mutante (C168S/C303S) projetado para PEGuilação direcionada ao sítio $Cys^{45}$ e, portanto, pode ser opcionalmente PEGuilado. SEQ ID NO: 89 também inclui mutante (S161C) projetado para PEGuilação direcionada ao sítio $Cys^{161}$ e, portanto, pode ser opcionalmente PEGuilado.

[208] Em certas modalidades, a arginase pode compreender a SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 ou SEQ ID NO: 104, em que SEQ ID NO: 102 e SEQ ID NO: 104 opcionalmente compreende um grupo polietilenoglicol (PEG).

[209] Qualquer reagente de PEGuilação conhecido na técnica pode ser usado para anexar covalentemente PEG às enzimas catabólicas de arginina aqui descritas. Reagentes de PEGuilação exemplificadores incluem, sem limitação, mPEG-ALD (metoxipolietilenoglicol-propionaldeído); mPEG-MAL (metoxipolietilenoglicol-maleimida); mPEG-NHS (metoxipolietilenoglicol-N-hidroxi-succinimida); mPEG-SPA (metoxipolietilenoglicol-succinimidil propionato); e mPEG-CN (cloreto de metoxipolietilenoglicol-cianúrico).

[210] O grupo PEG pode ter um peso molecular de cerca de 5.000 a cerca de 20.000 amu, cerca de 5.000 a cerca de 15.000 amu, cerca de 5.000 a cerca de

12.000 amu, cerca de 7.000 a cerca de 12.000 amu, ou cerca de 7.000 a cerca de 10.000 amu. Em certas modalidades, o grupo PEG tem um peso molecular de cerca de 2.000 amu a 10.000 amu. Em certas modalidades, o grupo PEG é PEG4.000, PEG5.000, PEG6.000 ou PEG7.000.

[211] O grupo PEG pode ser covalentemente ligado diretamente à arginase ou através de um ligante. Em certas modalidades, a arginase é covalentemente ligada por meio de um ligante de ácido propiônico ao PEG. Em outras modalidades, a arginase é covalentemente ligada por meio de um ligante de ácido carboxílico C2-C10, C2-C9, C2-C8, C2-C7, C2-C6, C2-C5 ou C2-C4 de cadeia linear ou ramificada ao PEG.

[212] Em modalidades alternativas, o método de tratamento de pelo menos uma afecção selecionada do grupo que consiste em obesidade, um distúrbio metabólico e uma complicação e/ou comorbidade relacionada em um indivíduo em necessidade disso compreende a administração de uma dieta com baixo teor de arginina ou substancialmente livre de arginina ao indivíduo.

[213] O método de tratamento de pelo menos uma afecção selecionada do grupo que consiste em obesidade, um distúrbio metabólico e uma complicação e/ou comorbidade relacionada também pode incluir a prevenção de pelo menos uma afecção selecionada do grupo que consiste em obesidade, um distúrbio metabólico, e uma complicação relacionada e/ou comorbidade.

[214] O distúrbio metabólico pode incluir obesidade, hipercolesterolemia, dislipidemia, esteatose, resistência à insulina, intolerância à glicose, hiperglicemia e diabetes ou combinações dos mesmos e complicações relacionadas e/ou comorbidades podem incluir retinopatia diabética, nefropatia diabética, vasculopatia diabética, neuropatia diabética, esteaoepatite, fibrose, cirrose, inflamação, hipertensão, doença cardiovascular e branqueamento da gordura marrom ou uma combinação dos mesmos.

[215] Em certas modalidades, o distúrbio metabólico é o tratamento e/ou prevenção da resistência à insulina, por exemplo, em indivíduos com diabetes

tipo I ou, particularmente, tipo II. Como os exemplos demonstram abaixo, a depleção de arginina resulta em um aumento na sensibilidade à insulina de um indivíduo.

[216] O método de tratamento da obesidade pode incluir reduzir a massa gorda ou prevenir o ganho de massa gorda em um indivíduo. O tratamento de um indivíduo com um agente de depleção de arginina pode resultar na redução dos níveis de expressão de mRNA de vários fatores de transcrição adipogênicos e enzimas lipogênicas no tecido adiposo branco visceral (WAT), fígado e músculo esquelético, como *Pparg*, *Srebp1c*, *Acc* e *Scd1* em comparação com indivíduos não tratados em uma dieta rica em gordura. Em certas modalidades, o nível de expressão da redução dos níveis de expressão de mRNA dos reguladores da lipogênese é reduzido em, por exemplo, pelo menos cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80% ou cerca de 90% dos níveis de expressão de mRNA correspondentes em um indivíduo não tratado com uma dieta rica em gordura. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com um agente de depleção de arginina resulta na redução da expressão de mRNA de um ou mais genes selecionados do grupo que consiste em *Pparg*, *Srebp1c*, *Acc* e *Scd1* no WAT, fígado e/ou músculos esqueléticos do indivíduo.

[217] A obesidade pode ser o resultado de e/ou associada a um distúrbio metabólico (como hiperglicemia, hiperinsulinemia) e/ou outros fatores, como comer demais, falta de exercício físico, etc.

[218] O distúrbio metabólico também pode incluir o tratamento e/ou prevenção de esteatose em um sujeito, como esteatose cardíaca, esteatose hepática, esteatose renal, esteatose pancreática e esteatose muscular.

[219] O distúrbio metabólico também pode incluir o tratamento e/ou prevenção de fibrose em um indivíduo, como fibrose hepática, fibrose renal, fibrose pancreática e fibrose cardíaca.

[220] O distúrbio metabólico também pode envolver o tratamento de

hipercolesterolemia, dislipidemia, por exemplo, pela redução do colesterol total no plasma, colesterol LDL, apolipoproteína B e/ou níveis de triglicerídeos.

[221] O tratamento de um indivíduo com um agente de depleção de arginina pode reduzir a concentração de leptina plasmática, por exemplo, pelo menos cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60% ou cerca de 70% da concentração correspondente de leptina plasmática em um indivíduo não tratado em um HFD. Em certas modalidades, a concentração de leptina plasmática pode ser reduzida em cerca de 10% a cerca de 70%, cerca de 10% a cerca de 60%, cerca de 10% a cerca de 50%, cerca de 10% a cerca de 40%, cerca de 10% a cerca 30% da concentração correspondente de leptina plasmática em um indivíduo não tratado em um HFD.

[222] O tratamento de um indivíduo com um agente de depleção de arginina pode reduzir a concentração de triglicerídeos plasmáticos em, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, cerca de 30% ou cerca de 40% da concentração correspondente de triglicerídeos plasmáticos em um indivíduo não tratado em um HFD. Em certas modalidades, a concentração de triglicerídeos plasmáticos pode ser reduzida em cerca de 5% a cerca de 40%, cerca de 5% a cerca de 30% ou cerca de 5% a cerca de 20% da concentração correspondente de triglicerídeos plasmáticos em um indivíduo não tratado em um HFD.

[223] O tratamento de um indivíduo com um agente de depleção de arginina pode reduzir a concentração de colesterol total plasmático em, por exemplo, pelo menos cerca de 5%, cerca de 10% ou cerca de 15% da concentração correspondente de colesterol total plasmático em um indivíduo não tratado em um HFD. Em certas modalidades, a concentração de colesterol total plasmático pode ser reduzida em cerca de 5% a cerca de 15%, cerca de 5% a cerca de 10% ou cerca de 10% a cerca de 15% da concentração correspondente de colesterol total plasmático em um indivíduo não tratado em um HFD.

[224] O tratamento de um indivíduo com um agente de depleção de arginina pode reduzir a concentração de ácido graxo livre plasmático em, por exemplo,

pelo menos cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15% ou cerca de 20% da concentração correspondente de ácido graxo livre plasmático em um indivíduo não tratado em um HFD. Em certas modalidades, a concentração de ácidos graxos livres plasmáticos pode ser reduzida em cerca de 5% a cerca de 20%, cerca de 5% a cerca de 15% ou cerca de 5% a cerca de 10% da concentração correspondente de ácidos graxos livres plasmáticos em um indivíduo não tratado em um HFD.

[225] A concentração de arginina plasmática no indivíduo necessária para observar um efeito terapêutico pode variar com base em vários fatores, incluindo a condição do indivíduo e o tipo e gravidade da doença e/ou afecção médica e/ou composição da dieta. A seleção dos níveis de arginina no plasma alvo está bem ao alcance de um versado na técnica. Em certas modalidades, a concentração de arginina plasmática está abaixo de cerca de 100 μM, cerca de 90 μM, cerca de 80 μM, cerca de 70 μM, cerca de 60 μM, cerca de 50 μM, cerca de 40 μM, cerca de 30 μM, cerca de 20 μM, cerca de 10 μM ou cerca de 5 μM. Em certas modalidades, a concentração de arginina plasmática é de cerca de 0,1 μM a cerca de 100 μM, cerca de 0,1 μM a cerca de 90 μM, cerca de 0,1 μM a cerca de 80 μM, cerca de 0,1 μM a cerca de 70 μM, cerca de 0,1 μM a cerca de 60 μM, cerca de 0,1 μM a cerca de 50 μM, cerca de 0,1 μM a cerca de 40 μM, cerca de 0,1 μM a cerca de 30 μM, cerca de 0,1 μM a cerca de 20 μM, ou cerca de 0,1 μM a cerca de 10 μM. Em certas modalidades, o nível de arginina está abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (por exemplo, abaixo de cerca de 3 μM) e/ou abaixo do limite de detecção do Espectrômetro de Massa Triplo Quadrupolo de Cromatografia Líquida/Ionização por Eletroaspersão Agilent 6460 (por exemplo, inferior a cerca de 0,3 μM).

[226] A determinação da duração do tratamento, por exemplo, a duração do tempo em que as concentrações de arginina no plasma são mantidas em um estado esgotado no indivíduo, está bem dentro da habilidade de um versado na técnica. Em certas modalidades, a duração do tratamento é de cerca de 1, cerca

de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 8, cerca de 12, cerca de 16, cerca de 20, cerca de 24, cerca de 28, cerca de 32, cerca de 36, cerca de 40, cerca de 44 , cerca de 48, cerca de 52, cerca de 56 semanas ou mais.

[227] A depleção de arginina demonstrou ser um tratamento eficaz de uma série de afecções, incluindo, sem limitação, infecções virais (US 8.507.245 aqui incorporado a título de referência em sua totalidade), esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças autoimunes (US 9.789.169, aqui incorporado a título de referência em sua totalidade), hiperargininemia congênita (Identificador ClinicalTrials.gov: NCT02488044), doença enxerto-versus-hospedeiro (GvHD) (Hallet W., et al., *Exploiting arginase to prevent GVHD*, Blood 2010 116:5.440 a 5.441), inflamação (Sahin E., et al., *Macrophage PTEN regulates expression and secretion of arginase I modulating innate and adaptive immune responses,* J Immunol. 15 de Ago de 2014;193(4):1717-27), e degeneração neurovascular retinal (Fouda AY. et al., *Arginase 1 promotes retinal neurovascular protection from ischemia through suppression of macrophage inflammatory responses* Cell Death Dis. 25 de Set de 2018;9(10):1001).

[228] Consequentemente, também é fornecido neste documento um método de tratamento de pelo menos uma afecção selecionada do grupo que consiste em infecções virais, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças autoimunes, hiperargininemia congênita, doença do enxerto contra hospedeiro (GvHD) e inflamação em um indivíduo em necessidade disso que compreende a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão descrita do presente documento.

[229] Objetos adicionais, vantagens e características novas desta revelação se tornarão evidentes para aqueles versados na técnica após o exame dos exemplos a seguir, que não se destinam a ser limitantes.

**EXEMPLO 1: CONSTRUÇÃO DE GENES DE FUSÃO ABD E ABD094**

[230] O gene de N-ABD para a fusão N-terminal foi construído misturando os iniciadores 01-08 (SEQ ID NO: 1-8) listados na Tabela 1 em uma reação de PCR

com cada iniciador a uma concentração de 20 nM, juntamente com tampão de reação 1X de iProof DNA polimerase (Bio-rad), dNTP 0,2 mM e 0,5 unidade de DNA polimerase iProof (Bio-rad) em um volume de reação de 50 µl. Programa de PCR foi definido como: (1) 98 °C, 10 s; (2) 50 °C, 20 s; (3) 72 °C, 15 s; (4) repetir (1) a (3) 35 vezes. Em seguida, 1 µl de produto de reação de PCR foi adicionado a uma nova reação de PCR juntamente com 1X tampão de reação de DNA polimerase iProof (Bio-rad), dNTP 0,2 mM, iniciador 0,2 µM (N-ABDNde-F): 5'-GATCTTAAGCATATGCATCATCACCATC-3' (SEQ ID NO: 9), iniciador (N-ABDHind-R): 5'-ACAGCTAAAAGCTTATCAGCCTAGGATCCGCCGCTACCATTG-3' (SEQ ID NO: 93) e 0,5 unidade de DNA polimerase iProof em um volume de reação de 50 µl. Programa de PCR foi definido como: (1) 98 °C, 10 s; (2) 50 °C, 20 s; (3) 72 °C, 15 s; (4) repetir (1) a (3) 35 vezes; (5) 72 °C, 5 minutos. A construção do gene N-ABD094 foi a mesma que os procedimentos para a construção do gene N-ABD, exceto que os iniciadores 09-16 (SEQ ID NO: 9-16) listados na **Tabela 1** foram usados em vez dos iniciadores 01-08 (SEQ ID NO: 1-8) listados na **Tabela 1**.

[231] O gene de C-ABD para a fusão C-terminal foi construído misturando os iniciadores 17-24 listados na **Tabela 1** em uma reação de PCR com cada iniciador a uma concentração de 20 nM, juntamente com tampão de reação 1X de DNA polimerase iProof, dNTP 0,2 mM e 0,5 unidade de DNA polimerase iProof em um volume de reação de 50 µl. Programa de PCR foi definido como: (1) 98 °C, 10 s; (2) 50 °C, 20 s; (3) 72 °C, 15 s; (4) repetir (1) a (3) 35 vezes. Em seguida, 1 µl de produto de reação de PCR foi adicionado a uma nova reação de PCR juntamente com 1X tampão de reação de DNA polimerase iProof, dNTP 0,2 mM, iniciador 0,2 µM (C-ABDNde-F): 5'-TAGCTGATCATATGTTATGCGATGGATCCAGTAACAAC-3' (SEQ ID NO: 91), iniciador 0,2 µM (C-ABDHind-R): 5'-GACCCTAAAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATG-3' (SEQ ID NO: 92) e 0,5

unidade de DNA polimerase iProof em um volume de reação de 50 µl. Programa de PCR foi definido como: (1) 98 °C, 10 s; (2) 50 °C, 20 s; (3) 72 °C, 15 s; (4) repetir (1) a (3) 35 vezes; (5) 72 °C, 5 minutos. A construção do gene C-ABD094 foi a mesma que os procedimentos para a construção do gene C-ABD, exceto que os iniciadores 25-32 (SEQ ID NO: 25-32) listados na **Tabela 1** foram usados em vez dos iniciadores 17-24 (SEQ ID NO: 17-24) listados na **Tabela 1**.

[232] O fragmento de PCR N-ABD, N-ABD094, C-ABD ou C-ABD094 foi digerido com as enzimas de restrição Nde I e Hind III e ligado ao vetor pRSET-lac pré-digerido com as mesmas enzimas e transformado em *Escherichia coli* Top10 para gerar o plasmídeo pN-ABD, pN-ABD094, pC-ABD e pC-ABD094, respectivamente. O plasmídeo pRSET-lac foi modificado de pRSET-A (Invitrogen) substituindo o promotor T7 pelo promotor lac de pGEMT-Easy Vector (Promega).

[233] A fusão N-ABD ou N-ABD094 do gene da arginase humana I foi construída pela mistura do iniciador HARGBam-F 0,2 µM (5'-TTAGCTGGGGATCCGCCAAGTCCAGAACCATAGG-3') (SEQ ID NO: 93), do iniciador HARGHind-R 0,2 µM (5'-GAGATCAAAGCTTACTTAGGTGGGTTAAGGTAGTC-3') (SEQ ID NO: 94) junto com tampão de reação 1X de DNA polimerase iProof, dNTP 0,2 mM, 100 ng de cDNA de arginase humana I e 0,5 unidade de DNA polimerase iProof em um volume de reação de 50 µl. Programa de PCR foi definido como: (1) 98 °C, 10 s; (2) 50 °C, 20 s; (3) 72 °C, 30 s; (4) repetir (1) a (3) 35 vezes; (5) 72 °C, 5 minutos. O fragmento de PCR do gene da arginase humana I foi digerido com as enzimas de restrição BamH I e Hind III e ligado ao vetor pN-ABD ou pN-ABD094 pré-digerido com as mesmas enzimas e transformado em *Escherichia coli* ER2566 (NEB) para gerar o plasmídeo pN-ABD -rhArg e pN-ABD094-rhArg, respectivamente.

[234] A fusão C-ABD ou C-ABD094 do gene da arginase humana I foi construída pela mistura do iniciador HARGNde-F 0,2 µM (5'-

TAGGCTGCATATGAGCGCCAAGTCCAGAACCATAG-3') (SEQ ID NO: 95), do iniciador HARGBam-R 0,2 μM (5'-ATCAGCTAGGATCCCTTAGGTGGGTTAAGGTAGTCAATAGG-3') (SEQ ID NO: 96) junto com tampão de reação 1X de DNA polimerase iProof (bio-rad), dNTP 0,2 mM, 100 ng de cDNA de arginase humana I e 0,5 unidade de DNA polimerase iProof (bio-rad) em um volume de reação de 50 μl. Programa de PCR foi definido como: (1) 98 °C, 10 s; (2) 50 °C, 20 s; (3) 72 °C, 30 s; (4) repetir (1) a (3) 35 vezes; (5) 72 °C, 5 minutos. O fragmento de PCR do gene da arginase humana I foi digerido com as enzimas de restrição Nde I e BamH III e ligado ao vetor pC-ABD ou pC-ABD094 pré-digerido com as mesmas enzimas e transformado em *Escherichia coli* ER2566 (NEB) para gerar o plasmídeo pC-ABD-rhArg e pC-ABD094-rhArg, respectivamente.

[235] A fusão N-ABD ou N-ABD094 do gene de *Bacillus caldovelox* arginase (BCA) foi construída pela mistura do iniciador BCABam-F 0,2 μM (5'-ATGCTAGTGGATCCATGAAGCCAATTTCAATTATCG -3') (SEQ ID NO: 97), do iniciador HARGHind-R 0,2 μM (5'-TCAGCCTAAAGCTTACATGAGTTTTTCACCAAACAACG-3') (SEQ ID NO: ) junto com tampão de reação 1X de DNA polimerase iProof, dNTP 0,2 mM, 100 ng de DNA genômico de *Bacillus caldovelox* e 0,5 unidade de DNA polimerase iProof em um volume de reação de 50 μl. Programa de PCR foi definido como: (1) 98 °C, 10 s; (2) 50 °C, 20 s; (3) 72 °C, 30 s; (4) repetir (1) a (3) 35 vezes; (5) 72 °C, 5 minutos. O fragmento de PCR do gene de *Bacillus caldovelox* arginase foi digerido com as enzimas de restrição BamH I e Hind III e ligado ao vetor pN-ABD ou pN-ABD094 pré-digerido com as mesmas enzimas e transformado em *Escherichia coli* ER2566 (NEB) para gerar o plasmídeo pN-ABD-BCA e pN-ABD094-BCA, respectivamente.

[236] A fusão C-ABD ou C-ABD094 do gene de *Bacillus caldovelox* arginase (BCA) foi construída misturando o iniciador BCANde-F 0,2 μM (5'-ATGCTAGCCATATGAAGCCAATTTCAATTATCGGG -3') (SEQ ID NO: 99),

com o iniciador BCABam-R 0,2 µM (5’-TCAGCTAAGGATCCCATGAGTTTTTCACCAAACAACG -3’) (SEQ ID NO: 100) junto com tampão de reação 1X de DNA polimerase iProof, dNTP 0,2 mM, 100 ng de DNA genômico de *Bacillus caldovelox* e 0,5 unidade de DNA polimerase iProof em um volume de reação de 50 µl. Programa de PCR foi definido como: (1) 98 °C, 10 s; (2) 50 °C, 20 s; (3) 72 °C, 30 s; (4) repetir (1) a (3) 35 vezes; (5) 72 °C, 5 minutos. O fragmento de PCR do gene da arginase *Bacillus caldovelox* foi digerido com as enzimas de restrição Node I e BamH I e ligado ao vetor pC-ABD ou pC-ABD094 pré-digerido com as mesmas enzimas e transformado em *Escherichia coli* ER2566 (NEB) para gerar o plasmídeo pC-ABD-BCA e pC-ABD094-BCA, respectivamente.

**TABELA 1. INICIADORES DE DNA USADOS NA SÍNTESE DE GENE ABD E ABD094.**

| **Número** | **Sequências** |
|---|---|
| 01 | 5’-GGAGATGGACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATGC-3’ (SEQ ID NO: 1) |
| 02 | 5’-GCTAAGACTTTAGCTTCAGCTAAGGAATTCGCATCCACGGCTTCATCATG-3’ (SEQ ID NO: 2) |
| 03 | 5’-CCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGA-3’ (SEQ ID NO: 3) |
| 04 | 5’-TAGGTTCTTGTAATAGTCACTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTCTGTTAG-3’ (SEQ ID NO: 4) |
| 05 | 5’-GGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAATGCCAAAACTGTTGA-3’ (SEQ ID NO: 5) |
| 06 | 5’-AAATTTCATCTATCAGTGCTTTTACACCTTCAACAGTTTTGGCATTGTTG-3’ (SEQ ID NO: 6) |
| 07 | 5’-GTAAAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTTCGGGTAGTAA-3’ (SEQ ID NO: 7) |
| 08 | 5’-TCCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAGGTAATGCAG-3’ (SEQ ID NO: 8) |
| 09 | 5’-GATCTTAAGCATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCGGTGGA-3’ (SEQ ID NO: 9) |

| Número | Sequências |
|---|---|
| 10 | 5’-GCTTCTTTCGCTTCCGCCAGGCTGTTCGCATCCACCGCTTCATCATG-3’ (SEQ ID NO: 10) |
| 11 | 5’-GCGGAAGCGAAAGAAGCGGCGAACGCGGAACTGGATAGCTATGGCGTGAG-3’ (SEQ ID NO: 11) |
| 12 | 5’-TTATCAATCAGGCGTTTATAAAAATCGCTCACGCCATAGCTATCCAGTTC-3’ (SEQ ID NO: 12) |
| 13 | 5’-GATTTTTATAAACGCCTGATTGATAAAGCGAAAACCGTGGAAGGCGTGGA-3’ (SEQ ID NO: 13) |
| 14 | 5’-CGGCAGCGCCGCCAGAATCGCATCTTTCAGCGCTTCCACGCCTTCCACGGT-3’ (SEQ ID NO: 14) |
| 15 | 5’-TTCTGGCGGCGCTGCCGTCGGGTAGTAACAACAATAATAACAATGGTAGC-3’ (SEQ ID NO: 15) |
| 16 | 5’-GGATCCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACC-3’ (SEQ ID NO: 16) |
| 17 | 5’-CATATGTTAGCTGATGGATCCAGTAACAACAATAATAACAATGGTAGCGG-3’ (SEQ ID NO: 17) |
| 18 | 5’-AATTCGCATCCACGGCTTCATCACCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTG-3’ (SEQ ID NO: 18) |
| 19 | 5’-GAAGCCGTGGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAG-3’ (SEQ ID NO: 19) |
| 20 | 5’-CTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTCTGTTAGCTAAGACTTTAGCTTCAGC-3’ (SEQ ID NO: 20) |
| 21 | 5’-GAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAAC-3’(SEQ ID NO: 21) |
| 22 | 5’-TACACCTTCAACAGTTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGTAATAGTCAC-3’ (SEQ ID NO: 22) |
| 23 | 5’-GCCAAAACTGTTGAAGGTGTAAAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGC-3’ (SEQ ID NO: 23) |
| 24 | 5’-ATGGTGATGGTGATGATGAGGTAATGCAGCTAAAATTTCATCTATCAGTG-3’ (SEQ ID NO: 24) |
| 25 | 5’-CATATGTTATGCGATGGATCCAGTAACAACAATAATAACAATGGTAGCGG-3’ (SEQ ID NO: 25) |
| 26 | 5’-TGTTCGCATCCACCGCTTCATCACCGCCGCTACCATTGTTATT |

| Número | Sequências |
|---|---|
| | ATTGTTG-3’ (SEQ ID NO: 26) |
| 27 | 5’-GAAGCGGTGGATGCGAACAGCCTGGCGGAAGCGAAAGAA GCGGCGAACGC-3’ (SEQ ID NO: 27) |
| 28 | 5’-AAAATCGCTCACGCCATAGCTATCCAGTTCCGCGTTCGCCGCT TCTTTCG-3’ (SEQ ID NO: 28) |
| 29 | 5’-CTATGGCGTGAGCGATTTTTATAAACGCCTGATTGATAAAGC GAAAACCG-3’ (SEQ ID NO: 29) |
| 30 | 5’-TCGCATCTTTCAGCGCTTCCACGCCTTCCACGGTTTTCGCTTT ATCAATC-3’ (SEQ ID NO: 30) |
| 31 | 5’-GAAGCGCTGAAAGATGCGATTCTGGCGGCGCTGCCGCATCAT CACCATCA-3’ (SEQ ID NO: 31) |
| 32 | 5’-CTAAAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGCGGCAG-3’ (SEQ ID NO: 32) |

**EXEMPLO 2: EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO ABD-RHARG OU ABD094-RHARG POR FERMENTAÇÃO**

[237] Para produzir N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) proteína de fusão, *Escherichia coli* ER2566 transformada com pN-ABD-rhArg foi cultivada em 50 ml de meio de semente (1,5 g de extrato de levedura, 0,25 g de NaCl e 5 mg de ampicilina) a 30 °C em um agitador orbital a 250 rpm por 16 horas . A cultura de semente foi, então, transferida para o meio de fermentação de 1 l (10 g de extrato de levedura, 16 g de triptona, 6,7 g $Na_2HPO_4.7H_2O$, 3,41 g de $KH_2PO_4$, 2,41 g de $NH_4Cl$, 0,67 g de $(NH_4)_2SO_4$, 10 g de glicerol, 1 g de glicose , $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2$ 1 mM e 0,1 g de ampicilina) e cultivado a 28 °C fornecido com 1 l/min de ar e com uma taxa mínima de 500 rpm, o pH foi mantido em 7,4. A taxa de agitação foi aumentada automaticamente a fim de manter o mínimo de oxigênio dissolvido $pO_2$ em pelo menos 20%. Quando a absorvância a 600 nm de comprimento de onda da cultura atingiu uma densidade óptica (OD) de 15, 500

ml de meio (10 g de extrato de levedura, 16 g de triptona, 2,41 g de $NH_4Cl$, 0,67 g $(NH_4)_2SO_4$, 20 g de glicerol) foram alimentados à taxa de 31,25 ml/h durante 16 horas contínuas. As células foram coletadas por centrifugação e a proteína foi purificada por uma coluna de sepharose Ni-IDA. Normalmente, mais de 1 g/l de cultura de proteína purificada foi obtido. A endotoxina foi, então, removida da proteína purificada pelo método Triton X-114 [Aida Y. e Pabst M.J. (1990) *Journal of Immunological Methods.* **132**: 191 a 195, aqui incorporado a título de referência]. Os procedimentos para a produção de proteínas de fusão N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), C-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 51), C-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 52), N-ABD-BCA (SEQ ID NO: 53), N-ABD094-BCA (SEQ ID NO: 54), C-ABD-BCA (SEQ ID NO: 55) e C-ABD094-BCA (SEQ ID NO: 56) eram os mesmos que os procedimentos de produção para N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) exceto que as células foram transformadas com o respectivo plasmídeo em conformidade. A Figura 1 e a **Tabela 2** mostra um exemplo da purificação de proteína do domínio de ligação de albumina acima mencionado arginase humana recombinante (rhArg), *isto é,* N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50).

[238] **Tabela 2.** A proteína N-ABD094-rhArg foi preparada e 990 mg de proteína pura foram obtidos.

| | **Vol. (ml)** | **Conc (mg/ml)** | **Total (mg)** | **Ativ. Específica (U/mg)** |
|---|---|---|---|---|
| N-ABD094-rhArg | 50 | 19,81 | 990 | 184 |

A Figura 12 mostra os resultados de uma preparação. 709 mg de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) foi obtido, com atividade específica de 205 U/mg e concentração proteica de 10,5 mg/ml.

**EXEMPLO 3: CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DO GENE N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 38)**

[239] O gene N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 38) foi sintetizado por PCR de extensão de sobreposição com base no gene N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 37).

Duas reações de PCR foram realizadas. Em primeiro lugar, foi usado o plasmídeo pRSET/lac com o gene N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 38). A região rhArg foi isolada e amplificada na primeira reação de PCR por ABD094-0F (SEQ ID NO: 57) e HuArgHinBam-R (SEQ ID NO: 64). O produto de PCR foi isolado e purificado por gel de agarose a 0,7% (Biorad) com 100 V por 30 min e kit de purificação de banda de gel (GE Healthcare Life Science). ABD094 foi, então, adicionado ao produto de PCR por meio da segunda reação de PCR. Uma mistura de iniciadores diluída 20x, incluindo ABD094-0F, ABD094-1F, ABD094-2F, ABD094-3F, ABD094-4F e ABD094-5F (SEQ ID NO: 57-62) foi primeiro preparado com água milli-Q esterilizada. A mistura de iniciador e o abdNde-F se sobrepõem. A segunda reação de PCR foi realizada por abdNde-F (SEQ ID NO: 63), HuArgHinBam-R (SEQ ID NO: 64), e mistura de iniciadores diluída 20x. O produto de PCR foi isolado e purificado pelos mesmos métodos descritos acima. As sequências dos iniciadores são mostradas na **Tabela 3**. Os sítios de ligação dos iniciadores são ilustrados na Figura 2A. A sequência de DNA do gene de fusão N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 38) obtido e sua sequência de proteína é mostrada na Figura 2B.

**TABELA 3. LISTA DE INICIADORES PARA CLONAR O GENE N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 38)**

| **Nome do iniciador** | **Sequência** |
|---|---|
| ABD094-0F | 5’-ATTCTGGCAGCGCTGCCGTCGGGTAG TAACAACAATAATAACA ATGGTAG-3’ (SEQ ID NO: 57) |
| ABD094-1F | 5’-AACCGTGGAAGGTGTGGAAGCGCTGAAA GATGCGATTCTGG CAGCGCTGC-3’ (SEQ ID NO: 58) |
| ABD094-2F | 5’-GATTTTTATAAACGTCTGATTGATAAAGCGAA AACCGTGGAAGGTGTGGA-3’ (SEQ ID NO: 59) |
| ABD094-3F | 5’-CTGGATAGCTATGGCGTGAGCGATTTTTATAAACG TCTGATTGATAAAGC-3’ (SEQ ID NO: 60) |
| ABD094-4F | 5’-GCGGAAGCGAAAGAAGCAGCAAACGCGGAACTG GATAGCTATGGCGTGAG-3’ (SEQ ID NO: 61) |

| **Nome do iniciador** | **Sequência** |
|---|---|
| ABD094-5F | 5'-ACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAATTCC CTGGCGGAAGCGAAAGAAGCA-3’ (SEQ ID NO: 62) |
| abdNde-F | 5’-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCAT GATGAAGCCGTGG-3’ (SEQ ID NO: 63) |
| HuArgHinBam-R | 5’-TGACTACCTTAACCCACCTAAGTAAGCTT GGATCCTGTAACG-3’ (SEQ ID NO: 64) |

[240] O produto de PCR e o vetor pRSET/lac foram duplamente digeridos por BamHI-HF e NdeI (New England BioLabs) a 37 °C por 2 h. Tanto o inserto quanto o vetor foram isolados e purificados por gel de agarose 0,7% (Biorad) com 100 V por 30 min e kit de purificação de banda de gel (GE Healthcare Life Science). A inserção e o vetor foram então ligados por T4 ligase (New England BioLabs) à temperatura ambiente por 20 min. As células competentes foram transformadas pelo DNA recombinante e espalhadas na placa LB com 50 µg/ml de canamicina. A placa LB foi incubada a 37 °C de um dia para o outro. 8 colônias foram coletadas e verificadas quanto à presença de N-ABD094-rhArg por PCR com abdNde-F e HuArgHinBam-R. As colônias com resultado positivo na PCR foram posteriormente cultivadas em 5 ml 2x TY com 50 µg/ml de canamicina a 30 °C de um dia para o outro. O caldo bacteriano foi centrifugado em tubo de microcentrífuga de 1,7 ml a 16.100 x g por 1 min. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em tampão de solubilização (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,1 M, $MnCl_2$ 1 mM, pH 7,4) e quebrados por congelamento e descongelamento repetido em nitrogênio líquido. O lisado celular foi centrifugado para obter solução de proteína. O ensaio de atividade da arginase por DAMO foi realizado para testar a presença de arginase.

**EXEMPLO 4: CONSTRUÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO DE BCA**

[241] O gene que codifica BCA (número de acesso Pubmed: U48226) foi pedido a partir do GenScript, onde foi sintetizado *de novo* e inserido no vetor de

clonagem pUC57. O único resíduo de cisteína foi introduzido por mutagênese dirigida ao sítio, enquanto a marca de seis histidinas foi adicionada ao terminal C para facilitar o processo de purificação da proteína. O gene BCA modificado foi subclonado no vetor pET-3a e transformado em células competentes BL21 (DE3) para a expressão de BCA. Estrutura de cristal de BCA (PDB: 2CEV) pode ser recuperada do banco de dados de proteínas. A sequência de proteína do BCA manipulado (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) é mostrada na Figura **3.**

**EXEMPLO 5: CONSTRUÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO DE BCA-ABD**

[242] Um par de iniciadores que codificam o domínio de ligação à albumina (ABD) foi construído e amplificado por PCR de sobreposição. Resumidamente, 200 ng de iniciadores foram usados como molde e amplificados por 1 unidade de High-Fidelity DNA Polymerase iProof (Bio-Rad). Os iniciadores foram incubados a 98 °C por 30 s, enquanto 15 ciclos de amplificação incluindo desnaturação por calor a 98 °C por 10 s, hibridização a 60 °C por 30 se extensão a 72 °C por 15 s.

[243] **5’-Senso-ABD**

GCGCAGCATGATGAAGCCGTGGATGCGAACAGCTTAGCTGAAGCTAAAGT CTTAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAA CC (SEQ ID NO: 77)

[244] **5’-Antissenso-ABD**

TTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTCATCTATCAGTGCTTTTACACCTTCAACA GTTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGTAATAGTCACTTACTCCAT (SEQ ID NO: 78)

[245] O gene que codifica ABD construído por esse par de iniciadores foi amplificado por 2 conjuntos diferentes de iniciadores de modo a construir BCA-6xHis-ABD (também referido como BHA) (SEQ ID NO: 75) e BCA-ABD-6xHis (também referido como BAH) (SEQ ID NO: 76). Para a construção de BHA, o ABD foi primeiro amplificado pelo seguinte par de iniciadores para os quais o iniciador direto foi projetado para a PCR de sobreposição com o BCA por meio

da etiqueta de seis Histidinas enquanto o sítio de restrição BamH I e o códon de parada foram introduzidos para a ligação para o vetor pET-3a usando o iniciador reverso:

[246] **Iniciador direto para clonar ABD :**

5’- GCATCACCATCACCATCACGCGCAGCATGATGAAG-3’ (SEQ ID NO: 79)

[247] **Iniciador reverso para clonar ABD:**

5’- cg*GGATCC*TTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTCATCTAT-3’ (SEQ ID NO: 80)

[248] O produto de PCR da amplificação de ABD foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e os produtos de PCR foram purificados. Enquanto o BCA manipulado com uma mutação extra (V20P) foi clonado com o uso do seguinte par de iniciadores para os quais o códon de parada foi excluído:

[249] **Iniciador direto para clonar BCA :**

5’-ggaattcc*CATATG*AAGCCAATTTCAATTATCG-3’ (SEQ ID NO: 81)

[250] **Iniciador reverso para clonar BCA:**

5’- GTGATGGTGATGGTGATGCA-3’ (SEQ ID NO: 82)

[251] O BCA amplificado pelos iniciadores acima foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% e os produtos de PCR foram purificados. Os produtos de PCR acima de BCA e ABD foram amarrados por PCR de sobreposição. Da mesma forma, 200 ng de BCA e ABD foram usados como molde e amplificados por 1 unidade de High-Fidelity DNA Polymerase iProof. O BCA e o ABD foram incubados a 98 °C por 30 s, enquanto 15 ciclos de amplificação, incluindo desnaturação por calor a 98 °C por 10 s, hibridização a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. O produto da PCR de sobreposição foi usado como modelo para amplificação adicional com o uso do seguinte par de iniciadores:

[252] **Iniciador direto para clonar BHA :**

5’-ggaattcc*CATATG*AAGCCAATTTCAATTATCG-3’ (SEQ ID NO: 83)

[253] **Iniciador reverso para clonar BHA:**

5’-cg*GGATCC*TTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTCATCTAT-3’ (SEQ ID NO: 84)

[254] O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%

e a banda correspondente a BHA foi excisada do gel para purificação.

[255] Para a construção de BAH, o ABD foi primeiro amplificado pelo seguinte par de iniciadores para os quais o iniciador direto foi projetado para a PCR de sobreposição diretamente com o BCA enquanto o sítio de restrição BamHI, a etiqueta de seis histidinas e o códon de parada foram introduzidos através do iniciador reverso:

[256] **Iniciador direto para clonar ABD:**

5’-CGTTGTTTGGTGAAAAACTCATGGCGCAGCATGATGAAG -3’ (SEQ ID NO: 85)

[257] **Iniciador reverso para clonar ABD:**

5’-

cg*GGATCC*TTAGTGATGGTGATGGTGATGAGGTAATGCAGCTAAAATTTCA TCTAT-3’ (SEQ ID NO: 86)

[258] O produto de PCR da amplificação de ABD foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e os produtos de PCR foram purificados. O BCA manipulado com uma mutação extra (V20P) foi clonado com o uso do seguinte par de iniciadores para os quais o códon de parada e a etiqueta de seis histidinas foram excluídos:

[259] **Iniciador direto para clonar BCA:**

5’-ggaattcc*CATATG*AAGCCAATTTCAATTATCG-3’ (SEQ ID NO: 81)

[260] **Iniciador reverso para clonar BCA:**

5’- GTGATGGTGATGGTGATGCA-3’ (SEQ ID NO: 82)

[261] O BCA amplificado pelo iniciador acima foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% e os produtos de PCR foram purificados. O produto de PCR acima de BCA e ABD foi amarrado por PCR de sobreposição. Da mesma forma, 200 ng de BCA e ABD foram usados como molde e amplificados por 1 unidade de High-Fidelity DNA Polymerase iProof. O BCA e o ABD foram incubados a 98 °C por 30 s, enquanto 15 ciclos de amplificação, incluindo desnaturação por calor a 98 °C por 10 s, hibridização a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. O

produto da PCR de sobreposição foi usado como modelo para amplificação adicional com o uso do seguinte par de iniciadores:

[262] **Iniciador direto para clonar BAH:**

5’-ggaattcc*CATATG*AAGCCAATTTCAATTATCG-3’ (SEQ ID NO: 87)

[263] **Iniciador reverso para clonar BAH:**

5’-

cg*GGATCC*TTAGTGATGGTGATGGTGATGAGGTAATGCAGCTAAAATTTCA

T

CTAT-3’ (SEQ ID NO: 88)

[264] O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% e a banda correspondente a BHA foi excisada do gel para purificação. O produto de PCR que codifica BHA e BAH e o vetor pET-3a foram duplamente digeridos com NdeI e BamHI. O BHA e o BAH foram ligados ao vetor pET-3a e transformados em células competentes de *E. coli* TOP10. As sequências de nucleotídeos de BHA e BAH foram confirmadas por sequenciamento de DNA. O vetor pET-3a contendo o inserto BHA ou BAH foi transformado no vetor BL21 (DE3) para a expressão da proteína.

**EXEMPLO 6: CONSTRUTOS DE PROTEÍNA DE BHA E BAH**

[265] A sequência de proteína de BCA usada nesse estudo é a mesma usada por Bewley et al. (Structure 7, 435 a 448, 1999) (PDB ID: 2CEV, aqui incorporado a título de referência) exceto que contém uma etiqueta 6xHis no terminal C e uma mutação S161C. Os construtos de BCA-6xHis-ABD (BHA) e BCA-ABD-6xHis (BAH) foram projetados e os estoques de células de *E. coli* podem expressar BHA e BAH. Em ambos BHA e BAH, a porção BCA é uma versão mutada de BCA com seu resíduo de valina na posição 20 mutado para prolina (V20P), enquanto a porção ABD é a versão de tipo selvagem de ABD com uma sequência ligante (AQHDEAVDANS) (Jonsson et al., 2008, Protein Eng. Des. Sel. 21, 515 a 527). A porção ABD está localizada na própria extremidade C da proteína de fusão (no caso do BHA) ou fundida entre o BCA e a etiqueta de

histidina 6x (no caso do BAH). O alinhamento das sequências de proteínas de BCA, BHA e BAH usadas nesse estudo é mostrado na Figura 4.

[266] **Sequência de aminoácidos BCA (tipo selvagem) (PDB ID: 2CEV):**
MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKA
ERLHEQGDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLA
GVAKHYERLGVIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGG
YSPKIKPEHVVLIGVRSLDEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYL
KERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSA
EFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLM (SEQ ID NO: 70)

[267] **Sequência de aminoácidos BCA (S161C)-His**:
MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKA
ERLHEQGDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLA
GVAKHYERLGVIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGG
YCPKIKPEHVVLIGVRSLDEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYL
KERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSA
EFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMHHHHHH (SEQ ID NO: 71)

[268] **Sequência de aminoácidos BHA**:
MKPISIIGVPMDLGQTRRGPDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKA
ERLHEQGDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLA
GVAKHYERLGVIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGG
YCPKIKPEHVVLIGVRSLDEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYL
KERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSA
EFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMHHHHHHAQHDEAVDANSLAE
AKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP (SEQ ID NO: 75)

[269] **Sequência de aminoácidos BAH**:
MKPISIIGVPMDLGQTRRGPDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKA
ERLHEQGDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLA
GVAKHYERLGVIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGG
YCPKIKPEHVVLIGVRSLDEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYL

KERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSA
EFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMAQHDEAVDANSLAEAKVLANR
ELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPHHHHHH (SEQ ID NO: 76)

**EXEMPLO 7: PRODUÇÃO DE BHA E BAH**

[270] Foram usados estoques de células de *E. coli* que expressaram BHA e BAH. Para preparar a cultura de sementes, uma pequena quantidade de estoque de glicerol *E. coli* BL21 (DE3) foi inoculada em 10 ml de meio LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina. A cultura de sementes foi cultivada a 37 °C com agitação a 700 rpm de um dia para o outro (~16 h). A cultura de sementes durante a noite em um volume de 2,5 ml foi, então, usada para inocular 250 ml de meio LB com 100 µg/ml de ampicilina. As células inoculadas foram cultivadas a 37 °C com agitação a 280 rpm durante 2 a 4 h até uma densidade óptica a 600 nm de comprimento de onda ($OD_{600}$) de 0,6 a 0,8. IPTG (0,2 mM) foi, então, adicionado ao meio de cultura para induzir a superexpressão da proteína alvo. As células foram cultivadas por mais 4 h e coletadas por centrifugação a 4.500 rpm.

**PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DE NÍQUEL**

[271] Os sedimentos de células de *E. coli* foram ressuspensos em tampão contendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM (pH 7,4) e foram interrompidos por sonicação. Os detritos celulares foram, então, removidos por centrifugação a 10.000 rpm durante 40 min. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna quelante HiTrap de 5 ml (GE Healthcare) que tinha sido carregada com $Ni^{2+}$ e equilibrada com tampão A (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4) com o uso de um purificador ÄKTA. As proteínas foram eluídas com o uso de um gradiente de imidazol 0 a 0,5 M, que foi obtido pela combinação de tampão A com tampão B (imidazol 0,5 M em tampão A) em várias proporções. As frações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com o uso de geis de poliacrilamida a 12% e aqueles contendo a

proteína alvo foram agrupados. As frações agrupadas foram concentradas e o tampão das frações agrupadas concentradas foram trocados por fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4) com o uso de dispositivo de filtro centrífugo (Amicon) ou dispositivo de filtração de fluxo tangencial (TFF) (Millipore). O corte de membrana foi de 30.000 MW para BHA e BAH. O retentado foi, então, diluído até a concentração desejada e submetido a filtração estéril através de um filtro de seringa de 0,2 µm e armazenado a 4 °C.

[272] De acordo com o cromatograma de purificação de BHA, três picos são observados durante o processo de eluição com o uso de concentrações crescentes de imidazol (Figura 5A). Os dois primeiros picos são fundidos, sucedidos pelo terceiro pico que ocorre quando a concentração de imidazol atinge ~0,13 M (Figura 5A). Quando analisado por SDS-PAGE, verifica-se que o terceiro pico consiste principalmente em uma proteína alvo de cerca de 40 kDa (Figura 5B, pistas F4-F8). É provável que essa proteína alvo seja BHA, uma vez que o peso molecular calculado do monômero de BHA com base em sua sequência de aminoácidos é 39,44 kDa. Portanto, sugere-se que o BHA foi expresso e purificado com sucesso. As frações contendo BHA relativamente puro foram reunidas para outros processos.

[273] De acordo com o cromatograma de purificação de BAH, três picos são observados durante o processo de eluição com o uso de concentrações crescentes de imidazol (Figura 5C). O segundo e o terceiro picos são mesclados e ocorrem quando a concentração de imidazol atinge ~ 0,18 M (Figura 5C). Quando analisado por SDS-PAGE, verifica-se que esse pico fundido consiste principalmente em uma proteína alvo de cerca de 40 kDa (Figura 5D, pistas F6-F14) que provavelmente será BAH. Em comparação com o BHA que é eluído em ~0,13 M de imidazol, o BAH parece se ligar mais fortemente à coluna de afinidade de níquel. Isso provavelmente ocorre devido ao fato de que o domínio ABD, quando inserido entre o BCA e a etiqueta de histidina 6x, ajuda a tornar a etiqueta de histidina 6x mais exposto e, portanto, o BAH pode interagir com os

íons de níquel na coluna de forma mais eficaz do que o BHA. As frações contendo BAH relativamente puro foram reunidas e trocadas por tampão com o uso de um dispositivo de filtração de fluxo tangencial (TFF) (Millipore) em vez de um dispositivo de filtro centrífugo.

[274] Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima (BCA, BHA ou BAH) que catalisa a produção de 1 µmol de ureia por minuto em condições de ensaio padrão. A atividade específica da enzima é expressa em unidades de atividade por mg de proteína. Sob condições de ensaio DAMO padrão (37 °C, pH 7,4), BHA recentemente purificado (SEQ ID NO: 75) tem um valor de atividade específica de 220,6 ± 15,8 U/mg, que está próximo do valor de BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) (243,30 U/mg).

[275] Para proteínas de fusão que compreendem um polipeptídeo BCA e um polipeptídeo ABD, rendimento de proteína extremamente alto de cerca de 290 mg de proteína por litro de cultura em frasco de agitação foi obtido no caso de BHA (SEQ ID NO: 75). Os rendimentos das proteínas de fusão ABD são altamente dependentes dos sistemas de expressão usados. Foi relatado que o rendimento de ABD fundido com sCR1 varia de 0,4 a 1,1 µg por 24 h por ml de cultura de células de ovário de hamster chinês (Makrides et al., 1996, J. Pharmacol. Exp. Ther. 277, 534 a 542). Cerca de 2 a 15 mg de proteínas de fusão diacorpo-ABD de cadeia única podem ser obtidas a partir de cada litro de cultura de células HEK293 (Hopp et al., 2010, Protein Eng. Des. Sel. 23, 827 a 834; Stork et al., 2007, Protein Eng. Des. Sel. 20, 569 a 576). O rendimento da proteína de fusão ABD-TolA expressa no hospedeiro *E. coli* BL21 é de 20 mg/l de meio de caldo LB (Ahmad et al., 2012, Proteins 80, 774 a 789). Em comparação, o rendimento de BHA é muito maior. Os resultados demonstraram que a produção de BHA (SEQ ID NO: 75) é simples e bom custo-benefício.

**EXEMPLO 8: EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE BCA (S161C)-HIS (SEQ ID NO: 89)**

[276] Uma cultura de sementes durante a noite da cepa de *E. coli* BL21 (DE3)

pLysS transformada com o plasmídeo pET-3a-BCA (S161C)-His foi preparada em 5 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e foi deixada crescer no frasco agitador a 37 °C durante 16 h com agitação a 280 rpm. Para 250 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina, 2,5 ml de cultura durante a noite foram adicionados e cultivados a 37 °C com agitação a 280 rpm até a densidade óptica ($OD_{600}$) atingir 0,8 a 0,9 a 600 nm. Isopropil-β-D-tio-galactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado a uma concentração final de 0,2 mM. Após 4 h de indução, as células foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g durante 20 min a 4 °C. O sedimento celular pode ser rompido por sonicação e prosseguir para a purificação ou mantido a -20 °C até ser necessário. O pélete celular foi suspenso em 20 ml de tampão de solubilização (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) contendo $MnCl_2$ 10 mM. As células foram primeiro interrompidas por sonicação em gelo por 10 min com pulso a cada 30 s em amplitude de 40%. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 12.000 x g durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi incubado a 70 °C durante 15 min e os precipitados formados durante a etapa de tratamento térmico foram removidos por centrifugação. A fração solúvel foi filtrada através de um filtro de 0,22 µm antes do carregamento na coluna de 5 ml HisTrap Chelating HP. O fluxo através da fração foi coletado durante o carregamento da amostra e as proteínas não ligadas foram lavadas por 5 volumes de coluna (CV) de tampão inicial ou até o nível da linha de base desligar. As proteínas alvo ligadas à coluna foram eluídas por eluição de gradiente competitivo usando imidazol (0,5 M de imidazol em tampão de partida). As frações alvo foram identificadas e reunidas, as quais seriam trocadas por tampão em fosfato de sódio 20 mM a pH 7,4 com o uso da Unidade de Filtro Centrífugo Amicon Ultra-15 com corte de MW de 10 kDa seguindo as instruções do fabricante. A amostra foi filtrada em condições estéreis através de um filtro de 0,22 µm e armazenada a 4 °C até ser necessária.

