

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 745**

51 Int. Cl.:

A61K 38/50 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2015** **E 21203466 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024** **EP 4005590**

54 Título: **Métodos y composiciones para modular el sistema inmunológico con arginasa I**

30 Prioridad:

29.04.2014 US 201461985924 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2025

73 Titular/es:

BIO-CANCER TREATMENT INTERNATIONAL LTD. (100.00%)
Room 511-513, 5/F, Bio-Informatics Centre, 2 Science Park West Avenue, Hong Kong Science Park, Shatin, New Territories, HKSAR Hong Kong, CN

72 Inventor/es:

SCHABBAUER, GERNOT;
BLUML, STEPHEN;
SAHIN, EMINE;
CHENG, PAUL y
CHEN, LI

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 3 013 745 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para modular el sistema inmunológico con arginasa I

5 Antecedentes de la invención

El sistema inmunológico funciona para proteger al cuerpo contra antígenos dañinos, bacterias, virus, toxinas, sangre o tejidos de otra persona o especie y células cancerosas. Los trastornos del sistema inmunológico pueden provocar hiperactividad o hipoactividad del sistema inmunológico. En casos de hiperactividad del sistema inmunológico, el cuerpo ataca y daña sus propios tejidos. En casos de hipoactividad del sistema inmunológico, también conocida como inmunodeficiencia, la capacidad del cuerpo para combatir los antígenos extraños se ve disminuida, lo que a menudo conduce a una mayor vulnerabilidad a las infecciones.

15 La enzima arginasa metaboliza la L-arginina en L-ornitina y urea. Además de su papel fundamental en el ciclo de la urea hepático, la arginasa se expresa en algunas células del sistema inmunológico de algunos mamíferos. Sin embargo, no está claro si las interferencias con el metabolismo de la L-arginina pueden usarse para tratar las afecciones inmunitarias. Es importante destacar que existen varios desafíos en la formulación de arginasas exógenas como un agente terapéutico que es adecuado para la administración clínica.

20 Resumen de la invención

La invención proporciona una arginasa I recombinante para su uso en el tratamiento de una afección ósea en un sujeto, en donde la afección ósea se selecciona del grupo que consiste en: osteoporosis; inflamación en el hueso; enfermedad de Paget; osteogénesis imperfecta; displasia fibrosa; y osteomielitis; opcionalmente en donde la afección ósea es osteoporosis asociada con una disfunción de los osteoclastos.

En algunas modalidades, la arginasa recombinante está pegilada. En algunas modalidades, la arginasa recombinante pegilada es la arginasa I humana recombinante.

30 En algunas modalidades, la arginasa I humana recombinante pegilada purificada modula la inflamación mediante la inhibición de la polarización de las células T. En algunas modalidades, la arginasa I humana recombinante pegilada purificada inhibe la polarización de las células T mediante la modulación de la liberación de citocinas. En algunas modalidades, la arginasa I humana recombinante pegilada purificada modula la expresión de la interleucina 6 (IL-6). En algunas modalidades, la arginasa I humana recombinante pegilada purificada modula la expresión del interferón gamma (INF γ). En algunas modalidades, la administración de arginasa I humana recombinante pegilada purificada agota el nivel de arginina en el plasma de un sujeto por debajo de 10 μ M.

40 En algunas modalidades, la arginasa I humana recombinante purificada es SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, o la SEQ ID NO: 16. En algunas modalidades, la arginasa I humana recombinante está pegilada.

45 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la regulación positiva de la arginasa I por LPS en macrófagos.

La Figura 2 ilustra un aumento en la expresión de la arginasa I acompañado de la pérdida de PTEN.

La Figura 3 ilustra la función de C/EBP β en macrófagos deficientes en PTEN.

La Figura 4 ilustra que la activación constitutiva de PI3K promueve la expresión y liberación de la arginasa I al espacio extracelular.

La Figura 5 ilustra la inhibición de la polarización de las células T por la arginasa I.

La Figura 6 ilustra los resultados de un tratamiento de un modelo de esclerosis múltiple reconocido en la técnica, el ratón con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), con la arginasa I humana recombinante.

La Figura 7 representa gráficos que miden varios parámetros clínicos de ratones artríticos tratados con arginasa I humana recombinante.

La Figura 8 ilustra la reducción de la inflamación de las patas en ratones artríticos tratados con la arginasa I humana recombinante.

La Figura 9 ilustra la reducción de la liberación sistémica de interleucina 6 (IL-6) en ratones artríticos tratados con la arginasa I humana recombinante.

5 La Figura 10 representa gráficos que miden la expresión de citocinas proinflamatorias después de la inmunización con colágeno.

La Figura 11 es un gráfico que representa la puntuación clínica de un modelo de ratón con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) tratado con la arginasa I humana recombinante.

10 La Figura 12 representa el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia de poblaciones de células inmunitarias en ratones con EAE tratados con la arginasa I humana recombinante.

La Figura 13 representa los resultados de experimentos de clasificación de células activadas por fluorescencia que indican que el tratamiento con arginasa I humana recombinante previene la proliferación de células T.

15 La Figura 14 es un esquema de un proceso utilizado para optimizar una composición farmacéutica que comprende una arginasa I purificada.

20 La Figura 15 es un gráfico que ilustra el agotamiento de la arginina sérica por una arginasa I humana recombinante purificada pegilada con mPEG-MAL (modificación de -SH).

La Figura 16 es un gráfico que ilustra el agotamiento de la arginina sérica con varias arginasas humanas recombinantes purificadas pegiladas en residuos de Lys.