**EXEMPLO 9: PURIFICAÇÃO DE BCA (S161C)-HIS (SEQ ID NO: 89) DE FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA ALIMENTADA**

[277] A fermentação de células de *E. coli* expressando BCA (S161C)-His em um biorreator de 5 litros produziu 248,86 g de peso celular úmido. O pélete celular foi ressuspenso em tampão de solubilização contendo DNase e RNase que quebrou a enorme quantidade de DNA e RNA liberado por homogeneização, reduzindo assim a viscosidade do lisado celular. O lisado celular, após passagem pelo homogeneizador por três vezes, foi incubado a 37 °C por 15 minutos para reduzir ainda mais a viscosidade, seguido de centrifugação para obtenção da fração solúvel. A primeira etapa de purificação remove as impurezas não-alvo por tratamento térmico a 70 °C por 15 min, que precipitou as proteínas termolábeis e o BCA (S161C)-His termoestável (SEQ ID NO: 89) foi recuperado por centrifugação.

[278] A fração solúvel contendo a proteína alvo foi posteriormente purificada por coluna de afinidade de Ni com volume de leito de 196 ml embalado em coluna XK50. Resumidamente, um programa de eluição de 4 segmentos foi usado para eluir o BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) da coluna de afinidade de Ni. O primeiro gradiente de eluição de 0 a 30% de tampão de eluição pretendia remover a proteína que se ligava de forma não específica na coluna. O segundo segmento foi mantido a 30%, o que permitiu a eluição completa das proteínas ligadas não específicas. A proteína alvo foi eluída no terceiro segmento, aumentando a concentração do tampão de eluição de 30 para 70%. O quarto segmento do tampão de eluição de 70 a 100% eluiu qualquer proteína restante que ainda estava ligada à coluna. As frações que deram absorvância no comprimento de onda de UV 280 nm foram analisadas por SDS-PAGE enquanto as 24 frações de E1 a A’5 (50 ml cada), contendo a proteína alvo, foram reunidas (Figuras 6A e 6B). As frações reunidas contendo alta concentração de imidazol foram dessalinizadas por sistema de filtração de fluxo tangencial (TFF), com base em nosso entendimento da estrutura hexamérica do BCA (tipo selvagem) (SEQ ID NO: 70), membranas com 30 kDa NMWC foram usadas para TFF. O BCA purificado (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) foi mantida em tampão PBS,

filtrada com filtro de 0,2 µm sob condição estéril e armazenada a 4 °C até o uso. Através da purificação em escala piloto de 2 etapas, cerca de 1.096 mg de proteína BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) foram obtidas e a atividade específica foi determinada como sendo 264 U/mg.

**EXEMPLO 10: DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ARGINASE**

[279] A atividade de BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) foi avaliada pelo método colorimétrico direto com o uso de diacetil monoxima (DAMO) que determina a quantidade de produto, ureia, na reação enzimática. Resumidamente, uma diluição em série de 0,3 ml de soluções de BCA juntamente com 0,15 ml de água e substrato de arginina 720 mM em pH 7,4 foi pré-incubada separadamente a 37 °C por 10 min. A reação enzimática foi realizada adicionando 0,3 ml de substrato de arginina às soluções de enzima pré-incubadas. A mistura de reação foi incubada a 37 °C por exatamente 5 minutos e reagente de extinção [ácido tricloroacético a 50% (TCA)] foi adicionado para parar a reação. Os brancos de amostra foram preparados de maneira semelhante, mas o mesmo volume de soluções de enzima foi adicionado após a solução de TCA.

[280] A ureia formada a partir da reação acima foi quantificada com o uso do método colorimétrico direto DAMO descrito pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Esse protocolo foi adotado pela OMS como Procedimentos Operacionais Padrão (POP) para medir a concentração de ureia no sangue. Vários reagentes foram preparados em relação ao SOP, o reagente de ácido misto foi preparado adicionando lentamente 100 ml de ácido sulfúrico concentrado a 400 ml de água destilada seguido por 0,3 ml de reagente ácido estoque (0,5 g de hexa-hidrato de cloreto férrico em 15 ml de água destilada e constituir até 25 ml por ácido fosfórico concentrado). O reagente de cor mista foi preparado misturando 35 ml de reagente de cor padrão A (1 g de DAMO em 50 ml de água destilada) e 35 ml de reagente de cor B (0,25 g de tiosemicarbazida em 50 ml de água destilada) e

perfazer até 500 ml com água destilada. O padrão de ureia de trabalho foi preparado pela adição de 5 ml de padrão de ureia estoque (0,5 g de ureia em 50 ml de ácido benzoico) a 45 ml de ácido benzoico (1 g/dl). O ensaio DAMO foi realizado adicionando 100 µl de mistura de reação diluída 20 vezes a um tubo de vidro de ebulição e seguido por 3 ml de reagente de desenvolvimento de cor que é preparado de fresco misturando água destilada, reagente de cor misturado e reagente de ácido misturado em uma razão de 1:1:1. Os tubos foram incubados a 100 °C por 15 min e deixados resfriar à temperatura ambiente por 5 min. A absorvância a 540 nm foi medida. Uma unidade de arginase é definida como a quantidade de enzima que converte um micromol de arginina em ornitina e ureia por minuto a 37 °C, pH 7,4. A atividade da enzima foi calculada com o uso das seguintes equações, o valor de absorbância da amostra foi subtraído de seu branco:

$$\Delta A_{540nm}\ \text{Amostra} = A_{540nm}\ \text{Amostra} - A_{540nm}\ \text{Branco de Amostra}$$

A quantidade de ureia produzida é calculada a partir da curva padrão:

$$\text{Unidades/ml de enzima} = \frac{(\mu\text{mol de ureia liberada})\ (df)}{(5)\ (0{,}3)}$$

df = Fator de diluição de enzima

0,3 = volume (em mililitros) de enzima usada

5 = tempo (em minutos) do ensaio pela definição de unidade

**EXEMPLO 11: DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA**

[281] A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford. O concentrado de reagente de ensaio de proteína (Bio-rad) foi diluído 5 vezes antes do uso. 20 µl da amostra foram misturados com 1 ml de reagente corante diluído e incubados em temperatura ambiente por 10 min. Para determinar a

concentração de proteína, a mistura foi medida a 595 nm com o conjunto padrão de albumina sérica bovina de início rápido (Bio-rad) como padrão no intervalo de 0-1 mg/ml.

**EXEMPLO 12: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA DE FUSÃO BHA (SEQ ID NO: 75)**

[282] A atividade catabólica de arginina de BHA (SEQ ID NO: 75) foi analisada a fim de revelar se a atividade enzimática seria afetada na presença de HSA. Os resultados mostraram que a atividade do BHA (SEQ ID NO: 75) não foi afetada pelas várias quantidades de HSA adicionadas ao ensaio de atividade. A razão molar de BHA: HSA testada nos estudos de ligação foram 1:10, 1:5, 1:1, 5:1 e 10:1. Sob todas essas condições, as atividades específicas medidas de BHA (SEQ ID NO: 75) sozinho e os complexos BHA-HSA eram muito similares, e eram de aproximadamente 200 U/mg.

**EXEMPLO 13: Ligação de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) OU BHA (SEQ ID NO: 75) A HSA REVELADA POR ANÁLISE PAGE NÃO DESNATURANTE**

[283] Quando ABD é fundido com rhArg ou BCA, é importante para a proteína de fusão reter a capacidade de ligação à albumina e a atividade enzimática. Para demonstrar a capacidade de ligação de ABD nas proteínas de fusão, uma quantidade fixa de albumina de soro humano (HSA) foi incubada com N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) ou BHA (SEQ ID NO: 75) em diferentes razões molares. As misturas de reação foram analisadas em sua condição nativa em PAGE não desnaturante onde as proteínas foram separadas por tamanho e conformação.

[284] Na Figura 7, a mobilidade de HSA e N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) sozinho são mostradas nas Pistas 2 e 3 do PAGE não desnaturante, respectivamente (Figura 7). Uma quantidade fixa de HSA (30 pmoles) foi titulada contra N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) em várias razões molares e os resultados são ilustrados nas Pistas 5 a 9. Ao aumentar a quantidade de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) na reação de ligação, a quantidade de HSA livre foi reduzida de maneira proporcional e, assim, indicando a ligação específica de N-ABD-rhArg

(SEQ ID NO: 49) a HSA. Na Figura 8, a mobilidade de HSA e BHA (SEQ ID NO: 75) sozinho são mostradas nas Pistas 6 e 7 do PAGE não desnaturante, respectivamente (Figura 8). Uma quantidade fixa de HSA (60 pmoles) foi titulada contra BHA (SEQ ID NO: 75) em várias razões molares e os resultados são ilustrados nas Pistas 1 a 5. Ao aumentar a quantidade de BHA (SEQ ID NO: 75) na reação de ligação, a quantidade de HSA livre foi reduzida de maneira proporcional e, assim, indicando a ligação específica de BHA (SEQ ID NO: 75) a HSA.

**EXEMPLO 14: ESTUDO *IN VIVO* DE BHA (SEQ ID NO: 75)**

[285] Seis camundongos BALB/c de 8 semanas de idade foram usados para o estudo *in vivo* de BHA (SEQ ID NO: 75). Antes da injeção de BHA (SEQ ID NO: 75), uma amostra de sangue foi retirada de cada camundongo e usada como controle (0 h). Os camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos para injeção intraperitoneal (i.p.) e intravenosa (i.v.), respectivamente. BHA (SEQ ID NO: 75) (250 U) foi injetado em cada camundongo, e amostras de sangue foram coletadas 6, 24, 72 e 120 h após a injeção. O plasma de cada amostra de sangue a 16 µl foi analisado por um analisador de aminoácidos (Biochrom) para conteúdo de arginina e ornitina.

[286] O efeito de depleção de arginina *in vivo* de BHA (BHA SEQ ID NO: 75) foi estudado em camundongos BALB/c e é comparado àquele de BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89), conforme mostrado na Figura 9. De acordo com os resultados, o nível de arginina plasmática retorna rapidamente ao normal dentro de 24 h após a injeção de BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) (Figura 9). Em contrapartida, um nível indetectável de arginina plasmática foi retido por pelo menos 24 horas após a injeção de BHA (SEQ ID NO: 75) (Figura 9). Esse resultado indica que a fusão de ABD prolongou a meia-vida circulante de BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) *in vivo*. Os resultados demonstram que a fusão ABD é uma estratégia viável e promissora para melhorar as propriedades farmacodinâmicas de enzimas depletoras de arginina. A via de administração

parece não ter influência no efeito de depleção de arginina do BHA (SEQ ID NO: 75) *in vivo* (Figura 9). Além disso, todos os camundongos mostraram boa tolerância com a administração de BHA (SEQ ID NO: 75) visto que nenhum efeito colateral óbvio foi observado. Tomadas em conjunto, as proteínas de fusão aqui descritas, como BHA (SEQ ID NO: 75), provaram a viabilidade da estratégia de fusão ABD diminuindo a arginina plasmática a um nível indetectável por um período muito mais longo (pelo menos 24 horas) do que quando se usa BCA nativo (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) (8 horas) sem a fusão ABD.

**EXEMPLO 15: Estudo de farmacodinâmica *IN VIVO* DE N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)**

[287] Os efeitos anticancerígenos da arginase foram investigados há muito tempo (Greenberg e Sassenrath, 1953, Cancer Res. 13, 709 a 715). A arginase demonstrou ter um efeito anticâncer muito bom *in vitro*. No entanto, quase nenhum efeito foi observado *in vivo*, devido à meia-vida plasmática curta. A arginina plasmática caiu para o nível mais baixo 3 horas após a injeção de arginase nativa em camundongos C3H. A arginina aumentou para o nível basal normal 5 horas após a injeção no mesmo modelo (Greenberg e Sassenrath, 1953, Cancer Res. 13, 709 a 715). Portanto, a arginase foi considerada um agente anticâncer ineficaz, devido à meia-vida plasmática curta. Isso sugeriu que a meia-vida plasmática pode afetar a potência do fármaco enzimático *in vivo*. N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) e N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) mostraram atividade específica similar. Constatou-se que a extensão da meia-vida plasmática de rhArg (SEQ ID NO: 103) via fusão com ABD é um método eficaz. Para reduzir o custo de produção de rhArg (SEQ ID NO: 103) com meia-vida plasmática extendida, N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) e N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) foram desenvolvidos.

[288] Quinze camundongos BALB/c fêmeas (10 semanas de idade) foram usados nesse estudo. Eles foram mantidos em grupos de cinco por gaiola. Uma dose única de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) (500 U, 250 U e 125 U,

respectivamente) foi administrado aos camundongos via injeção i.p.. Amostras de sangue foram coletadas da veia safena em tubos capilares heparinizados e centrifugadas a 800 x g para obtenção do plasma. Dezesseis microlitros de amostra de plasma foram submetidos à medição da concentração de L-arginina com o uso do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30. Os resultados estão mostrados na Figura **10.** Medir as concentrações de arginina no plasma mostrou que 500U de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) pode esgotar a arginina plasmática para níveis abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (3 µM) por pelo menos 9 dias, 250U de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) pode esgotar a arginina sérica para níveis abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (3 µM) por pelo menos 7 dias, 125U de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) pode esgotar a arginina sérica para níveis abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (3 µM) por pelo menos 3 dias em camundongos BALB/c. Esses resultados sugerem claramente que a meia-vida plasmática de rhArg pode ser estendida por fusão com ABD. Em comparação com BHA (SEQ ID NO: 75) (Figura 9), N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) pode esgotar a arginina a um nível muito baixo nos camundongos por um período excepcionalmente mais longo, o que destaca a importância da necessidade de um projeto racional da proteína de fusão.

**EXEMPLO 16: Estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos *IN VIVO* DE N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)**

[289] Cinquenta camundongos machos C57BL/6J (10 a 12 semanas de idade) foram usados nesse estudo. Uma dose única de 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) foi administrado ao rato via injeção i.p.. Amostras de sangue foram coletadas da veia safena em tubos capilares heparinizados e centrifugadas a 800 x g para obtenção do plasma. Cinco microlitros de amostra de plasma foram submetidos à medição da concentração de L-arginina por cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem com o uso do Espectrômetro de Massa Triplo Quadrupolo de Ionização por Eletropulverização/Cromatografia Líquida

Agilent 6460, com um limite de detecção de L-arginina 0,3 µM. Cinco microlitros de amostra de plasma foram submetidos à medição de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) concentrações com o uso do Kit de ELISA de Arginase I Humano (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Abcam) que detecta especificamente arginase humana e não reage com arginase de camundongo.

[290] Após a injeção, o soro foi coletado na Hora 2, Hora 4, Hora 8, Hora 16, Hora 24 (Dia 1) e do Dia 2 ao Dia 12 em intervalos de 24 horas, e do Dia 12 ao Dia 30 em intervalos de 72 horas. Para encontrar um equilíbrio entre o número de animais usados e para minimizar o efeito nos resultados do estudo de farmacocinética e farmacodinâmica causado pela remoção de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) do camundongo como consequência da coleta de sangue, os camundongos foram divididos em 10 grupos, com n = 5 em cada grupo, e submetidos à coleta de sangue no ponto (ou pontos) no tempo indicado mostrado entre colchetes: Grupo 1 (Hora 2), Grupo 2 (Hora 4), Grupo 3 (Hora 8), Grupo 4 (Hora 16), Grupo 5 (Hora 24), Grupo 6 (Dia 2, Dia 7, Dia 12), Grupo 7 (Dia 3, Dia 8, Dia 18), Grupo 8 (Dia 4, Dia 9, Dia 21), Grupo 9 (Dia 5, Dia 10, Dia 15, Dia 24), Grupo 10 (Dia 0, Dia 6, Dia 11, Dia 27, Dia 30). Os resultados farmacodinâmicos e farmacocinéticos são mostrados respectivamente nas Figuras 13 e 14.

[291] Os resultados da medição das concentrações de arginina no plasma mostraram que 500U de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) administrado via injeção i.p. pode esgotar as concentrações de arginina no plasma para 1 µM dentro de 2 horas após a injeção (Figura 13). As concentrações plasmáticas de arginina foram mantidas em ≤ 1 µM por 10 dias antes de um aumento gradual nos dias subsequentes (**Tabela 4**). As concentrações de arginina plasmática retornaram à metade do nível basal entre os Dias 18 e 21. Esses resultados sugerem que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode manter a arginina plasmática em um nível muito baixo (≤ 1 µM) nos camundongos por um período excepcionalmente longo.

**TABELA 4. As concentrações plasmáticas de arginina antes e em diferentes pontos no tempo após injeção i.p. de 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)**

| **Ponto no tempo após injeção** | **Concentrações de arginina no plasma (μM) (Média de 5 camundongos ± SEM)** |
|---|---|
| 0 | 134,543 ± 3,791 |
| Hora 2 | 1,007 ± 0,013 |
| Hora 4 | 0,934 ± 0,021 |
| Hora 8 | 0,912 ± 0,006 |
| Hora 16 | 0,943 ± 0,010 |
| Hora 24 | 0,934 ± 0,007 |
| Dia 2 | 0,944 ± 0,007 |
| Dia 3 | 0,965 ± 0,008 |
| Dia 4 | 0,535 ± 0,121 |
| Dia 5 | 0,681 ± 0,043 |
| Dia 6 | 0,896 ± 0,089 |
| Dia 7 | 0,792 ± 0,135 |
| Dia 8 | 0,916 ± 0,079 |
| Dia 9 | 1,224 ± 0,178 |
| Dia 10 | 0,721 ± 0,054 |
| Dia 11 | 3,828 ± 1,511 |
| Dia 12 | 7,607 ± 2,325 |
| Dia 15 | 31,283 ± 4,569 |
| Dia 18 | 48,648 ± 3,989 |
| Dia 21 | 73,55 ± 3,76 |
| Dia 24 | 76,07 ± 4,92 |
| Dia 27 | 111,09 ± 6,21 |
| Dia 30 | 110,91 ± 3,81 |

[292] Os parâmetros farmacocinéticos são calculados com modelo de dois

compartimentos.

[293] A constante de taxa de eliminação $k_e$ é calculada pela seguinte equação:

$$k_e = \frac{\ln C_1 - lnC_2}{t_2 - t_1}$$

[294] A meia-vida plasmática $t_{1/2}$ é calculada pela seguinte equação:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

[295] A área sob a curva (AUC) é calculada pela regra trapezoidal com a seguinte equação:

$$AUC_{t_1-t_2} = \frac{(C_1 + C_2)}{2} \times (t_2 - t_1)$$

[296] Para comparação, usa-se a meia-vida relatada do rhArg nativo na literatura. A proteína de fusão N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) tinha meia-vida de eliminação de 3,9 ± 0,3 dias (Figura 14), implicando que as mesmas são eliminadas muito mais lentamente do que uma proteína não de fusão rhArg, que tem uma meia-vida muito mais curta. Para uma comparação específica, a arginase humana tem meia-vida de apenas alguns minutos em circulação (Georgiou et al., US 8.440.184 B2), indicando que a conjugação prolonga drasticamente o tempo de circulação. Esses resultados sugerem claramente que a meia-vida plasmática de rhArg pode ser estendida em grandes proporções por fusão com ABD. A meia-vida de circulação do ADI nativo (algumas horas) foi prolongada pela PEGuilação (Ensor et al., Cancer Res 2002, 62:5.443 a 5.450). O ADI PEGuilado teve uma meia-vida de circulação de 2 a 3 dias e apenas o ADI PEGuilado (não o ADI nativo) foi eficaz na inibição do crescimento de tumores *in vivo*. Na comparação de rhArg nativo e rhArg PEGuilado administrado a camundongos via injeção i.p., 1.500 U de rhArg PEGuilado por camundongos (6 U/g de camundongo) poderia esgotar a arginina em circulação para níveis abaixo do limite de detecção do analisador de aminoácidos (3 µM) por 6 dias, enquanto uma dose alta de rhArg nativo (7.500 U/camundongo) reduziu apenas a arginina circulante para ~20 µM dentro de 3 horas após a injeção, com arginina

retornando ao nível basal ~2 dias após a injeção (Tsui et al., Cancer Cell Int. 17 de abril de 2009;9:9). A arginase nativa é eliminada da circulação em minutos (Savoca et al., Cancer Biochem. Biophy's. 7:261 a 268, 1984). Para uso clínico, é essencial que a arginase seja projetada de modo a permitir que persista por muitos dias ou semanas em circulação. Na ausência de qualquer modificação, a arginase humana tem meia-vida de apenas alguns minutos em circulação devido ao fato de que seu tamanho não é grande o suficiente para evitar a filtração pelos rins (Georgiou et al., US 8.440.184 B2). Portanto, a presente invenção desenvolveu formas completamente novas e altamente melhoradas de arginase com persistência de circulação dramaticamente melhorada para uso terapêutico.

**EXEMPLO 17: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) REDUZ A MASSA GORDA, SUPRIME A LIPOGÊNESE E MELHORA A SENSIBILIDADE À INSULINA EM CAMUNDONGOS MAGROS NORMAIS**

[297] Nossos dados em um modelo de camundongo mostram que uma única injeção i.p. de 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) a camundongos machos C57BL/6J magros normais de 8 semanas de idade puderam manter as concentrações de arginina plasmática em ≤ 1 μM por pelo menos 10 dias, demonstrando a longa meia-vida circulatória de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (Figura 13). Assim, trataram-se camundongos machos C57BL/6J magros normais alimentados com uma dieta ração comum via injeção i.p. de 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em intervalos de 10 dias por 4 semanas. Após 4 semanas de tratamento, houve redução de mais de 25% da massa gorda visceral (perigondal, perirenal e mesentérica) e subcutânea (almofada de gordura inguinal) (Figura. 15A) em comparação com os camundongos de controle injetados com o veículo (solução salina). O exame histológico do tecido adiposo branco visceral (WAT) mostrou uma redução proeminente no tamanho dos adipócitos (Figura 15B). Analisou-se ainda a lipogênese e foi constatado que em camundongos tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), os níveis de mRNA de várias enzimas lipogênicas importantes, incluindo acetil-CoA

carboxilase 1 (Acc1), ácido graxo sintase (Fasn) e estearoil-CoA dessaturase 1 (Scd1), foram dramaticamente suprimidos no WAT visceral (Figura 16A) e fígado (Figura 16B).

[298] A obesidade está altamente associada à resistência à insulina. Portanto, conduziram-se estudos *in vivo* e *in vitro* para determinar se N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) o tratamento terá efeitos sobre a sensibilidade à insulina. Os resultados do teste de tolerância à insulina (ITT) mostraram que os camundongos tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) exibiram um aumento significativo na sensibilidade à insulina após 2 semanas de tratamento com fármacos (Figura 17A). Em seguida, examinou-se especificamente a sensibilidade à insulina hepática tratando hepatócitos primários preparados a partir de camundongos machos C57BL/6J com meio contendo 5U/ml de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), que nessa concentração não afetou a viabilidade celular (Figura 17B). 24 horas após a cultura em N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) ou meio de controle (sem adição de N-ABD094-rhArg), os hepatócitos primários foram estimulados com insulina 100 nM por 20 min. As células foram, então, coletadas para análise de Western blot para detectar a proteína quinase B fosforilada (pAkt), que é comumente usada como marcador de sinalização de insulina. Os resultados mostraram que houve um aumento proeminente na fosforilação de Akt no grupo tratado com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) quando comparado ao grupo de controle, demonstrando um aumento na sinalização da insulina hepática (Figura 17C).

[299] As revelações em camundongos magros normais demonstraram que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) tem meia-vida circulatória longa e pode reduzir a massa gorda, suprimir a lipogênese e melhorar a sensibilidade à insulina tanto *in vivo* como *in vitro*. Esses resultados dão suporte ao fato de que a proteína de fusão ABD-rhArg pode ser usada para a prevenção e tratamento da obesidade e distúrbios metabólicos associados, como resistência à insulina e esteatose hepática (fígado gorduroso).

**EXEMPLO 18: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) PREVINE DE FORMA EFICAZ A OBESIDADE INDUZIDA POR HFD**

[300] Tratamento com arginase humana recombinante [N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)] pode reduzir significativamente a massa gorda, suprimir a lipogênese e melhorar a sensibilidade à insulina em camundongos magros normais.

[301] Testou-se o efeito de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) sobre a adiposidade e vários parâmetros metabólicos em animais obesos. Foi empregado um modelo de camundongo com obesidade induzida por dieta rica em gordura (DIO) [Wang e Liao, 2012, Methods Mol. Biol. 821:421 a 433], que compartilha muitas características com a obesidade humana e é amplamente utilizado para testar potenciais agentes antiobesidade [Vickers et al., 2011, Br. J. Pharmacol. 164(4):1.248 a 1.262]. Especificamente, C57BL/6J, que é a cepa de camundongo mais comumente usada para o modelo de obesidade poligênica, foi empregada no estudo. É bem relatado que camundongos C57BL/6J alimentados com uma dieta rica em gordura terão ganho de peso proeminente, se tornarão obesos e desenvolverão hiperinsulinemia, hiperglicemia, tolerância à glicose diminuída e resistência à insulina [Gallou-Kabani et al., 2007, Obesity 15 (8):1996-2005].

[302] Para determinar a eficácia de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) na prevenção da obesidade induzida por dieta e distúrbios metabólicos associados, camundongos C57BL/6J machos foram alimentados com uma dieta rica em gordura contendo 60% em kcal de gordura (HFD; *Research Diets*, D12492) de 8 semanas de idade a 12 semanas, e simultaneamente receberam injeção i.p. de 200-300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) ou solução salina como controle do veículo em intervalos de 7 dias. Camundongos C57BL/6J alimentados com uma dieta com baixo teor de gordura combinada contendo 10 kcal% de gordura (LFD; *Research Diets*, D12450J) e injetados com solução salina serviu como o controle de massa magra de várias medições.

[303] Dois coortes, com n = 5 em cada grupo, foram conduzidos

separadamente. Os camundongos foram alojados em grupos de 5. Resultados semelhantes foram obtidos nas duas coortes independentes. Os dados de um coorte de camundongos foram resumidos nos Exemplos 18 a 22.

[304] Em comparação com o controle magro alimentado com um LFD e tratado com veículo [referido como grupo LFD (veículo)], camundongos machos tratados com veículo alimentados com um HFD [referido como grupo HFD (veículo)] mostraram um ganho acentuado no peso corporal (Figura 18A) e tamanho (Figura 18B), com um aumento significativo na massa de tecido adiposo branco (WAT) nos depósitos viscerais principais (perigonadal, perirenal e mesentérico) e subcutâneos (inguinais) (Figura 19A). No entanto, os camundongos alimentados com um HFD, mas simultaneamente tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) [referido como grupo HFD (rhArg)] poderia ser efetivamente evitado de ganho de peso e expansão do WAT causados pela ingestão de HFD. O exame histológico de WAT revelou que o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) suprimiu a hipertrofia de adipócitos de forma proeminente (Figura 19B). A análise dos níveis de expressão de mRNA com o uso de qRT-PCR em tempo real em gWAT mostrou ainda uma regulação negativa dramática de vários fatores críticos de transcrição adipogênica, incluindo receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (*Pparg*) e proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1c (*Srebp1c*) e enzimas lipogênicas (*Acc1* e *Scd1*) (Figura 19C). Esses genes também foram significativamente regulados para baixo no músculo esquelético de camundongos alimentados com HFD tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (Figura 20), sugerindo que o efeito antilipogênese de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) não se limita a WAT.

[305] Depois de confirmar o efeito antiobesidade do N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em camundongos machos, o efeito de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em camundongos fêmeas ($n$ = 5 em cada grupo) foi estudado para determinar se havia qualquer diferença de sexo. Os resultados mostraram que o tratamento concomitante com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) foi igualmente

eficaz na proteção de camundongos fêmeas alimentados com um HFD a partir de 8 semanas de idade por 12 semanas a partir do ganho de peso (Figura 21A) e acúmulo excessivo de WAT nos depósitos viscerais principais (perigonadal, perirenal e mesentérico) e subcutâneos (inguinais) (Figura 21B) e pode melhorar a sensibilidade à insulina (Figura 22A) e tolerância à glicose (Figura 22B).

[306] Para testar o efeito de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em células de gordura, pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongo foram usados, que são comumente empregados como modelo baseado em células para estudar adipogênese [Green e Meuth, 1974, Cell 3:127 a 133]. Constatou-se que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia inibir efetivamente a adipogênese e a lipogênese em células 3T3-L1 (Figura 23), e suprimiu significativamente os níveis de mRNA de vários fatores de transcrição adipogênica (Figura 24A) e enzimas lipogênicas (Figura 24B). Efeito inibitório similar foi observado quando os pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados em arginase bovina ou outra enzima de depleção da arginina-arginina desiminase (ADI) ou meio sem arginina (Figura 23). A arginase converte L-arginina em L-ornitina e ureia, enquanto ADI converte L-arginina em L-citrulina. No entanto, L-ornitina, ureia ou L-citrulina não conseguiram inibir a adipogênese e a lipogênese em células 3T3-L1 (Figura 23).

[307] Além disso, a suplementação de meio livre de arginina com concentrações variáveis de L-arginina demonstrou o efeito dependente da dose de arginina na adipogênese e lipogênese (Figura 25A), com uma concentração limite entre 10 a 40 µM de arginina para ativação de fatores de transcrição adipogênicos críticos, incluindo Cebpa e Pparg e a enzima lipogênica Scd1 (Figura 25B).

[308] Juntos, essas constatações demonstram que o efeito antiadipogênese e lipogênese de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) é mediado pela privação de arginina.

[309] Coletivamente, esses resultados apoiam que a depleção de arginina pela proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-

PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzimas de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) pode ser usado como uma terapia antiobesidade preventiva.

**EXEMPLO 19: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) EVITA A RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA POR HFD, TOLERÂNCIA À GLICOSE PREJUDICADA E DISTÚRBIOS METABÓLICOS**

[310] A obesidade está comumente associada à resistência à insulina, tolerância à glicose prejudicada e distúrbios metabólicos. De fato, em comparação com os camundongos de controle magros tratados com veículo alimentados com um LFD, os camundongos tratados com veículo alimentados com um HFD mostraram uma redução significativa na sensibilidade ao efeito de redução da glicose no sangue da insulina injetada no teste de tolerância à insulina (ITT) conduzido às 6 semana após a alimentação em um HFD (Figura 26A), que piorou ainda mais em 11 semanas (Figura 26B). Concomitante com a sensibilidade à insulina reduzida, esses camundongos foram significativamente menos eficientes em retornar a glicose no sangue aos níveis basais após serem injetados com D-glicose no teste de tolerância à glicose (GTT) por 5 semanas após a alimentação em um HFD (Figura 27A), implicando no desenvolvimento de tolerância à glicose diminuída, que piorou ainda mais após 10 semanas de consumo de HFD (Figura 27B). De fato, os níveis de glicose no sangue em jejum (por 5 horas) (Figura 28A) e de insulina no plasma em jejum (Figura 28B) foram significativamente elevados, e a classificação HOMA-IR (Figura 28C), uma medição da resistência à insulina, foi maior nos camundongos alimentados com HFD tratados com veículo em comparação com os camundongos de controle magros. Os níveis plasmáticos de jejum de leptina (Figura 29A), colesterol total (Figura 29B), triglicerídeos (Figura 29C) e ácidos graxos livres (Figura 29D) aumentaram significativamente quando medidos 12 semanas após a alimentação no HFD. Notavelmente, o tratamento concomitante com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia prevenir completamente o desenvolvimento de

resistência à insulina, tolerância à glicose diminuída, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e acidemia gordurosa hiper-livre induzida pela HFD.

[311] Juntos, esses resultados demonstram que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode prevenir eficazmente a resistência à insulina e a intolerância à glicose, um precursor para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Também pode prevenir a resistência à leptina e outros distúrbios metabólicos, incluindo dislipidemia associada à obesidade.

[312] Coletivamente, esses resultados suportam que a depleção de arginina pela proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzimas de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) pode ser usado como uma terapia preventiva antidiabetes, antidislipidemia, antiaterosclerose e antidistúrbio metabólico.

**EXEMPLO 20: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) PREVINE A ESTEATOSE INDUZIDA POR HFD**

[313] A esteatose se refere à retenção anormal de lipídios dentro da célula. A esteatose hepática não alcoólica (fígado gorduroso não alcoólico) é uma comorbidade comum associada à obesidade. Embora possa ser assintomático durante o estágio inicial, se torna esteato-hepatite quando o fígado está inflamado, que pode progredir para fibrose e evoluir para cirrose em estágios mais avançados, o que aumenta muito o risco de se tornar carcinoma hepatocelular. Na verdade, verificou-se que nos camundongos tratados com veículo alimentados com um HFD, o fígado estava proeminentemente aumentado e de cor pálida (Figura 30A), com o peso quase o dobro dos camundongos de controle magros (Figura 30B). O manchamento de seções de fígado com red oil O revelou extensa acumulação de grandes gotículas de lipídios (Figura 31A), com um aumento correspondente de dez vezes nas concentrações de triglicerídeos (Figura 31B). Concomitante a essas

constatações, os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), comumente medidos como biomarcadores para danos ao fígado, foram significativamente elevados (Figura 32). Notavelmente, o tratamento concomitante com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia prevenir efetivamente o acúmulo excessivo de lipídios no fígado de camundongos alimentados com o HFD, de modo que o peso e o conteúdo de triglicerídeos do fígado e os níveis séricos de ALT fossem similares ao controle magro. Em consonância com essas constatações, foi revelado que, enquanto HFD induziu uma regulação positiva significativa de vários fatores críticos de transcrição adipogênicos e enzimas liogênicas no fígado, o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia suprimir significativamente a regulação positiva desses genes (Figura 31C). Juntos, esses resultados demonstram que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) é altamente eficaz na prevenção da esteatose hepática.

[314] Além do fígado, a obesidade também está associada ao acúmulo excessivo de lipídios no rim (esteatose renal), no pâncreas (esteatose pancreática) e no coração (esteatose cardíaca), causando lipotoxicidade e disfunção desses órgãos. Na verdade, verificou-se que nos camundongos tratados com veículo alimentados com um HFD, houve um aumento significativo no peso do rim (Figura 33A), pâncreas (Figura 33B) e coração (Figura 33C). O tratamento concorrente com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia prevenir eficazmente o ganho de peso nestes órgãos, o que sugere que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode prevenir o acúmulo excessivo de lipídios e a lipotoxicidade nesses órgãos.

[315] Coletivamente, esses resultados suportam que a proteína de fusão ABD-rhArg pode prevenir eficazmente a esteatose e a depleção de arginina por N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzimas de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) podem ser usadas como uma terapia preventiva antiesteatose.

**EXEMPLO 21: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) PREVINE A INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDA POR HFD**

[316] A expansão excessiva do WAT aumentará a produção de várias adipocinas, que desencadeiam inflamação crônica de baixo grau que contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina. A proteína quimioatraente de monócitos-1 (Mcp1) é uma das principais adipocinas pró-inflamatórias secretadas pelo WAT que regula a infiltração de macrófagos no WAT, resistência à insulina e esteatose hepática na obesidade. Na verdade, descobrimos que o nível de mRNA de Mcp1 foi significativamente regulado positivamente em WAT perigonadal de camundongos tratados com veículo alimentados com um HFD (Figura 34A). Concomitante com isso, os níveis séricos de Mcp1 circulatório, medidos por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), foram significativamente elevados em comparação com o controle magro (Figura 34B). Outras adipocinas pró-inflamatórias, que incluem interleucina 1 beta (Il1b) e fator de necrose tumoral alfa (*Tnfa*), também mostraram expressão aumentada de mRNA em WAT perigondal (Figura 34A). Notavelmente, o tratamento concomitante com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia suprimir a suprarregulação dessas adipocinas no WAT perigonadal e suprimir uma elevação nos níveis séricos de Mcp1.

[317] Esses resultados demonstram que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode prevenir a inflamação crônica de baixo grau associada à obesidade e apoiar o potencial de depleção de arginina pela proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzima de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) como uma terapia anti-inflamatória preventiva.

**EXEMPLO 22: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)PREVINE O BRANQUEAMENTO INDUZIDO POR HFD E A DESREGULAÇÃO DA OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO ADIPOSO MARROM E AUMENTA A TERMOGÊNESE SEM TREMORES**

[318] O tecido adiposo marrom (BAT) serve para dissipar os combustíveis oxidativos em calor (termogênese sem arrepios). Estudos recentes mostram que tem grande capacidade de gasto energético para neutralizar a obesidade. Em contrapartida, o clareamento do BAT está associado à obesidade e prejudica a função do BAT. De fato, constatou-se que em camundongos tratados com veículo alimentados com um HFD, o BAT interescapular foi proeminentemente ampliado (Figura 35A), com o peso o dobro dos camundongos de controle magros (Figura 35B). O exame histológico revelou extenso acúmulo de grandes células unilobulares intercaladas entre adipócitos castanhos multilobulares (Figura 35C), sugerindo uma conversão de adipócitos marrons em células brancas. No entanto, em camundongos alimentados com HFD tratados simultaneamente com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), o peso, tamanho e aparência histológica do BAT foram similares àqueles dos camundongos de controle magros. Constatou-se ainda que o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) regulou de forma positiva significativamente a proteína de desacoplamento 1 (*Ucp1*) de gene específico de BAT que é crucial para a termogênese, e também regulou positivamente o coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (*Pgc1α*), o regulador transcricional chave de Ucp1 em adipócitos marrons, enquanto suprime a regulação negativa induzida por HFD de Acil-CoA oxidase 1 (*Acox1*), um dos principais genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (Figura 36). Constatou-se que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) o tratamento pode bloquear a regulação negativa de *Acox1*, indicando o potencial de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) na normalização da oxidação de ácidos graxos.

[319] Juntos, esses resultados demonstram que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) o tratamento pode prevenir efetivamente o branqueamento da gordura marrom e a desregulação da oxidação dos ácidos graxos no BAT associada à obesidade, e aumenta a termogênese sem tremores para combater o efeito da adiposidade da HFD.

[320] Essas constatações suportam o potencial de depleção de arginina pela proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, ABD094-rhArg, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzima de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) como uma terapia preventiva antiobesidade.

**EXEMPLO 23: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) reduz de forma eficaz a obesidade induzida por HFD**

[321] Depois de confirmar que o tratamento concomitante com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode prevenir eficazmente a obesidade induzida por HFD e complicações e comorbidades associadas, incluindo resistência à insulina, intolerância à glicose, hiperglicemia, dislipidemia, esteatose hepática, inflamação crônica e branqueamento de BAT, em seguida, estudou-se a eficácia de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) na redução da obesidade e na reversão desses distúrbios em camundongos com obesidade induzida por dieta pré-existente (DIO). Camundongos machos C57BL/6J foram alimentados com HFD de 5 semanas de idade por 12 semanas para induzir obesidade e complicações e comorbidades associadas. Os mesmos foram, então, estratificados de acordo com o peso corporal em 2 grupos e tratados com 600-700U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) ou solução salina como controle de veículo em intervalos de 7 dias por 12 semanas enquanto continua a ser alimentado com o HFD. Um grupo de camundongos foi alimentado com uma dieta com baixo teor de gordura (LFD) combinada e injetada com solução salina durante todo o estudo para servir como o controle da massa magra de várias medições. Dois coortes, com $n = 5$ em cada grupo, foram conduzidos separadamente. Os camundongos foram alojados em grupos de 5. Resultados semelhantes foram obtidos nas duas coortes independentes. Os dados de um coorte de camundongos foram apresentados nos Exemplos 23 a 28.

[322] Doze semanas de alimentação com HFD poderia aumentar o peso corporal de camundongos machos para mais de 50 g, que era marcadamente

mais pesado do que camundongos machos de controle magros alimentados com um LFD (Figura 37A e 37B). Após o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), o peso corporal de camundongos obesos induzidos por HFD diminuiu gradualmente. Em 5 semanas, seu peso corporal havia reduzido em mais de 30% e era similar àquele dos camundongos de controle magros. O peso corporal foi mantido neste nível até a conclusão de 12 semanas de tratamento. O peso da almofada de gordura nos depósitos viscerais principais (WAT perigonadal, perirenal e mesentérico) e depósito subcutâneo (WAT inguinal) em camundongos DIO tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) foi significativamente reduzido e era altamente similar àquele dos camundongos de controle magros (Figura 38A). O exame histológico de WAT revelou uma diminuição proeminente dos adipócitos em camundongos DIO tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (Figura 38B).

[323] Juntamente com os resultados no Exemplo 18, esses resultados suportam que a proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzima de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) podem ser usados para o tratamento terapêutico da obesidade.

**EXEMPLO 24: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) REVERTE A RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA POR HFD E TOLERÂNCIA À GLICOSE PREJUDICADA E CORRIGE DESARRANJO METABÓLICO**

[324] Antes do tratamento, os camundongos que se alimentaram de um HFD por 12 semanas desenvolveram resistência periférica à insulina (Figura 39) e tolerância à glicose diminuída (Figura 40), que são características de pré-diabetes, em comparação aos camundongos de controle magros. No entanto, por 4 semanas após o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), camundongos DIO mostraram um aumento acentuado na sensibilidade à insulina que se tornou comparável aos camundongos controle magros.

Normalização da sensibilidade à insulina em camundongos que receberam N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), embora continuamente sendo alimentado com um HFD, pode ser sustentado até o final de 12 semanas de tratamento com fármacos. Além disso, camundongos tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) exibiram uma melhora significativa na tolerância à glicose por 3 semanas de tratamento e foram totalmente restaurados a um nível similar àquele dos camundongos de controle magros por 7 semanas de tratamento. Em linha com essas melhorias, a glicose no sangue em jejum (Figura 41A) e a insulina plasmática (Figura 41B) de camundongos DIO tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) restaurou a níveis similares àqueles dos camundongos de controle magros por 4 semanas de tratamento com rhArg e manteve-se dentro da faixa normal até o final do tratamento. Isso resultou em uma diminuição dramática na pontuação HOMA-IR de 35,1 em camundongos antes do tratamento para 1,2 em camundongos 4 semanas após o tratamento (Figura 41C), o que implicou uma reversão da resistência à insulina. A leptina plasmática em jejum (Figura 42A) e os níveis de colesterol total (Figura 42B) também foram marcadamente reduzidos aos níveis normais.

[325] Coletivamente, nossos resultados demonstram a grande eficácia de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) na reversão da resistência à insulina, tolerância à glicose diminuída, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipercolesterolemia dentro de 4 semanas de tratamento.

[326] Juntos, esses resultados apoiam que a depleção de arginina pela proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzima de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) pode ser usado como um agente de sensibilização à insulina e para o tratamento terapêutico de pré-diabetes e diabetes tipo 2 caracterizado por resistência à insulina, intolerância à glicose e hiperglicemia e outros distúrbios associados à resistência à insulina. Também pode ser usado para o tratamento terapêutico de hiperleptinemia e

hipercolesterolemia.

**EXEMPLO 25: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) REVERTE A ESTEATOSE INDUZIDA POR HFD**

[327] Doze semanas de alimentação com HFD esteatose hepática induzida em camundongos machos (Figuras 30 e 31). Depois de estender a alimentação de HFD por 12 semanas, o fígado aumentou ainda mais e apareceu de cor pálida (Figura 43A). O peso do fígado foi mais do que o dobro dos camundongos de controle magros (Figura 43B). O acúmulo maciço de lipídeos se estendeu a todo o fígado (Figura 44A), com um aumento correspondente no teor de triglicerídeos (Figura 44B). Os níveis de expressão dos fatores de transcrição adipogênicos críticos *Pparg* e *Srebp1c* foram regulados para baixo para níveis similares àqueles do controle magro, enquanto os níveis de expressão das enzimas lipogênicas *Acc1* foram reduzidos ainda mais, e *Scd1* foi drasticamente suprimido (Figura 44C). Em comparação com camundongos que foram alimentados com um HFD por 12 semanas (Exemplo 20, Figura 32), houve uma elevação adicional dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) em camundongos alimentados com HFD por 24 semanas, e os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) também aumentaram significativamente (Figura 45), demonstrando uma nova progressão da lesão hepática. No entanto, em camundongos DIO tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), o fígado mostrou uma diminuição acentuada no tamanho a tal ponto que o peso era similar àquele controle magro (Figura 43B). Ademais, o fígado restaurou a cor avermelhada (Figura 43A), que foi bem correlacionado com uma depuração dramática de gotículas de lipídios (Figura 44A), com as concentrações de triglicerídeos reduzidas a um nível semelhante ao controle pobre (Figura 44B). Notavelmente, as concentrações plasmáticas de ALT e AST foram comparáveis ao controle magro, o que sugere que o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode prevenir a progressão adicional e corrigir danos hepáticos existentes. Coletivamente, nossos resultados revelam o efeito marcante de N-

ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) na reversão da esteatose hepática.

[328] Além do fígado, a obesidade também está associada ao acúmulo excessivo de lipídios no rim (esteatose renal), no pâncreas (esteatose pancreática) e no coração (esteatose cardíaca), causando lipotoxicidade e disfunção desses órgãos vitais. Na verdade, houve um aumento significativo no peso do rim (Figura 46A), pâncreas (Figura 47A) e coração (Figura 48A) em camundongos DIO tratados com veículo. O exame histológico revelou acúmulo de vacúolos que se assemelham a gotículas de lipídios nos túbulos renais (Figura 46C). O manchamento com red oil O de seções de rim mostrou que havia acúmulo ectópico de lipídios no glomérulo (Figura 46D). Havia um extenso acúmulo intralobular e interlobular de placas de WAT no pâncreas (Figura 47B), e ilhas de adipócitos brancos foram encontradas entre as fibras musculares cardíacas (Figura 48B). As concentrações de triglicerídeos aumentaram significativamente no rim (Figura 46B), pâncreas (Figura 47C), coração (Figura 48C). Além disso, uma elevação significativa nas concentrações de triglicerídeos também foi encontrada no músculo esquelético (Figura 49). Essas constatações indicam o desenvolvimento de esteatose nesses órgãos de camundongos DIO tratados com veículo. Contudo, o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode reduzir significativamente o peso do rim (Figura 46A), pâncreas (Figura 47A) e coração (Figura 48A) de camundongos DIO a um nível similar àquele do controle magro. O exame histológico confirmou uma redução acentuada de vacúolos nos túbulos renais (Figura O exame histológico confirmou uma redução acentuada de vacúolos nos túbulos renais (Figura 46D). Houve uma redução proeminente do WAT dentro do pâncreas (Figura 47B) e coração (Figura 48B). As concentrações de triglicerídeos no rim (Figura 46B), pâncreas (Figura 47C), coração (Figura 48C) e músculo esquelético (Figura 49) de camundongos DIO tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) foram restaurados em um nível similar àquele do controle magro. Essas constatações demonstram que N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode reverter com eficácia a esteatose no rim, pâncreas

e coração, e possivelmente também em outros órgãos.

[329] Coletivamente, esses resultados suportam que a proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzima de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) podem ser usados para o tratamento terapêutico da esteatose.

**EXEMPLO 26: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) reduz a inflamação crônica induzida por HFD e fibrose**

[330] Conforme ilustrado no Exemplo 21, a alimentação com HFD induz inflamação crônica. Em camundongos DIO tratados com veículo, concomitante com expressões reguladas positivamente de adipocina pró-inflamatória *Mcp1* em WAT perigonadal (Figura 50A), as concentrações séricas de *Mcp1* foram significativamente elevadas (Figura 50B). Por outro lado, em camundongos DIO tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50), as expressões *Mcp1* em WAT perigonadal foram significativamente reguladas para baixo e as concentrações séricas de *Mcp1* foram corrigidas para um nível similar àquele dos camundongos de controle magros (Figura 50B), que sugere que o tratamento com N-ABD094-rhArg pode aliviar a inflamação crônica induzida por HFD em WAT.

[331] No fígado de camundongos DIO tratados com veículo, houve regulação positiva significativa de vários genes pró-inflamatórios, incluindo Interleucina 1 alfa e 1 beta (*Il1a* e *Il1b*) (Figura 51A). A inflamação crônica está associada à fibrose. De fato, houve uma regulação positiva significativa do fator de transformação beta do gene profibrótico crítico (*Tgfb*) (Figura 51B). O tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia diminuir significativamente esses genes pró-inflamatórios e regular positivamente vários genes anti-inflamatórios, incluindo Interleucina 10 (*Il10*), Interleucina 22 (*Il22*) e Interferon gama (*Infg*) (Figura 51C). A expressão do gene profibrótico *Tgfb* foi restaurada a um nível similar àquele do controle magro. Similar ao fígado, no rim de camundongos DIO tratados com veículo, houve uma supraregulação significativa de vários genes

pró-inflamatórios, incluindo Mcp1, fator de necrose tumoral alfa (*Tnfa*) e *Il1b* (Figura 52A). O gene profibrótico da cadeia alfa 1 do colágeno tipo 1 (*Col1a1*) também foi significativamente regulado positivamente, o que está de acordo com os achados de deposição excessiva de fibras de colágeno, identificados pelo manchamento com vermelho de Sirius, no rim (Figura 52C). Notavelmente, o tratamento de camundongos DIO com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia diminuir a expressão desses genes pró-inflamatórios para níveis similares àquele do controle magro. O gene profibrótico *Col1a1* foi bastante suprimido, e a quantidade de fibras de colágeno foi significativamente reduzida. Da mesma forma, no pâncreas, o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia diminuir significativamente o gene pró-inflamatório, como *Mcp1* (Figura 52A) e o gene profibrótico crítico *Tgfb* (Figura 53B).

[332] Coletivamente, essas constatações demonstram que o tratamento com N-ABD094-rhArg pode efetivamente aliviar a inflamação crônica e a fibrose no fígado, rim, pâncreas e provavelmente em outros órgãos também.

[333] O fígado gorduroso (esteatose hepática) pode ser assintomático durante o estágio inicial. Torna-se esteato-hepatite quando o fígado está inflamado, que pode progredir para fibrose e evoluir para cirrose em estágios mais avançados, o que aumenta muito o risco de se tornar carcinoma hepatocelular. Os presentes resultados sugerem que o tratamento com N-ABD094-rhArg pode interromper a progressão da doença hepática e reverter o dano hepático.

[334] Juntos, esses resultados suportam que a depleção de arginina pela proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG, BCA-ABD) ou enzima de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ABD-ADI, ADC-PEG ou ADC-ABD) pode ser usado para o tratamento terapêutico de inflamação crônica e fibrose.

**EXEMPLO 27: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) reverte o branqueamento da gordura marrom**

[335] Após alimentação prolongada em um HFD, houve um aumento adicional

no tamanho (Figura 54A) e peso da BAT interescapular (Figura 54B) em camundongos DIO tratados com veículo em comparação com os camundongos de controle magros, que se correlacionou com a presença de uma grande quantidade de células uniloculares de tipo branco aumentadas (Figura 54C). Em contrapartida, o tratamento de camundongos DIO com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) poderia restaurar dramaticamente o BAT interescapular a um tamanho e peso similares àqueles dos camundongos de controle magros, com remissão quase completa das células uniloculares brancas. Coletivamente, essas constatações demonstram a grande capacidade de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) na reversão do branqueamento da gordura marrom.

[336] Coletivamente, esses resultados suportam que a proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzima de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) pode ser usado para o tratamento terapêutico da obesidade por meio da reversão do branqueamento da gordura marrom.

**EXEMPLO 28: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) DIMINUI A PRESSÃO ARTERIAL**

[337] A obesidade está associada a doenças cardiovasculares e hipertensão. Camundongos DIO tratados com 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em intervalos de 7 dias durante 5 semanas foram submetidos à medição da pressão arterial pelo método do punho de cauda com o uso do Sistema de Pressão Arterial Não Invasivo CODA (Kents Scientific Corporation). Verificou-se que a pressão arterial sistólica e diastólica (Figura 55A) e a frequência cardíaca (Figura 55B) de camundongos DIO tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) foram significativamente menores do que os camundongos DIO tratados com veículo e foram altamente comparáveis aos camundongos de controle magros. O Exemplo 25 mostra que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) pode reverter com eficácia a esteatose renal e cardíaca, o que pode ter efeitos benéficos na redução da pressão arterial.

[338] Coletivamente, esses resultados suportam que a proteína de fusão ABD-rhArg ou outras formas de arginase (por exemplo, rhArg-PEG, BCA-PEG ou BCA-ABD) ou enzima de depleção de arginina (por exemplo, ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG ou ADC-ABD) podem ser usados para o tratamento terapêutico da hipertensão.

**EXEMPLO 29: N-ABD0094-rhArg (SEQ ID NO: 50) NÃO INDUZ ANTICORPOS NEUTRALIZANTES E PERMANECE EFICAZ PARA USO PROLONGADO**

[339] A geração de anticorpos neutralizantes pode afetar a farmacodinâmica, farmacocinética, estabilidade e eficácia de um fármaco. Para determinar a resposta imunogênica, camundongos machos C57BL/6J de 8 semanas de idade alimentados com um LFD receberam injeção i.p. de 500U de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) ou solução salina como controle do veículo em intervalos de 7 dias por 8 meses. Verificou-se que, apesar da presença de anticorpos antifármaco contra N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (Figura 56A), esses anticorpos não tiveram efeitos neutralizantes sobre a atividade da arginase (Figura 56B), que está de acordo com as constatações de que as concentrações de arginina no plasma podem ser mantidas em níveis abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (3 µM) ao longo do período de estudo.

[340] Para avaliar a segurança do uso a longo prazo, amostras de soro e urina de camundongos alimentados com LFD tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) por 8 meses foram coletados para análise de ALT e AST, que são biomarcadores comumente usados de lesão hepática, e creatinina sérica e relação albumina/creatinina na urina para avaliação das funções renais. Verificou-se que camundongos alimentados com LFD tratados com o fármaco apresentaram diferenças significativas de camundongos alimentados com LFD tratados com veículo (Figura 57A e 57B) em todos esses parâmetros. Além disso, ao examinar as respostas funcionais e reatividade vascular de artérias isoladas com o uso de miografia de fio, não houve diferenças significativas entre

camundongos alimentados com LFD tratados com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) e camundongos alimentados com LFD tratados com veículo na contração do músculo liso vascular evocado por fenilefrina (Figura 58A), relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina (Figura 58B) e relaxamento independente do endotélio em resposta ao nitroprussiato de sódio doador de óxido nítrico (Figura 58C).

[341] Em um estudo separado no qual camundongos machos C57BL/6J obesos induzidos por dieta foram tratados com 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) por 20 semanas, enquanto continuava a ser alimentado com um HFD, o peso corporal foi reduzido a um nível similar àquele dos camundongos de controle magros por 5 semanas e continuou a ser mantido nesse nível sem repercussão. O monitoramento regular das concentrações de arginina no plasma mostrou que a arginina permaneceu em níveis abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (3 µM). Esses resultados suportam que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) permaneceu eficaz durante todo o período de tratamento. Juntas, essas constatações suportam que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) é seguro e eficaz para uso a longo prazo.

**EXEMPLO 30: PROTOCOLO DE PEGILAÇÃO PARA ARGINASE HUMANA RECOMBINANTE (RHARG)**

[342] Arginase humana recombinante (His-rhArg SEQ ID NO: 101) foi obtida por purificação com o uso de cromatografia de afinidade. Antes da PEGuilação, o His-rhArg purificado (SEQ ID NO: 101) foi diafiltrado contra fosfato de sódio 20 mM (pH 8,0) e a concentração de proteína foi ajustada para 2 mg/ml. Os reagentes de PEGuilação foram preparados em fosfato de sódio 20 mM (pH 8,0). Foi usada uma razão molar de reagente PEG para rhArg a 20:1. O reagente PEG foi adicionado ao His-rhArg (SEQ ID NO: 101) e, então, incubado durante 4 horas à temperatura ambiente com agitação. A mistura de reação foi, então, diafiltrada contra fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4) com o uso de filtração de fluxo tangencial (TFF). O excesso de PEG foi removido no fluxo com o uso de cromatografia de

afinidade e o His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) foi recuperado por eluição da proteína com imidazol 0,5 M. Qualquer His-rhArg não derivado (SEQ ID NO: 101) foi separada por outra rodada de cromatografia de afinidade. A mistura de reação foi, então, analisada por SDS-PAGE com o uso de gel de poliacrilamida a 12%. O gel foi manchado com azul Coomassie para identificação do peso molecular ou solução de iodo 0,1 M para detecção de PEG livre.

[343] Por exemplo, em uma preparação, 150 mg de His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) foi obtido, com atividade específica de 245 U/mg e concentração de 7,5 mg/ml. A Figura 11 e a **Tabela 5** mostram um exemplo da produção de PEG-rhArg e sua análise.

**TABELA 5. PRODUÇÃO DE HIS-rhArg PEGUILADO (SEQ ID NO: 101) E SUA ANÁLISE.**

| | **Volume (ml)** | **Concentração (mg/ml)** | **Total (mg)** | **Ativ. Específica (U/mg)** |
|---|---|---|---|---|
| Lote 3 de His-rhArg PEGuilado | 11 | 3,5 | 38,5 | 189 |
| Lote 3 de His-rhArg PEGuilado | 35 | 5,3 | 185,5 | 213 |

**EXEMPLO 31: TRATAMENTO COM HIS-rhArg PEGUILADO [SEQ ID NO: 101] REDUZ OBESIDADE E MELHOR A SENSIBILIDADE À INSULINA**

[344] Produção de His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) e descrita no Exemplo 30. Camundongos machos C57BL/6J com obesidade induzida por dieta pré-existente (DIO) receberam injeção i.p. de 300U His-rhArg PEGuilado [SEQ ID NO: 101], ou solução salina como controle de veículo, em intervalos de 7 dias por 5 semanas, enquanto é alimentado continuamente com um HFD. O peso corporal dos camundongos tratados com His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) gradualmente reduzido para 30 g, o que era similar àquele dos camundongos de controle magros tratados com veículo alimentados com uma dieta alimentar

(Figura 59). O peso da almofada de gordura nos depósitos viscerais principais (WAT perigonadal, perirenal e mesentérico) e no depósito subcutâneo (WAT inguinal) foi significativamente reduzido e era similar àquele dos camundongos de controle magros no final do estudo (Figura 60). O peso do fígado, rim, pâncreas e coração foi significativamente menor do que os camundongos DIO tratados com veículo e foi comparável aos camundongos de controle magros (Figura 60). O monitoramento regular das concentrações de arginina no plasma confirmou que a arginina permaneceu em níveis abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (3 µM) ao longo do estudo.

[345] Duas semanas após o tratamento de His-rhArg PEGuilado [SEQ ID NO: 101], camundongos DIO já mostraram níveis mais baixos de glicose no sangue em jejum (Figura 61A) e um aumento significativo na sensibilidade à insulina em comparação com camundongos DIO tratados com veículo (Figura 61B).

[346] Juntas, essas constatações suportam que His-rhArg PEGuilado [SEQ ID NO: 101] tem efeitos antiadiposidade e de sensibilização à insulina similares a N-ABD094-rhArg [SEQ ID NO: 50]. A privação de arginina por His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) tem efeitos terapêuticos para tratar a obesidade e doenças associadas à resistência à insulina.

**EXEMPLO 32: SUBSTITUIÇÃO DE ÍONS METÁLICOS**

[347] A arginase de tipo selvagem inclui tipicamente um íon metálico $Mn^{2+}$ (D'Antonio & Christianson, 2011, Biochemistry, 50: 8018-27). Verificou-se que a substituição de íons metálicos é um método para preparar uma forma muito mais potente de ABD094-rhArg (baixo valor de $K_m$ e alto valor de $k_{cat}/K_m$). N-ABD094-rhArg purificado (SEQ ID NO: 50) em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) foi misturado com 20 mM de íons de metais divalentes diferentes ($Mn^{2+}$, $Ni^{2+}$ ou $Co^{2+}$) e foi incubado a 52 a 55 °C por 15 a 60 min e, então, o tampão foi trocado por PBS tampão (pH 7,4).

[348] As amostras foram submetidas a estudos de atividade enzimática e cinética enzimática para determinar a atividade específica e eficiência catalítica

($k_{cat}/K_m$). As amostras foram aplicadas a espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, espectrômetro de emissão óptica Agilent 700 Series ICP) para análise quantitativa do conteúdo de metal.

[349] Cada amostra de proteína (100 a 200 µl) foi adicionada a 10 ml de $HNO_3$ a 1% em p/v e, então, diferentes elementos e comprimentos de onda foram selecionados para análise de ICP-OES. A razão entre metal e proteína foi determinada dividindo a concentração de metal pela concentração de proteína. O ensaio de proteína BCA Pierce™ foi usado para avaliar a concentração de proteína seguindo as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

[350] Adicionando íon metálico $Co^{2+}$ ou $Ni^{2+}$ a N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) resultou em boa remoção de $Mn^{2+}$ e incorporação de $Co^{2+}$ ou $Ni^{2+}$.

[351] Verificou-se que a enzima substituída por cobalto (N-ABD094-rhArg-$Co^{2+}$) mostrou $K_m$ muito menor (0,27 a 0,35 mM), $k_{cat}$ maior (250 a 316 $s^{-1}$) e eficiência catalítica maior $k_{cat}/K_m$ (905 a 917 $s^{-1}$ $mM^{-1}$). Para a enzima original (N-ABD094-rhArg-$Mn^{2+}$), a mesma apresenta $K_m$ de 1,37 a 1,89 mM, $k_{cat}$ de 82 a 98 $s^{-1}$ e $k_{cat}/K_m$ de 44 a 72 $s^{-1}$ $mM^{-1}$. O método de substituição de metal substituiu com sucesso $Mn^{2+}$ por $Co^{2+}$, levando a uma razão entre $Co^{2+}$ saturado e proteína de aproximadamente 2 a 4 e 1. Os dados sugerem que uma forma mais potente de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) ou outras proteínas de fusão aqui descritas podem ser fabricadas por substituição com outros íons de metal divalente (por exemplo, $Ni^{2+}$ ou $Co^{2+}$).

**EXEMPLO 33: TRATAMENTO COM N-ABD094-rhArg-$Co^{2+}$ [SEQ ID NO: 50 (SUBSTITUÍDO POR COBALTO)] REDUZ OBESIDADE**

[352] A produção de N-ABD094-rhArg-$Co^{2+}$ [SEQ ID NO: 50 (substituído por cobalto)] é descrita no Exemplo 32. Camundongos machos C57BL/6J com obesidade induzida por dieta pré-existente (DIO) receberam injeção i.p. de 25-100U N-ABD094-rhArg-$Co^{2+}$ [SEQ ID NO: 50 (substituído por cobalto)] por 5 semanas, enquanto é alimentado continuamente com um HFD. O peso corporal dos camundongos foi reduzido gradualmente de 55 g para 30 g dentro de 5

semanas de tratamento (Figura 62), similar ao efeito de 600-700U N-ABD094-rhArg (Figura 37). Esse resultado suporta que a substituição de $Mn^{2+}$ por $Co^{2+}$ aumenta significativamente a potência da proteína de fusão ABD-rhArg na redução do peso corporal.

**EXEMPLO 34: ENSAIO DE CULTURA E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

[353] Linhas de células cancerosas (por exemplo, MKN45, AGS, BGC823, HCT-15 e HCT-116) foram mantidas em meio RPMI com FBS a 10% e 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina por protocolo padrão.

[354] Para o ensaio de proliferação celular, células cancerosas ($5 \times 10^3$) em um volume de 100 µl de meio de crescimento foram semeadas em cada poço de uma placa de 96 poços e incubadas por 24 h. O meio de cultura foi reabastecido por meio livre de arginina (AFM) suplementado com diferentes concentrações de arginina, meio fresco contendo várias concentrações de diferentes enzimas de depleção de arginina, bem como usando essas enzimas em combinação com citrulina. A placa foi incubada por 1 a 3 dias adicionais a 37 °C em uma incubadora contendo uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de $CO_2$.

[355] Os ensaios quantitativos de proliferação celular foram realizados com o uso de ensaios de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) como amplamente descrito em outro lugar. A quantidade de enzima de depleção de arginina necessária para matar 50% das células em uma cultura foi definida como $IC_{50}$.

**EXEMPLO 35: INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE VÁRIAS LINHAS DE CÉLULAS DE CÂNCER HUMANO POR VÁRIAS ENZIMAS DEPLETORAS DE ARGININA (ADI, BCA E ADC)**

[356] As citotoxicidades de arginina desiminase (ADI), arginase bacteriana (BCA) e arginina descarboxilase (ADC) foram determinadas em um estudo comparativo em cinco linhas de células tumorais: A375, HeLa, BxPC-3, PANC-1 e HCT116.

[357] Como as reações catalisadas por ADI e BCA são etapas do ciclo da ureia, os efeitos antitumorais de ADI e BCA estão relacionados ao nível de ASS celular. Em contrapartida, o efeito antitumoral do ADC pode ser relativamente menos afetado pela presença de ASS, já que nenhum dos produtos catalíticos do ADC são intermediários do ciclo da ureia. Nossos resultados demonstraram que ADI, BCA e ADC exercem todos efeitos inibitórios nas linhagens celulares estudadas. ADI é eficaz contra A375, HCT116, BxPC-3, PANC-1, mas não células HeLa, enquanto BCA e ADC são eficazes contra todas essas cinco linhagens de células cancerosas testadas (**Tabela 6**). ADC é a enzima de depleção de arginina menos potente, mas é vantajosa sobre ADI e BCA em termos de eficácia, especialmente em células cancerosas ASS-positivas (**Tabela 6**).

[358] A sensibilidade das células tumorais a ADI exibe uma relação clara com o nível de ASS celular (**Tabela 6**). Tomados em conjunto, ADC e BCA podem inibir a proliferação de linhas de células cancerosas humanas de uma maneira independente de ASS em comparação com ADI.

[359] **Tabela 6**. $IC_{50}$ e citotoxicidade máxima de ADI, BCA e ADC em cinco linhas de células de câncer humano. As células foram tratadas por 72 h antes da análise de MTT. Os dados são a média de três experiências realizadas em triplicado. O valor de $IC_{50}$ é definido como a quantidade de enzima necessária para atingir 50% de inibição da viabilidade celular. A citotoxicidade máxima é expressa como a porcentagem máxima de células não viáveis alcançada por cada enzima. As células resistentes a ADI são definidas como células das quais mais de 50% sobrevivem com a dose máxima de ADI testada.

**TABELA 6**.

| **Tipo de Câncer** | **Linha de Células** | **Nível de Proteína ASS** | **$IC_{50}$ (µg/ml)** | | | **Citotoxidade máxima (%)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | **ADI** | **BCA** | **ADC** | **ADI** | **BCA** | **ADC** |
| Melanoma | A375 | Indetectável, indutível | 0,03 | 0,12 | 5,61 | 93,92 | 86,92 | 84,76 |

| Tipo de Câncer | Linha de Células | Nível de Proteína ASS | $IC_{50}$ (µg/ml) | | | Citotoxidade máxima (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ADI | BCA | ADC | ADI | BCA | ADC |
| Colorretal | HCT116 | Baixa | 0,10 | 0,22 | 12,23 | 72,18 | 81,05 | 84,35 |
| Pancreático | BxPC-3 | Médio | 0,09 | 0,44 | 16,85 | 57,53 | 84,82 | 93,16 |
| | PANC-1 | Baixo/médio, indutível | 0,04 | 1,81 | 4,65 | 55,68 | 63,01 | 82,98 |
| Cervical | HeLa | Baixo/alto, indutível | Resistente | 1,25 | 3,82 | <50 | 61,14 | 86,49 |

**EXEMPLO 36: CITOTOXICIDADE DE BHA (SEQ ID NO: 75) EM CÉLULAS CANCEROSAS GÁSTRICAS**

[360] A eficácia *in vitro* da arginase BHA de ligação à albumina (SEQ ID NO: 75) foi testado incubando a linha celular de câncer gástrico MKN45 com várias concentrações de BHA (SEQ ID NO: 75) por 72 h e pela determinação da viabilidade de MKN45 pelo ensaio MTT. Conforme mostrado na Figura 63, o crescimento de células cancerosas MKN45 foi inibido por BHA (SEQ ID NO: 75) de uma maneira dependente da dose. Isso confirmou ainda a citotoxicidade da proteína de fusão depletora de arginina em condições de cultura em que o meio foi suplementado com soro bovino fetal (FBS) e, incluindo albumina, bem como outras proteínas diferentes.

**EXEMPLO 37: AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR ANEXINA V-FITC E MANCHAMENTO DUPLO DE PI**

[361] Para avaliar a indução de apoptose pelo BCA arginase (SEQ ID NO: 71), 3 x $10^5$ as células foram semeadas em placas de 6 poços um dia antes de diferentes condições de tratamento. O meio foi retirado e reabastecido com meio completo suplementado com diferentes concentrações de BCA (SEQ ID NO: 71). Após exposição ao BCA por 24 h, 48 h e 72 h, tanto as células flutuantes quanto as aderentes foram coletadas. Resumidamente, as células flutuantes em meio de cultura foram coletadas por centrifugação a 100 x g por 3 min à temperatura

ambiente enquanto as células aderentes foram lavadas com PBS e removidas por incubação com solução de tripsina a 0,25% por 3 min a 37 °C. Após adição de meio completo, as células foram coletadas por centrifugação. As células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 0,1 ml de tampão de ligação (HEPES 0,01 M, pH 7,4; NaCl 0,14 M; $CaCl_2$ 2,5 mM) contendo iodeto de propídio (PI) e anexina V-FITC. As células foram coradas no escuro em temperatura ambiente por 15 min e 0,4 ml de tampão de ligação foram adicionados a cada tubo antes da análise de citometria de fluxo usando FACSAria (BD biociências). O citômetro foi configurado para adquirir os dados de 10.000 células para cada amostra e os dados foram analisados pelo software FACSAria.

[362] De acordo com os resultados da citometria de fluxo, a apoptose foi induzida em células de câncer de cólon humano HCT116 de uma maneira dependente do tempo após tratamento com BCA (SEQ ID NO: 71) (50 µg/ml de BCA). Em 24, 48 e 72 h após o tratamento com BCA, ~16%, 21% e 25% das células cancerosas HCT116 sofreram apoptose, respectivamente.

**EXEMPLO 38: ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E EFEITOS DE FÁRMACOS DE COMBINAÇÃO**

[363] Linhas de células de câncer de mama (por exemplo, células humanas MCF-7 e MDA-MB-231) foram usadas nesses estudos. As células cancerosas (5 x $10^3$ células) foram semeadas em placas de 96 poços (TPP) com 100 µl de meio completo. As placas foram incubadas na incubadora de um dia para o outro e as células foram deixadas aderir às placas. A His-rhArg arginase (SEQ ID NO: 101) (de 2 U/ml a 0,0032 U/ml) e a cloroquina inibidora de autofagia (CQ, de 100 µM a 0,16 µM) foram, então, adicionados à placa de 96 poços. Para o grupo de combinação de fármacos, His-rhArg (SEQ ID NO: 101) (de 2 U/ml a 0,0032 U/ml) foram adicionados com CQ 20 µM (método de razão não constante) aos poços. Cada dosagem foi triplicada em 3 poços para obter a alteração média da viabilidade celular. Após a incubação de 68 h, 10 µl de 5 mg/ml de solução de

TT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] foi adicionado. As placas foram colocadas de volta na incubadora e posteriormente incubadas por 4 h. Para dissolver o composto insolúvel, formazan, formado por MTT, foram adicionados 100 µl de SDS a 10% em HCl 0,01 M. As placas foram incubadas a 37 °C de um dia para o outro. A mudança de cor foi medida por espectrofotômetro a 570 nm. A configuração de controle (sem qualquer fármaco) foi usada como base para calcular a porcentagem de viabilidade celular que foi usada para traçar a curva de resposta à dose pelo software Prism 6.0 (GraphPad) para encontrar os valores de $IC_{50}$. Os efeitos de interação ou combinação entre His-rhArg (SEQ ID NO: 101) e CQ podem ser calculados por índice de combinação (CI). O software CalcuSyn (Biosoft) foi usado para calcular os valores CI.

[364] As células cancerosas MCF-7 foram sensíveis à privação de arginina pela arginase por 72 h (**Tabela 7**). CQ também mostrou seus efeitos citotóxicos em MCF-7 (**Tabela 8**). Para o grupo de combinação de fármacos, houve efeitos sinérgicos (CI <1) entre His-rhArg (SEQ ID NO: 101) e CQ (**Tabela 9**). A **Tabela 10** mostra o $IC_{50}$ de His-rhArg (SEQ ID NO: 101), CQ e rhArg mais CQ contra as células cancerosas MCF-7.

**TABELA 7. Porcentagem de viabilidade celular das células cancerosas MCF-7 após o tratamento com His-rhArg (SEQ ID NO: 101)**

| **Concentração de His-rhArg (U/ml)** | **Média de Viabilidade Celular Percentual (n = 6)** | **SEM** |
|---|---|---|
| 2 | 45,29% | 0,80% |
| 0,4 | 48,75% | 0,99% |
| 0,08 | 70,68% | 1,69% |
| 0,016 | 88,99% | 1,64% |
| 0,0032 | 80,88% | 2,40% |
| 0 | 100,00% | 1,44% |

**TABELA 8. PORCENTAGEM DE VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CANCEROSAS MCF-7 APÓS O TRATAMENTO COM CQ**

| Concentração de CQ (μM) | Média de Viabilidade Celular Percentual (n = 6) | SEM |
|---|---|---|
| 100 | 40,73% | 2,33% |
| 20 | 72,41% | 1,76% |
| 4 | 83,34% | 0,69% |
| 0,8 | 85,88% | 3,03% |
| 0,16 | 96,33% | 0,91% |
| 0 | 100,00% | 0,87% |

**TABELA 9. Índice de combinação (CI) e a porcentagem de viabilidade celular de combinação de His-rhArg (SEQ ID NO: 101) E CQ CONTRA AS CÉLULAS MCF-7**

| Concentração de His-rhArg (U/ml) | Concentração de CQ (μM) | Média de Viabilidade Celular Percentual (n = 6) | SEM | CI |
|---|---|---|---|---|
| 2 | 20 | 35,98% | 0,37% | 0,463 |
| 0,4 | 20 | 37,34% | 0,51% | 0,190 |
| 0,08 | 20 | 45,90% | 0,70% | 0,253 |
| 0,016 | 20 | 59,78% | 1,32% | 0,669 |
| 0,0032 | 20 | 69,27% | 0,98% | 1,440 |
| 0 | 0 | 100,00% | 1,44% | |

[365] **TABELA 10. $IC_{50}$ DE HIS-RHARG (SEQ ID NO: 101), CQ E COMBINANDO HIS-rhArg (SEQ ID NO: 101) E CQ CONTRA AS CÉLULAS CANCEROSAS MCF-7**

| **MCF-7** | **$IC_{50}$** | **SEM** |
|---|---|---|
| His-rhArg | 0,7869 U/ml | 0,0760 U/ml |
| CQ | 67,16 µM | 10,72 µM |
| His-rhArg + CQ | 0,07617 U/ml | 0,00576 U/ml |

[366] Os dados experimentais mostraram que as células de câncer de mama MDA-MB-231 eram sensíveis à privação de arginina por His-rhArg (SEQ ID NO: 101) e CQ (**Tabelas 11 e 12**). Combinação de His-rhArg (SEQ ID NO: 101) e CQ também mostrou citotoxicidade sinérgica nas células MDA-MB-231. O valor CI era menor que 1 (**Tabela 13**). A **Tabela 14** mostra o $IC_{50}$ de His-rhArg (SEQ ID NO: 101), CQ e His-rhArg (SEQ ID NO: 101) mais CQ contra as células de câncer de mama MDA-MB-231.

**TABELA 11. Porcentagem de viabilidade celular de HIS-rhArg (SEQ ID NO: 101) CONTRA AS CÉLULAS MDA-MB-231**

| **Concentração de His-rhArg (U/ml)** | **Média de Viabilidade Celular Percentual (n = 3)** | **SEM** |
|---|---|---|
| 2 | 49,10% | 1,67% |
| 0,4 | 50,24% | 0,33% |
| 0,08 | 70,87% | 1,39% |
| 0,016 | 79,26% | 7,62% |
| 0,0032 | 93,70% | 2,62% |
| 0 | 100,00% | 1,47% |

**TABELA 12. PORCENTAGEM DE VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS MDA-MB-231 APÓS INCUBADAS COM CQ POR 72 H**

| **Concentração de CQ (µM)** | **Média de Viabilidade Celular Percentual (n = 3)** | **SEM** |
|---|---|---|
| 100 | 43,17% | 0,97% |
| 20 | 75,18% | 1,50% |

| Concentração de CQ (µM) | Média de Viabilidade Celular Percentual (n = 3) | SEM |
|---|---|---|
| 4 | 82,16% | 0,49% |
| 0,8 | 98,14% | 1,38% |
| 0,16 | 99,03% | 1,67% |
| 0 | 100,00% | 3,53% |

**TABELA 13. Índice de combinação (CI) e a porcentagem de viabilidade celular de combinação de His-rhArg (SEQ ID NO: 101) E CQ CONTRA AS CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231.**

| Concentração de His-rhArg (U/ml) | Concentração de CQ (µM) | Média de Viabilidade Celular Percentual (n = 3) | SEM | CI |
|---|---|---|---|---|
| 2 | 20 | 44,55% | 1,88 % | 1,697 |
| 0,4 | 20 | 45,92% | 0,65 % | 0,584 |
| 0,08 | 20 | 55,33% | 1,42 % | 0,568 |
| 0,016 | 20 | 61,59% | 2,68 % | 0,623 |
| 0,0032 | 20 | 46,62% | 0,60 % | 0,263 |
| 0 | 0 | 100,00% | 3,92 % | |

**TABELA 14. $IC_{50}$ DE HIS-rhArg (SEQ ID NO: 101), CQ E COMBINANDO HIS-RHARG (SEQ ID NO: 101) E CQ CONTRA AS CÉLULAS MDA-MB-231**

| MDA-MB-231 | $IC_{50}$ | SEM |
|---|---|---|
| His-rhArg | 0,9522 U/ml | 0,1299 U/ml |
| CQ | 73,39 µM | 5,36 µM |

| **MDA-MB-231** | **$IC_{50}$** | **SEM** |
|---|---|---|
| His-rhArg + CQ | 0,1408 U/ml | 0,0274 U/ml |

[367] Também testamos a combinação de drogas de His-rhArg (SEQ ID NO: 101) (0,016, 0,08 ou 0,4 U/ml) e CQ (20 µM) em uma linha de células de câncer de fígado humano “Red Flu HepG2”. Efeitos sinérgicos (valores de IC menores que 1) também foram observados.

**EXEMPLO 39: ENSAIO DE MIGRAÇÃO TRANSWELL E ENSAIO DE INVASÃO**

[368] Linhas de células de câncer de mama (células humanas MDA-MB-231 e células 4T1 de camundongo) foram usadas nesses estudos. Tanto o ensaio de migração quanto o ensaio de invasão foram realizados em sistema Transwell Costar (Corning) de 24 poços (inserções de membrana de policarbonato, tamanho de poro de 8,0 µm). Antes do ensaio, as células foram cultivadas em meio livre de soro apropriado por pelo menos 24 horas. Um dia antes da semeadura das células nas câmaras superiores, 100 µl de matrigel diluído foram adicionados às câmaras superiores das inserções para o ensaio de invasão. Meio sem soro (100 µl) foi adicionado à câmara superior usada para o ensaio de migração. As placas de 24 poços foram incubadas na incubadora de um dia para o outro. No dia seguinte, as células foram tripsinizadas e contadas. Nos estudos, $3 \times 10^4$ células de 4T1 ou $5 \times 10^4$ células de MDA-MB-231, com 200 µl de meio livre de soro apropriado, foram semeadas nas câmaras superiores. Meio completo apropriado (750 µl) foi adicionado às câmaras inferiores. Para o grupo de tratamento com fármacos, 1 U/ml de His-rhArg (SEQ ID NO: 101) foi adicionado a ambas as câmaras. As placas de 24 poços foram incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada com $CO_2$ a 5% por 20 h (células 4T1) ou 24 h (células MDA-MB-231).

[369] Após a incubação, o meio nas câmaras superiores foi removido. As inserções Transwell foram lavadas com 1x PBS duas vezes. Metanol 100% frio

foi adicionado a ambas as câmaras superiores e inferiores por 10 min para fixar as células. As inserções foram lavadas com 1x PBS por duas vezes. Depois disso, violeta de cristal a 1% em 1x PBS foi adicionado a ambas as câmaras por 15 min para manchar as células. As inserções foram lavadas com 1x PBS duas vezes. As células da superfície da câmara superior foram removidas com bastonete de algodão. As inserções foram secas ao ar de um dia para o outro. As fotos foram tiradas por microscópio confocal. Os resultados mostraram que o número de células cancerosas que podem migrar e invadir através das inserções transwell diminuiu quando as células foram tratadas com 1 U/ml de His-rhArg (SEQ ID NO: 101), indicando que a depleção de arginina pela arginase pode inibir a migração e invasão de células cancerosas.

**EXEMPLO 40: N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) INIBE O CRESCIMENTO E METÁSTASE DE CÉLULAS AGRESSIVAS DO CÂNCER DE MAMA *IN VIVO***

[370] Para os estudos de modelo de xenoenxerto de células de câncer de mama 4T1 agressivos, foram usados 10 camundongos nus fêmeas (11 a 12 semanas de idade). Os mesmos foram mantidos em grupos de cinco por gaiola e receberam comida e água *ad libitum*. As células cancerosas 4T1 foram colhidas por tripsinização e lavadas duas vezes com 1X PBS e ressuspensas em 1X PBS para inoculação. As células cancerosas (1 x $10^6$ células de 4T1) foram injetadas por via subcutânea no flanco esquerdo dos camundongos. Os camundongos foram separados em dois grupos aleatoriamente quando o tumor tinha um comprimento médio de 6 mm após 3 dias de inoculação. Eles foram injetados com 500U (3,2 mg, 230 µl) N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) ou 1X PBS uma vez por semana. Amostras de sangue foram coletadas da veia safena. O tamanho do tumor e o peso corporal dos camundongos foram monitorados regularmente. O volume do tumor foi estimado pela seguinte equação:

$$\text{Volume de tumor } (mm^3) = \frac{comprimento\ x\ largura^2}{2}$$

[371] Os camundongos foram sacrificados após 16 dias de inoculação de

células cancerosas (ou seja, 13 dias após o início do experimento) por causa da necrose do tumor no grupo de controle injetado com PBS. Após serem sacrificados, os tumores foram coletados dos camundongos e o peso do tumor foi medido. Os pulmões também foram coletados e lavados com 1X PBS. Os pulmões foram fixados em solução de Bouin de um dia para o outro e lavados com 1X PBS após a fixação. Nódulos metastáticos pulmonares foram contados.

[372] É importante ressaltar que 500U da arginase de ligação à albumina N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) arginina esgotada a um nível abaixo do limite de detecção do Analisador de Aminoácidos Biochrom 30 (3 μM) por pelo menos 10 dias em camundongos BALB/c (Figura 10). Portanto, 500 U de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) foi administrado via injeção i.p. uma vez por semana em camundongos nus de xenoenxerto de câncer de mama 4T1 para estudo de eficácia. A **Tabela 15** mostra que 500 U de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) esgotou a arginina a um nível não detectado durante o experimento.

**TABELA 15. Níveis de ARGININA SÉRICA DO GRUPO TRATADO COM N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) DE CAMUNDONGOS (CAMUNDONGO 1-4). OS NÍVEIS FORAM MEDIDOS COM O USO DO ANALISADOR DE AMINOÁCIDOS BIOCHROM 30. BDL: ABAIXO DO NÍVEL DE DETECÇÃO; DIA 0: ANTES DO TRATAMENTO**

| | **Dia 0** | **Dia 6** | **Dia 13** |
|---|---|---|---|
| | Concentração de Arginina (μM) | Concentração de Arginina (μM) | Concentração de Arginina (μM) |
| 1 | 132,5 | 0 (BDL) | 0 (BDL) |
| 2 | 117,0 | 0 (BDL) | 0 (BDL) |
| 3 | 130,5 | 0 (BDL) | 0 (BDL) |
| 4 | 122,5 | 0 (BDL) | 0 (BDL) |

[373] As Figuras 64 a 67 mostram que 500U de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) pode inibir o crescimento de xenoenxerto de câncer de mama 4T1 em

camundongos nus. Houve diferença significativa no volume estimado do tumor entre o grupo de controle e o grupo experimental 12 dias e 13 dias após o início do experimento (Figuras 64 e 65). Também houve diferenças proeminentes no tamanho do tumor entre os dois grupos (Figuras 66 e 67).

[374] Estes resultados sugeriram que a depleção de arginina com o uso de 500U de N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) injetado uma vez por semana pode inibir significativamente o crescimento de xenoenxerto de câncer de mama agressivo 4T1 em camundongos nus. O estudo *in vivo* mostrou que N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) pode inibir o crescimento do câncer em camundongos nus de maneira segura e eficiente.

[375] Além disso, constatou-se que a fome de arginina pode inibir a metástase de células de câncer de mama 4T1, o que foi consistente com os presentes resultados *in vitro*. Os pulmões dos camundongos do grupo de tratamento foram coletados e examinados cuidadosamente em busca de sinais de metástase após os camundongos serem sacrificados. Três nódulos metastáticos pulmonares foram encontrados em três pulmões diferentes do grupo controle; ao passo que não houve nódulos metastáticos encontrados no grupo tratado com N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) (**Tabela 16**). Os resultados mostraram de forma convincente que a fome de arginina por N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) pode inibir a metástase tumoral. Isso sugeriu que a arginina pode desempenhar um papel importante na migração celular e metástase tumoral. Depleção de arginina por N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) pode inibir algumas vias que são importantes para a metástase de células cancerosas (Knott et al., 2018, Nature, 554:378 a 381).

**TABELA 16. NÚMERO DE NÓDULOS METASTÁTICOS EM ESTUDOS ANIMAIS.**

| Grupo | Número de nódulos metastáticos encontrados em pulmões | % de animais livres de metástase |
|---|---|---|
| Controle de PBS (n = 6) | 3 | 50% |
| 500 U de N-ABD-rhArg (n = 4) | 0 | 100% |

**EXEMPLO 41: CITOTOXICIDADE EM LINHAS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE CÓLON HUMANO COM A ENZIMA DE FUSÃO N-ABD094-RHARG (SEQ ID NO: 50)**

[376] A eficácia *in vitro* da proteína de fusão ABD e rhArg foi testada em linhas de células de câncer de cólon humano. Linhas de células de câncer de cólon humano (HCT116, LOVO e HT29) foram semeadas em placas de 96 poços em densidades de $5x10^3$ células/poço. Após 1 dia de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo diferentes concentrações (2, 0,4, 0,08, 0,016 e 0,0032 U/ml) de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50). O ensaio de MTT foi conduzido no Dia 3 [3 dias após o tratamento com N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)] para determinar os valores $IC_{50}$. O meio de cultura foi substituído por solução MTT (1 mg/ml) (Invitrogen) e incubado a 37 °C por 4 h. Após a incubação, a solução de MTT foi substituída por dimetilsulfóxido (DMSO), e a absorbância a 570 nm foi medida com uma referência de 650 nm. A viabilidade celular foi determinada dividindo a absorvância de células tratadas com N-ABD094-rhArg pela absorvância média de células não tratadas. Os valores de $IC_{50}$ de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) nas linhas de células cancerosas (com intervalo de confiança de 95%) foram analisadas pelo software Prism 6.0. Três conjuntos independentes de experimentos (n = 3) foram realizados para cada linha celular. Os resultados são mostrados na **Tabela 17**.

**TABELA 17. Experimento de fármaco único com o uso de N-ABD094-rhArg**

**(SEQ ID NO: 50); FÁRMACO = N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50); LINHA DE CÉLULA = HCT116**

| Conc. de fármaco (U/ml) | 0 | 0,0032 | 0,016 | 0,08 | 0,4 | 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 0,938 | 0,950 | 0,608 | 0,452 | 0,419 |
| SEM | 0 | 0,042 | 0,116 | 0,086 | 0,051 | 0,046 |

[377] Linha de células = LOVO

| Conc. de fármaco (U/ml) | 0 | 0,0032 | 0,016 | 0,08 | 0,4 | 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 0,922 | 0,848 | 0,566 | 0,432 | 0,392 |
| SEM | 0 | 0,048 | 0,037 | 0,075 | 0,040 | 0,038 |

[378] Linha de célula = HT29

| Conc. de fármaco (U/ml) | 0 | 0,0032 | 0,016 | 0,08 | 0,4 | 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 0,962 | 0,853 | 0,521 | 0,423 | 0,383 |
| SEM | 0 | 0,070 | 0,084 | 0,016 | 0,009 | 0,029 |

[379] Todas as linhas de células de câncer de cólon testadas foram muito sensíveis à enzima de fusão N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) *in vitro* com valores $IC_{50}$ entre 0,22 e 0,58 U/ml. HCT116 foi o tumor mais sensível com um IC50 de 0,22 U/ml. Os valores de $IC_{50}$ para LOVO e HT29 foram 0,38 U/ml e 0,58 U/ml, respectivamente.

**EXEMPLO 42: COMBINAÇÃO DE N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) E A CLOROQUINA EXERCE EFEITOS SINÉRGICOS DE CITOTOXICIDADE EM LINHAS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE CÓLON HUMANO**

[380] Os valores de $IC_{50}$ da cloroquina inibidora de autofagia (CQ) foram

determinados da seguinte forma: as linhas de células de câncer de cólon HCT116, LOVO e HT29 foram semeadas separadamente e após 1 dia de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo diferentes concentrações de CQ (100, 20, 4, 0,8, 0,16 μM). O ensaio de MTT foi conduzido no Dia 3. Três conjuntos independentes de experimentos (n = 3) foram realizados para cada linha celular. Os resultados são mostrados na **Tabela 18**.

**TABELA 18. EXPERIÊNCIA DE FÁRMACO ÚNICO COM O USO DE CQ; FÁRMACO = CLOROQUINA (CQ); LINHA DE CÉLULAS = HCT116**

| Conc. de fármaco (U/ml) | 0 | 0,16 | 0,8 | 4 | 20 | 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 0,981 | 0,967 | 0,921 | 0,897 | 0,874 |
| SEM | 0 | 0,032 | 0,037 | 0,059 | 0,033 | 0,027 |

[381] Linha de células = LOVO

| Conc. de fármaco (U/ml) | 0 | 0,16 | 0,8 | 4 | 20 | 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 0,973 | 0,921 | 0,759 | 0,495 | 0,060 |
| SEM | 0 | 0,029 | 0,017 | 0,027 | 0,018 | 0,002 |

[382] Linha de célula = HT29

| Conc. de fármaco (U/ml) | 0 | 0,16 | 0,8 | 4 | 20 | 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 1,057 | 1,009 | 0,983 | 1,018 | 0,037 |
| SEM | 0 | 0,079 | 0,071 | 0,083 | 0,073 | 0,006 |

[383] Os valores de $IC_{50}$ de CQ para HCT116, LOVO e HT29 foram >100 μM, 15 μM e 71 μM, respectivamente. Para o ensaio de combinação de fármacos, foi realizada uma análise de razão não constante (Hastak et al., 2010, Cancer Res.

70(20):7970-7980). As células de câncer de cólon foram semeadas e após 1 dia de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo diferentes concentrações de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 U/ml) combinado com uma quantidade fixa de CQ de acordo com seu $IC_{50}$. O ensaio de MTT foi conduzido no Dia 3. O índice de combinação (CI) de N-ABD094-rhArg combinado (SEQ ID NO: 50) e o tratamento de CQ foi analisado pelo software CalcuSyn versão 2.1. Três conjuntos independentes de experimentos (n = 3) foram realizados para cada linha celular. Os resultados são mostrados na **Tabela 19**.

**TABELA 19. Experimento de fármaco de cOMBINAÇÃO (FÁRMACO 1 MAIS FÁRMACO 2); FÁRMACO 1 = N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50); FÁRMACO 2 = CLOROQUINA (CQ) (CONCENTRAÇÃO FIXA A 20 μM); LINHA DE CÉLULAS = HCT116**

| Conc. de Fármaco 1 (U/ml) | 0 | 0,0032 | 0,016 | 0,08 | 0,4 | 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 0,951 | 0,885 | 0,476 | 0,273 | 0,231 |
| SEM | 0 | 0,024 | 0,027 | 0,008 | 0,008 | 0,006 |

[384] Linha de células = LOVO

| Conc. de Fármaco 1 (U/ml) | 0 | 0,0032 | 0,016 | 0,08 | 0,4 | 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 0,555 | 0,542 | 0,211 | 0,186 | 0,177 |
| SEM | 0 | 0,008 | 0,008 | 0,002 | 0,010 | 0,005 |

[385] Linha de célula = HT29

| Conc. de Fármaco 1 (U/ml) | 0 | 0,0032 | 0,016 | 0,08 | 0,4 | 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Viabilidade celular média (%) | 1 | 0,979 | 0,983 | 0,480 | 0,369 | 0,367 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SEM | 0 | 0,035 | 0,054 | 0,036 | 0,027 | 0,023 |

[386] Os resultados indicam que os valores de CI foram <1,0 quando 0,08 ou 0,4 U/ml de N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) foi combinado com 20 µM de CQ em todas as 3 linhas de células de câncer de cólon. Isso sugere que N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) é ativo sozinho e é sinérgico em combinação com CQ. Tomados em conjunto, a cloroquina inibidora de autofagia (CQ) aumenta o efeito de indução de morte celular da proteína de fusão N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) em células de câncer de cólon humano.

**EXEMPLO 43: N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) E HIS-rhArg PEGUILADO (SEQ ID NO: 101) AMBOS INIBEM O CRESCIMENTO E METÁSTASE DE CÉLULAS AGRESSIVAS DO CÂNCER DE MAMA *IN VIVO***

[387] Em outro estudo de aloenxerto de câncer de mama 4T1, camundongos nus fêmeas (5 a 6 semanas de idade) foram usados. Os mesmos foram mantidos em grupos de cinco por gaiola e receberam comida e água *ad libitum*. Células de câncer de mama 4T1 ($1 \times 10^5$) foram injetadas subcutaneamente no flanco direito dos camundongos. Os camundongos foram separados em quatro grupos aleatoriamente quando o tumor tinha um comprimento médio de 8 mm após 11 dias de inoculação. Havia um grupo de controle (n = 8) e três grupos experimentais, incluindo 500U de His-rhArg PEGuilado (SEQ ID NO: 101) (n = 8), 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) (n = 6) e 250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) (n = 8). Os camundongos do grupo de controle foram injetados com 1X PBS semanalmente. Para o grupo 500U ABD-rhArg e o grupo 250U ABD-rhArg, os camundongos foram injetados com 500U e 250U ABD-rhArg uma vez por semana, respectivamente; um grupo foi injetado com 500U PEG-rhArg uma vez por semana. Os camundongos foram sacrificados após 24 dias de inoculação (ou seja, 14 dias após o início de experimento) por causa da necrose do tumor em grupo de controle de PBS. Após o sacrifício, os camundongos foram dissecados. Os tumores foram coletados dos camundongos e seus pesos foram

medidos. Os pulmões também foram coletados e lavados com 1X PBS. Os pulmões foram fixados em solução de Bouin de um dia para o outro e lavados com 1X PBS após a fixação. Nódulos metastáticos pulmonares foram contados.

[388] Para os resultados, a Figura 68 mostra que tanto 500U de ABD-rhArg quanto 500U de PEG-rhArg inibiram significativamente o crescimento do tumor sólido 4T1 agressivo. No entanto, uma dose mais baixa de 250U ABD-rhArg não inibiu o crescimento do tumor. O resultado também correspondeu à alteração do peso do tumor em diferentes grupos (Figura 69). Portanto, ABD-rhArg inibiu o crescimento do tumor de uma maneira dependente da dose. É importante ressaltar que os dados mostraram claramente que a privação de arginina (por ABD-rhArg ou por PEG-rhArg) inibiu ou reduziu a metástase tumoral para os pulmões (Figuras 70A e 70B). Os nódulos de metástase dos pulmões em ambos os grupos 500U PEG-rhArg e 500U ABD-rhArg foram significativamente reduzidos em comparação com o grupo controle. Cortes histológicos de pulmão com coloração de hematoxilina e eosina (H&E) mostraram que os nódulos eram formados por uma série de células densas de câncer de mama. Os resultados sugeriram que os nódulos eram focos metastáticos. Tomados em conjunto, a depleção de arginina por arginase de longa ação inibe a metástase de células cancerosas agressivas no modelo de camundongo. Como a metástase do câncer é a principal causa de morte em pacientes (Knott et al., 2018, Nature, 554:378 a 381), essa constatação pode abrir novas possibilidades para uma terapia mais eficaz contra o câncer.

## REIVINDICAÇÕES

**1. PROTEÍNA DE FUSÃO caracterizada** pelo fato de que compreende um polipeptídeo de domínio de ligação de albumina (ABD) e um polipeptídeo de arginase.

**2. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 ou SEQ ID NO: 68.

**3. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72.

**4. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 ou SEQ ID NO: 68 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia com a SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72.

**5. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo fato de que o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 66 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 69.

**6. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um ligante peptídico conectando o terminal C do polipeptídeo ABD e o terminal N do polipeptídeo arginase, em que o ligante peptídico é um polipeptídeo linear que tem entre 1 a 20 aminoácidos.

**7. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o ligante peptídico compreende uma sequência polipeptídica com

pelo menos 90% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 73 ou SEQ ID NO: 74.

**8. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o polipeptídeo ABD compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 93% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 67 e o polipeptídeo de arginase compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 95% de homologia com a SEQ ID NO: 72.

**9. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o ligante peptídico é um ligante de poli-histidina que tem entre 4 a 8 aminoácidos de histidina.

**10. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de fusão compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 98% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 75 ou SEQ ID NO: 76.

**11. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de fusão compreende uma sequência polipeptídica com pelo menos 98% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 75 e SEQ ID NO: 76.

**12. PROTEÍNA DE FUSÃO**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de fusão compreende um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 75 e SEQ ID NO: 76.

**13. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA caracterizada** pelo fato de que compreende a proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, e um carreador, excipiente ou combinação dos mesmos farmaceuticamente aceitável.

**14. MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER EM UM INDIVÍDUO EM NECESSIDADE DO MESMO caracterizado** pelo fato de que compreende a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma

proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, ao indivíduo.

**15. MÉTODO DE TRATAMENTO DE PELO MENOS UMA AFECÇÃO SELECIONADA DO GRUPO QUE CONSISTE EM OBESIDADE, UM DISTÚRBIO METABÓLICO E UMA COMPLICAÇÃO RELACIONADA EM UM INDIVÍDUO EM NECESSIDADE DO MESMO caracterizado** pelo fato de que compreende a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma arginina agente de depleção ao indivíduo.

**16. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o distúrbio metabólico é selecionado do grupo que consiste em obesidade, intolerância à glicose, hiperglicemia, diabetes mellitus e a complicação relacionada é uma ou mais afecções selecionadas do grupo que consiste em nefropatia diabética, retinopatia diabética, vasculopatia diabética, neuropatia diabética, hipercolesterolemia, dislipidemia, esteatose, esteatohepatite, fibrose, cirrose, inflamação, hipertensão, doença cardiovascular e branqueamento da gordura marrom.

**17. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o distúrbio metabólico é resistência à insulina.

**18. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento da obesidade compreende pelo menos um dentre a prevenção do ganho de massa gorda e a redução da massa gorda.

**19. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o distúrbio metabólico é selecionado do grupo que consiste em esteatose hepática, esteatose renal, esteatose pancreática e esteatose cardíaca.

**20. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que a concentração de arginina no soro do indivíduo é mantida abaixo de 50 μM.

**21. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o agente de depleção de arginina é uma enzima catabólica de arginina.

**22. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que a enzima catabólica de arginina é uma proteína arginase, uma proteína arginina

desiminase ou uma proteína arginina descarboxilase.

**23. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a proteína arginase, proteína arginina desiminase ou proteína arginina descarboxilase compreende adicionalmente um ou mais grupos de polietilenoglicol (PEG).

**24. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a proteína arginase compreende um polipeptídeo que tem a SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 ou SEQ ID NO: 104.

**25. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a proteína arginase, proteína arginina desiminase ou proteína arginina descarboxilase compreende adicionalmente um domínio de ligação de albumina ou albumina de soro humano, ou um domínio Fc de IgG humana.

**26. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a enzima catabólica de arginina é uma proteína de fusão que compreende um polipeptídeo ABD e um polipeptídeo arginase; um polipeptídeo ABD e um polipeptídeo arginina desiminase; ou um polipeptídeo ABD e um polipeptídeo arginina descarboxilase.

**27. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que a enzima catabólica de arginina é a proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1.

**28. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que a enzima catabólica de arginina compreende um polipeptídeo com pelo menos 98% de homologia de sequência com a SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 75 ou SEQ ID NO: 76.

**29. MÉTODO DE TRATAMENTO DE PELO MENOS UMA AFECÇÃO SELECIONADA DO GRUPO QUE CONSISTE EM INFECÇÕES VIRAIS, ESCLEROSE MÚLTIPLA, ARTRITE REUMATOIDE, DOENÇAS AUTOIMUNES, HIPERARGININEMIA CONGÊNITA, DOENÇA DO ENXERTO**

**CONTRA HOSPEDEIRO (GVHD) E INFLAMAÇÃO EM UM INDIVÍDUO EM NECESSIDADE DISSO caracterizado** pelo fato de que compreende a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão, de acordo com a reivindicação1, ao indivíduo.

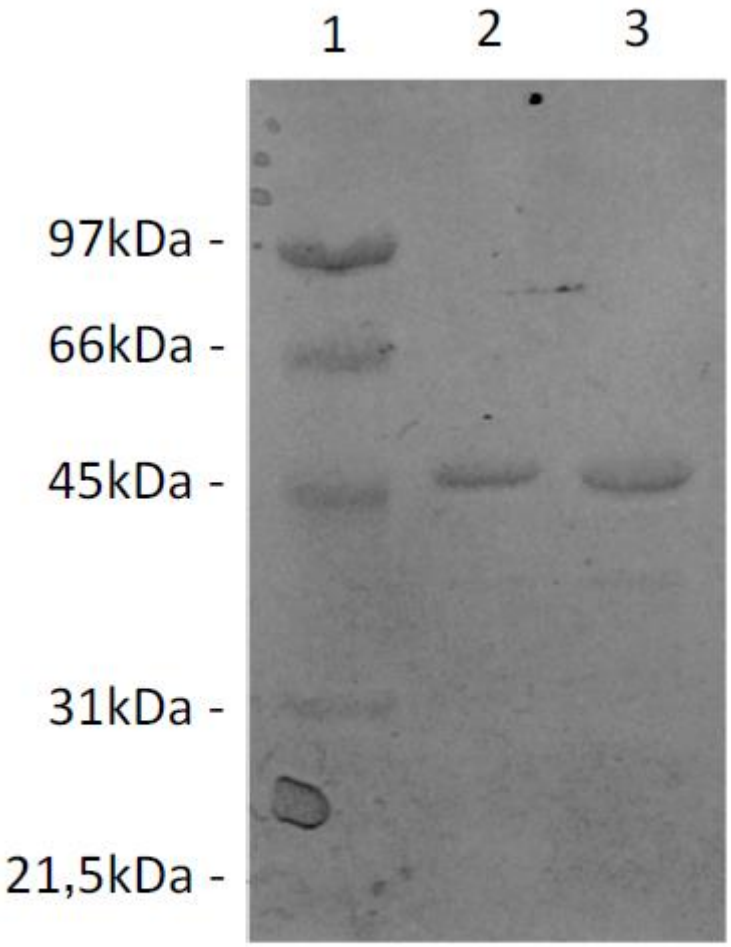



FIG. 1

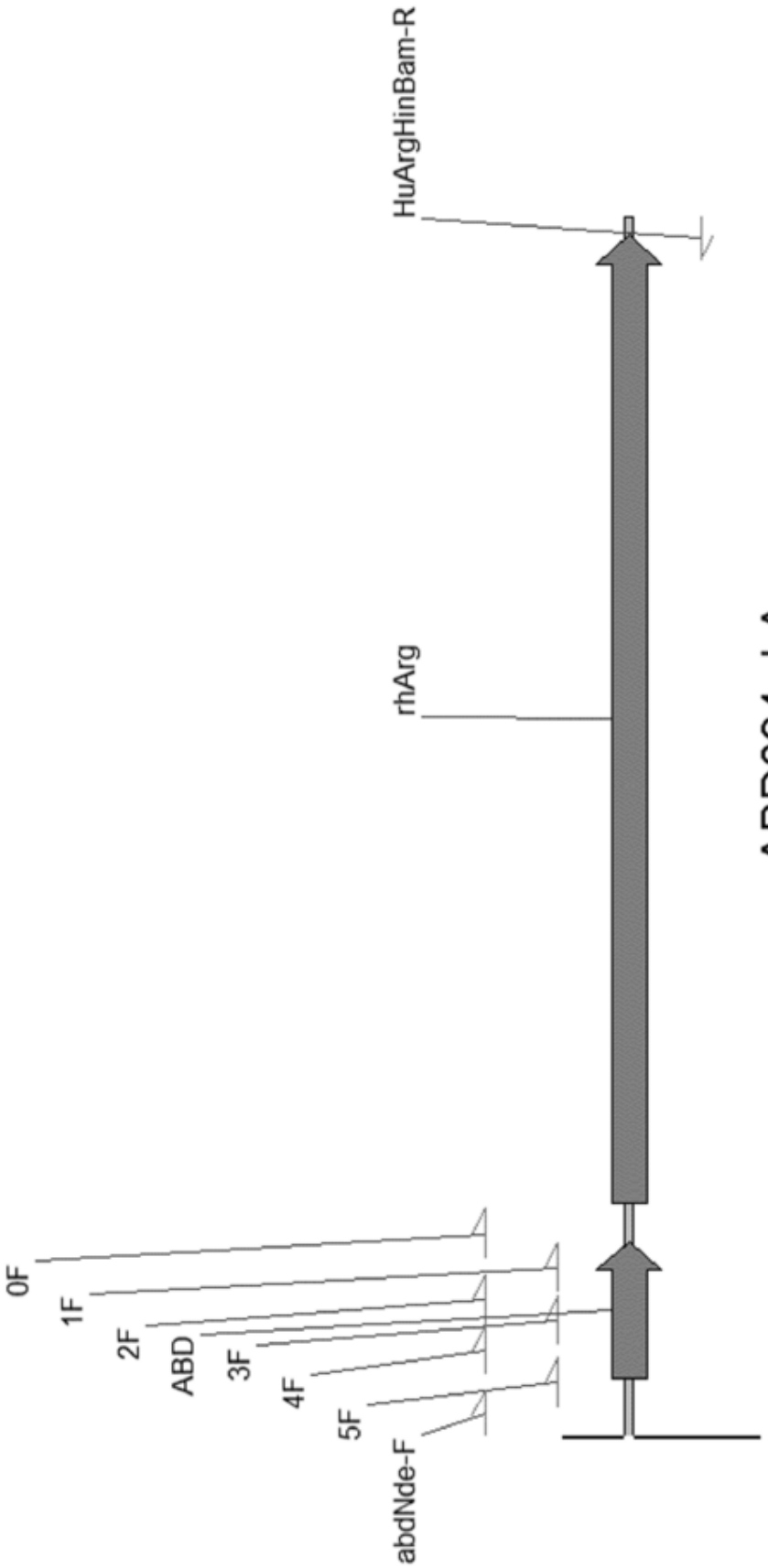

HuArgHinBam-R
rhArg
ABD094-rhArg
1220 bp
0F
1F
2F
ABD
3F
4F
5F
abdNde-F

FIG. 2A

```
        10         20         30         40         50         60
MHHHHHHDEA VDANSLAEAK EAANAELDSY GVSDFYKRLI DKAKTVEGVE ALKDAILAAL
        70         80         90        100        110        120
PSGSNNNNNN GSGGMSAKSR TIGIIGAPFS KGQPRGGVEE GPTVLRKAGL LEKLKEQECD
       130        140        150        160        170        180
VKDYGDLPFA DIPNDSPFQI VKNPRSVGKA SEQLAGKVAE VKKNGRISLV LGGDHSLAIG
       190        200        210        220        230        240
SISGHARVHP DLGVIWVDAH TDINTPLTTT SGNLHGQPVS FLLKELKGKI PDVPGFSWVT
       250        260        270        280        290        300
PCISAKDIVY IGLRDVDPGE HYILKTLGIK YFSMTEVDRL GIGKVMEETL SYLLGRKKRP
       310        320        330        340        350        360
IHLSFDVDGL DPSFTPATGT PVVGGLTYRE GLYITEEIYK TGLLSGLDIM EVNPSLGKTP
       370        380        390
EEVTRTVNTA VAITLACFGL AREGNHKPID YLNPPK
```

**FIG. 2B**

MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIW
YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG
EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
PVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
HHHHH

FIG. 3

```
BCA             MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
BHA             MKPISIIGVPMDLGQTRRGPDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
BAH             MKPISIIGVPMDLGQTRRGPDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
                ********************* ****************************************

BCA             GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIW
BHA             GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIW
BAH             GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIW
                ************************************************************

BCA             YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG
BHA             YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG
BAH             YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG
                ************************************************************

BCA             EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
BHA             EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
BAH             EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
                ************************************************************

BCA             PVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
BHA             PVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
BAH             PVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMA
                ************************************************************

BCA             HHHHH-----------------------------------------------------
BHA             HHHHHAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
BAH             QHDEAVDAN------SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
                :*..

BCA             --------
BHA             LP------
BAH             LPHHHHHH
```

**FIG. 4**

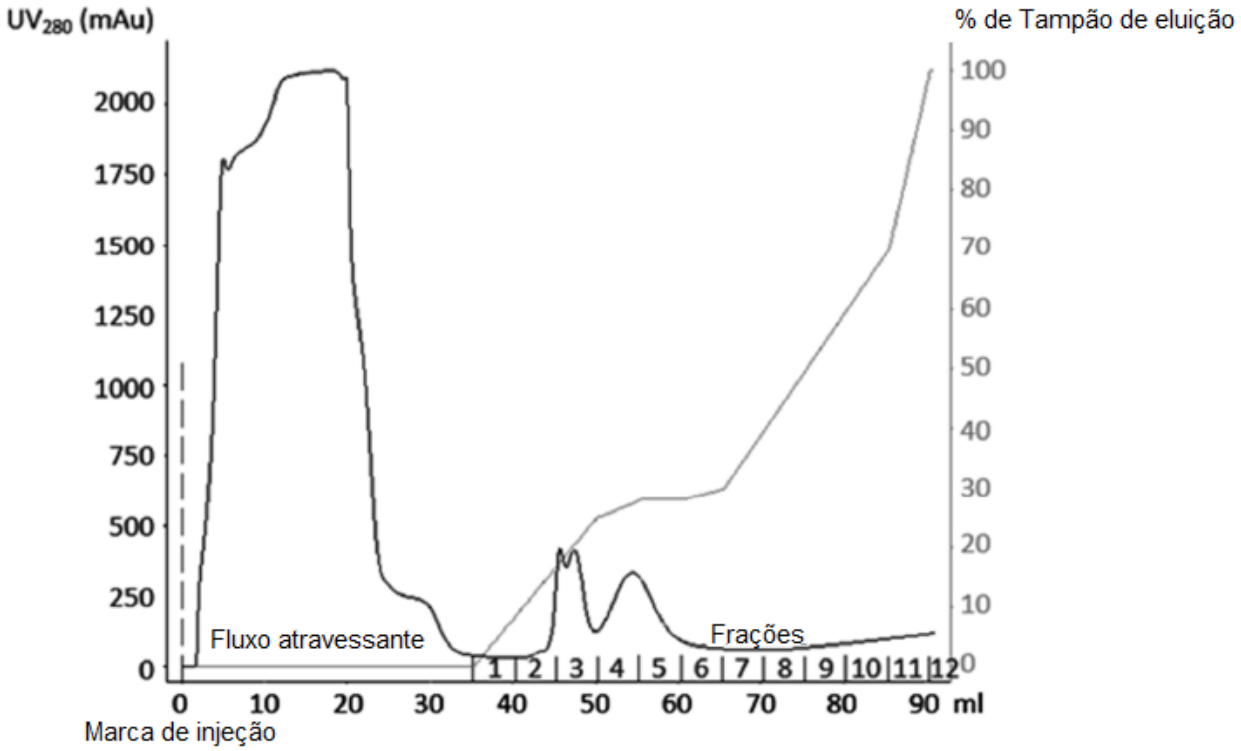

UV280 (mAu)
% de Tampão de eluição
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Fluxo atravessante
Frações
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 ml
Marca de injeção

**FIG. 5A**

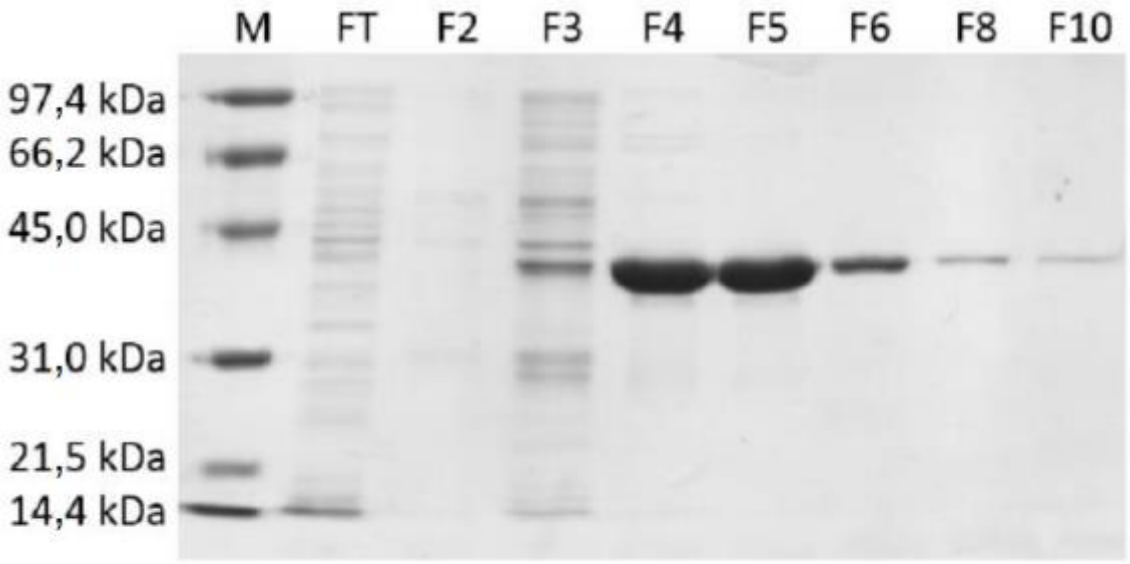

M
FT
F2
F3
F4
F5
F6
F8
F10
97,4 kDa
66,2 kDa
45,0 kDa
31,0 kDa
21,5 kDa
14,4 kDa

FIG. 5B

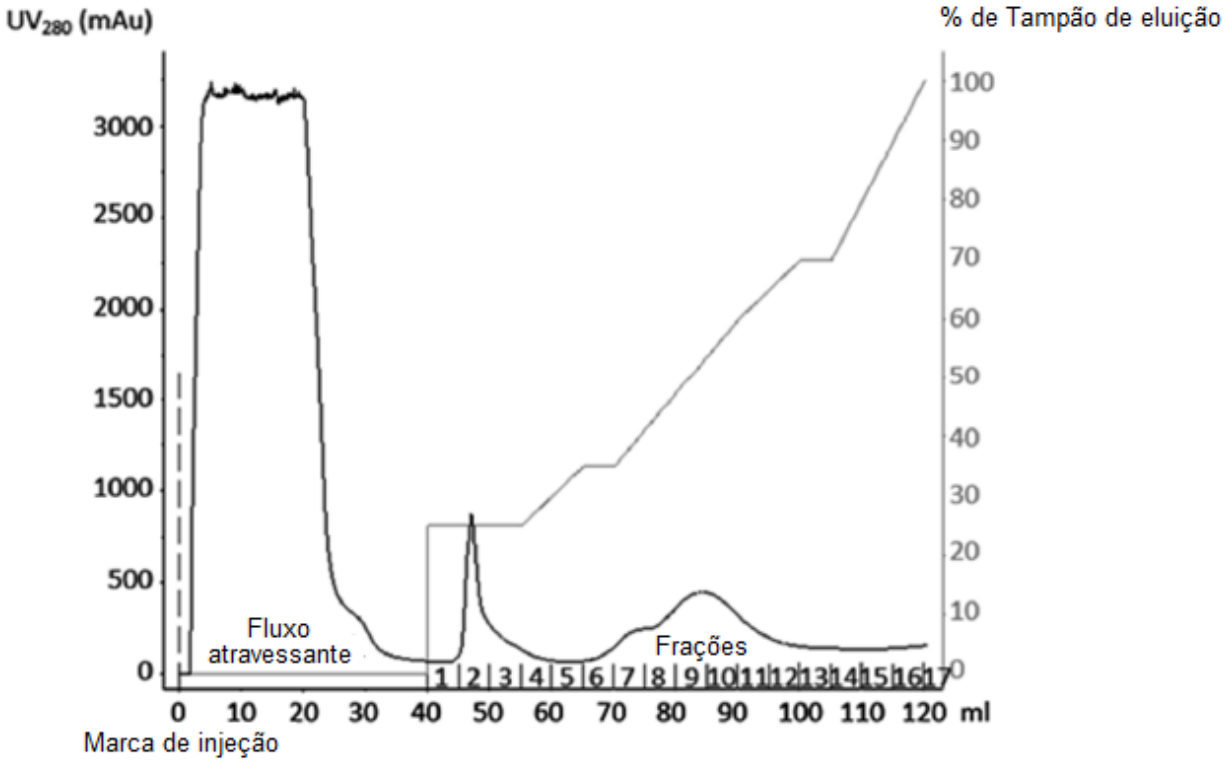

UV280 (mAu)
% de Tampão de eluição
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Fluxo atravessante
Frações
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 ml
Marca de injeção

**FIG. 5C**

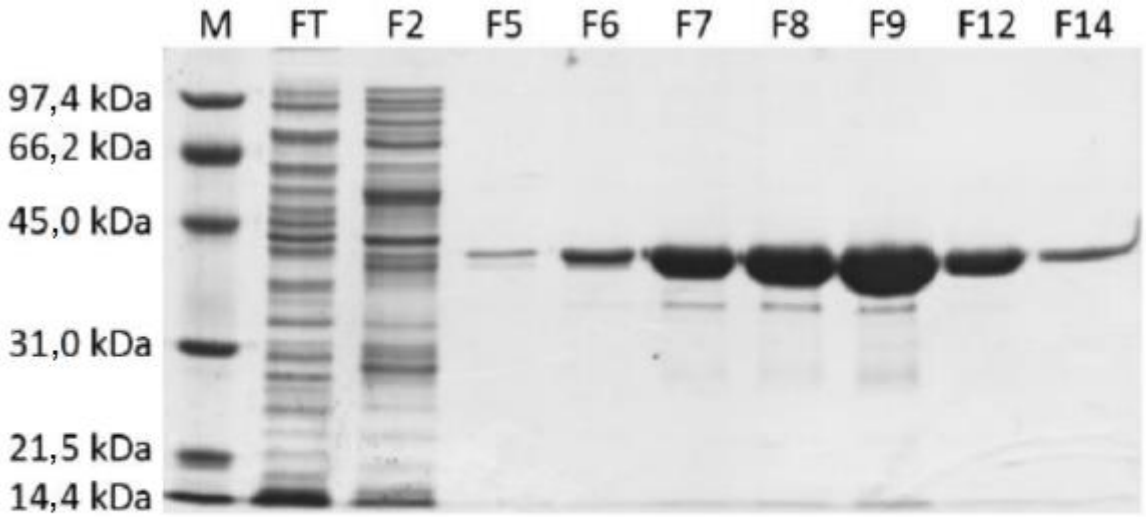

M
FT
F2
F5
F6
F7
F8
F9
F12
F14
97,4 kDa
66,2 kDa
45,0 kDa
31,0 kDa
21,5 kDa
14,4 kDa

FIG. 5D

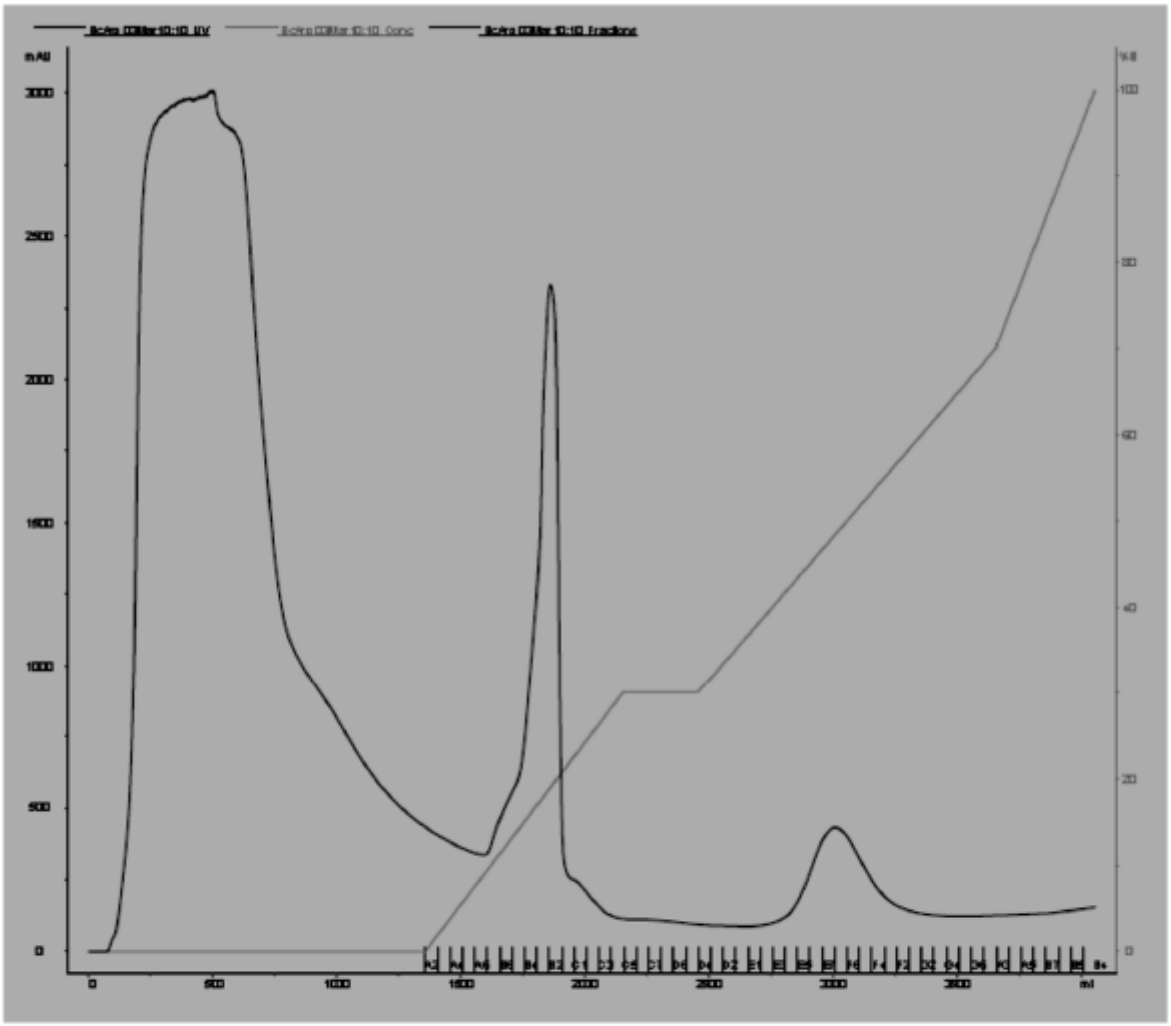

mAU
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
%B
100
80
60
40
20
0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
ml

FIG. 6A

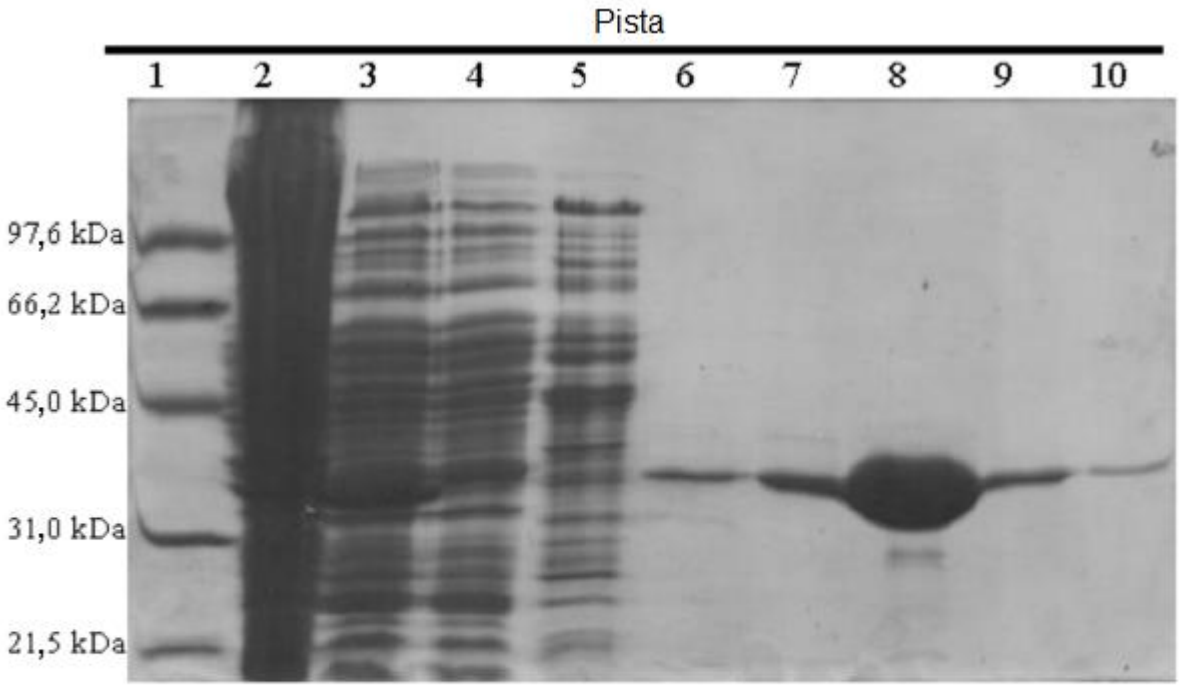



FIG. 6B

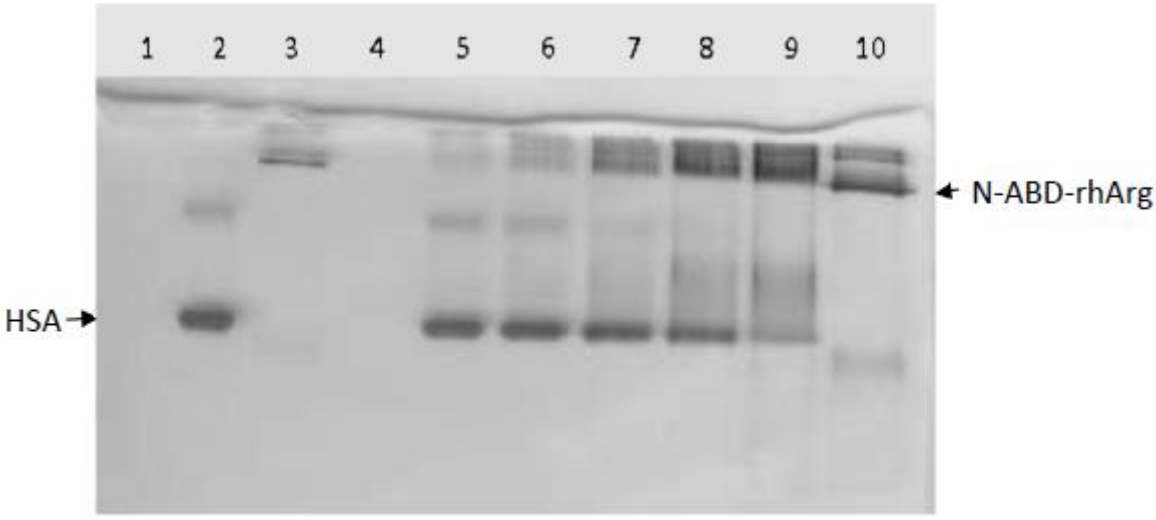



FIG. 7

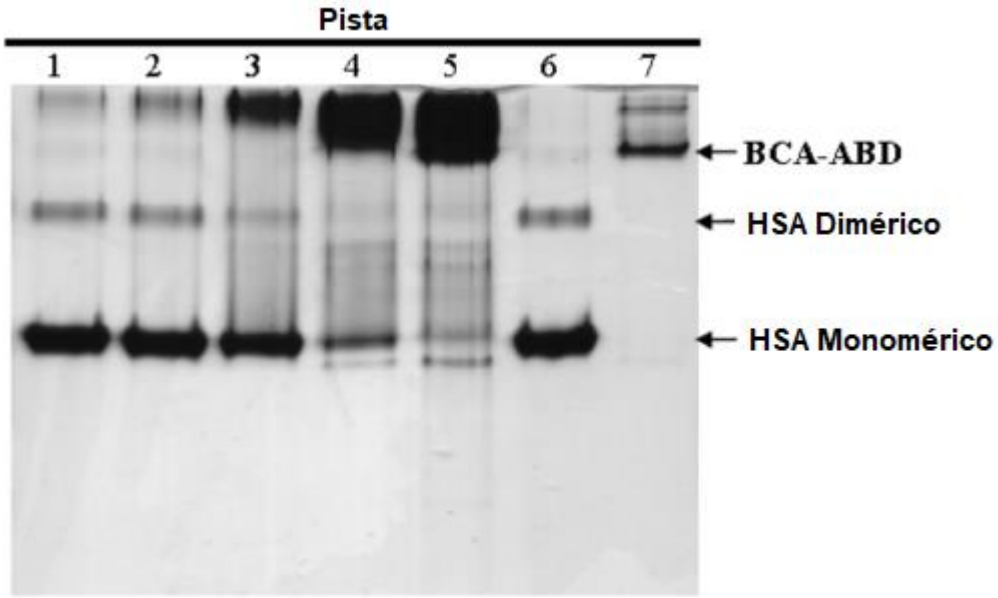



FIG. 8

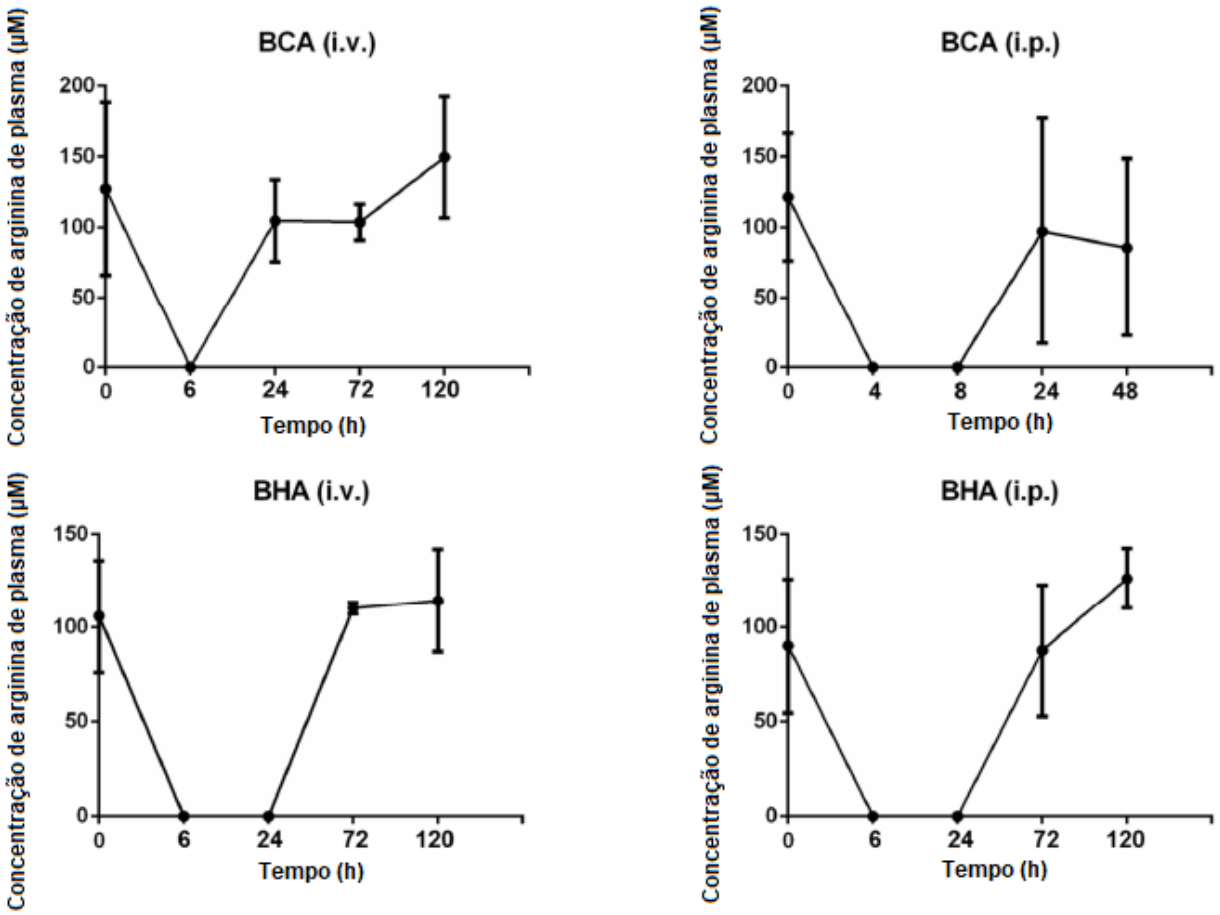

BCA (i.v.)
Concentração de arginina de plasma (µM)
200
150
100
50
0
0
6
24
72
120
Tempo (h)
BCA (i.p.)
Concentração de arginina de plasma (µM)
200
150
100
50
0
0
4
8
24
48
Tempo (h)
BHA (i.v.)
Concentração de arginina de plasma (µM)
150
100
50
0
0
6
24
72
120
Tempo (h)
BHA (i.p.)
Concentração de arginina de plasma (µM)
150
100
50
0
0
6
24
72
120
Tempo (h)

FIG. 9

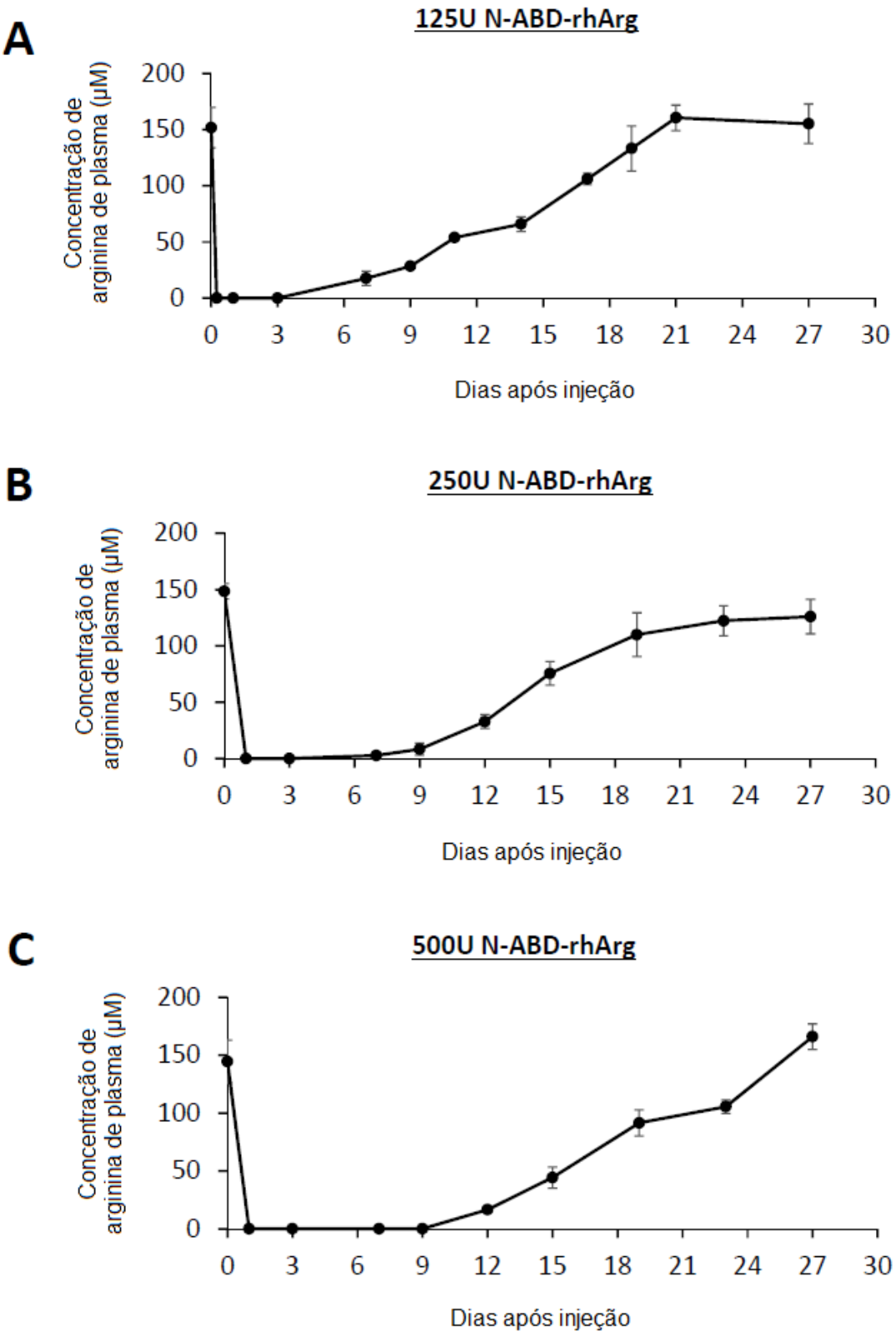

A
125U N-ABD-rhArg
Concentração de arginina de plasma (µM)
200
150
100
50
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
Dias após injeção
B
250U N-ABD-rhArg
Concentração de arginina de plasma (µM)
200
150
100
50
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
Dias após injeção
C
500U N-ABD-rhArg
Concentração de arginina de plasma (µM)
200
150
100
50
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
Dias após injeção

**FIG. 10**

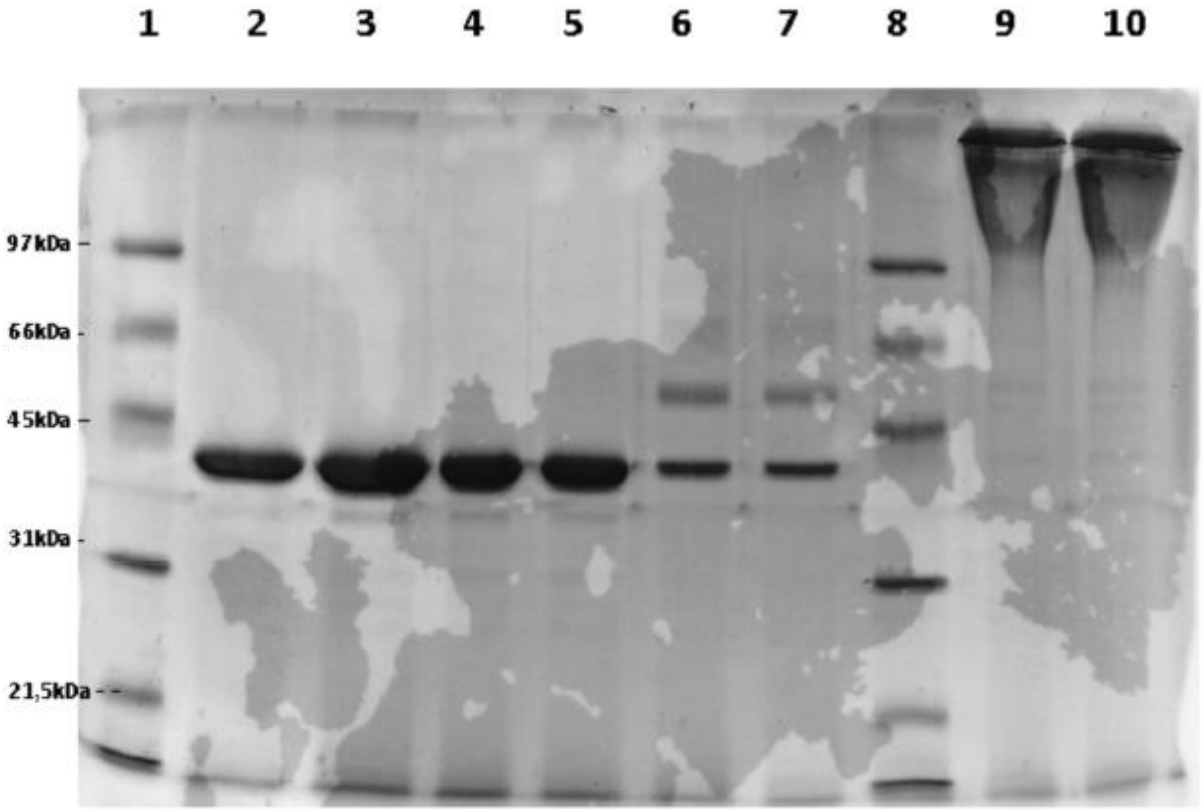



FIG. 11

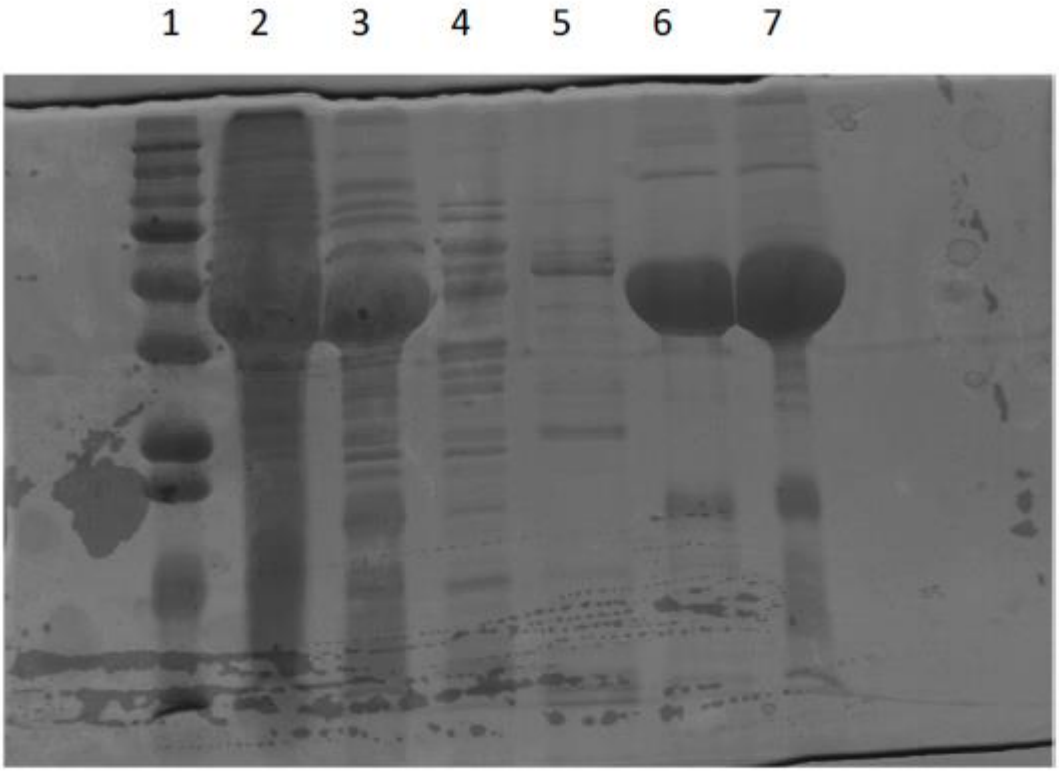



FIG. 12

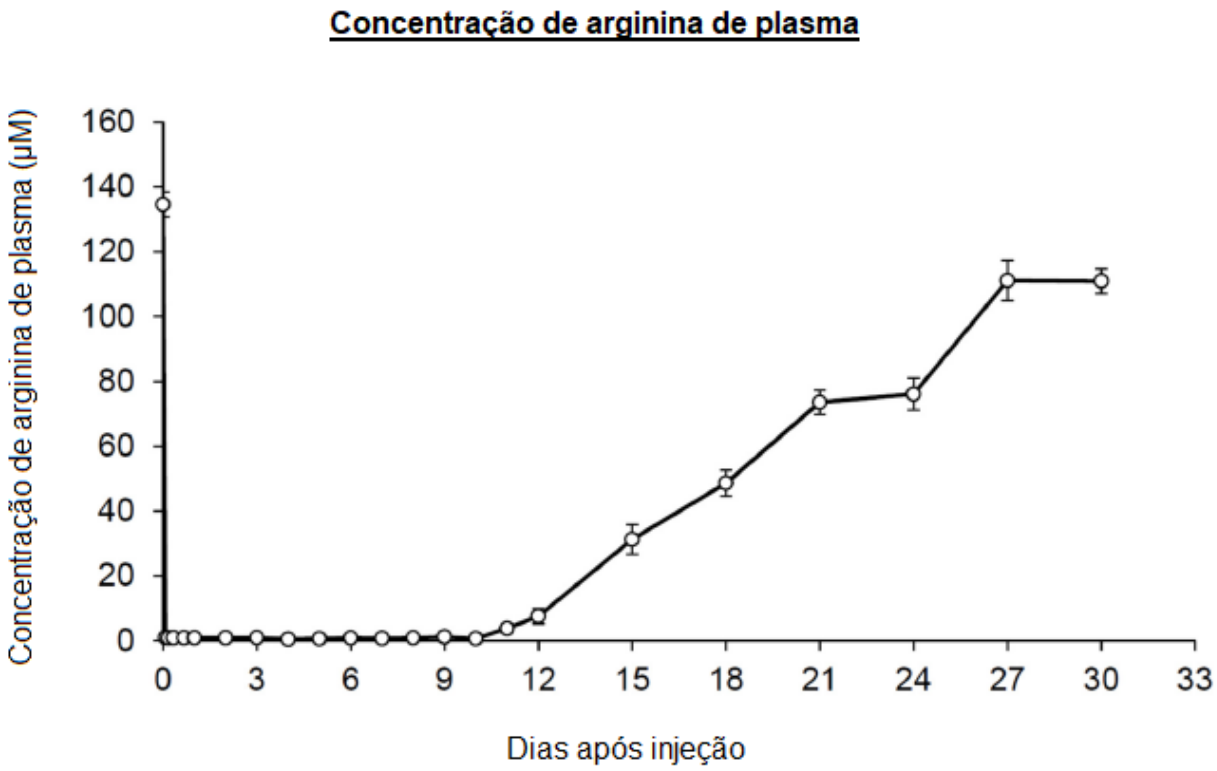

Concentração de arginina de plasma
Concentração de arginina de plasma (µM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
Dias após injeção

FIG. 13

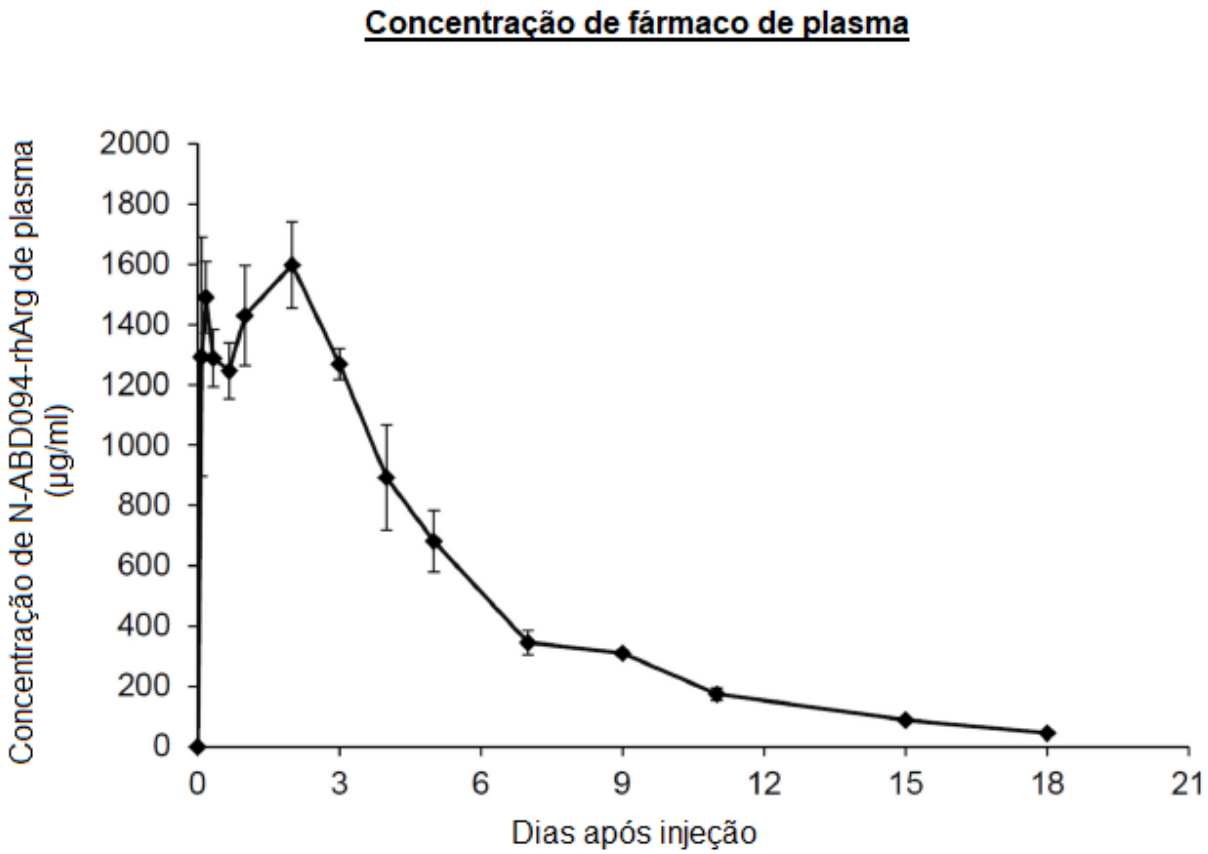

Concentração de fármaco de plasma
Concentração de N-ABD094-rhArg de plasma (µg/ml)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
3
6
9
12
15
18
21
Dias após injeção

FIG. 14

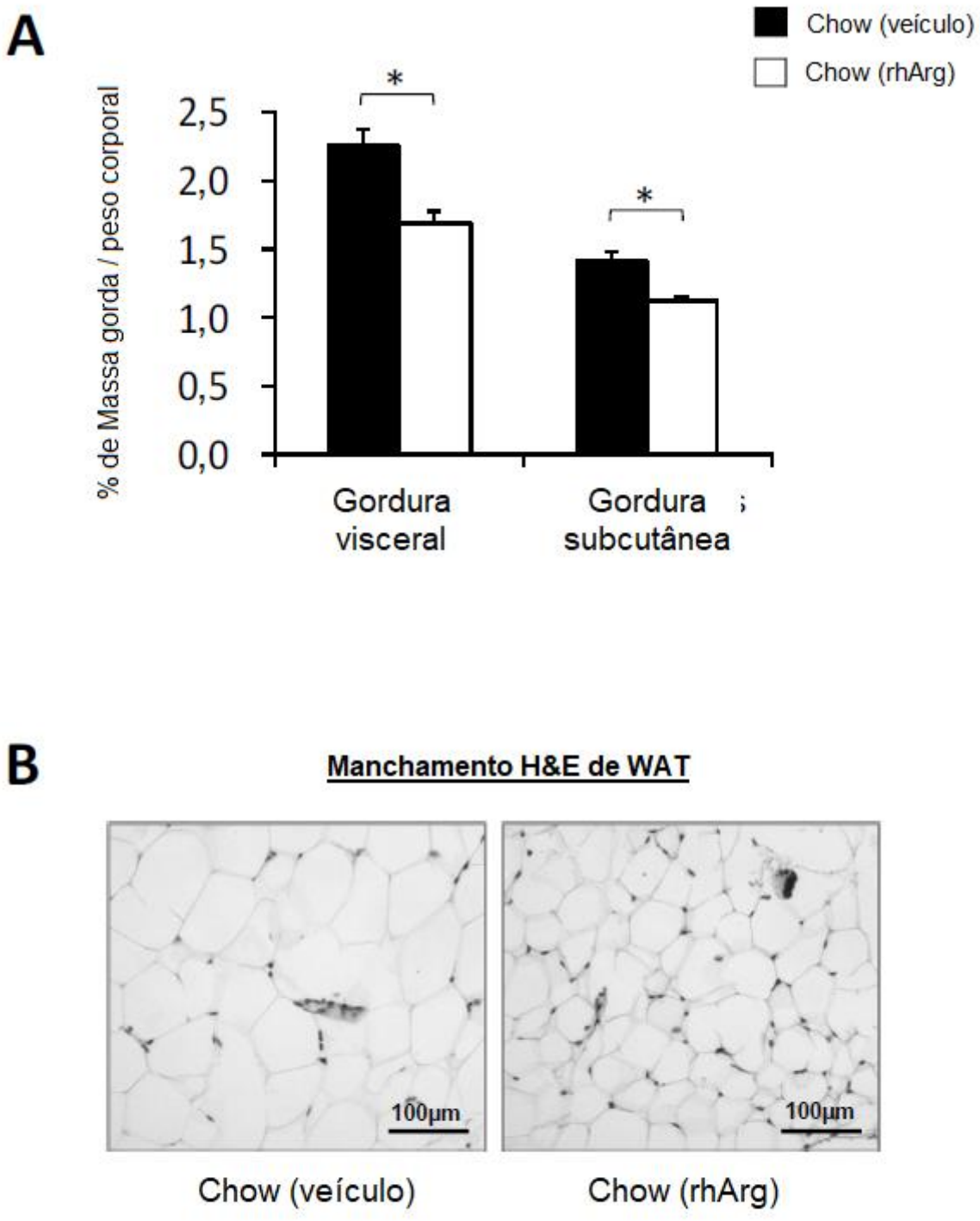

A
Chow (veículo)
Chow (rhArg)
% de Massa gorda / peso corporal
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
*
Gordura visceral
Gordura subcutânea
B
Manchamento H&E de WAT
100µm
100µm
Chow (veículo)
Chow (rhArg)

FIG. 15

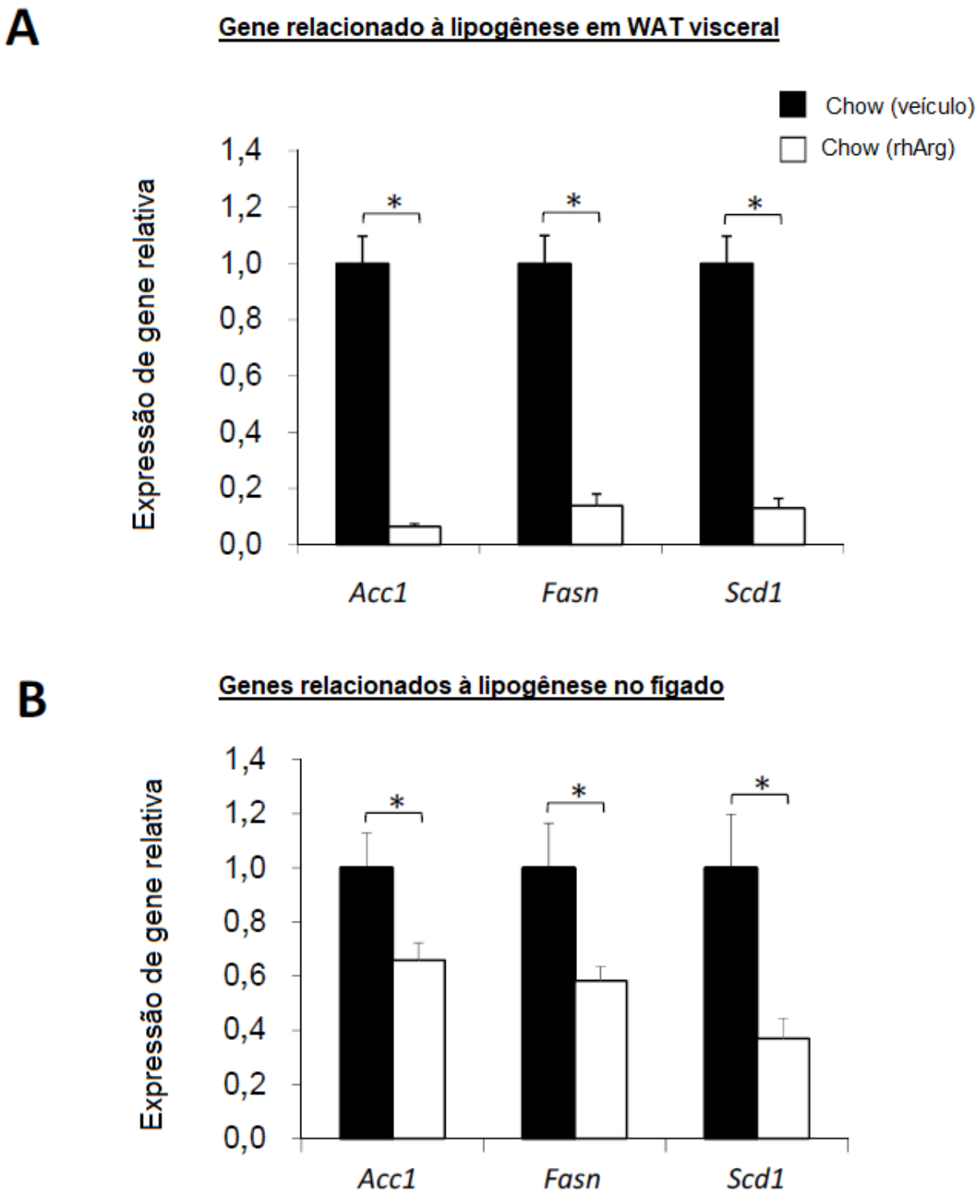
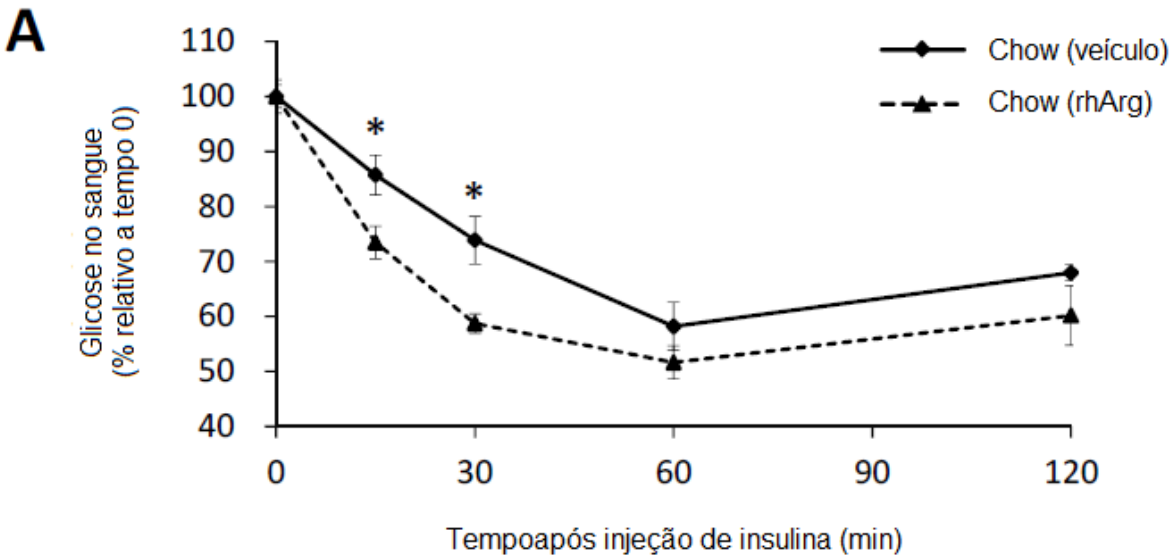
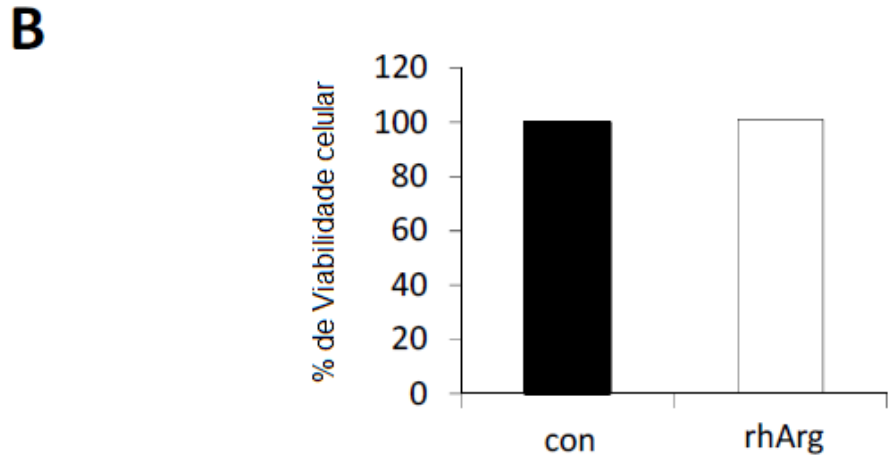

A
Gene relacionado à lipogênese em WAT visceral
Chow (veículo)
Chow (rhArg)
Expressão de gene relativa
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
*
*
Acc1
Fasn
Scd1
B
Genes relacionados à lipogênese no fígado
Expressão de gene relativa
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
*
*
Acc1
Fasn
Scd1

FIG. 16


A
Glicose no sangue
(% relativo a tempo 0)
110
100
90
80
70
60
50
40
0
30
60
90
120
Tempoapós injeção de insulina (min)
Chow (veículo)
Chow (rhArg)
*
*


B
% de Viabilidade celular
120
100
80
60
40
20
0
con
rhArg

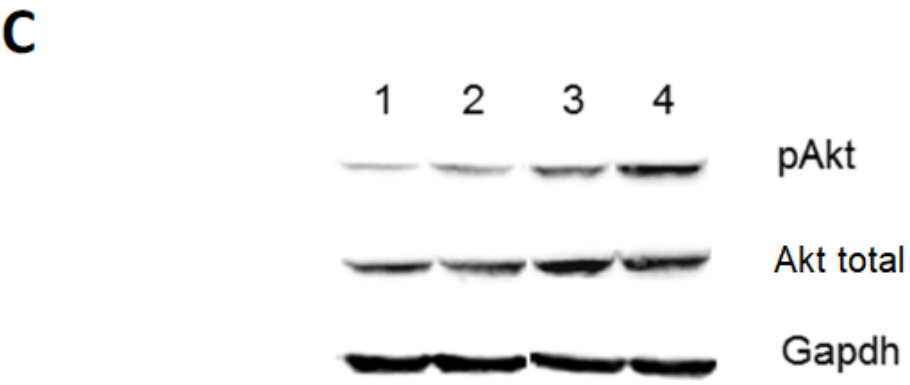
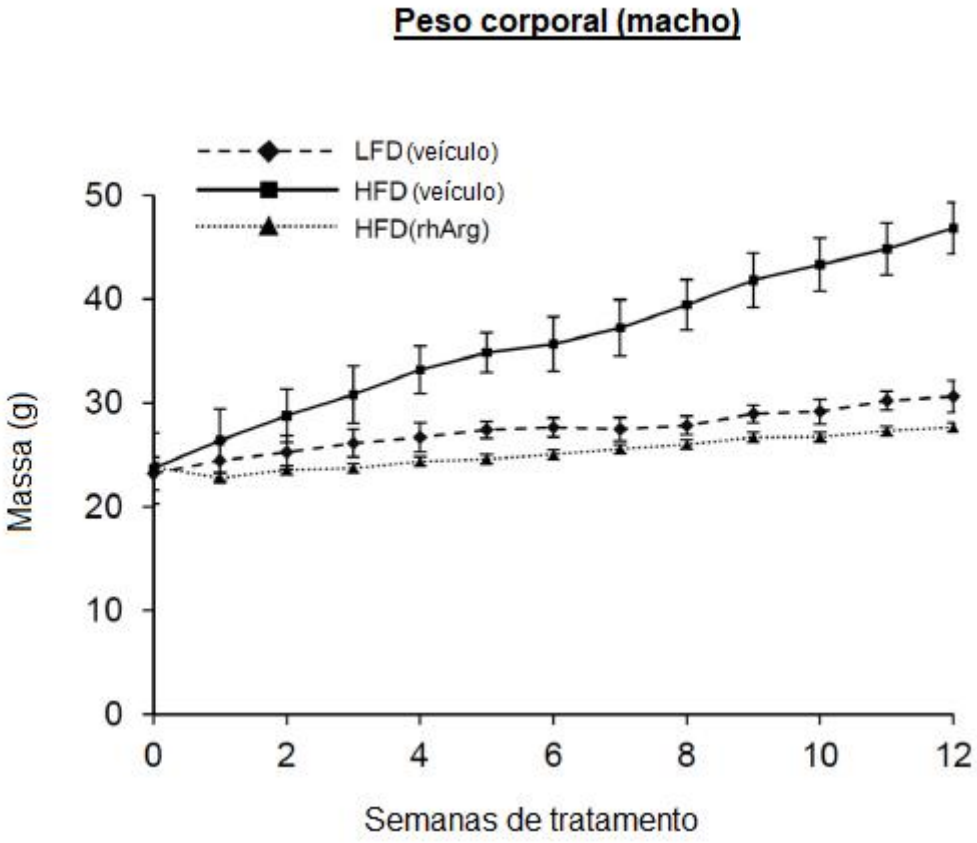

C
1
2
3
4
pAkt
Akt total
Gapdh

FIG. 17

**A**


Peso corporal (macho)
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Massa (g)
0
10
20
30
40
50
0
2
4
6
8
10
12
Semanas de tratamento

**B**

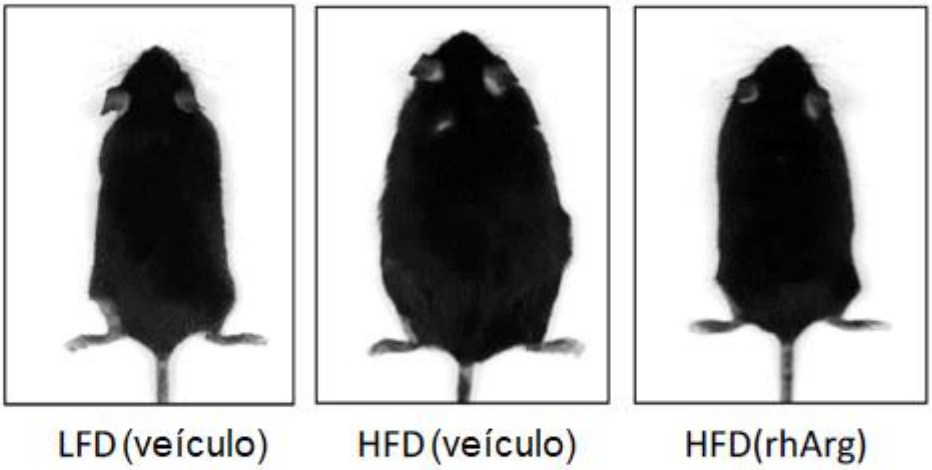
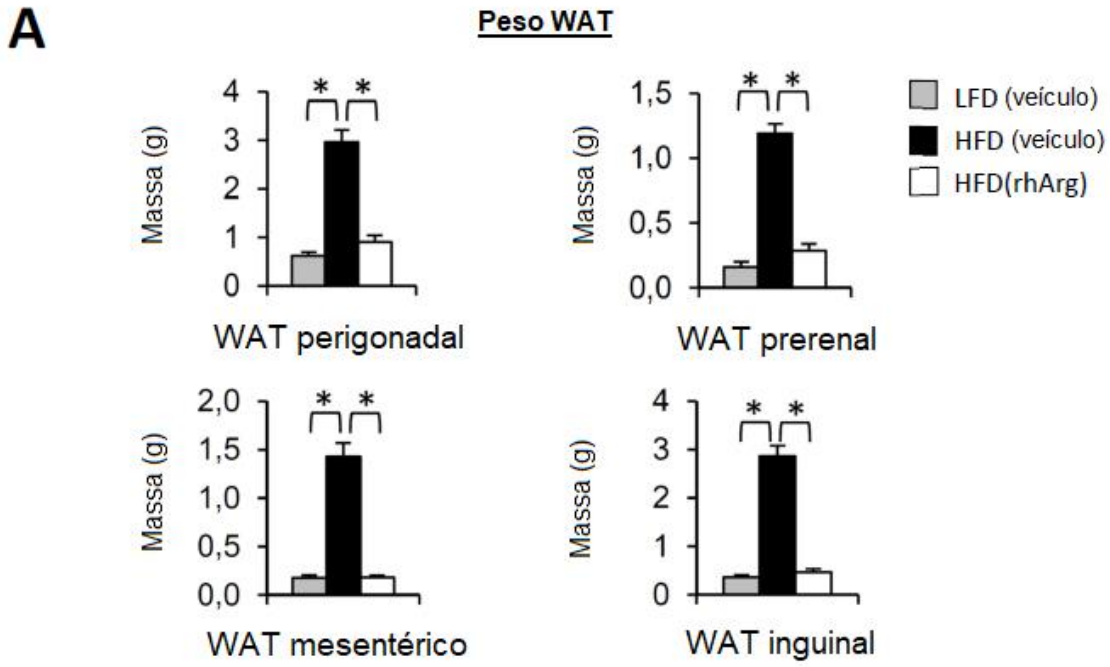
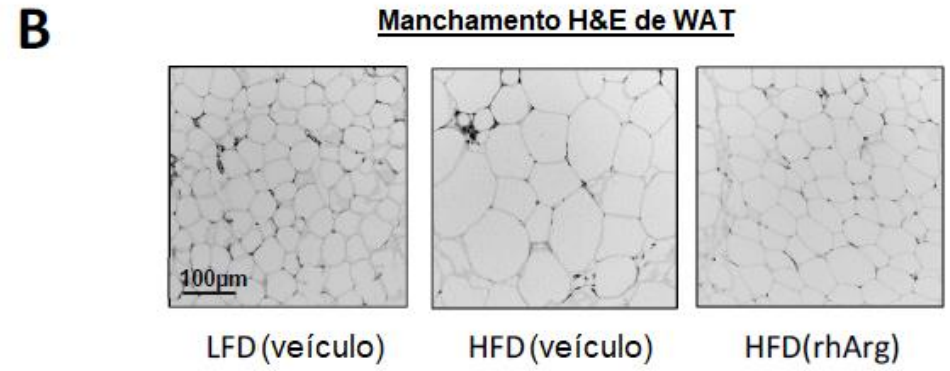

LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

**FIG. 18**


A
Peso WAT
Massa (g)
WAT perigonadal
WAT prerenal
WAT mesentérico
WAT inguinal
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)


B
Manchamento H&E de WAT
100µm
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

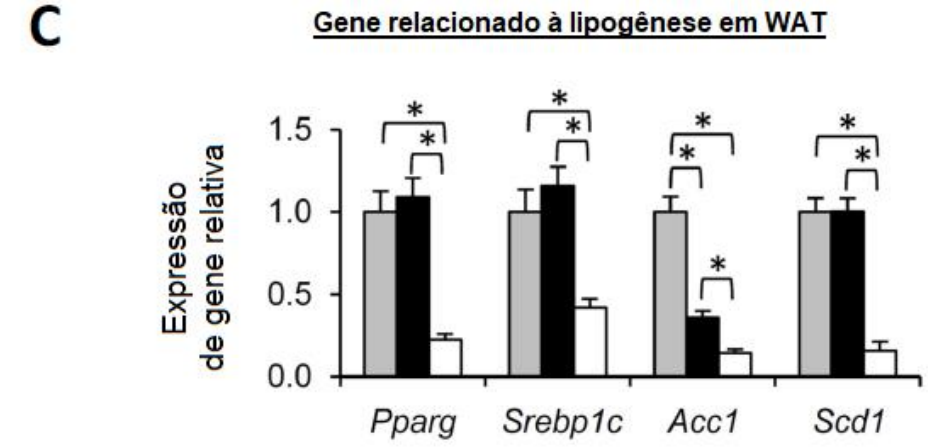

C
Gene relacionado à lipogênese em WAT
Expressão de gene relativa
Pparg
Srebp1c
Acc1
Scd1

FIG. 19

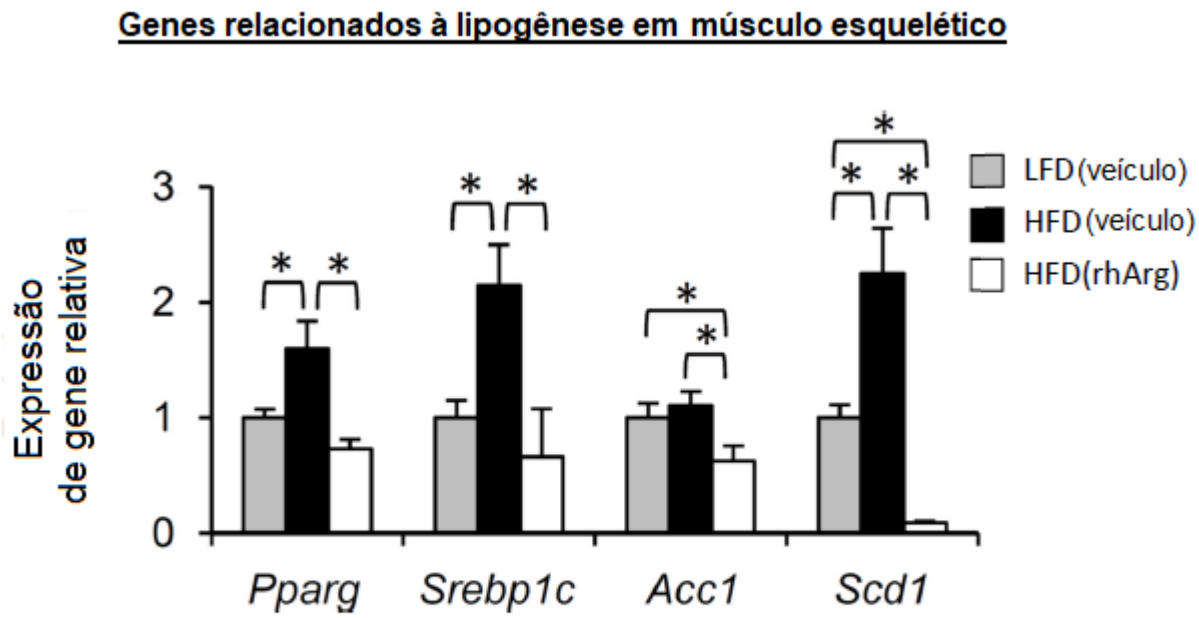

Genes relacionados à lipogênese em músculo esquelético
Expressão de gene relativa
0
1
2
3
*
*
*
*
*
*
*
*
*
Pparg
Srebp1c
Acc1
Scd1
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 20

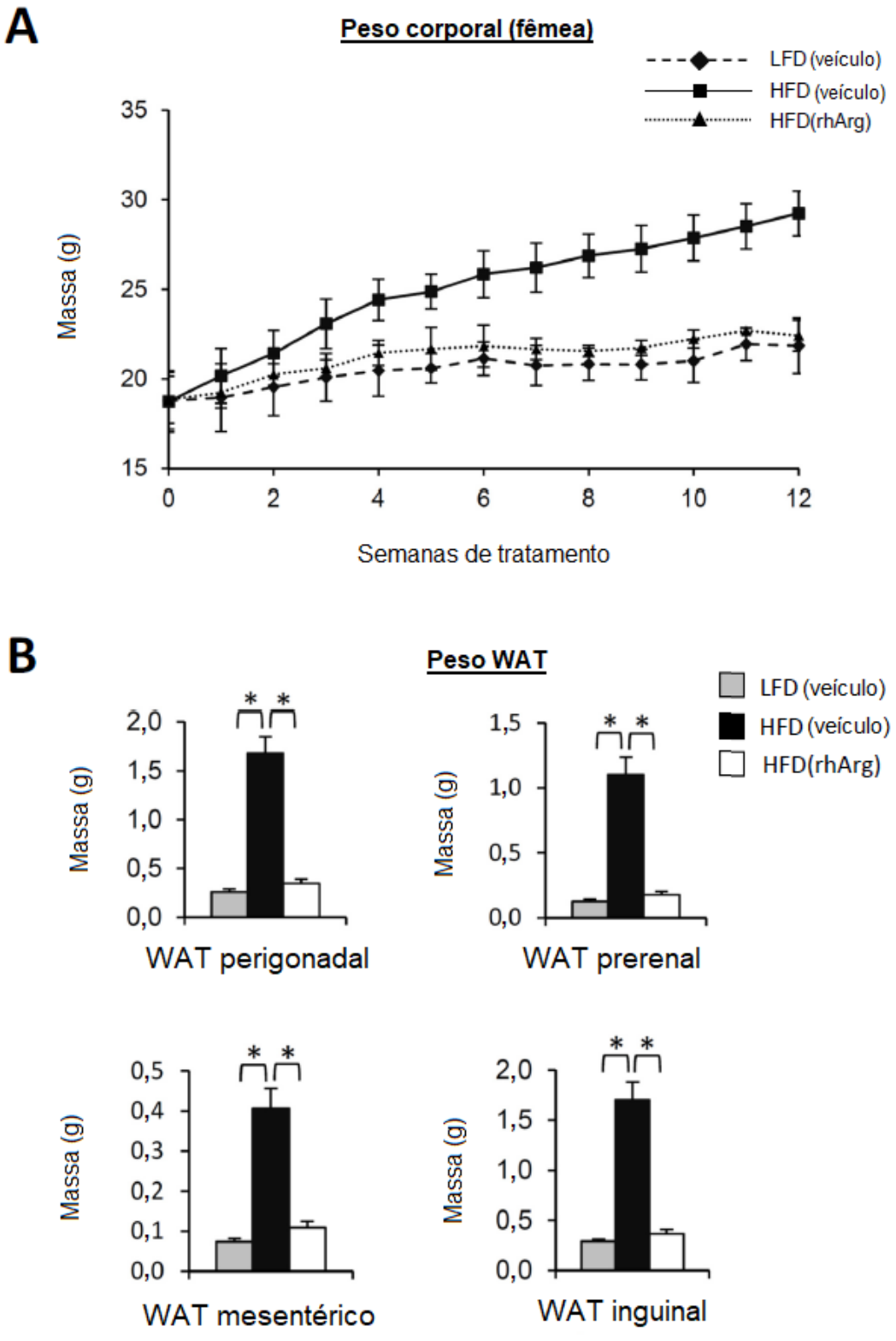

A
Peso corporal (fêmea)
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Massa (g)
35
30
25
20
15
0
2
4
6
8
10
12
Semanas de tratamento
B
Peso WAT
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Massa (g)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
WAT perigonadal
1,5
1,0
0,5
0,0
WAT prerenal
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
WAT mesentérico
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
WAT inguinal

FIG. 21

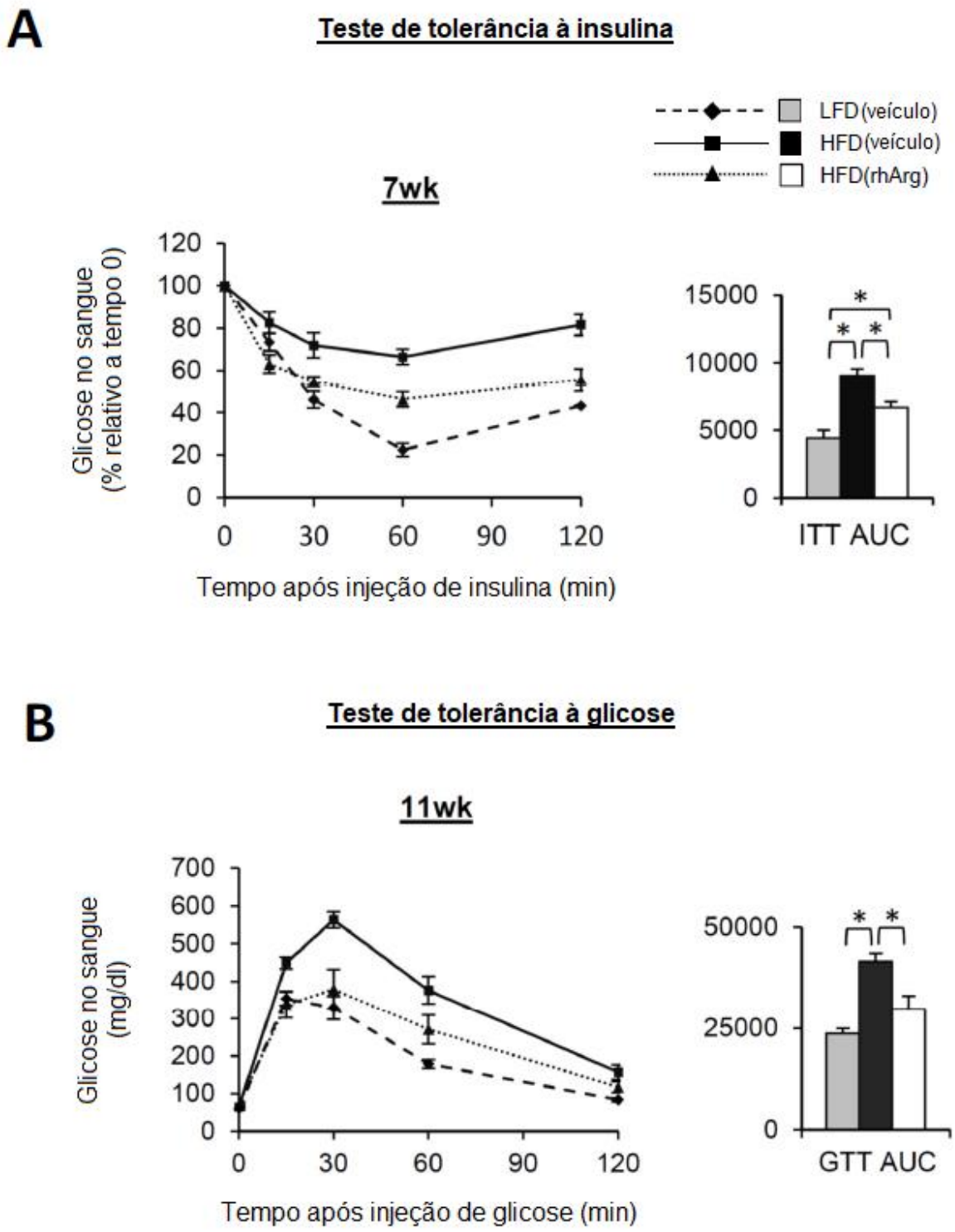

A
Teste de tolerância à insulina
LFD(veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)
7wk
Glicose no sangue
(% relativo a tempo 0)
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
Tempo após injeção de insulina (min)
15000
10000
5000
0
ITT AUC
B
Teste de tolerância à glicose
11wk
Glicose no sangue
(mg/dl)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
30
60
90
120
Tempo após injeção de glicose (min)
50000
25000
0
GTT AUC

FIG. 22

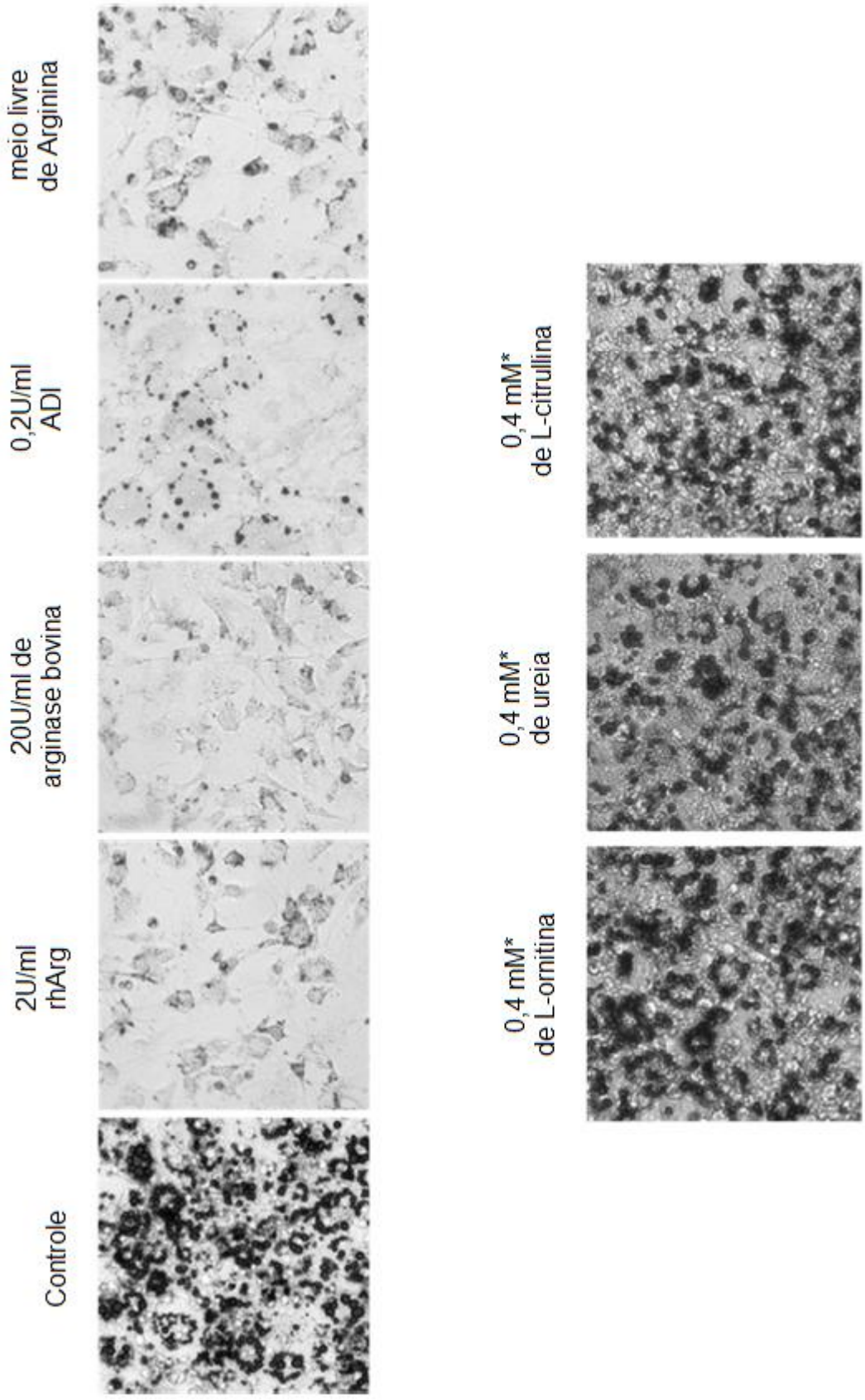

Controle
2U/ml rhArg
20U/ml de arginase bovina
0,2U/ml ADI
meio livre de Arginina
0,4 mM* de L-ornitina
0,4 mM* de ureia
0,4 mM* de L-citrullina

FIG. 23

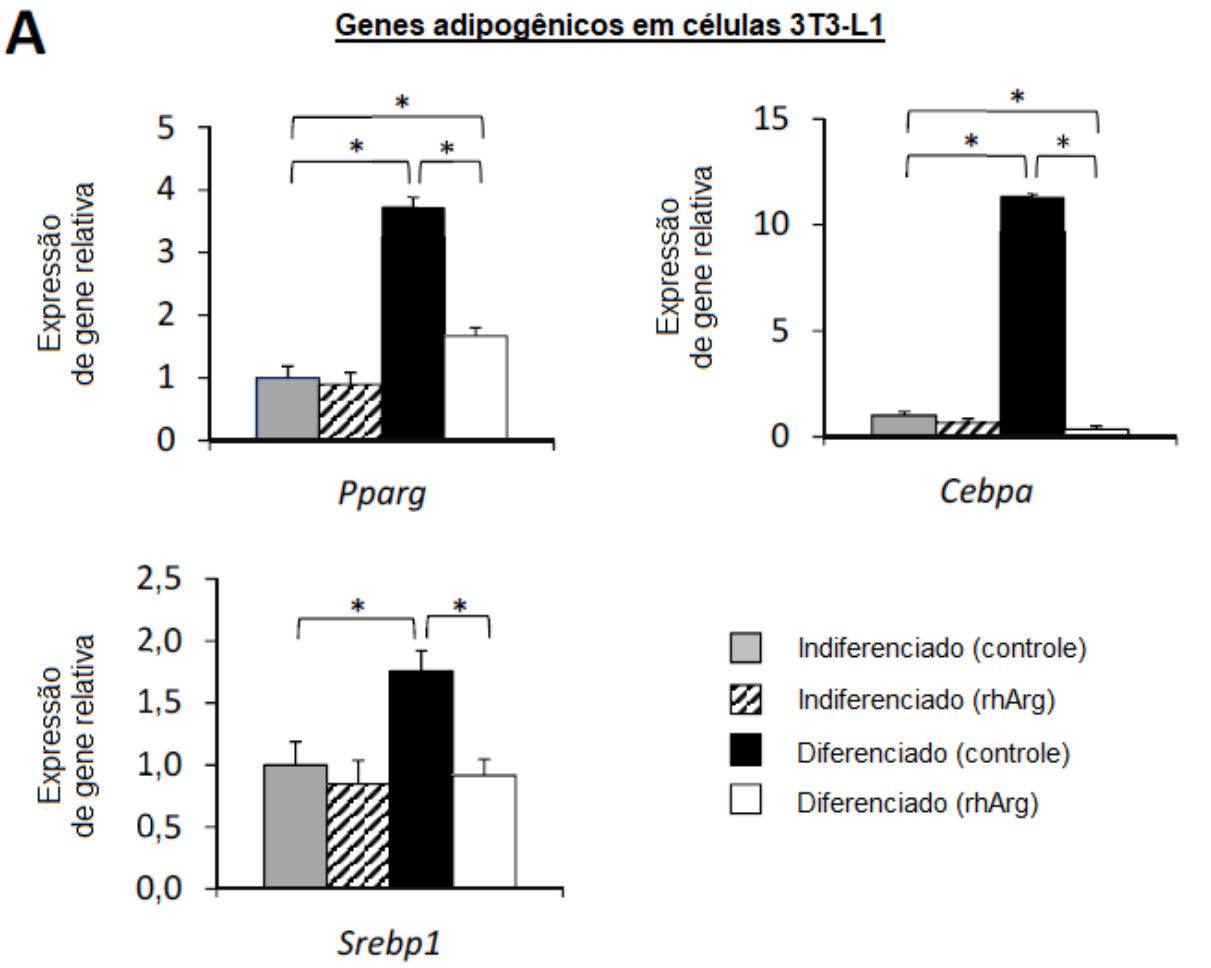
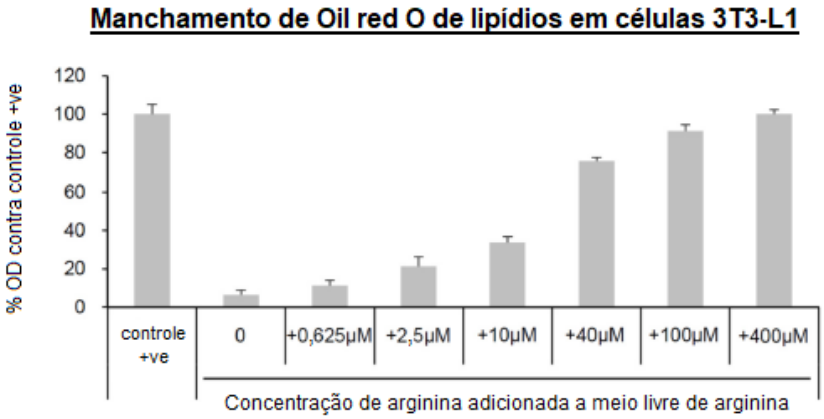

A
Genes adipogênicos em células 3T3-L1
Expressão de gene relativa
Pparg
Cebpa
Srebp1
Indiferenciado (controle)
Indiferenciado (rhArg)
Diferenciado (controle)
Diferenciado (rhArg)
B
Genes lipogênicos em células 3T3-L1
Expressão de gene relativa
Fasn
Scd1

FIG. 24

**A**


Manchamento de Oil red O de lipídios em células 3T3-L1
% OD contra controle +ve
120
100
80
60
40
20
0
controle +ve
0
+0,625µM
+2,5µM
+10µM
+40µM
+100µM
+400µM
Concentração de arginina adicionada a meio livre de arginina

**B**

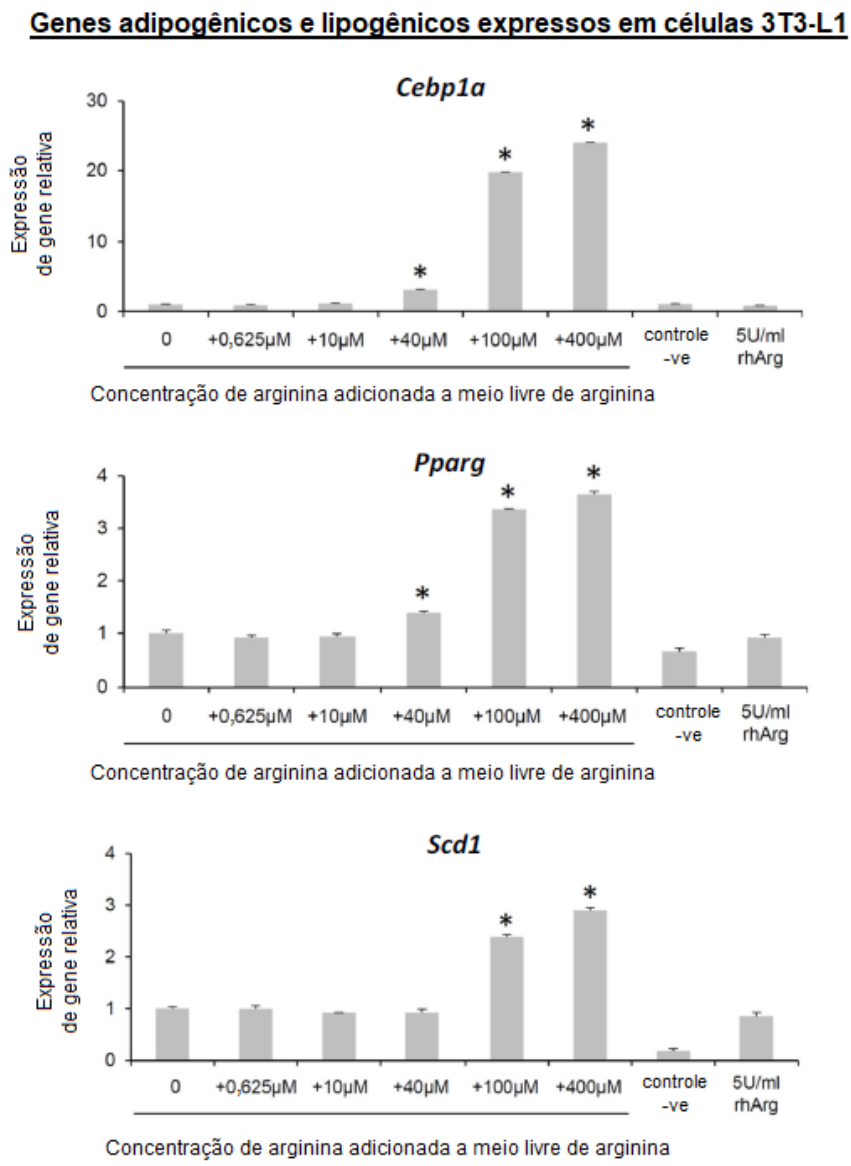

Genes adipogênicos e lipogênicos expressos em células 3T3-L1
Cebp1a
Expressão de gene relativa
30
20
10
0
0
+0,625µM
+10µM
+40µM
+100µM
+400µM
controle -ve
5U/ml rhArg
Concentração de arginina adicionada a meio livre de arginina
Pparg
Expressão de gene relativa
4
3
2
1
0
0
+0,625µM
+10µM
+40µM
+100µM
+400µM
controle -ve
5U/ml rhArg
Concentração de arginina adicionada a meio livre de arginina
Scd1
Expressão de gene relativa
4
3
2
1
0
0
+0,625µM
+10µM
+40µM
+100µM
+400µM
controle -ve
5U/ml rhArg
Concentração de arginina adicionada a meio livre de arginina

**FIG. 25**

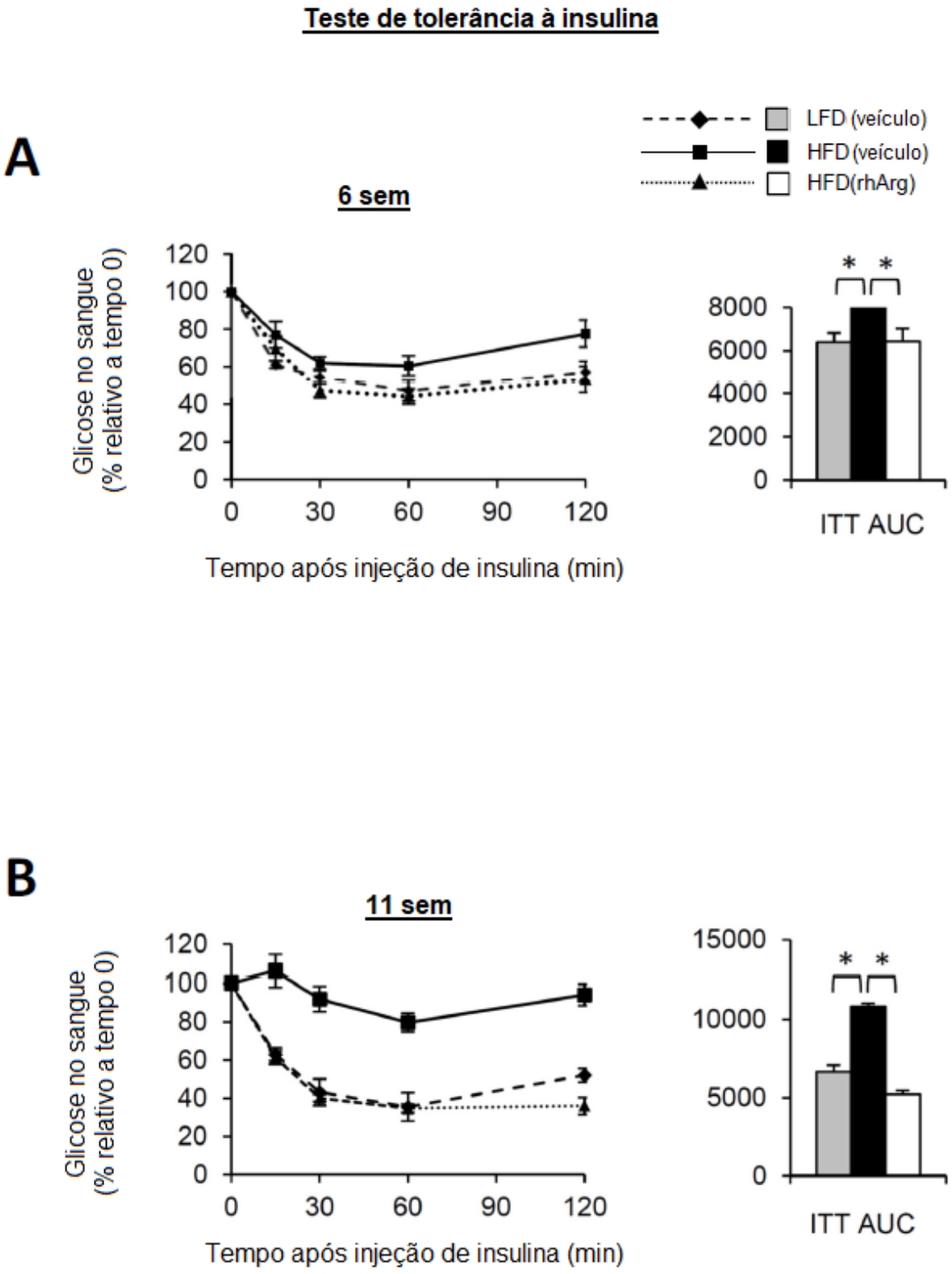

Teste de tolerância à insulina
A
6 sem
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Glicose no sangue
(% relativo a tempo 0)
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
Tempo após injeção de insulina (min)
8000
6000
4000
2000
0
ITT AUC
* *
B
11 sem
Glicose no sangue
(% relativo a tempo 0)
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
Tempo após injeção de insulina (min)
15000
10000
5000
0
ITT AUC
* *

FIG. 26

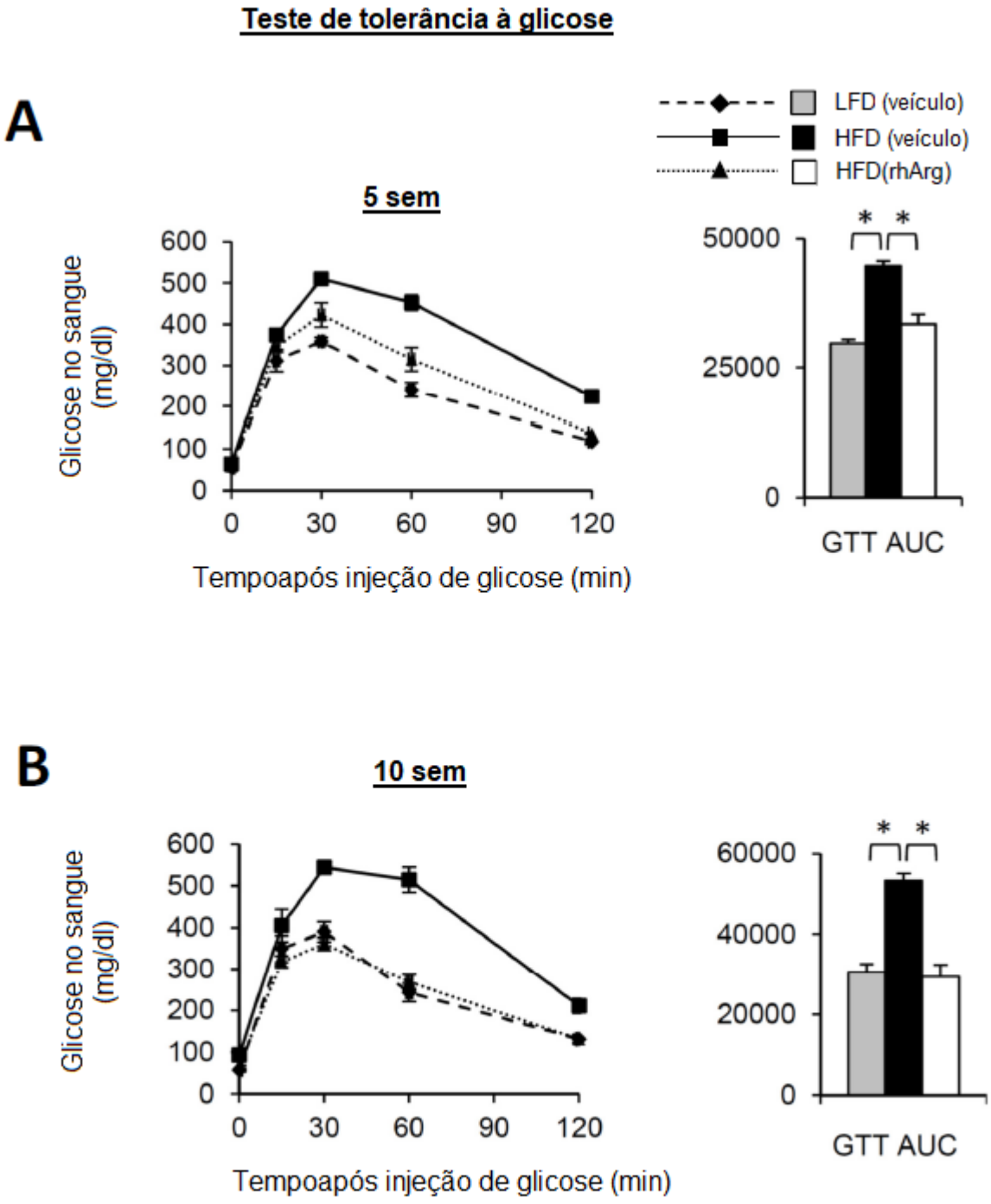

Teste de tolerância à glicose
A
5 sem
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Glicose no sangue (mg/dl)
600
500
400
300
200
100
0
0
30
60
90
120
Tempoapós injeção de glicose (min)
50000
25000
0
GTT AUC
B
10 sem
Glicose no sangue (mg/dl)
Tempoapós injeção de glicose (min)
60000
40000
20000
0
GTT AUC

FIG. 27

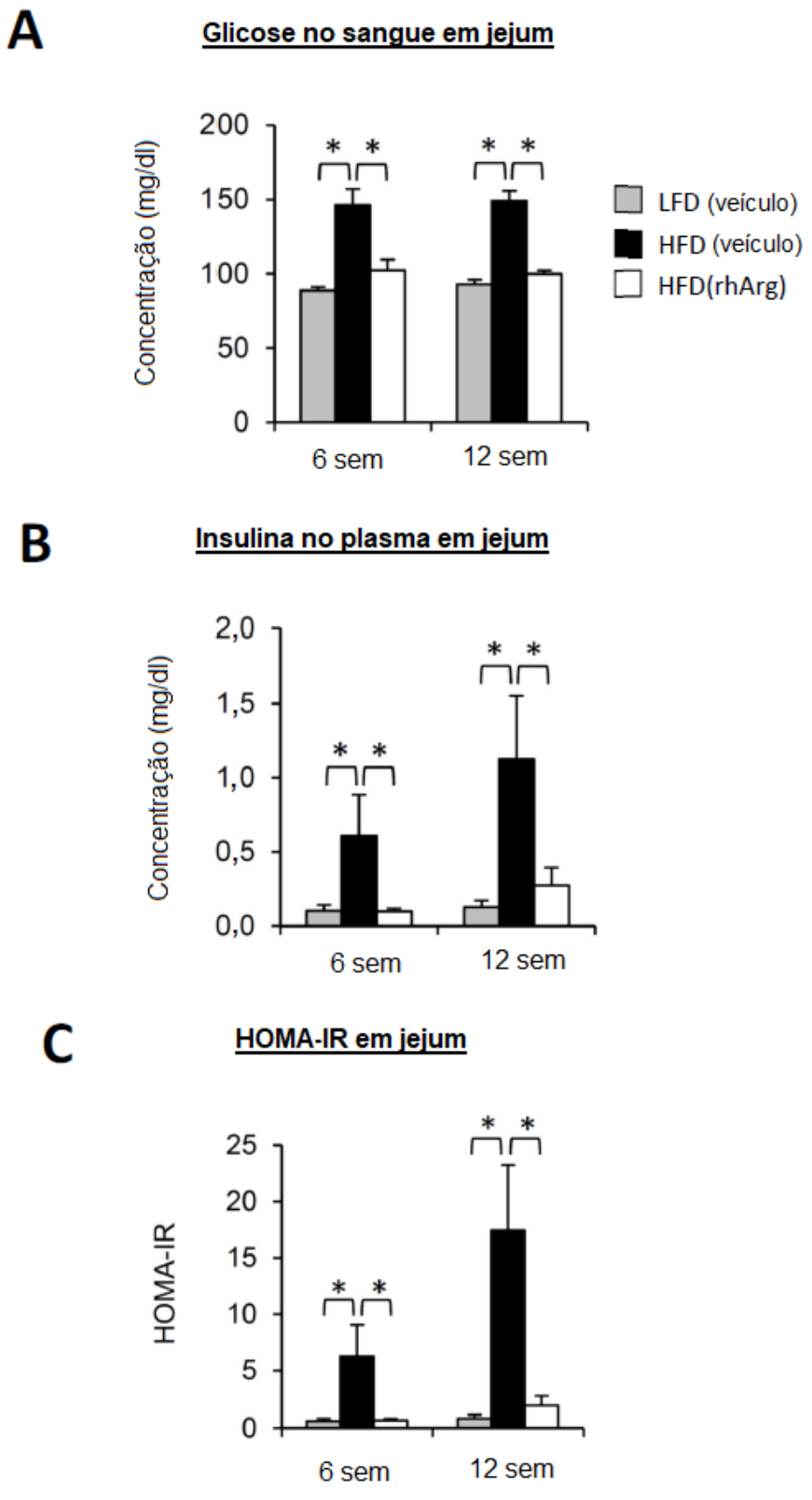

A
Glicose no sangue em jejum
Concentração (mg/dl)
200
150
100
50
0
6 sem
12 sem
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
B
Insulina no plasma em jejum
Concentração (mg/dl)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
6 sem
12 sem
C
HOMA-IR em jejum
HOMA-IR
25
20
15
10
5
0
6 sem
12 sem

FIG. 28

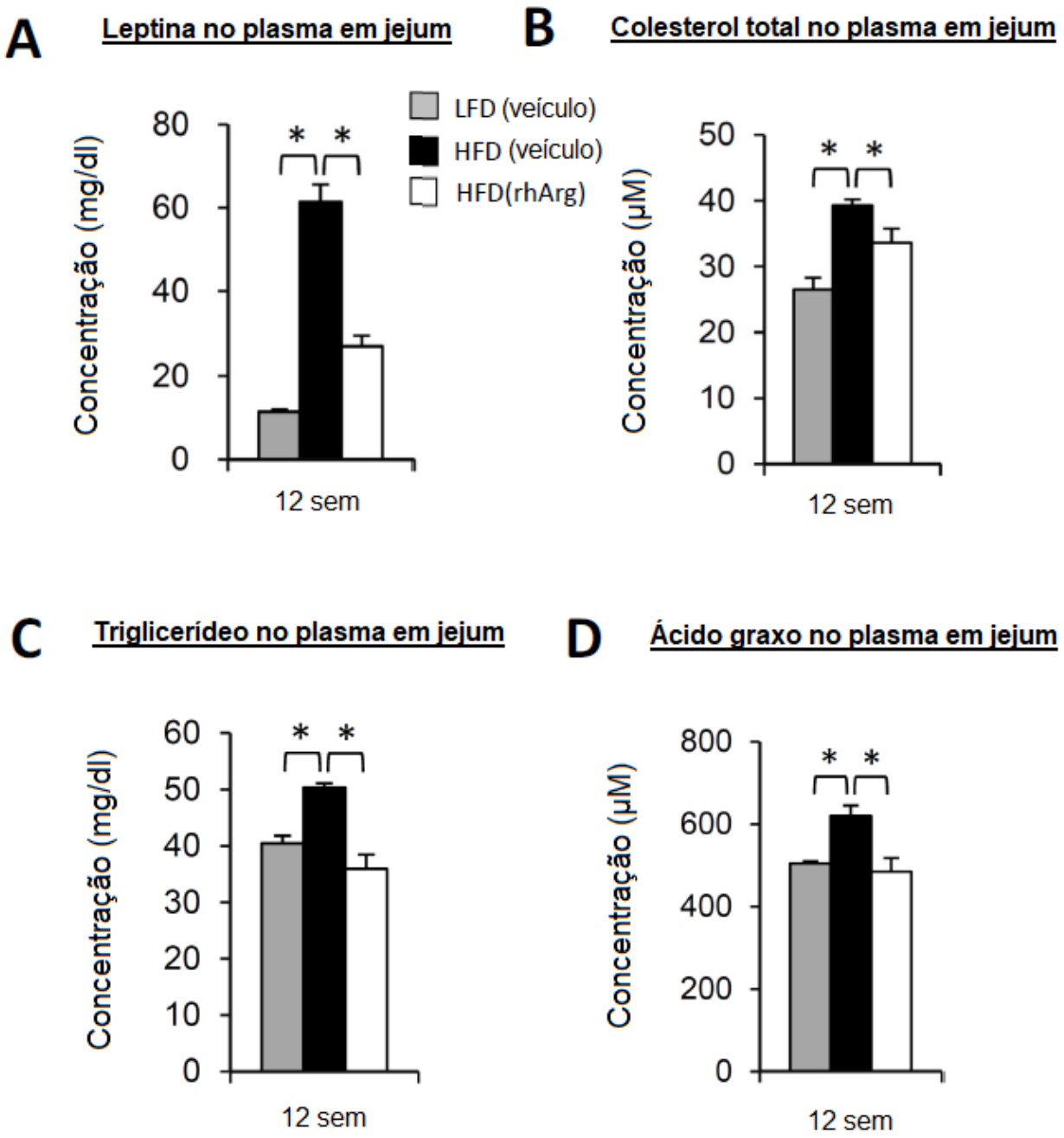
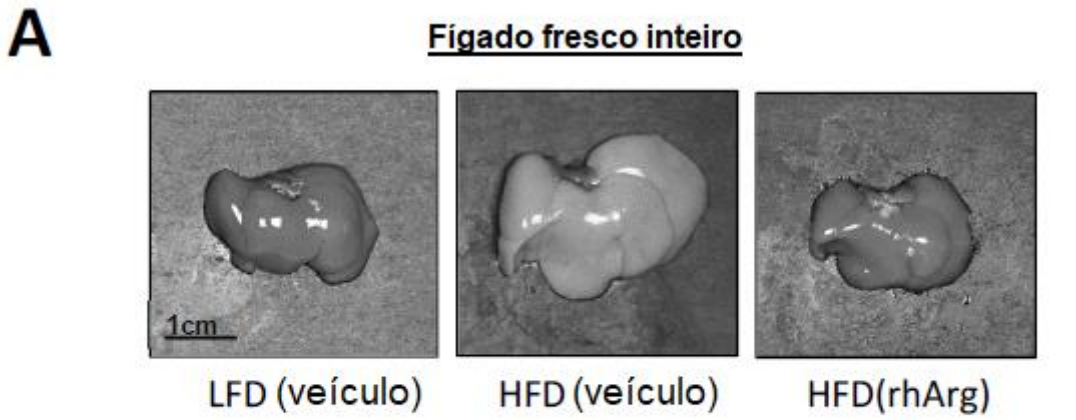

A
Leptina no plasma em jejum
B
Colesterol total no plasma em jejum
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Concentração (mg/dl)
Concentração (µM)
12 sem
C
Triglicerídeo no plasma em jejum
D
Ácido graxo no plasma em jejum

FIG. 29


A
Fígado fresco inteiro
1cm
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

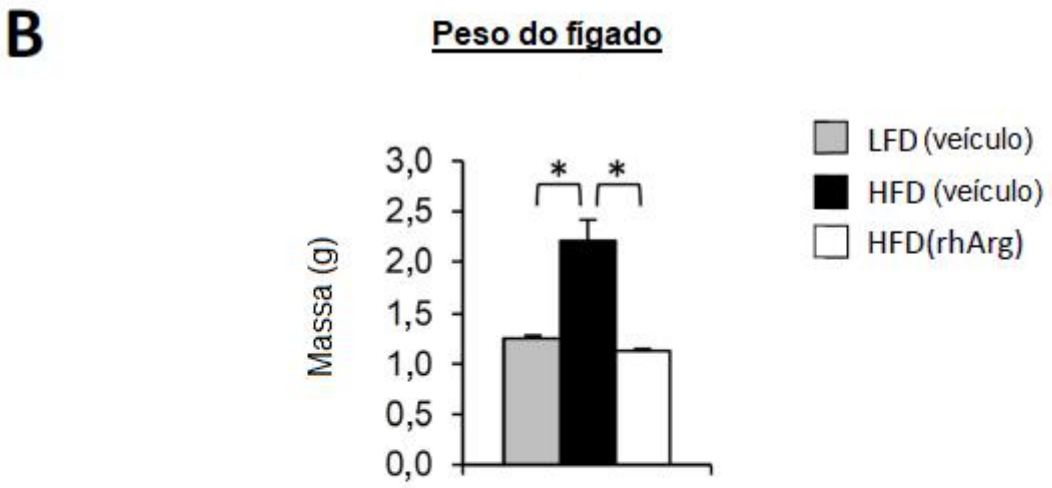

B
Peso do fígado
Massa (g)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
*
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 30

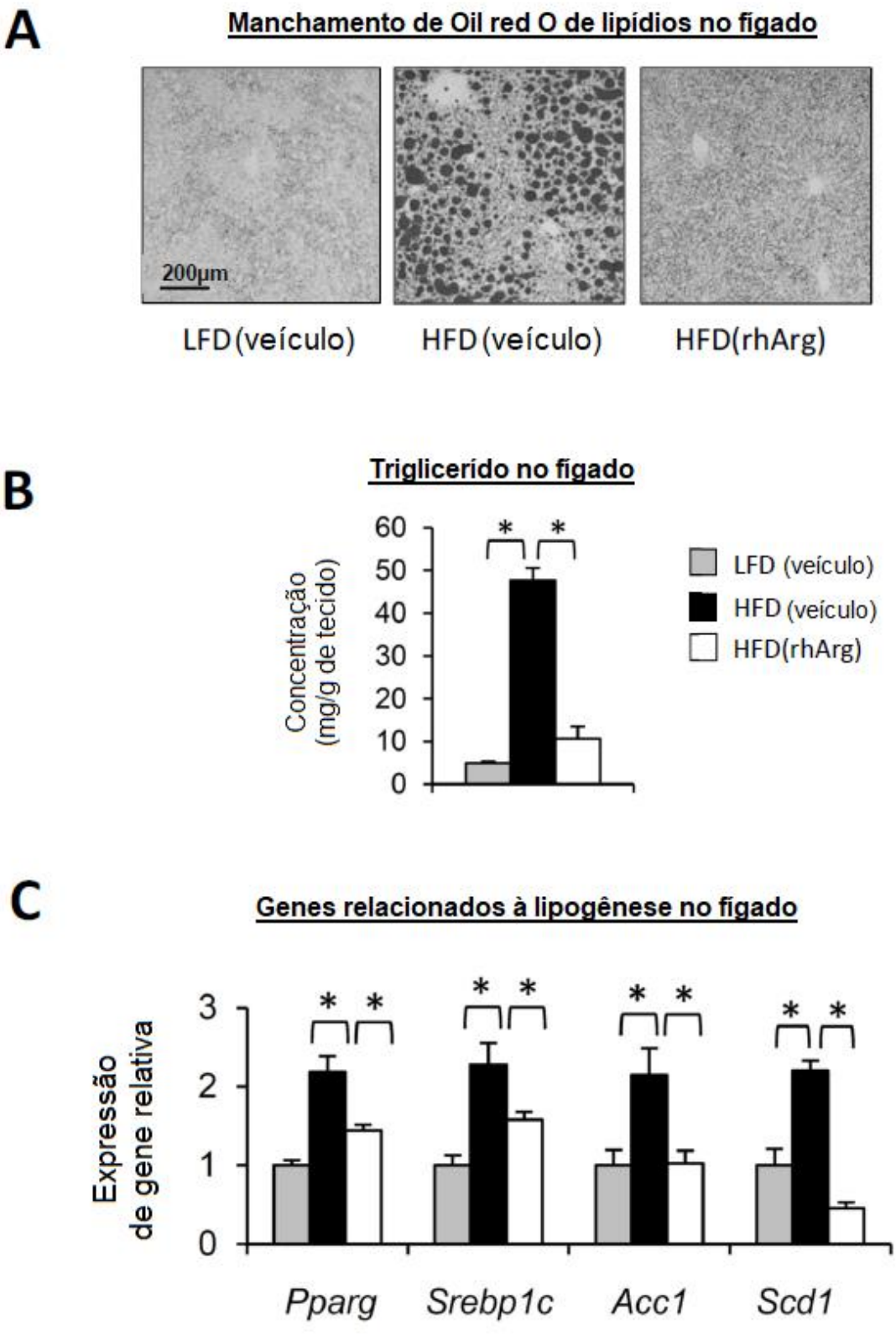

A
Manchamento de Oil red O de lipídios no fígado
200µm
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
B
Triglicerído no fígado
Concentração (mg/g de tecido)
60
50
40
30
20
10
0
*
*
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
C
Genes relacionados à lipogênese no fígado
Expressão de gene relativa
3
2
1
0
*
*
Pparg
Srebp1c
Acc1
Scd1

FIG. 31

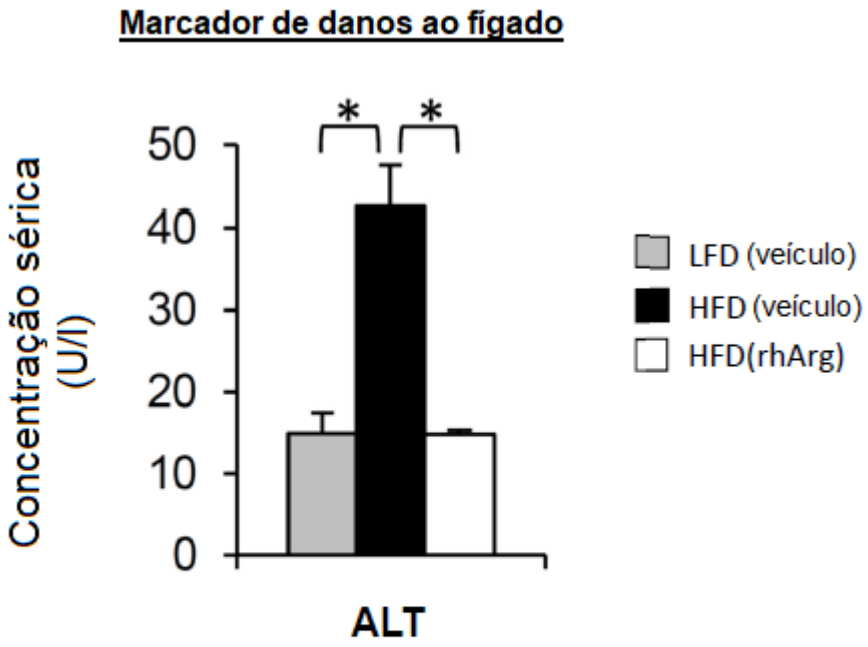

Marcador de danos ao fígado
Concentração sérica (U/l)
50
40
30
20
10
0
*
*
ALT
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 32

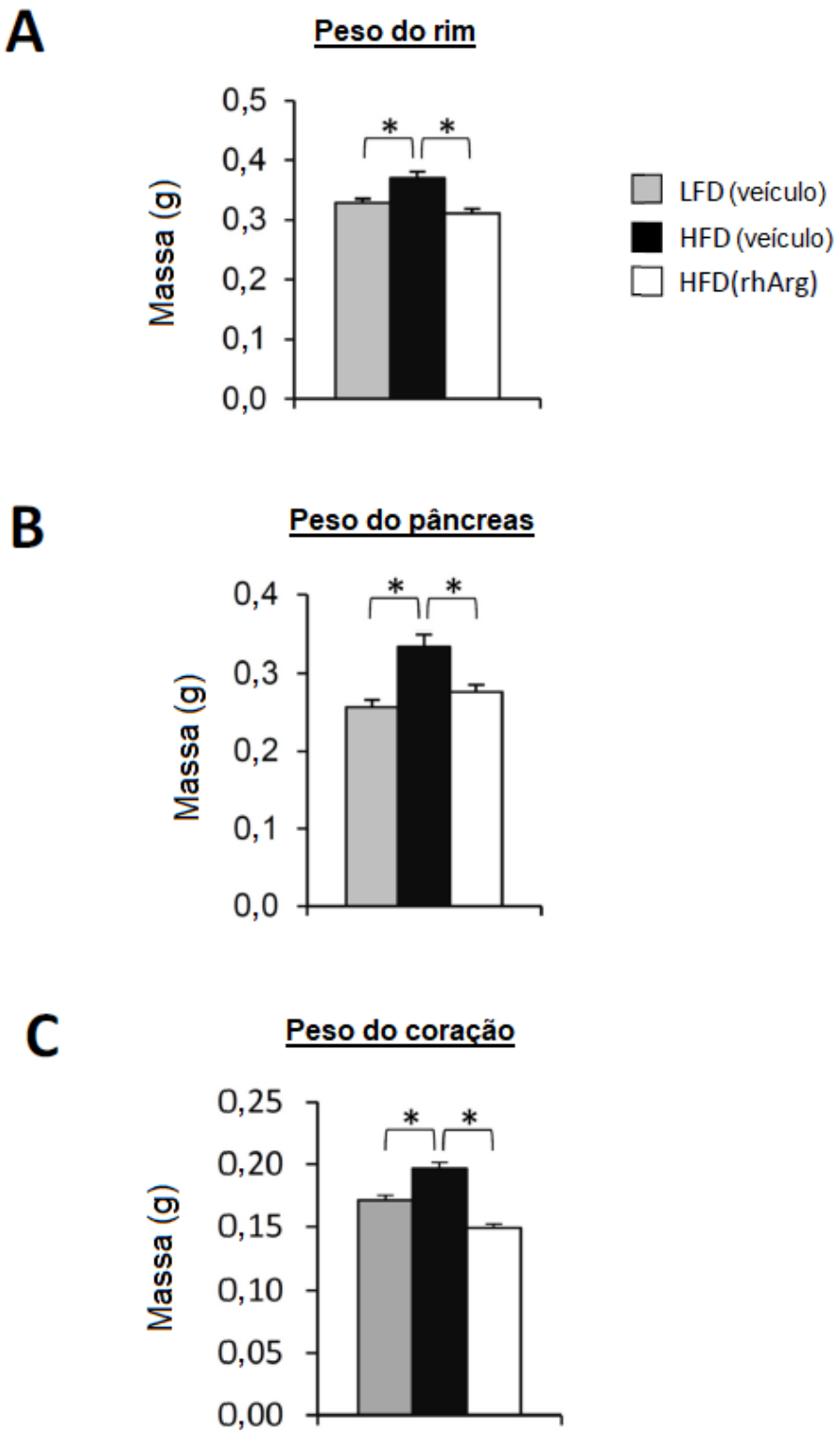

A
Peso do rim
Massa (g)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
*
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
B
Peso do pâncreas
Massa (g)
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
*
C
Peso do coração
Massa (g)
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
*
*

FIG. 33

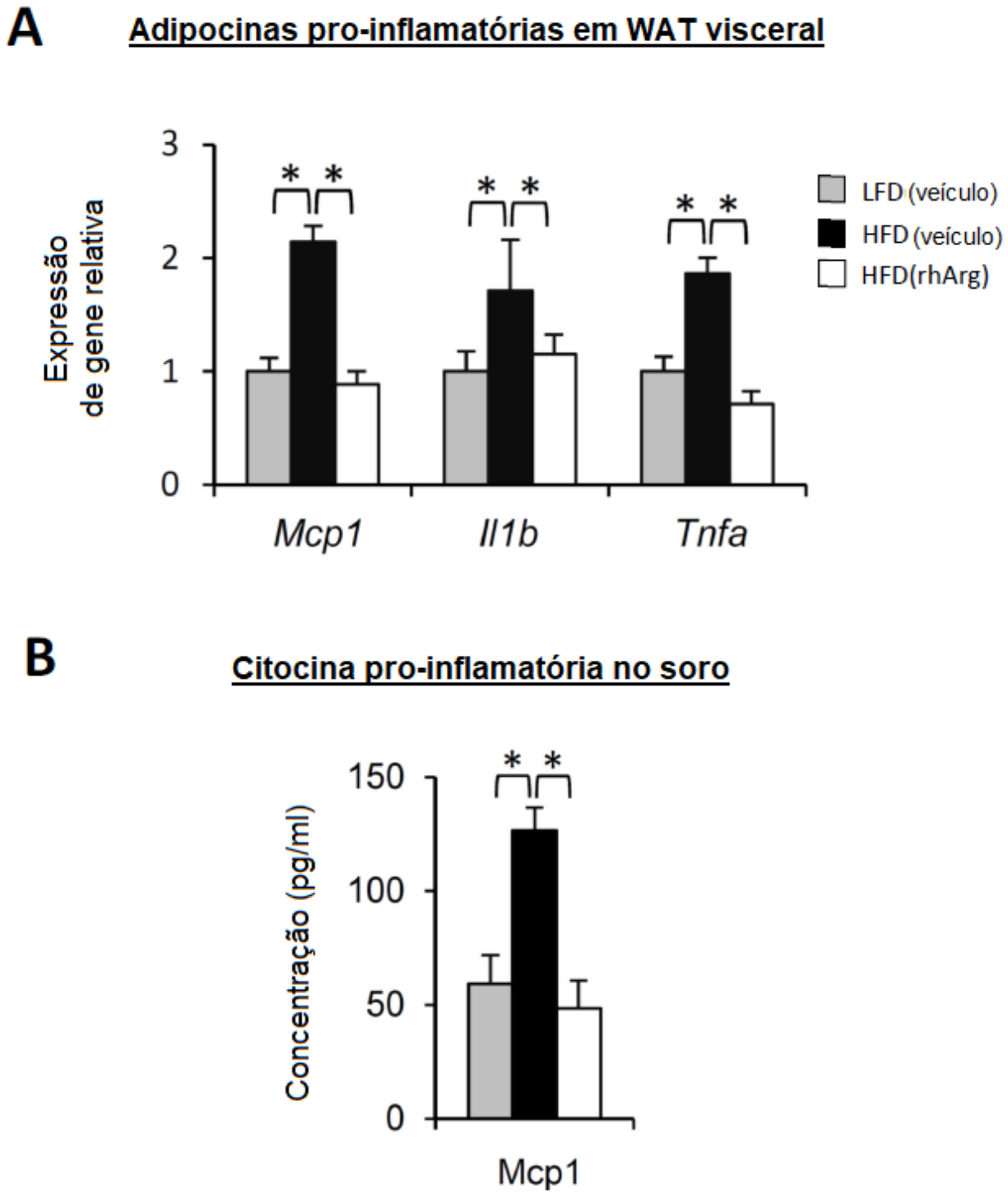

A
Adipocinas pro-inflamatórias em WAT visceral
Expressão de gene relativa
3
2
1
0
* *
* *
* *
Mcp1
Il1b
Tnfa
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
B
Citocina pro-inflamatória no soro
Concentração (pg/ml)
150
100
50
0
* *
Mcp1

FIG. 34

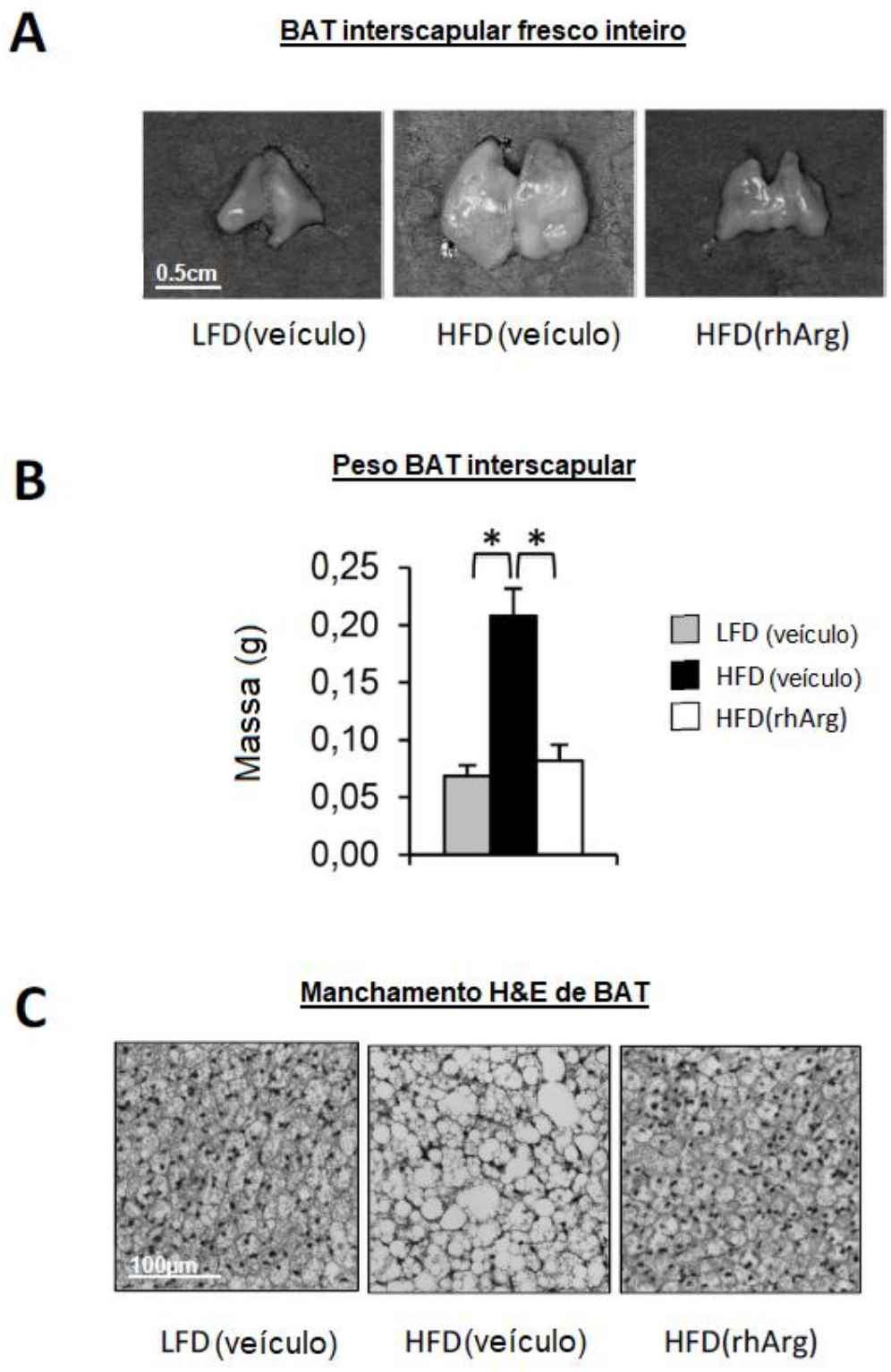

A
BAT interscapular fresco inteiro
0.5cm
LFD(veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
B
Peso BAT interscapular
Massa (g)
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
* *
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
C
Manchamento H&E de BAT
100µm
LFD (veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 35

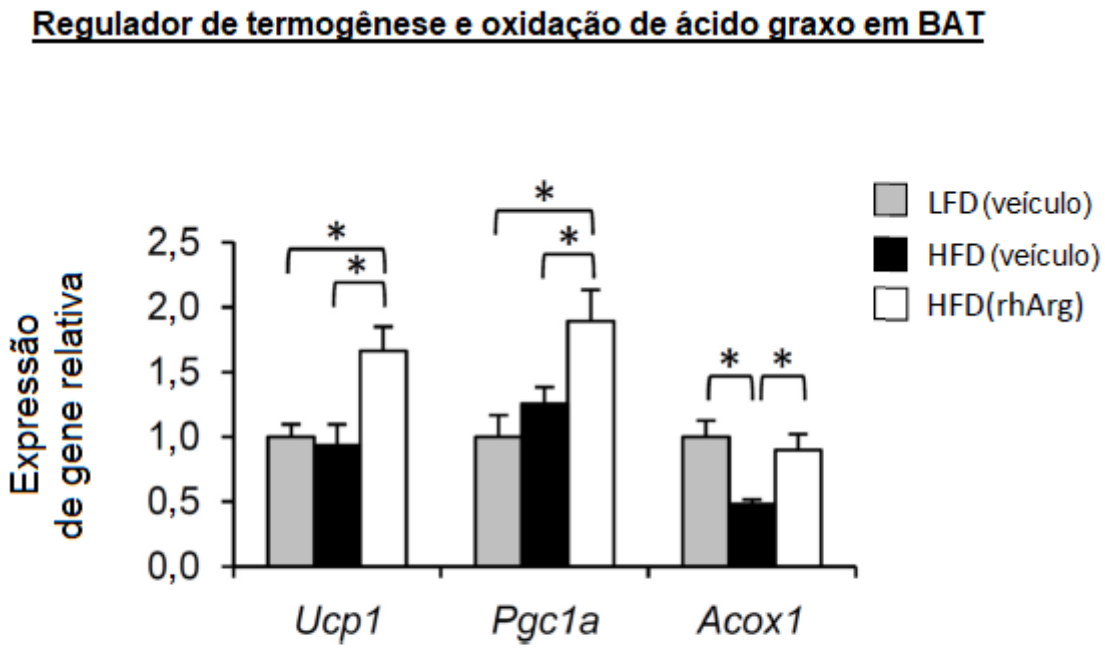
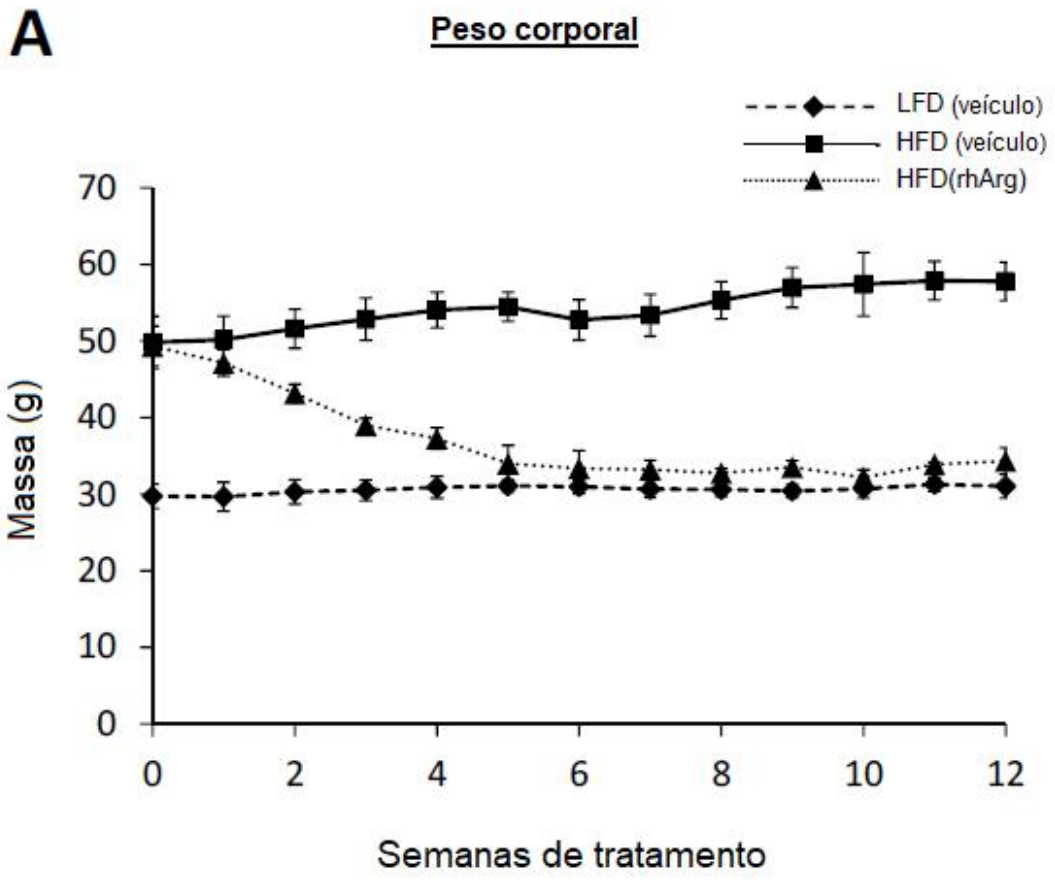

Regulador de termogênese e oxidação de ácido graxo em BAT
Expressão de gene relativa
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
*
*
*
*
*
Ucp1
Pgc1a
Acox1
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 36


A
Peso corporal
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Massa (g)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
Semanas de tratamento

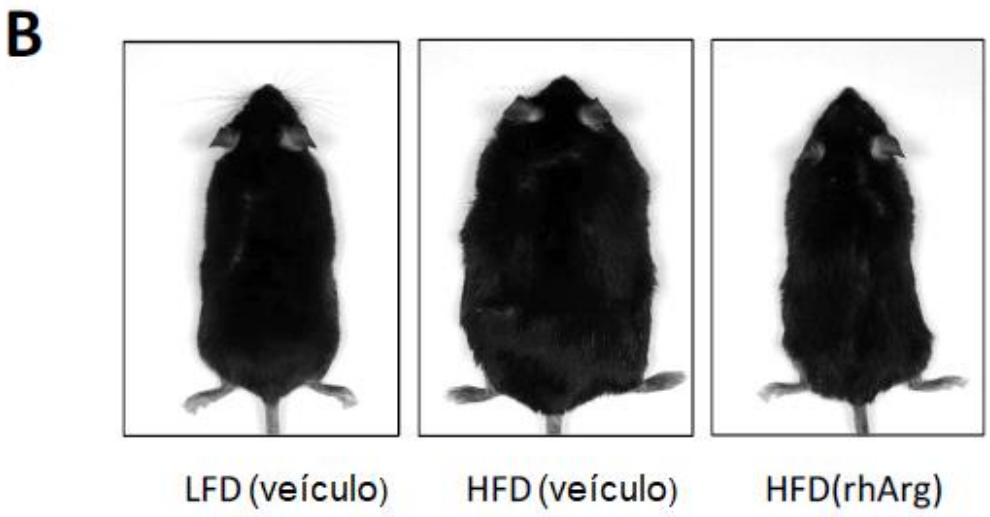
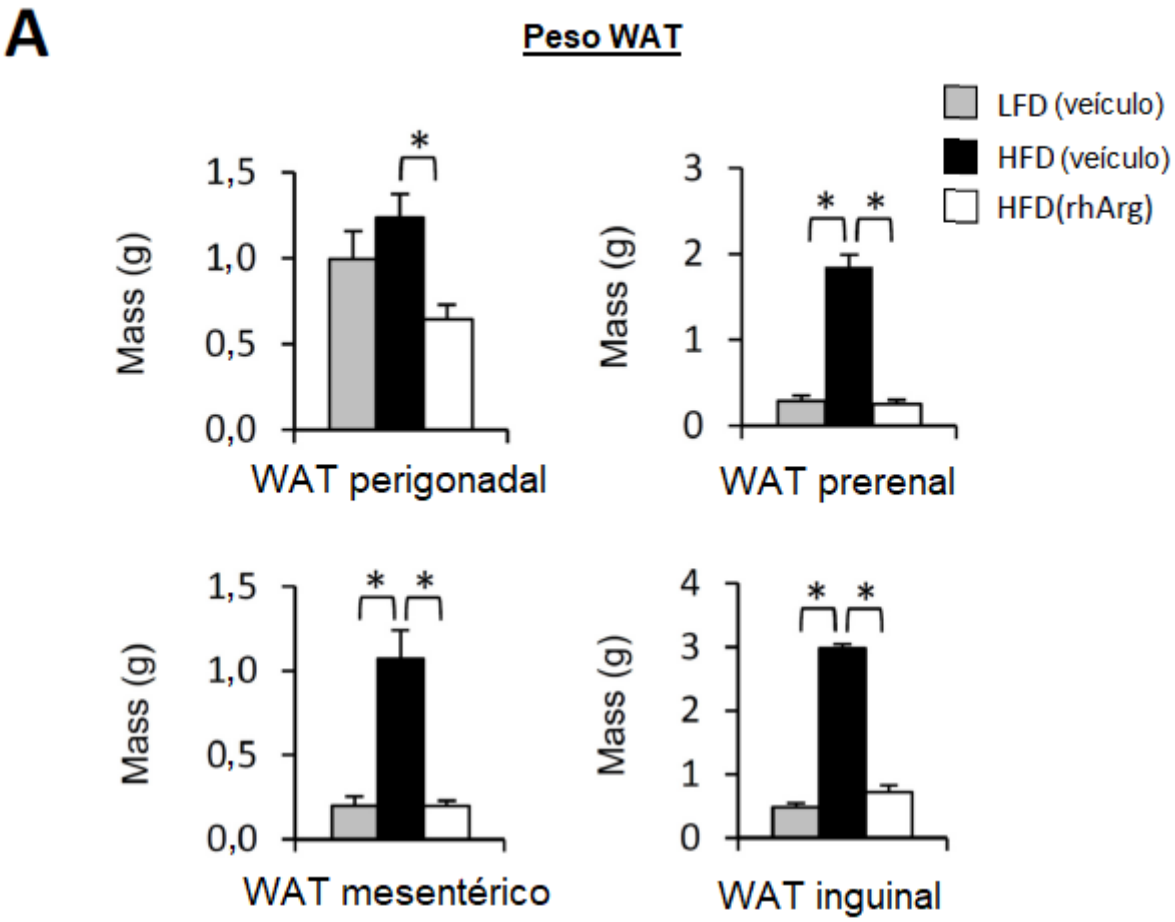

B
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 37


A
Peso WAT
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Mass (g)
1,5
1,0
0,5
0,0
WAT perigonadal
3
2
1
0
WAT prerenal
WAT mesentérico
4
WAT inguinal
*

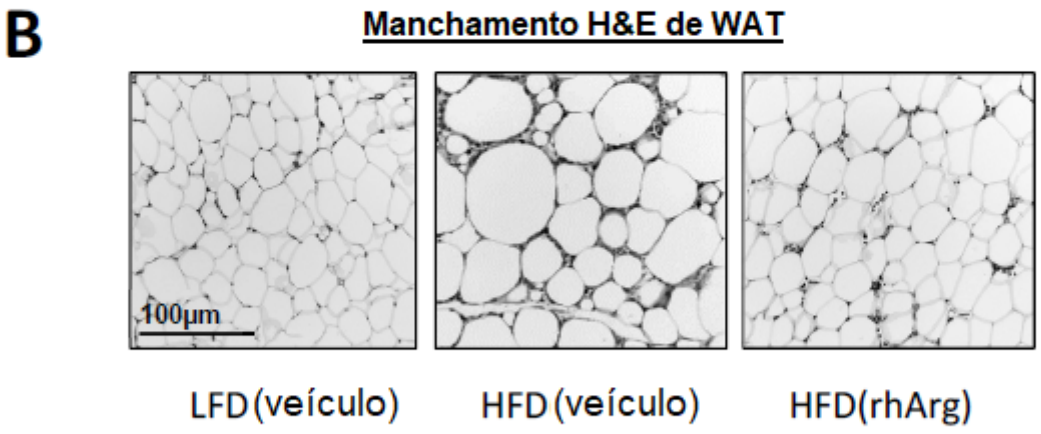

B
Manchamento H&E de WAT
100µm
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 38

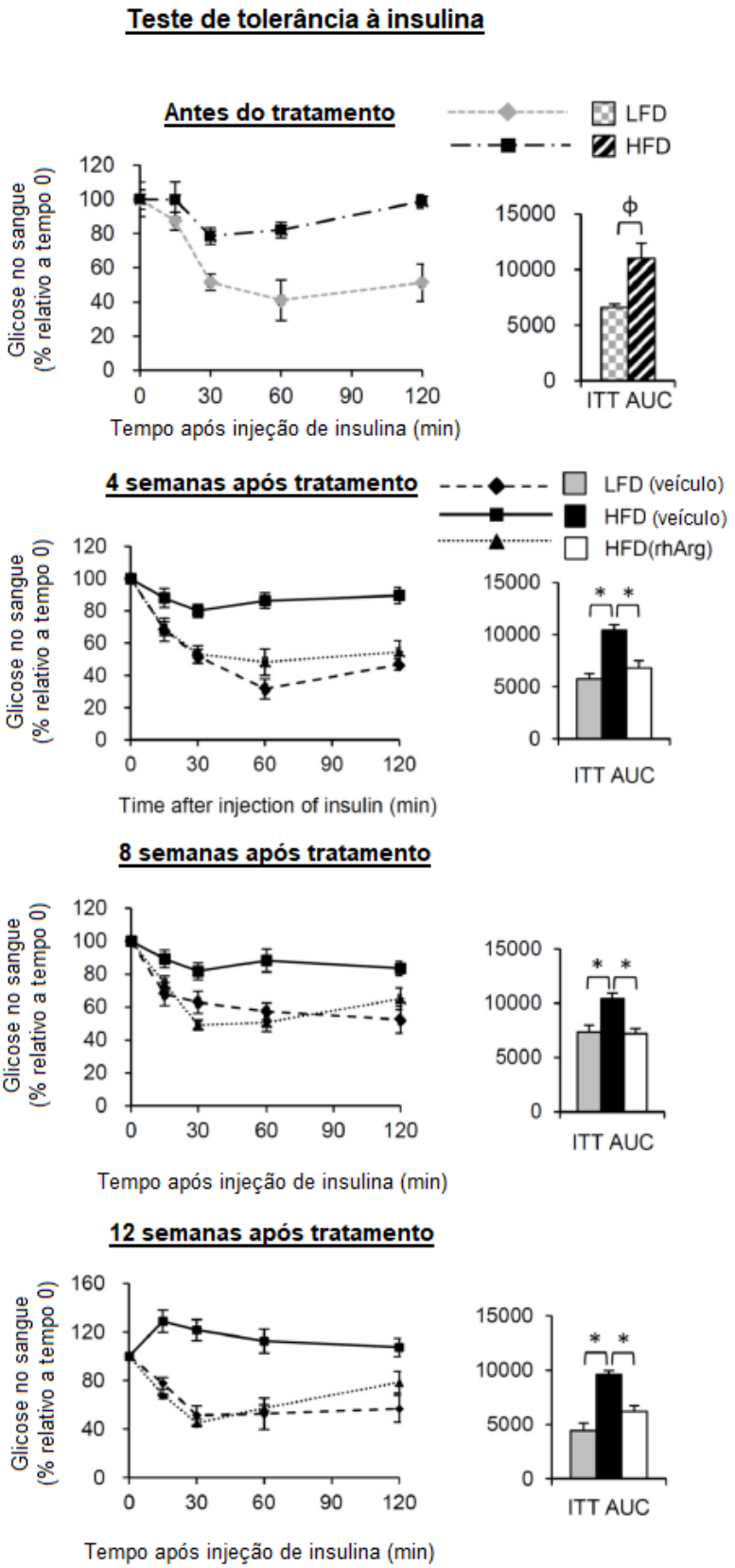

Teste de tolerância à insulina
Antes do tratamento
LFD
HFD
Glicose no sangue (% relativo a tempo 0)
Tempo após injeção de insulina (min)
ITT AUC
Φ
4 semanas após tratamento
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Time after injection of insulin (min)
8 semanas após tratamento
Tempo após injeção de insulina (min)
12 semanas após tratamento
Tempo após injeção de insulina (min)

FIG. 39

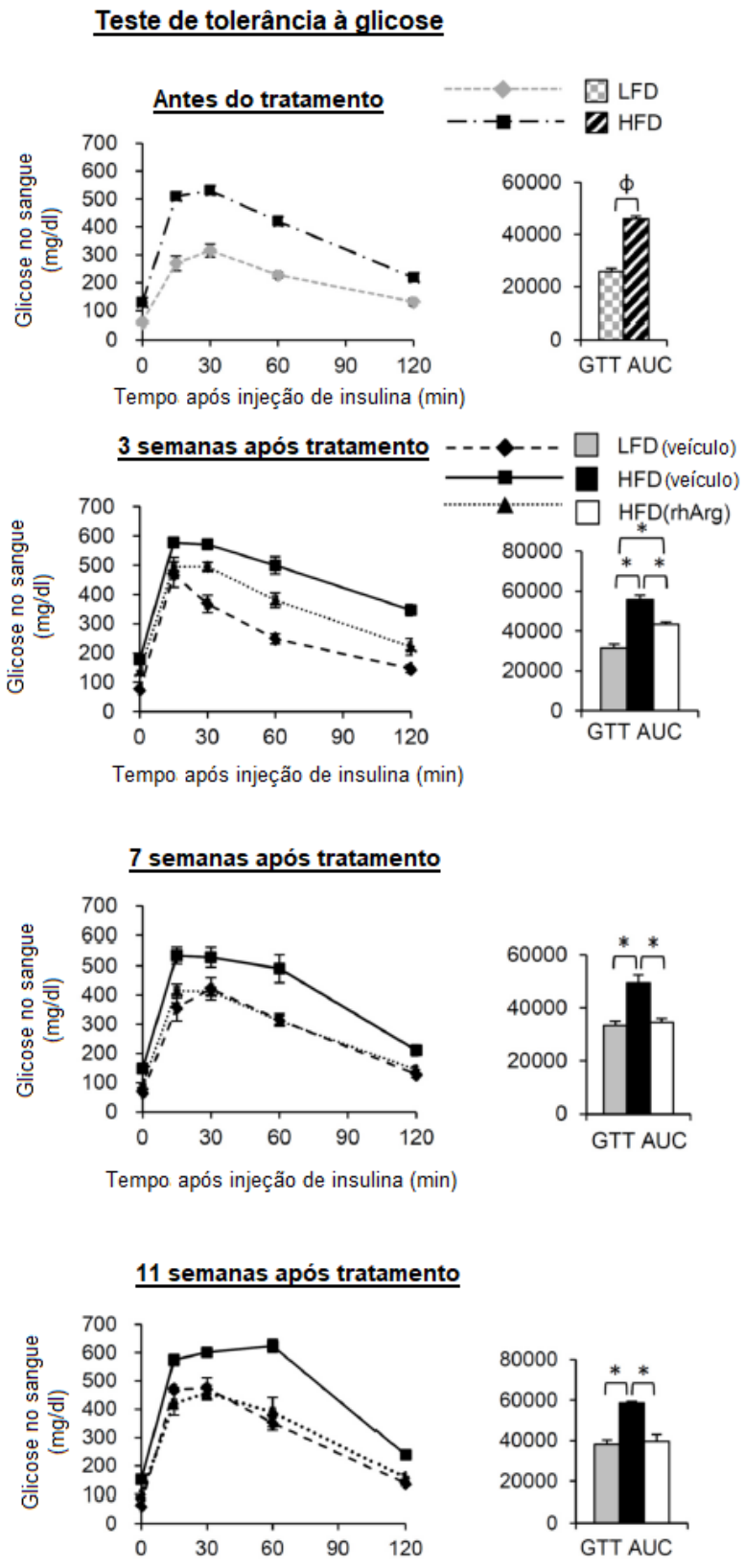

Teste de tolerância à glicose
Antes do tratamento
LFD
HFD
Glicose no sangue (mg/dl)
Tempo após injeção de insulina (min)
GTT AUC
ϕ
3 semanas após tratamento
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
7 semanas após tratamento
11 semanas após tratamento

FIG. 40

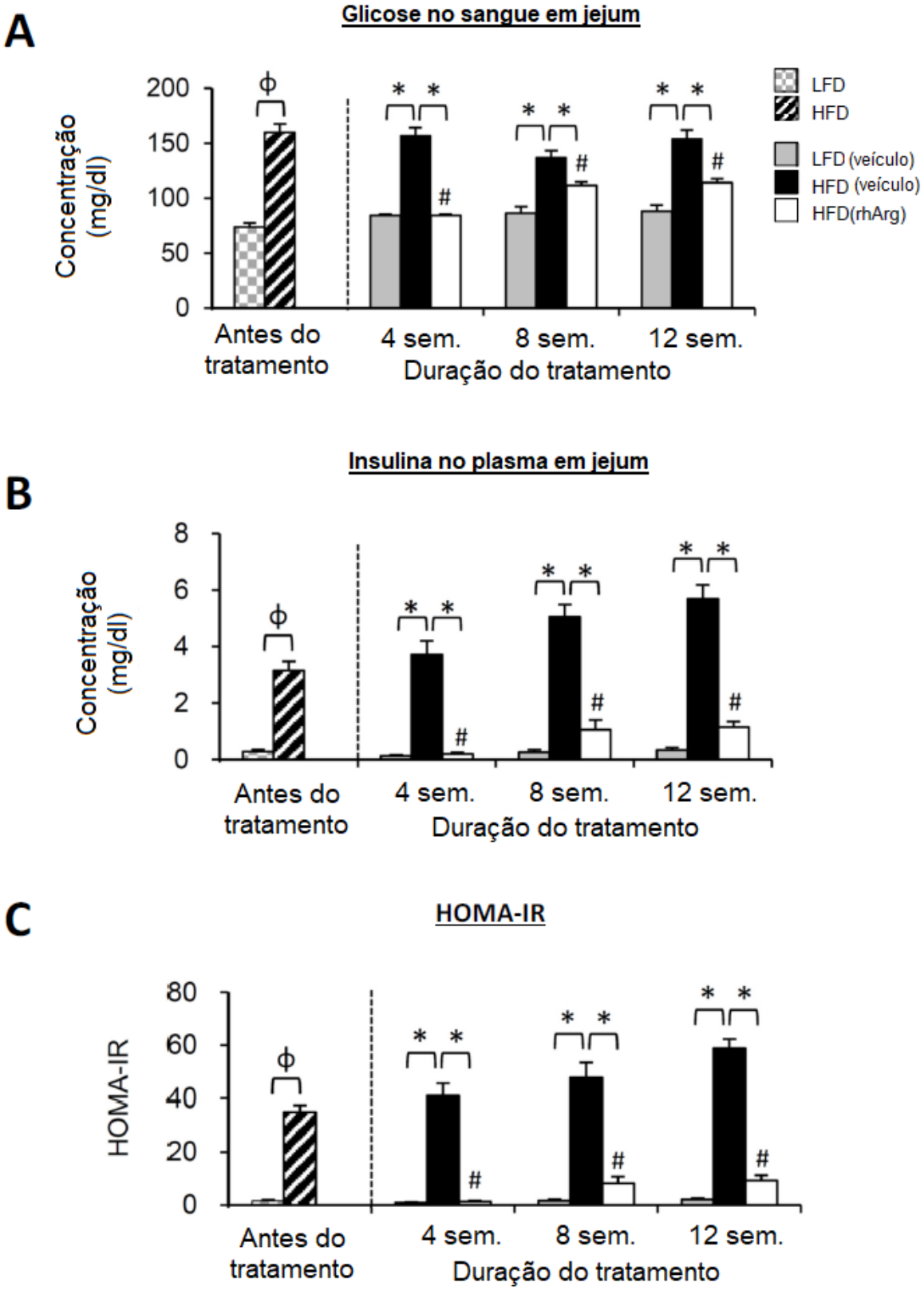

A
Glicose no sangue em jejum
Concentração (mg/dl)
200
150
100
50
0
ϕ
* *
#
LFD
HFD
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Antes do tratamento
4 sem.
8 sem.
12 sem.
Duração do tratamento
B
Insulina no plasma em jejum
Concentração (mg/dl)
8
6
4
2
0
C
HOMA-IR
80
60
40
20
0

FIG. 41

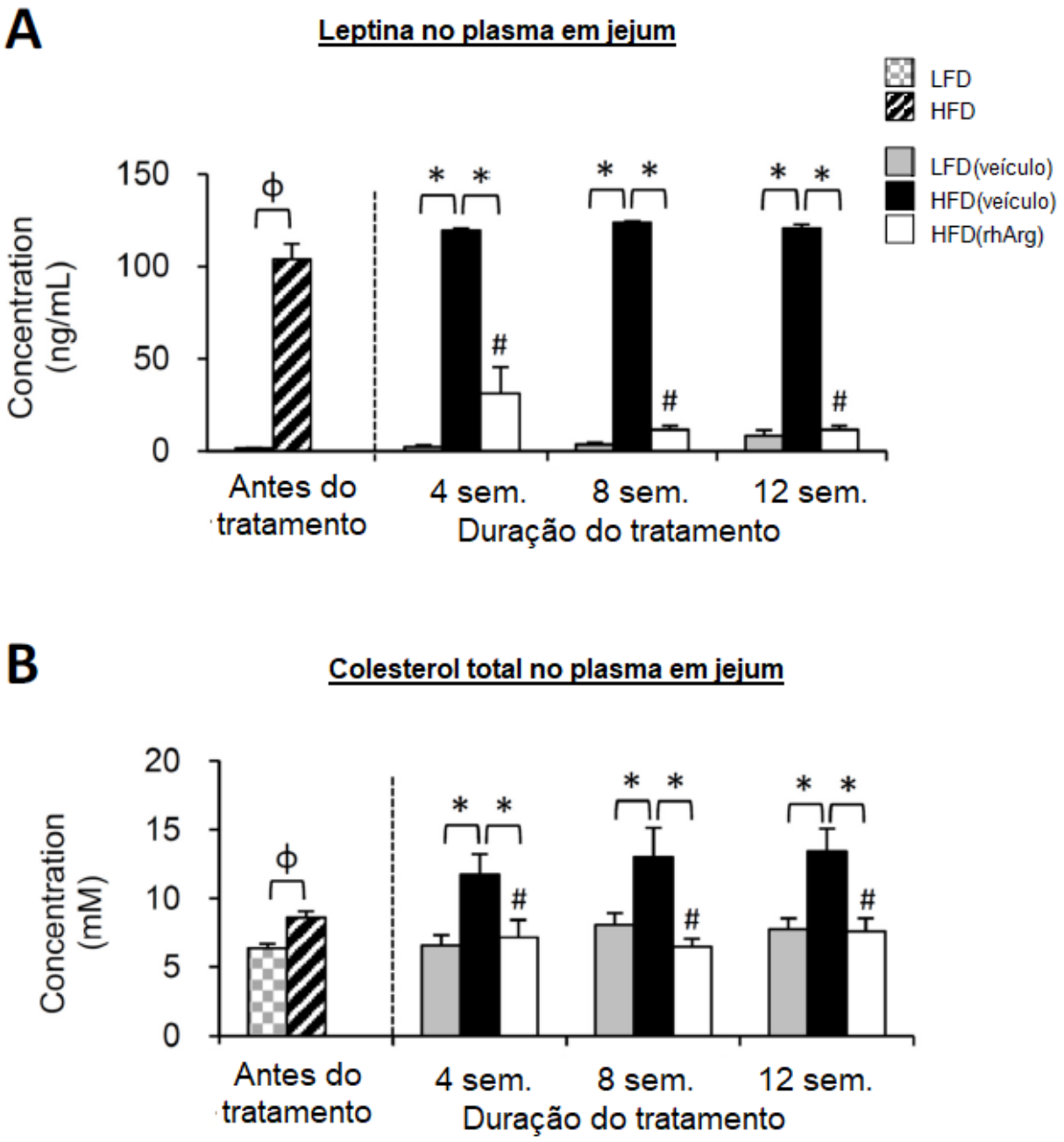

A
Leptina no plasma em jejum
LFD
HFD
LFD(veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)
Concentration (ng/mL)
150
100
50
0
ϕ
* *
#
Antes do tratamento
4 sem.
8 sem.
12 sem.
Duração do tratamento
B
Colesterol total no plasma em jejum
Concentration (mM)
20
15
10
5
0
ϕ
* *
#
Antes do tratamento
4 sem.
8 sem.
12 sem.
Duração do tratamento

FIG. 42

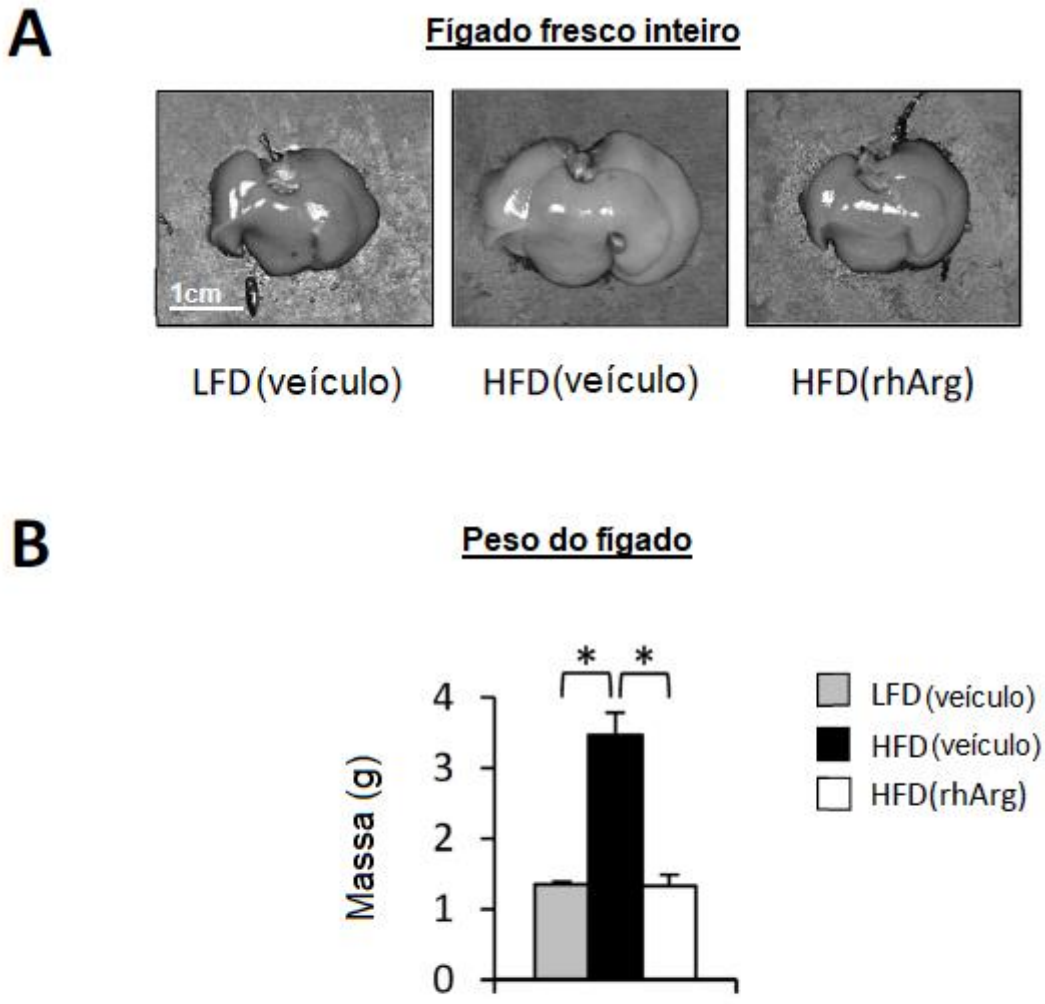

A
Fígado fresco inteiro
1cm
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD (rhArg)
B
Peso do fígado
Massa (g)
0
1
2
3
4
*
*
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD (rhArg)

FIG. 43

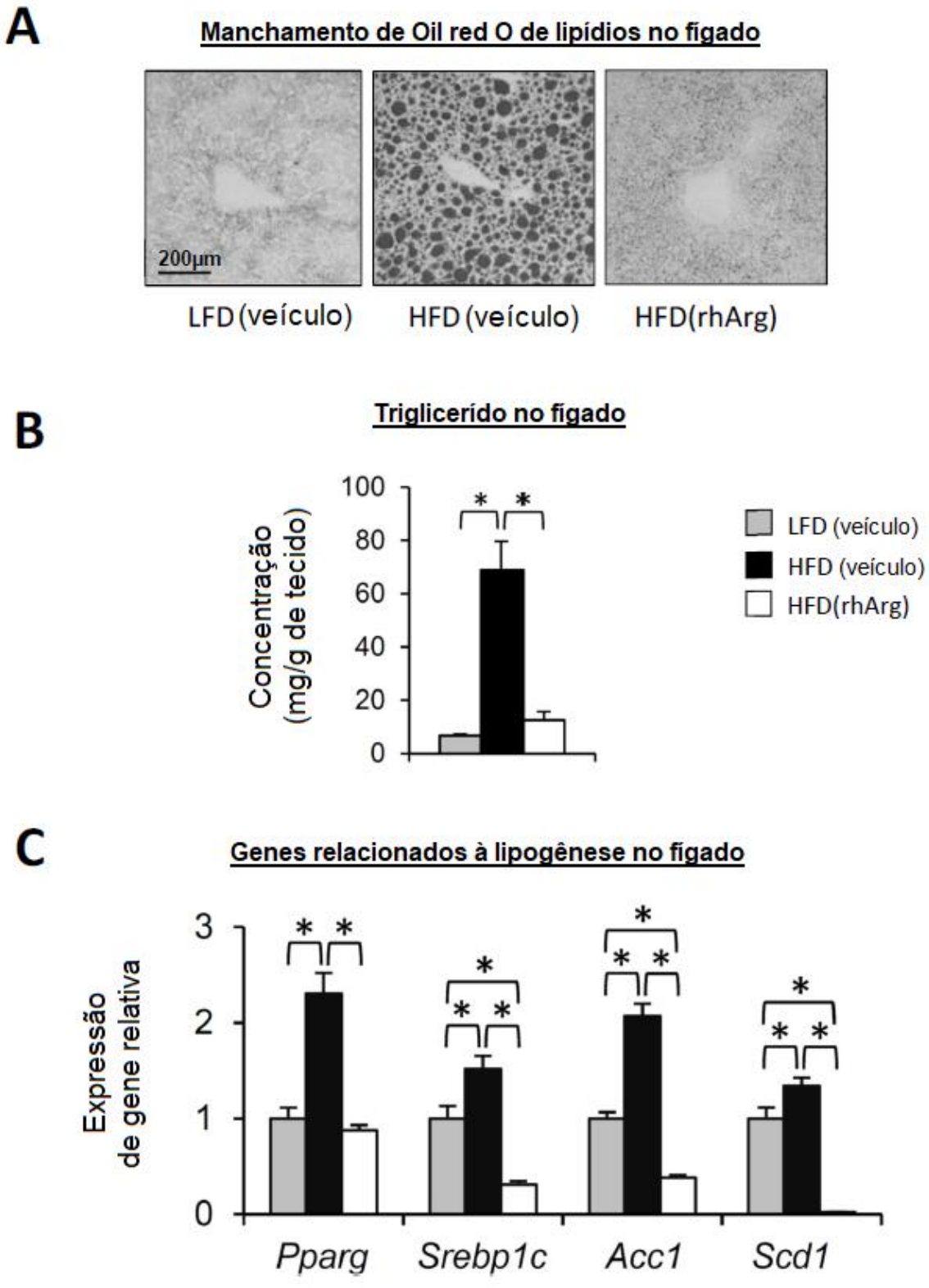

A
Manchamento de Oil red O de lipídios no fígado
200µm
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
B
Triglicerído no fígado
Concentração (mg/g de tecido)
100
80
60
40
20
0
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
C
Genes relacionados à lipogênese no fígado
Expressão de gene relativa
3
2
1
0
Pparg
Srebp1c
Acc1
Scd1

FIG. 44

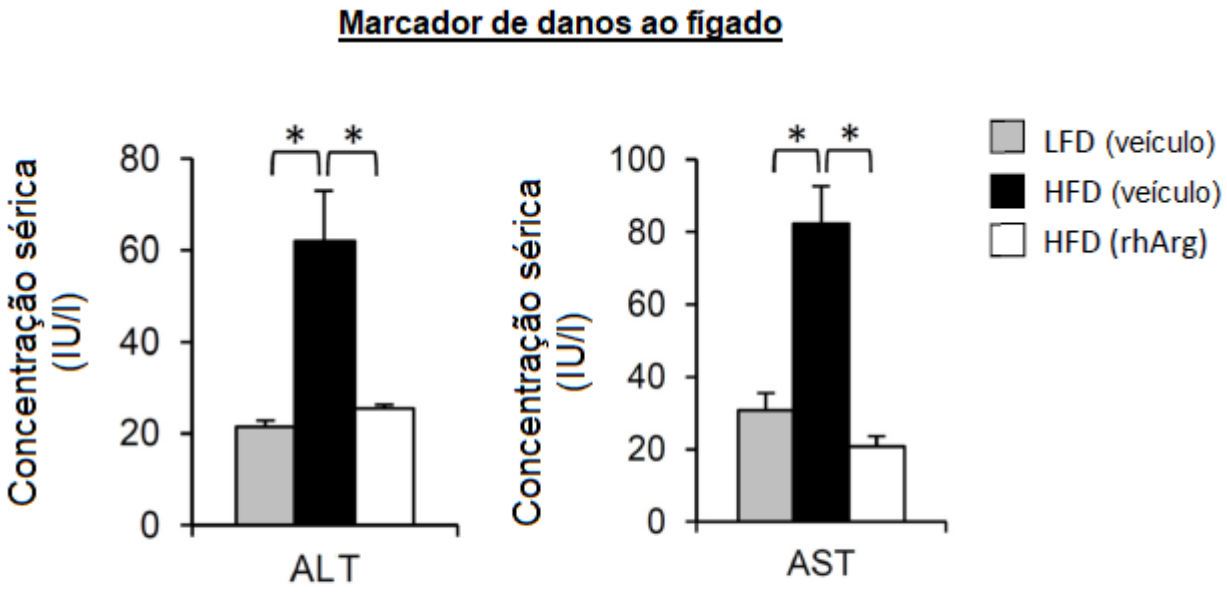

Marcador de danos ao fígado
Concentração sérica (IU/l)
80
60
40
20
0
ALT
*
*
Concentração sérica (IU/l)
100
80
60
40
20
0
AST
*
*
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD (rhArg)

FIG. 45

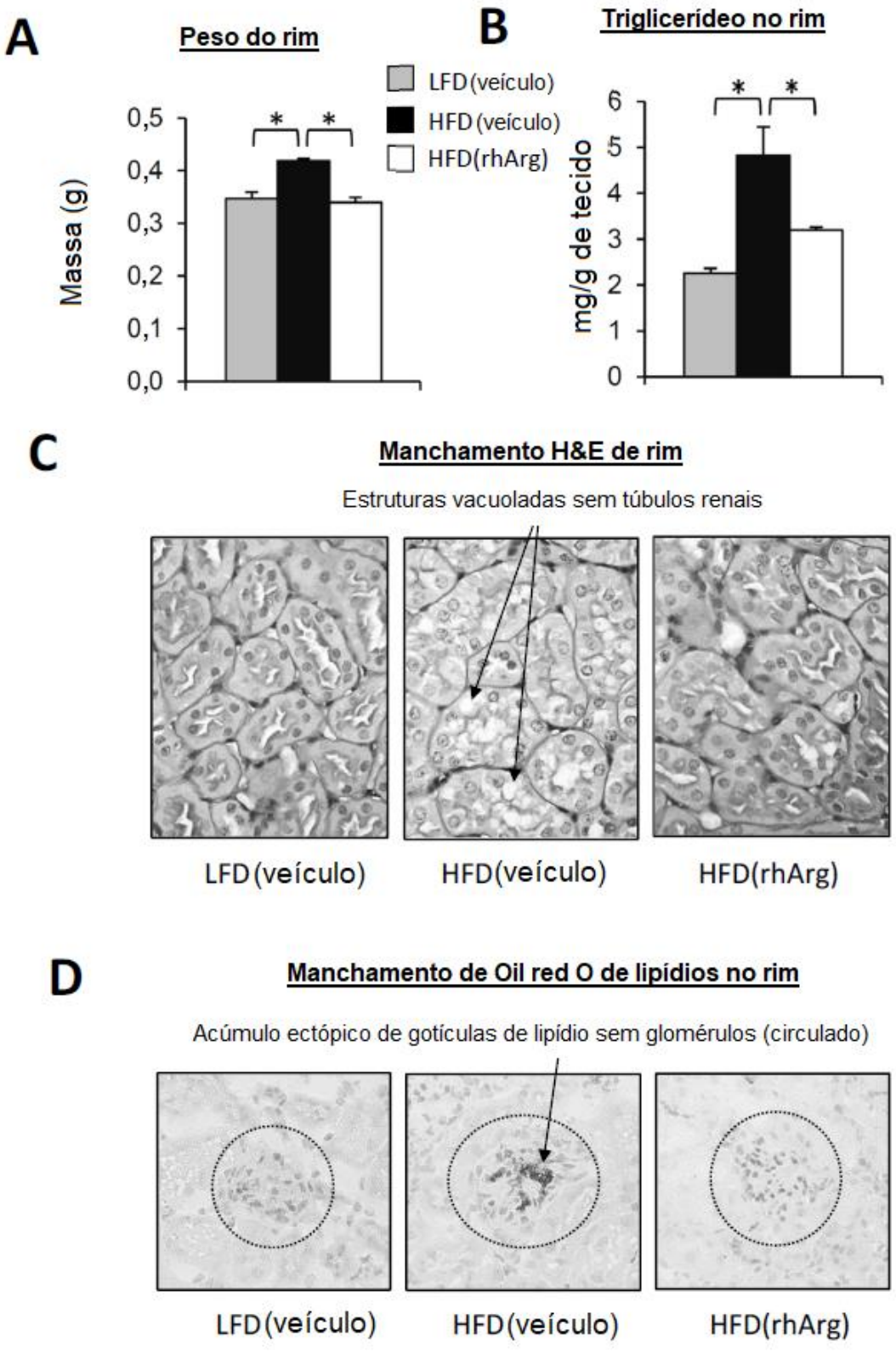
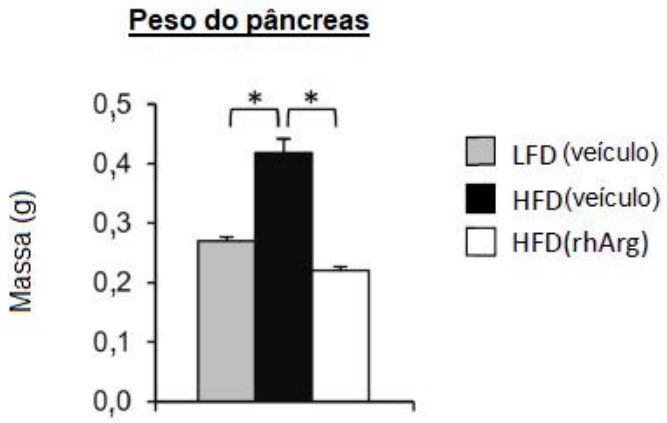
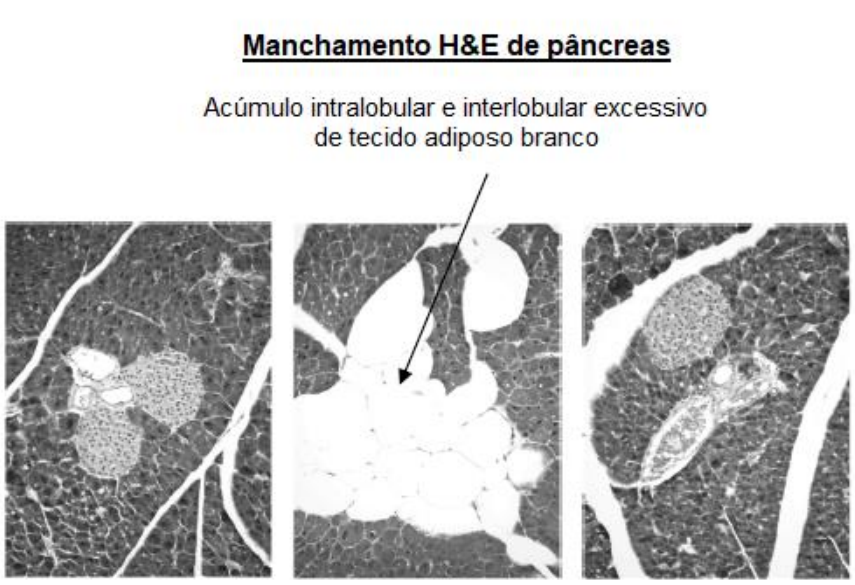

A
Peso do rim
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)
Massa (g)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
*
B
Triglicerídeo no rim
mg/g de tecido
6
5
4
3
2
1
0
*
*
C
Manchamento H&E de rim
Estruturas vacuoladas sem túbulos renais
LFD (veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)
D
Manchamento de Oil red O de lipídios no rim
Acúmulo ectópico de gotículas de lipídio sem glomérulos (circulado)
LFD (veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)

**FIG. 46**

A


Peso do pâncreas
Massa (g)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
*
LFD (veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)

B


Manchamento H&E de pâncreas
Acúmulo intralobular e interlobular excessivo
de tecido adiposo branco

C

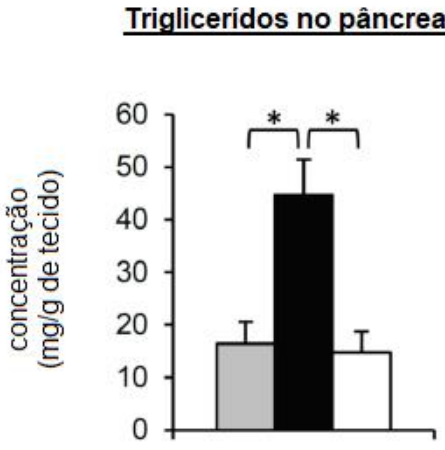

Triglicerídos no pâncreas
concentração
(mg/g de tecido)
60
50
40
30
20
10
0
*
*

FIG. 47

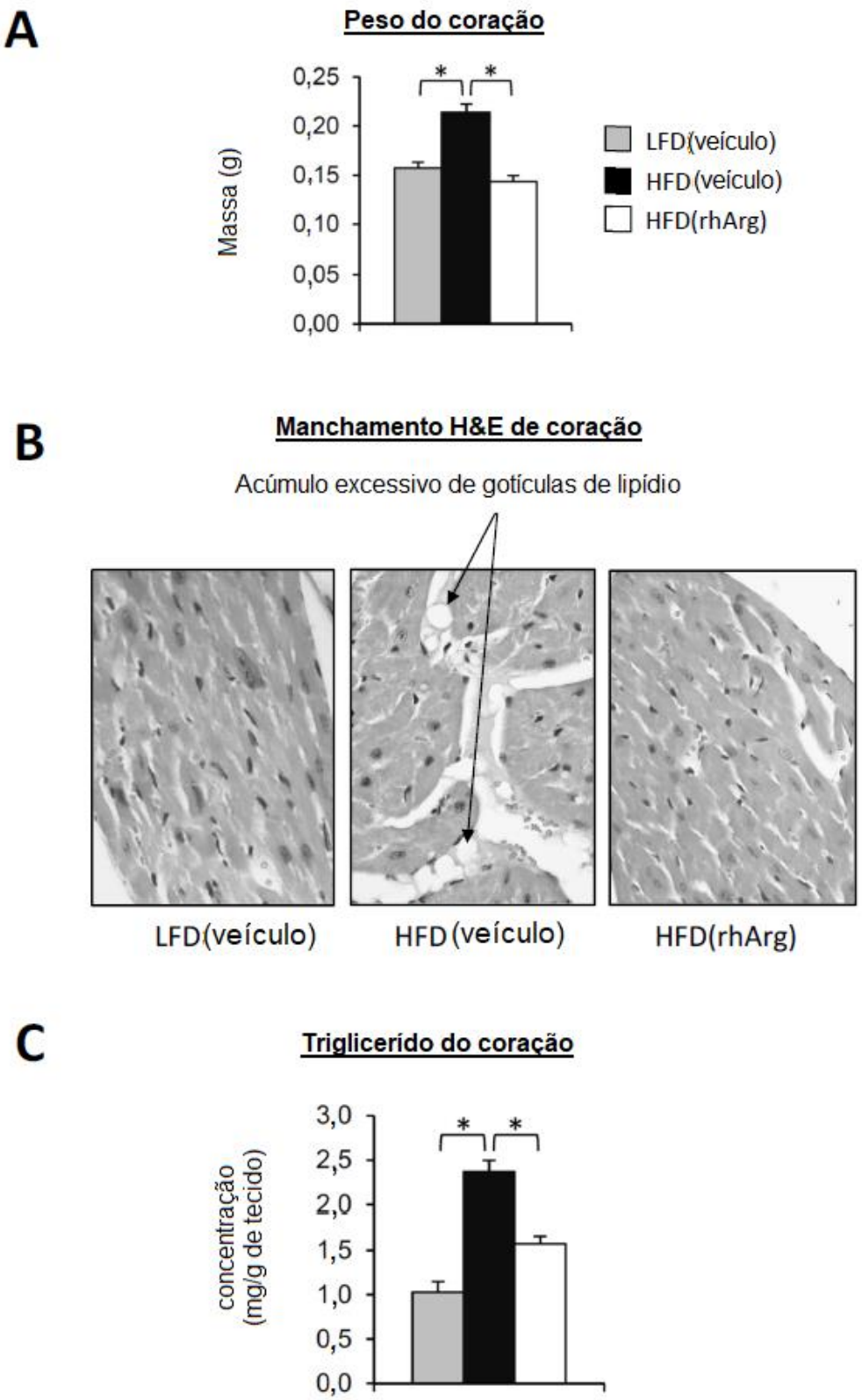

A
Peso do coração
Massa (g)
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
*
*
LFD(veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)
B
Manchamento H&E de coração
Acúmulo excessivo de gotículas de lipídio
LFD(veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)
C
Triglicerído do coração
concentração (mg/g de tecido)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
*

FIG. 48

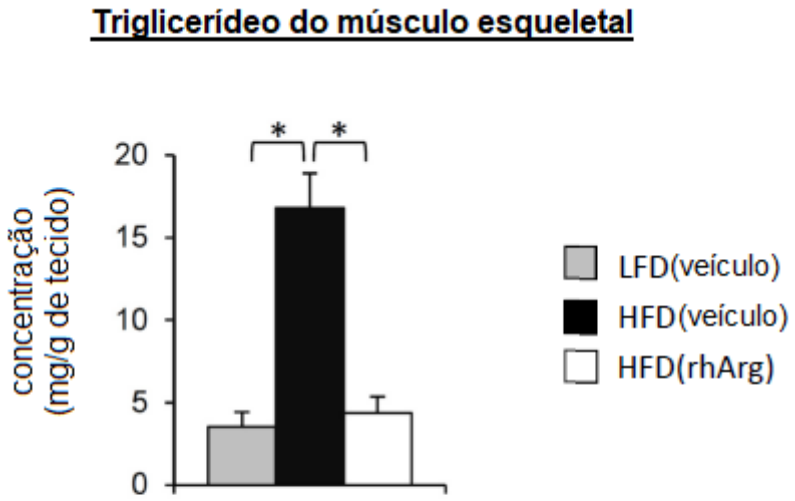
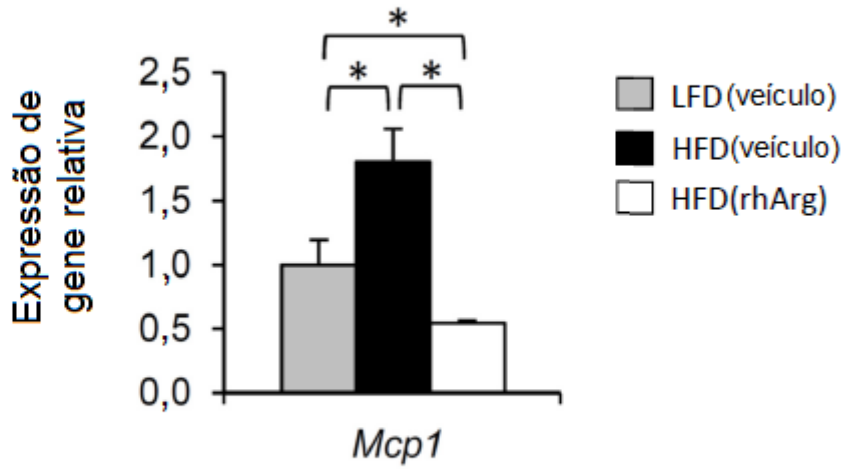

Triglicerídeo do músculo esqueletal
concentração (mg/g de tecido)
20
15
10
5
0
*
*
LFD(veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 49

**A**


Adipocina pro-inflamatória em WAT visceral
Expressão de gene relativa
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
*
*
Mcp1
LFD (veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)

**B**

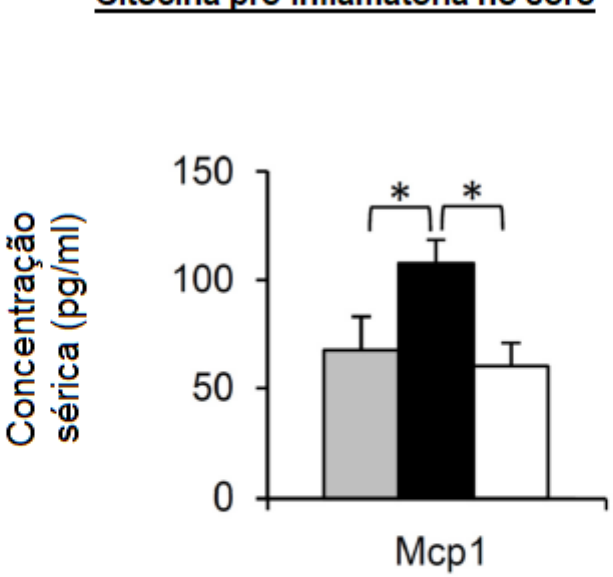

Citocina pro-inflamatória no soro
Concentração sérica (pg/ml)
150
100
50
0
*
*
Mcp1

**FIG. 50**

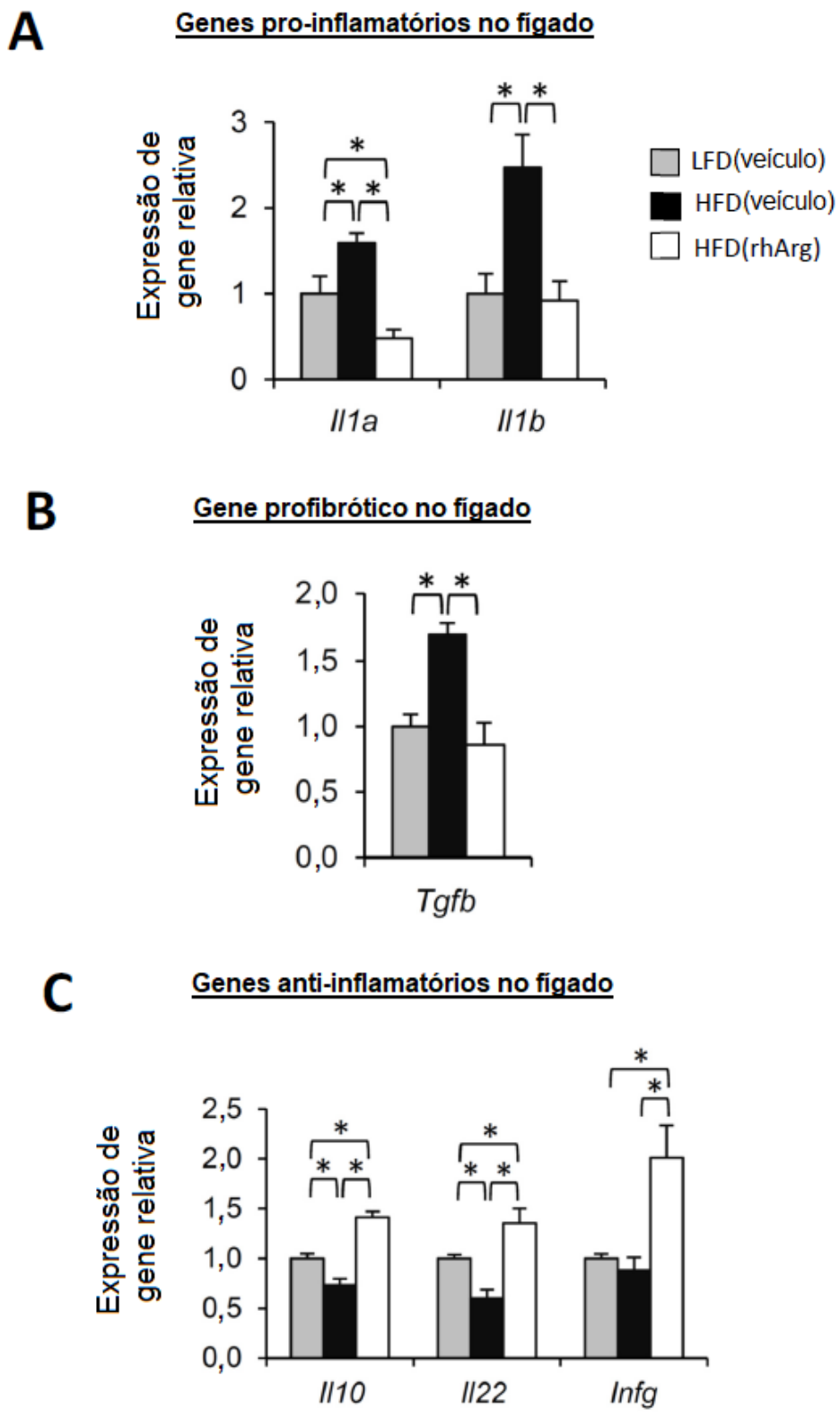
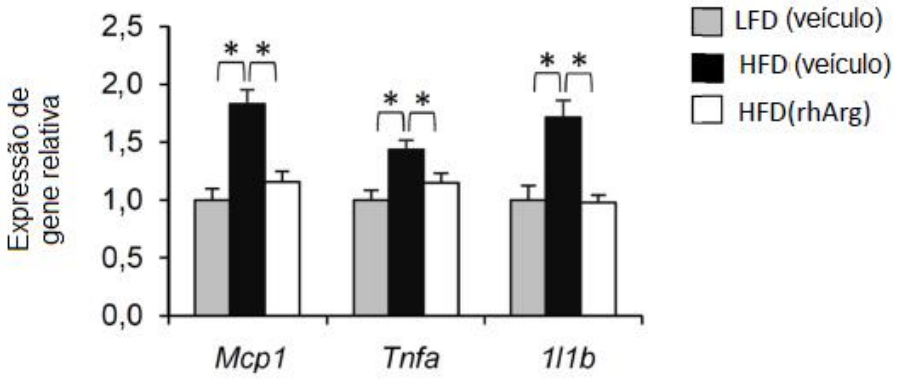

A
Genes pro-inflamatórios no fígado
Expressão de gene relativa
3
2
1
0
*
* *
* *
Il1a
Il1b
LFD(veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)
B
Gene profibrótico no fígado
Expressão de gene relativa
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
* *
Tgfb
C
Genes anti-inflamatórios no fígado
Expressão de gene relativa
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Il10
Il22
Infg

FIG. 51

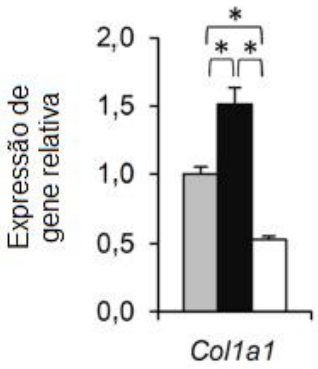
**A**

**Genes pro-inflamatórios no rim**




**B**

**Gene profibrótico no rim**




**C**

**Manchamento de Sirius red de fibras de colágeno**

Depósito excessivo de fibras de colágeno ao redor de túbulos renais e glomérulos hipertróficos (g)

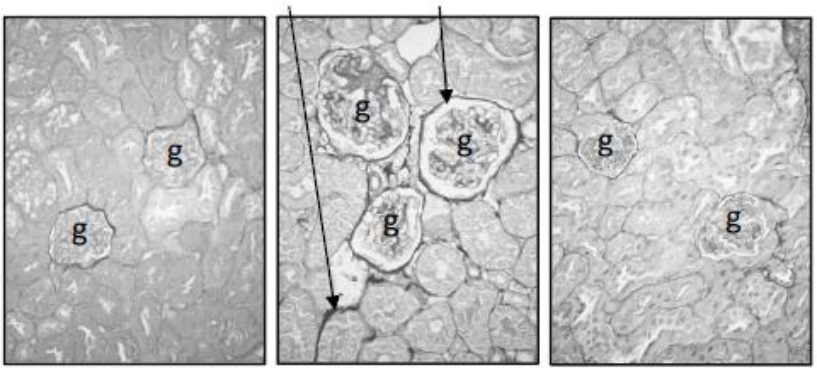
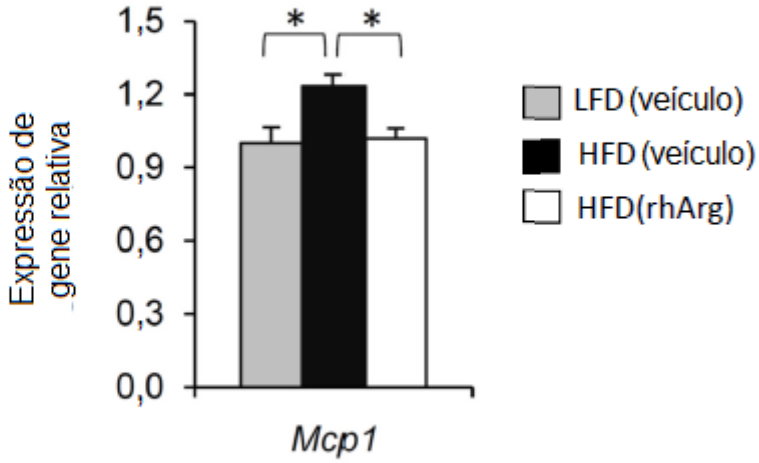



**FIG. 52**

**A** **Genes pro-inflamatórios no pâncreas**




**B** **Genes profibróticos no pâncreas**

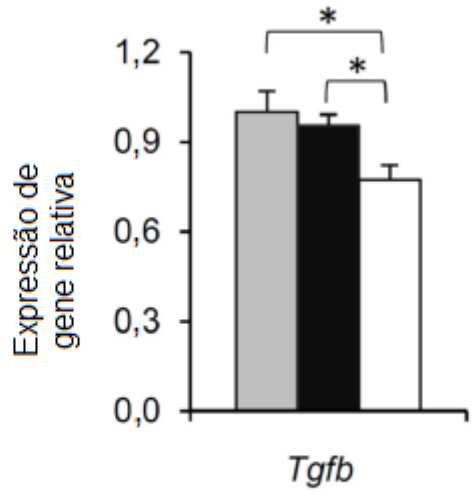
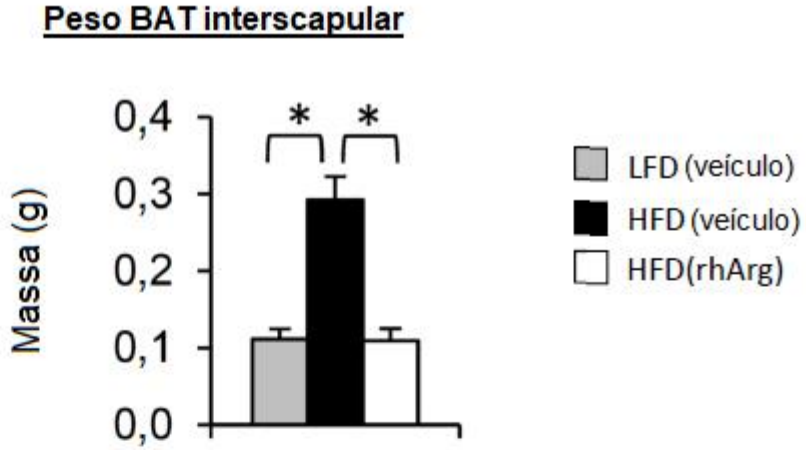
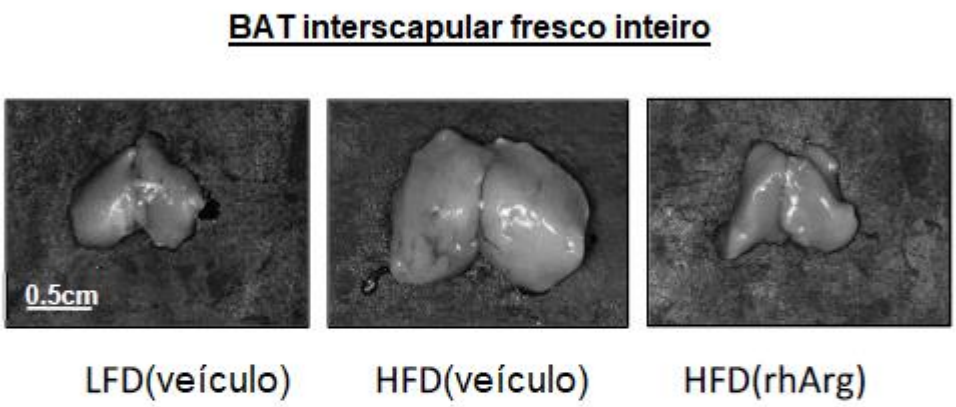



**FIG. 53**

A


Peso BAT interscapular
Massa (g)
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
*
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

B


BAT interscapular fresco inteiro
0.5cm
LFD(veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)

C

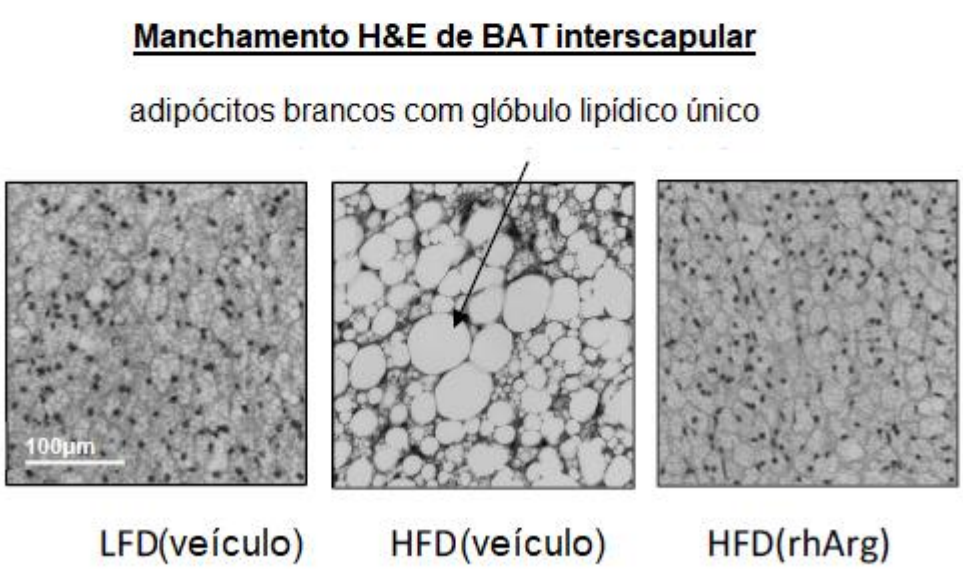
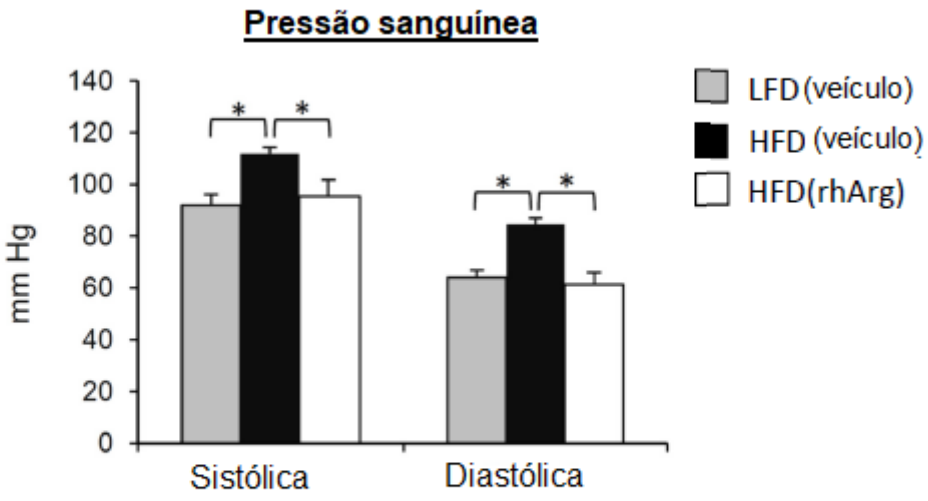

Manchamento H&E de BAT interscapular
adipócitos brancos com glóbulo lipídico único
100µm
LFD(veículo)
HFD(veículo)
HFD(rhArg)

FIG. 54

A


Pressão sanguínea
140
120
100
80
60
40
20
0
mm Hg
*
*
*
*
Sistólica
Diastólica
LFD (veículo)
HFD (veículo)
HFD(rhArg)

B

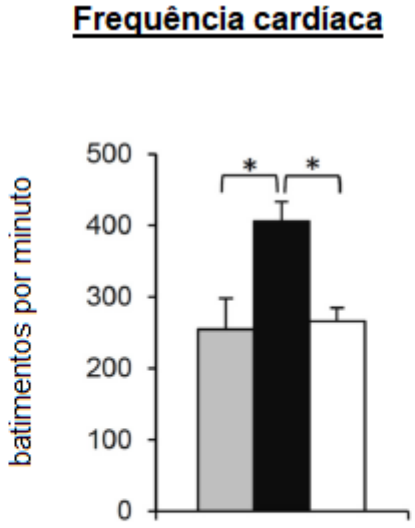

Frequência cardíaca
500
400
300
200
100
0
batimentos por minuto
*
*

FIG. 55

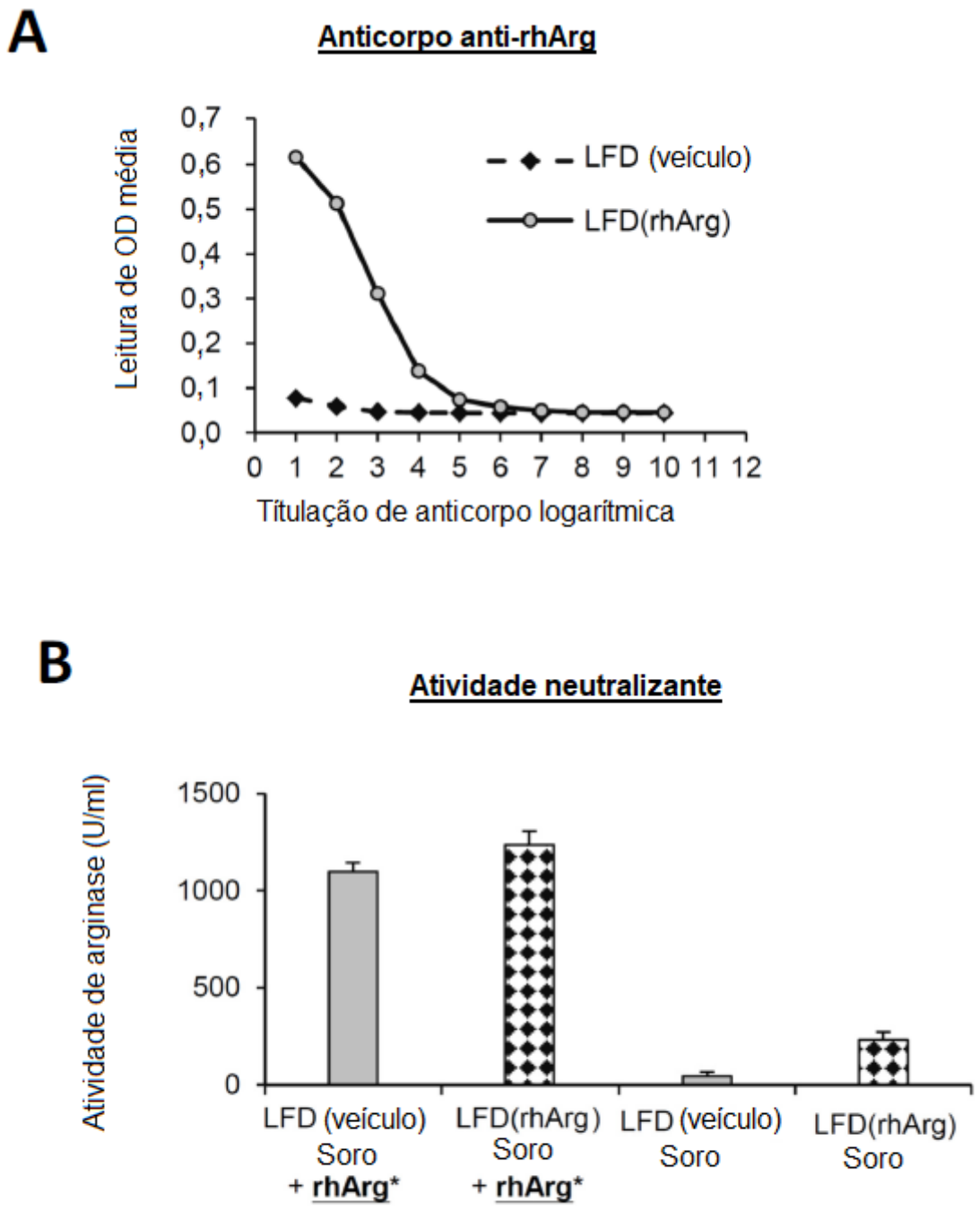

A
Anticorpo anti-rhArg
Leitura de OD média
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
LFD (veículo)
LFD(rhArg)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Titulação de anticorpo logarítmica
B
Atividade neutralizante
Atividade de arginase (U/ml)
1500
1000
500
0
LFD (veículo) Soro + rhArg*
LFD(rhArg) Soro + rhArg*
LFD (veículo) Soro
LFD(rhArg) Soro

FIG. 56

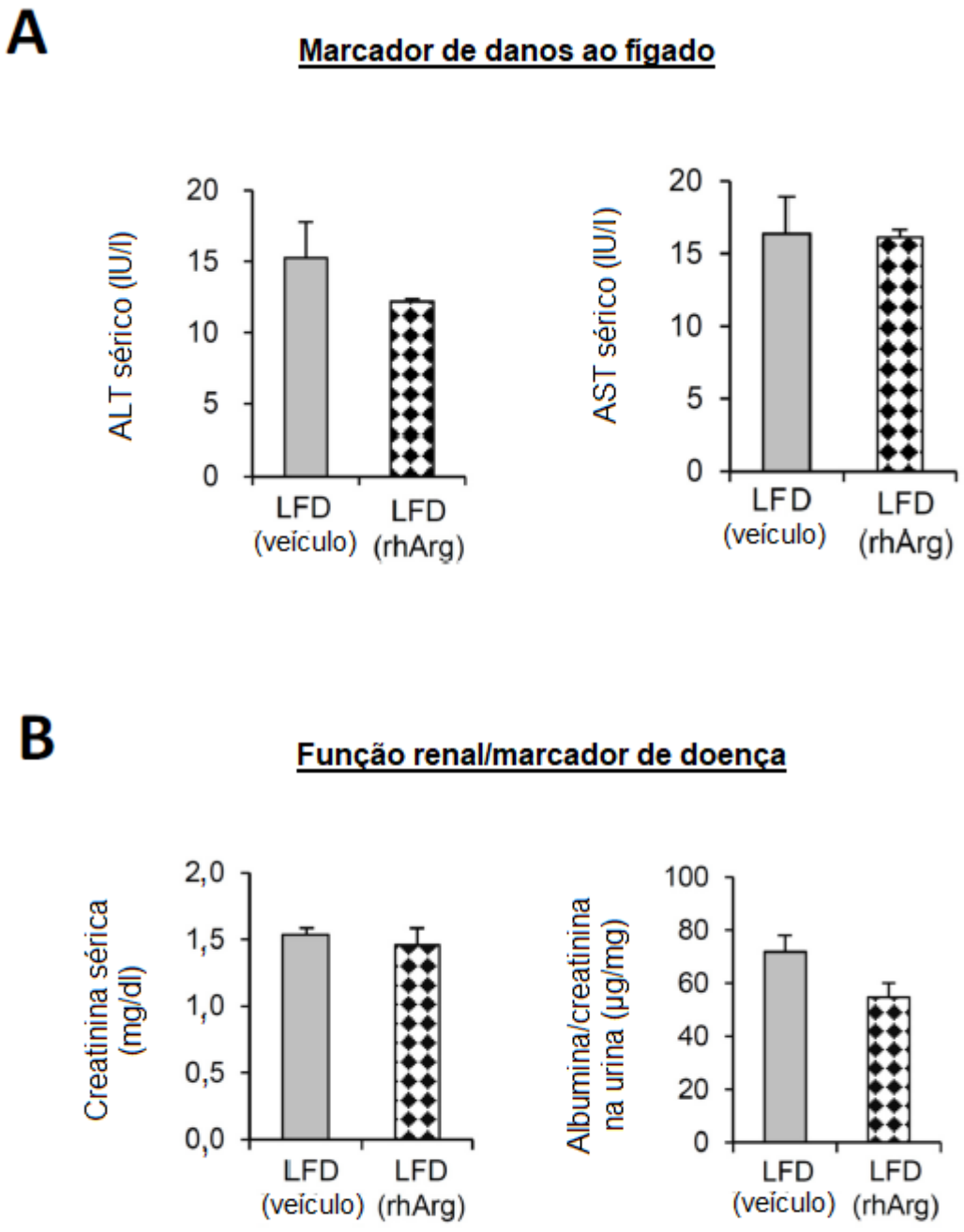

A
Marcador de danos ao fígado
ALT sérico (IU/l)
20
15
10
5
0
LFD (veículo)
LFD (rhArg)
AST sérico (IU/l)
20
15
10
5
0
LFD (veículo)
LFD (rhArg)
B
Função renal/marcador de doença
Creatinina sérica (mg/dl)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
LFD (veículo)
LFD (rhArg)
Albumina/creatinina na urina (µg/mg)
100
80
60
40
20
0
LFD (veículo)
LFD (rhArg)

FIG. 57

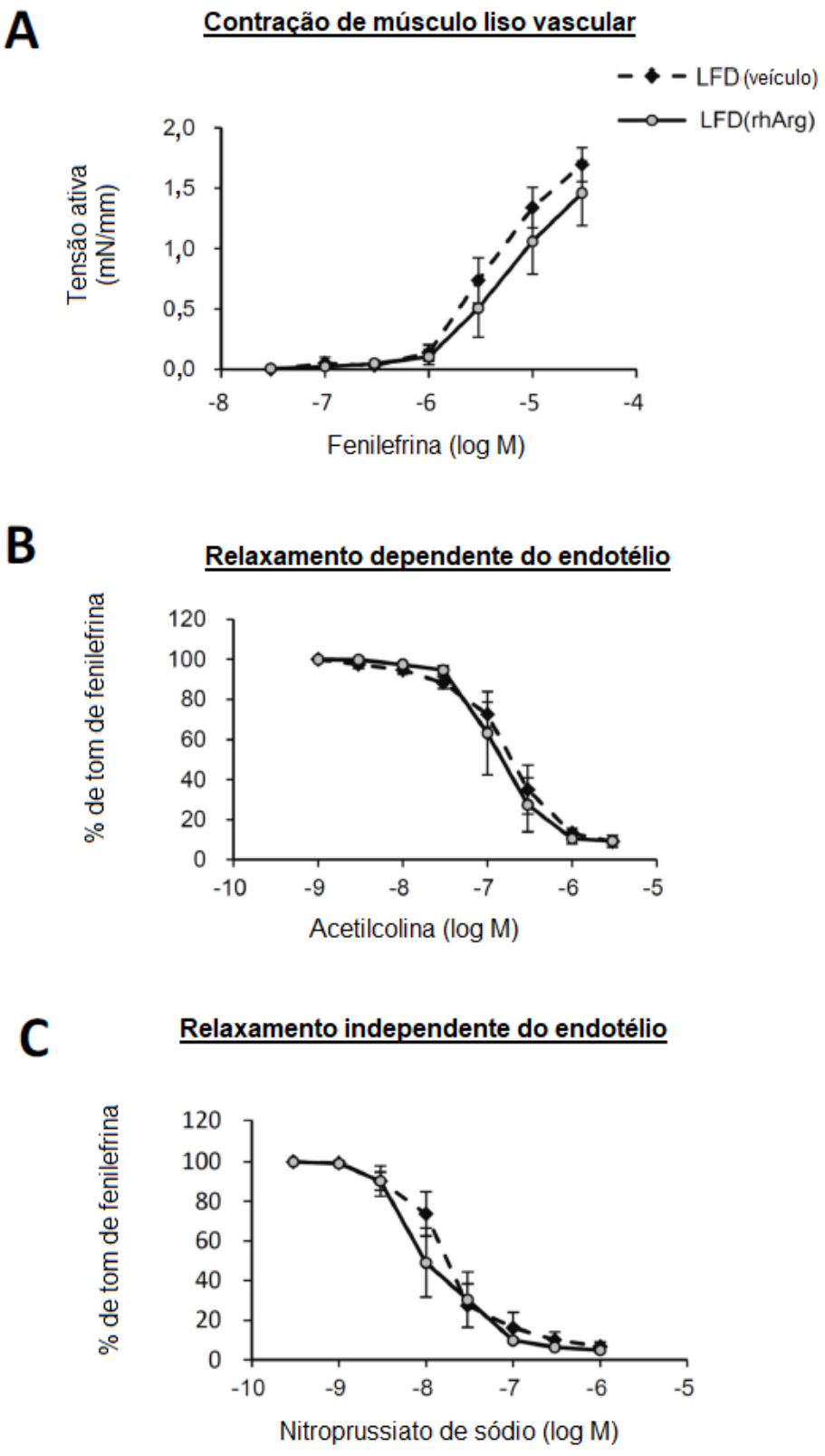

A
Contração de músculo liso vascular
LFD (veículo)
LFD(rhArg)
Tensão ativa (mN/mm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-8
-7
-6
-5
-4
Fenilefrina (log M)
B
Relaxamento dependente do endotélio
% de tom de fenilefrina
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
Acetilcolina (log M)
C
Relaxamento independente do endotélio
% de tom de fenilefrina
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
Nitroprussiato de sódio (log M)

FIG. 58

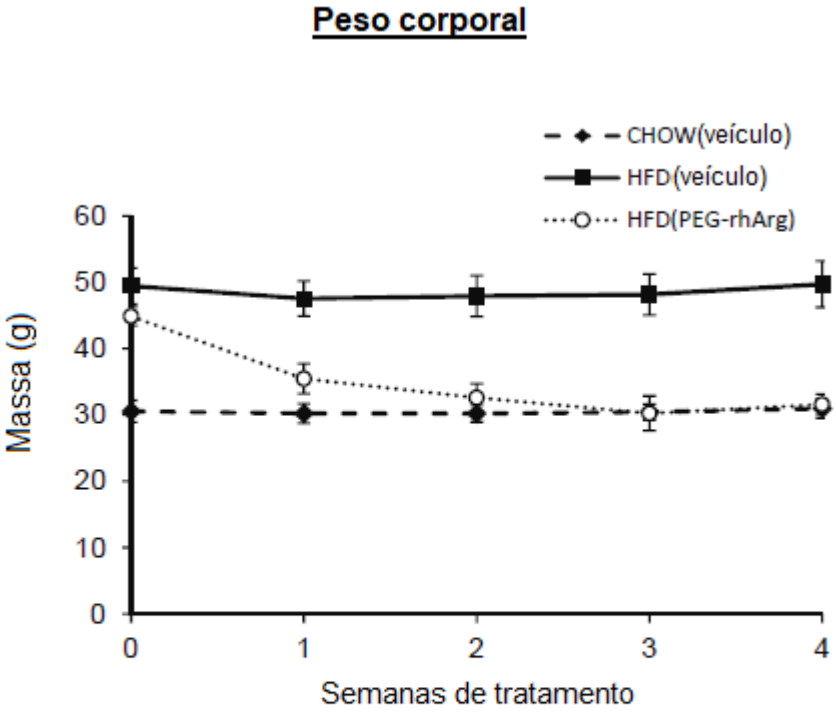

Peso corporal
CHOW(veículo)
HFD(veículo)
HFD(PEG-rhArg)
Massa (g)
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
Semanas de tratamento

FIG. 59

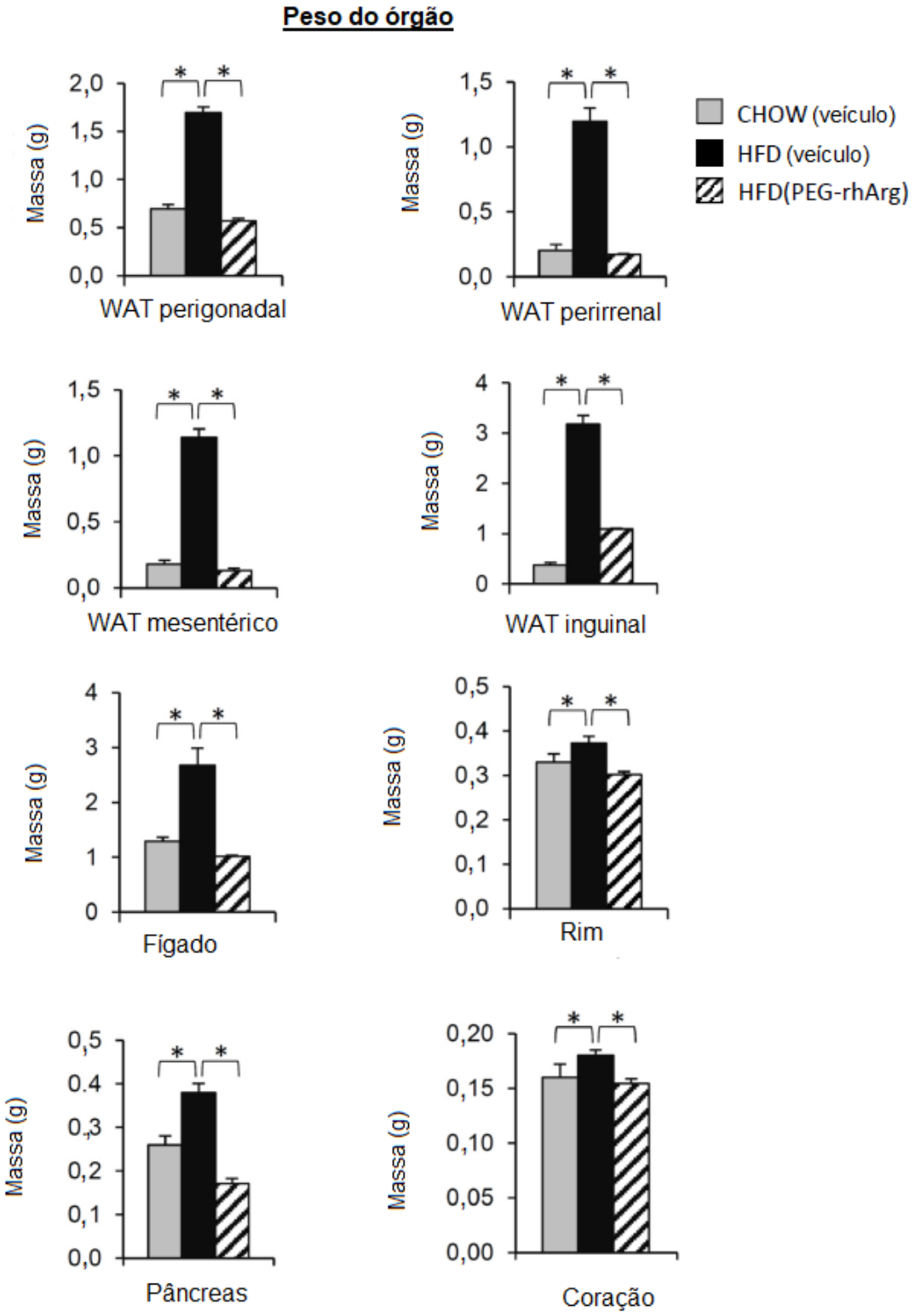
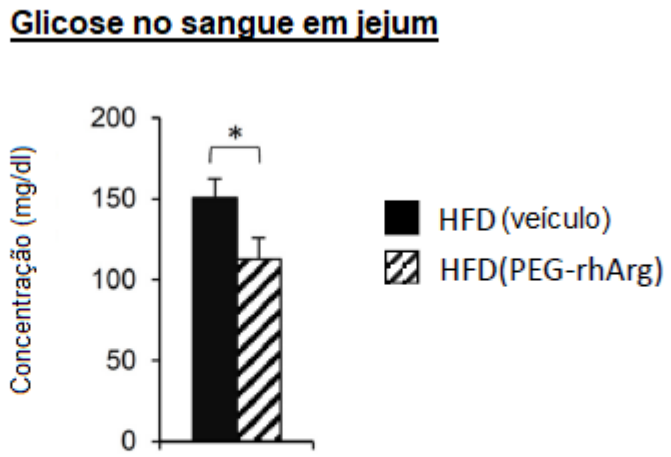

Peso do órgão
Massa (g)
WAT perigonadal
WAT perirrenal
WAT mesentérico
WAT inguinal
Fígado
Rim
Pâncreas
Coração
CHOW (veículo)
HFD (veículo)
HFD(PEG-rhArg)

FIG. 60

A


Glicose no sangue em jejum
Concentração (mg/dl)
200
150
100
50
0
*
HFD (veículo)
HFD(PEG-rhArg)

B

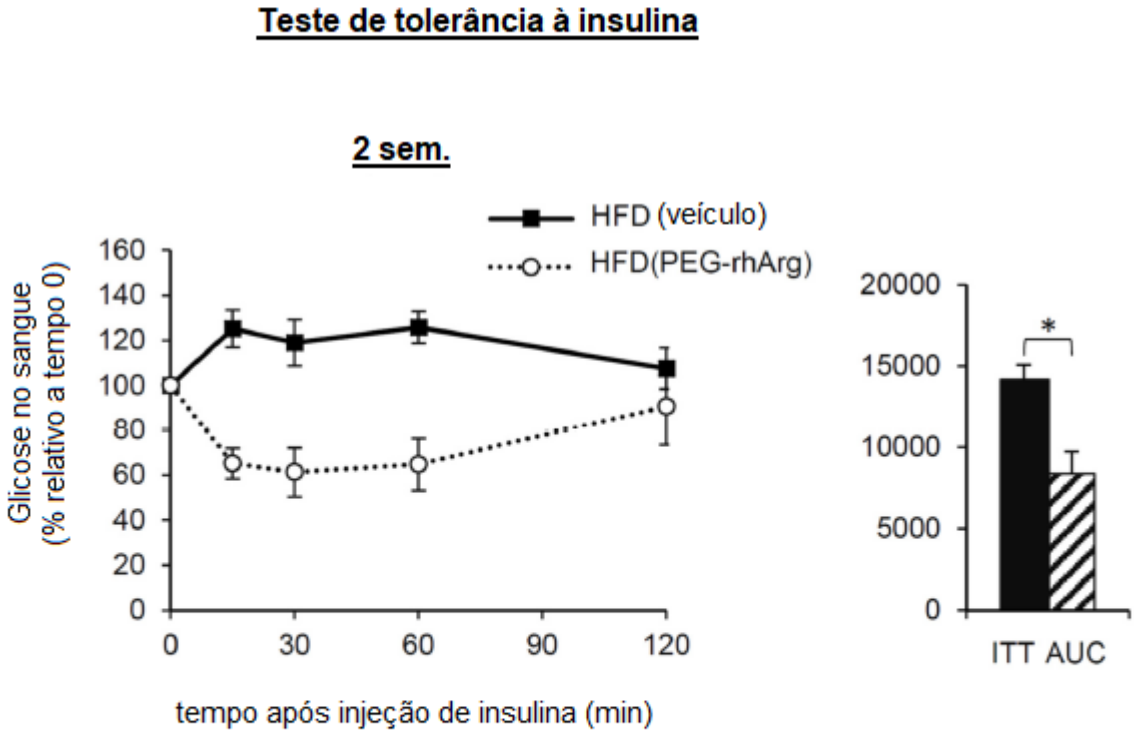

Teste de tolerância à insulina
2 sem.
HFD (veículo)
HFD(PEG-rhArg)
Glicose no sangue
(% relativo a tempo 0)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
tempo após injeção de insulina (min)
20000
15000
10000
5000
0
*
ITT AUC

FIG. 61

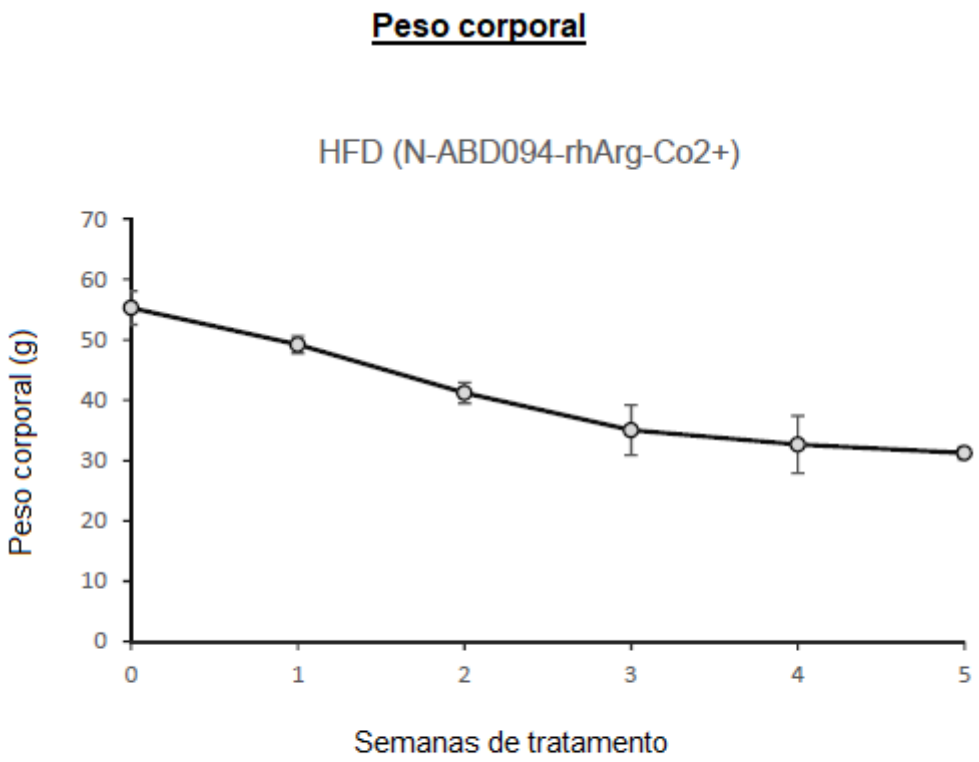

Peso corporal
HFD (N-ABD094-rhArg-Co2+)
Peso corporal (g)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
Semanas de tratamento

FIG. 62

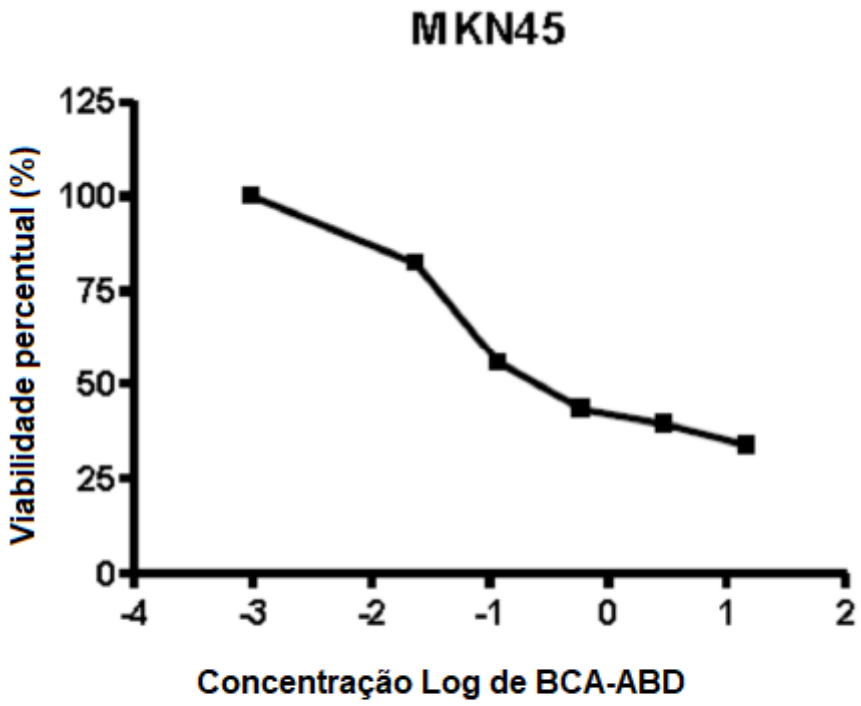

MKN45
Viabilidade percentual (%)
125
100
75
50
25
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Concentração Log de BCA-ABD

FIG. 63

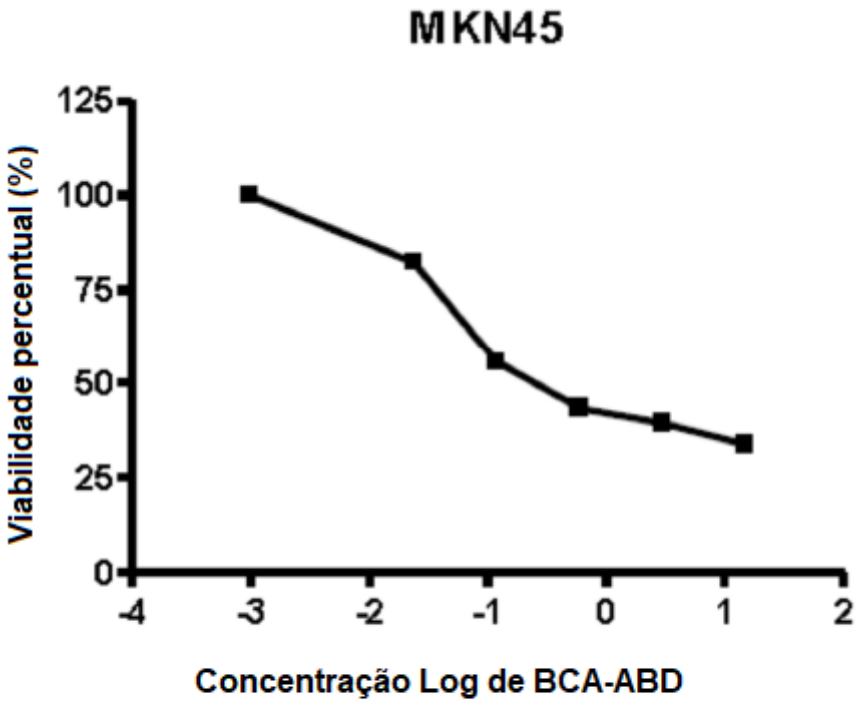

MKN45
Viabilidade percentual (%)
125
100
75
50
25
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Concentração Log de BCA-ABD

FIG. 63

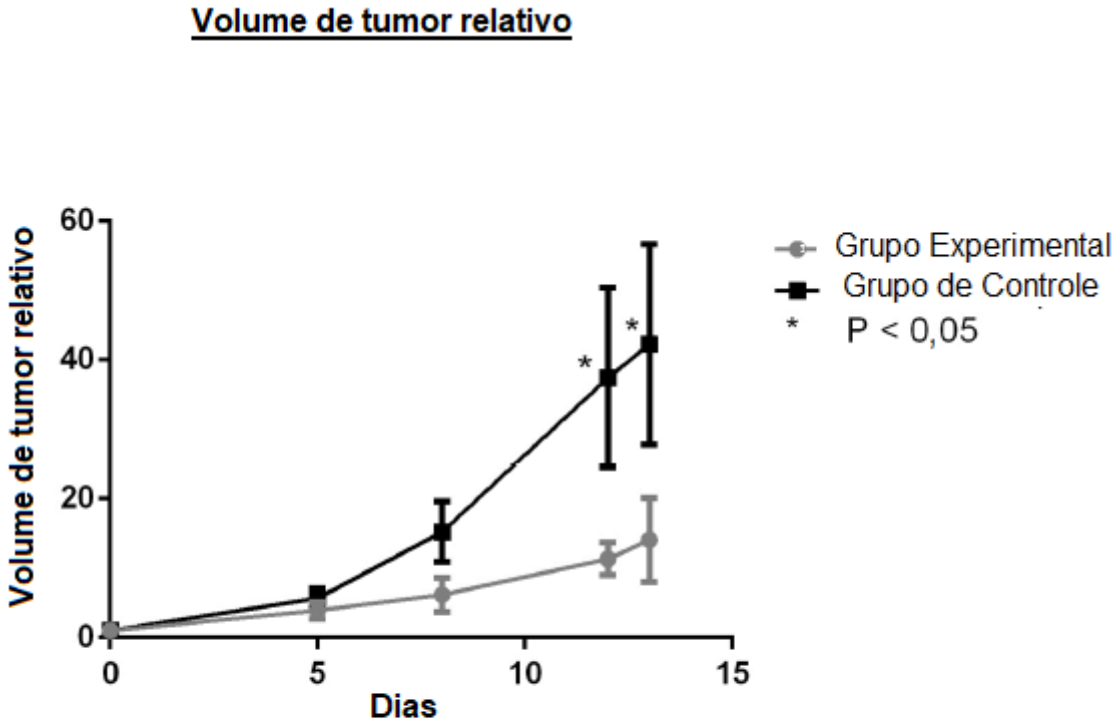

Volume de tumor relativo
Volume de tumor relativo
60
40
20
0
0
5
10
15
Dias
*
*
Grupo Experimental
Grupo de Controle
* P < 0,05

FIG. 65

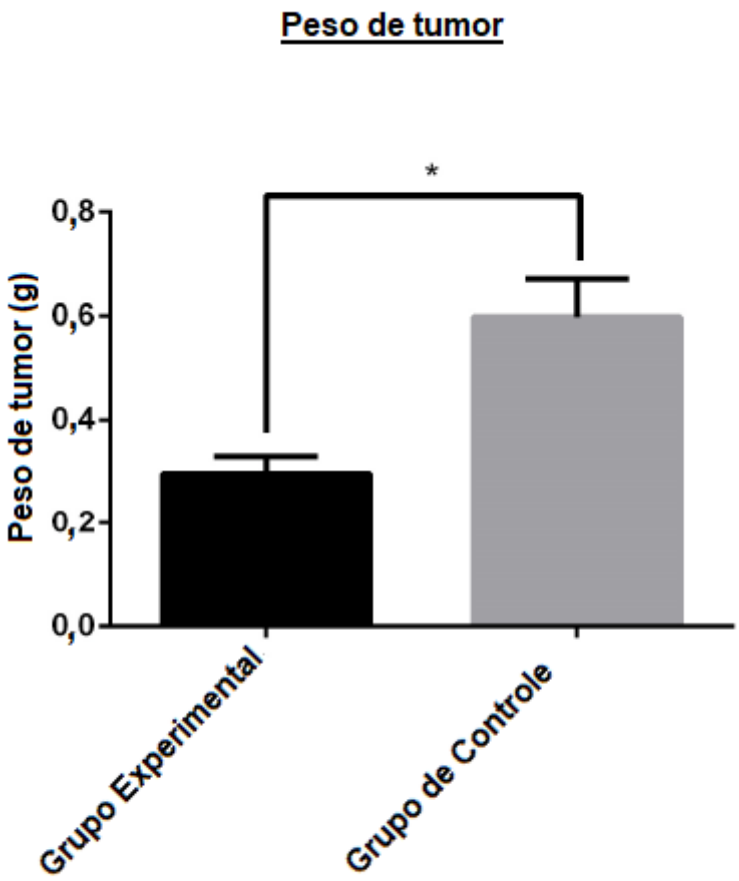

Peso de tumor
*
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Peso de tumor (g)
Grupo Experimental
Grupo de Controle

FIG. 66

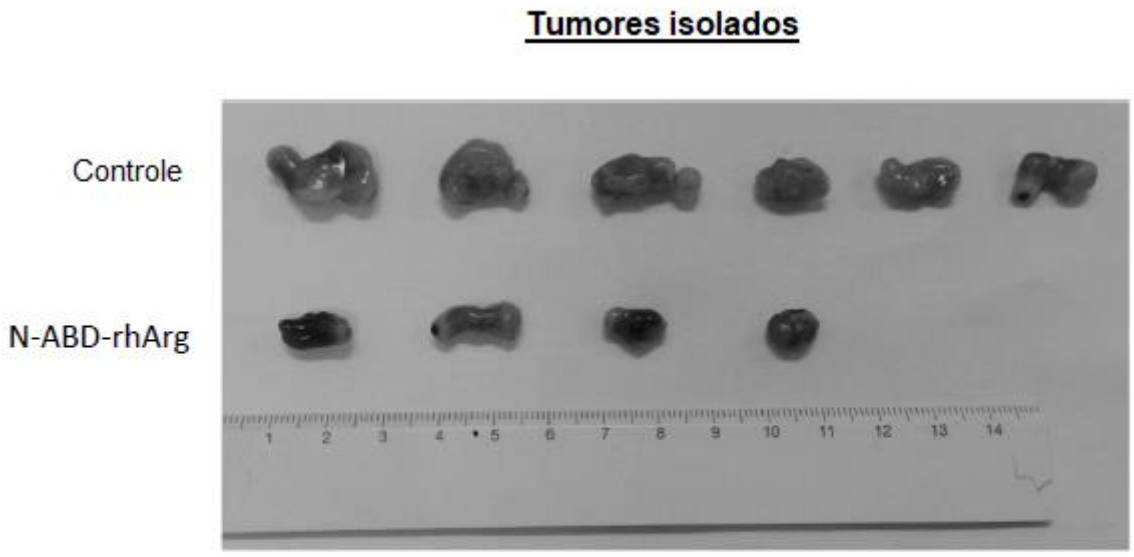



FIG. 67

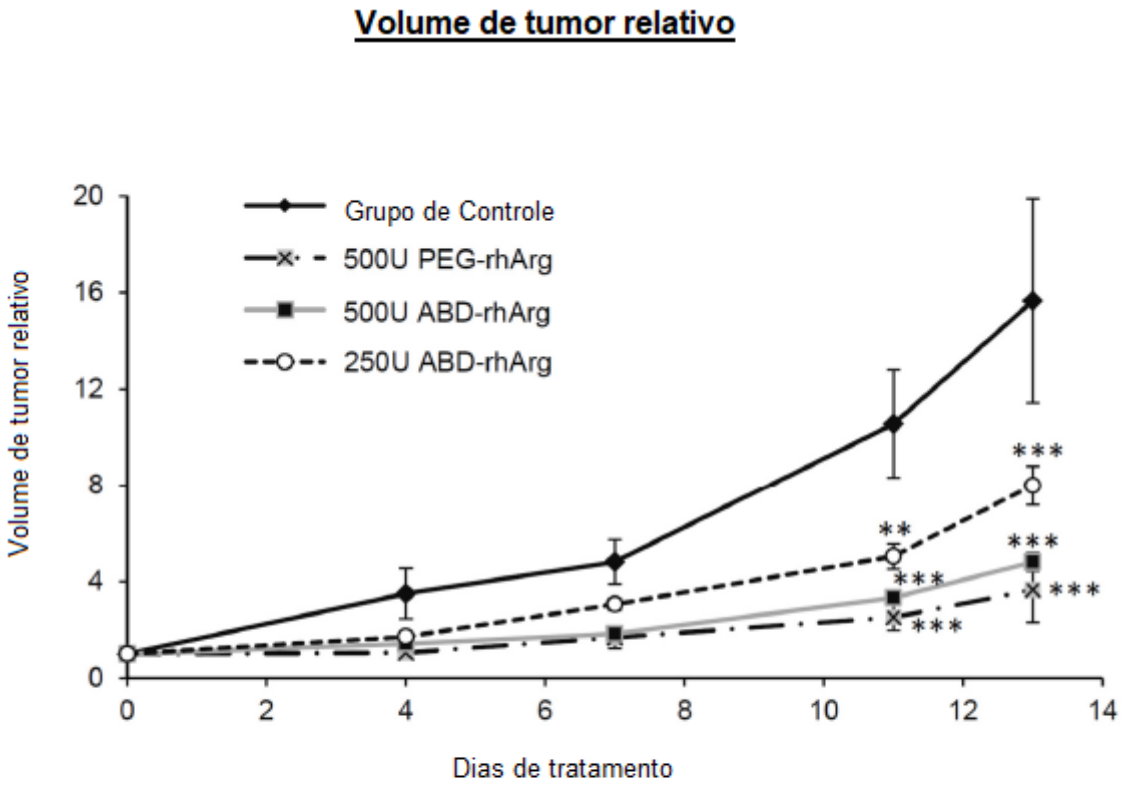

Volume de tumor relativo
Grupo de Controle
500U PEG-rhArg
500U ABD-rhArg
250U ABD-rhArg
Volume de tumor relativo
Dias de tratamento
0
4
8
12
16
20
0
2
4
6
8
10
12
14
**
***

FIG. 68

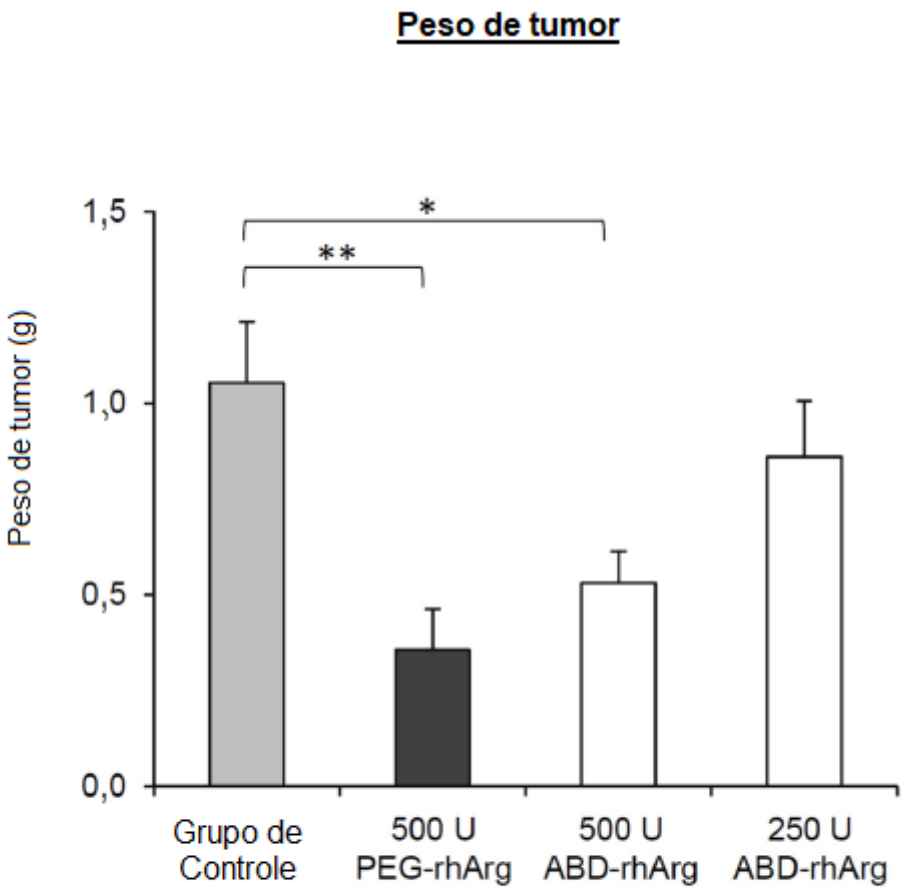
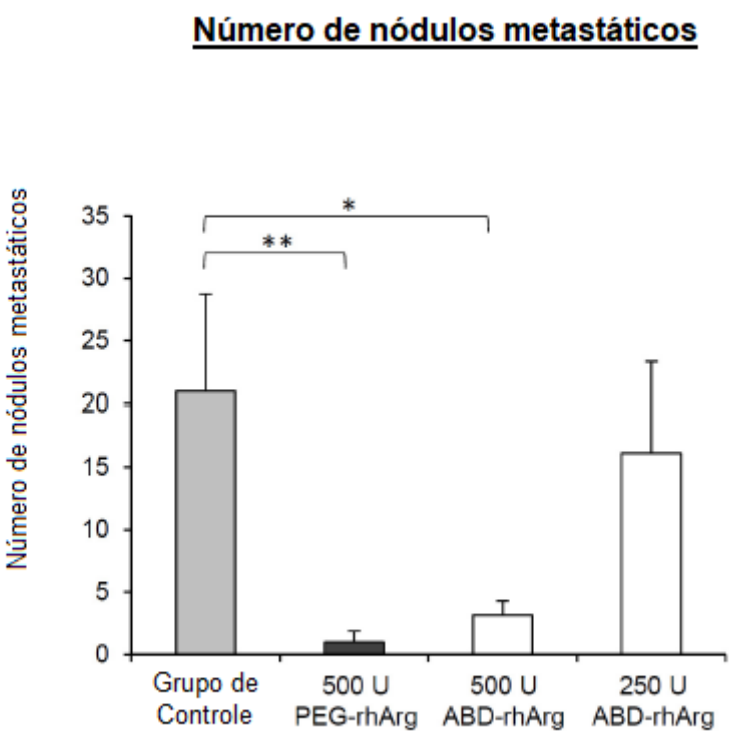

Peso de tumor
Peso de tumor (g)
1,5
1,0
0,5
0,0
*
**
Grupo de Controle
500 U PEG-rhArg
500 U ABD-rhArg
250 U ABD-rhArg

FIG. 69

A


Número de nódulos metastáticos
Número de nódulos metastáticos
35
30
25
20
15
10
5
0
*
**
Grupo de Controle
500 U PEG-rhArg
500 U ABD-rhArg
250 U ABD-rhArg

B

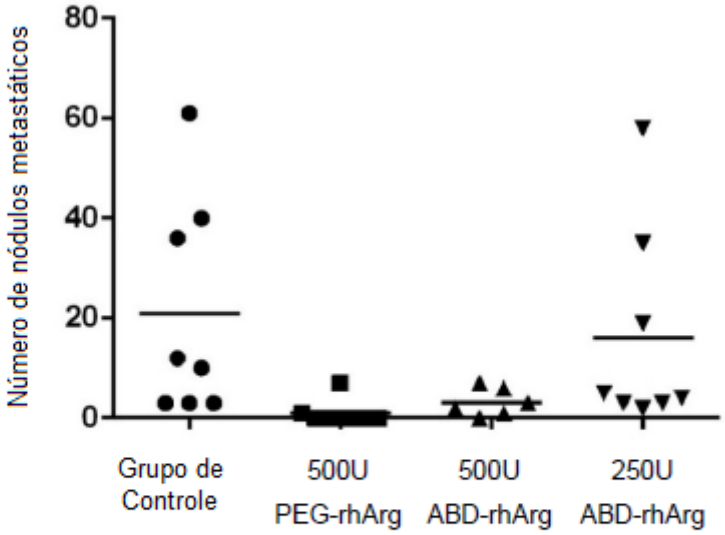

Número de nódulos metastáticos
80
60
40
20
0
Grupo de Controle
500U PEG-rhArg
500U ABD-rhArg
250U ABD-rhArg

FIG. 70

## RESUMO

**COMPOSIÇÃO E APLICAÇÃO DE AGENTES DEPLETORES DE ARGININA PARA CÂNCER, OBESIDADE, DISTÚRBIOS METABÓLICOS E COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES RELACIONADAS**

A presente revelação refere-se a proteínas de fusão de domínio de ligação de albumina de arginase (ABD) e métodos de preparação e uso das mesmas. Também são fornecidos métodos que envolvem depleção de arginina para o tratamento de obesidade, distúrbios metabólicos e complicações e comorbidades relacionadas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

**Código de Controle**

Campo 1




Campo 2




Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 5_Listagem de Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 27/11/2020
- Hora de Geração do Código: 10:54:36
- Código de Controle:
  - Campo 1: 67A2A956E15FC62F
  - Campo 2: D8D969E64836C554