25 La Figura 17 es un gráfico que ilustra el grado de pegilación de varias proteínas arginasa I humana recombinante purificada mediante conjugación de aminas (-NH₂).

La Figura 18 es un gráfico que ilustra el análisis de epítomos de una arginasa I humana recombinante pegilada purificada.

30 La Figura 19 ilustra los niveles de expresión de ARNm de IFN γ e IL-17A de las células T reestimuladas con glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) inhibidas con la arginasa I humana purificada.

35 La Figura 20 ilustra los niveles de expresión de las proteínas IFN γ e IL-17A de células T reestimuladas con glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) inhibidas con la arginasa I humana purificada.

La Figura 21 ilustra las mejoras en la puntuación clínica de ratones con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) tratados con una arginasa I humana recombinante.

40 La Figura 22 es un esquema de un ensayo de diferenciación de osteoclastos.

La Figura 23 es un gráfico que ilustra un ensayo de osteoclastos de macrófagos derivados de médula ósea de tipo salvaje diferenciados tratados con una arginasa I humana recombinante.

45 La Figura 24 es un gráfico que demuestra que la expresión de la arginasa I puede perderse durante la osteoclastogénesis.

La Figura 25 ilustra que la adición de la arginasa I recombinante durante la diferenciación de osteoclastos puede modular la formación de osteoclastos.

50 La Figura 26 es un gráfico que ilustra que el bloqueo de la osteoclastogénesis puede depender de las funciones catalíticas de la arginasa I humana recombinante (recArgI).

55 La Figura 27 es un gráfico que ilustra un ensayo en el que la adición de la arginasa I recombinante a células madre hematopoyéticas no influyó en la formación de osteoclastos.

La Figura 28 es un gráfico que ilustra los efectos de diferentes dosis de arginasa I humana recombinante (recArgI) en el día 0 o en el día 6 de la osteoclastogénesis.

60 La Figura 29 es un gráfico que ilustra los niveles de expresión de ARNm de genes de la osteoclastogénesis después de 7 días de diferenciación con y sin incubación con la arginasa I humana recombinante (recArgI).

Descripción detallada de la invención

65 La mayoría de los seres vivos están expuestos a un número de antígenos diferentes todos los días. Sin embargo, algunos animales poseen sistemas inmunológicos que son capaces de responder a tales antígenos

y protegerlos contra el inicio o la formación de enfermedades. Para funcionar correctamente, un sistema inmunológico debe detectar una amplia variedad de antígenos, como virus, gusanos parásitos o alérgenos, e iniciar una respuesta en el cuerpo contra las sustancias extrañas, células anormales y/o tejidos. En respuesta a un antígeno desconocido, un sistema inmunológico sano comienza a producir anticuerpos.

En algunas enfermedades, sin embargo, un sistema inmunológico puede comenzar a producir anticuerpos que, en lugar de combatir las infecciones, atacan los propios tejidos del cuerpo. Esto puede provocar enfermedades autoinmunitarias. Los crecimientos cancerosos, incluidos los tumores cancerosos malignos, también pueden ser reconocidos por las células inmunitarias innatas de un sujeto y desencadenar una respuesta inmunitaria. La activación de las células inmunitarias innatas desencadena numerosas vías de señalización intracelular, que requieren un control estricto para montar una respuesta inmunitaria adecuada.

La arginasa I es un elemento clave del ciclo de la urea, que convierte la arginina en urea y es predominantemente activa en el hígado. La arginasa I también juega un papel funcional en el sistema inmunológico. Las células T, por ejemplo, dependen del aminoácido semiesencial arginina para madurar y responder a las infecciones. La expresión de la arginasa I en las células inmunitarias innatas conduce al agotamiento de los niveles de arginina de un sistema fisiológico en condiciones inflamatorias. Por ejemplo, la expresión de la arginasa I en las células mieloides puede conducir a la anergia de las células T y prevenir las funciones de las células T colaboradoras.

En ratones, la arginasa I se expresa en las células de origen monocítico. En los humanos, la arginasa I se expresa de forma constitutiva en granulocitos/neutrófilos y participa en la actividad fungicida. Algunos consideran que los macrófagos que expresan la arginasa I son activados alternativamente o macrófagos M2, implicados en la regeneración y reparación de tejidos, pero también en la defensa inmunitaria contra patógenos y parásitos multicelulares. La expresión de la arginasa I en células mieloides murinas está regulada por las citocinas Th2 IL-4/IL-13. Sin embargo, no está claro si la arginasa I humana y la arginasa I murina funcionan mediante un mecanismo de acción similar.

La vía de señalización PI3K/PTEN juega un papel funcional en numerosos procesos fisiológicamente importantes como la inmunidad innata, la supervivencia celular, la proliferación, la migración y el metabolismo. La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) puede regular negativamente la expresión y liberación de citocinas proinflamatorias en algunas células. Estos procesos de señalización están estrictamente regulados por la fosfatasa lipídica PTEN, un antagonista de la vía PI3K. La PTEN es un supresor de tumores que es responsable de la producción elevada de citocinas como la interleucina 6 (IL-6) en respuesta a los agonistas del receptor tipo Toll (TLR). Se considera que la activación de PI3K es proinflamatoria y la modulación de la vía de PI3K es indispensable para la guía adecuada de las células inmunitarias al sitio de infección o inflamación.

En la presente descripción se describen los experimentos que caracterizan la adición de la arginasa I pegilada recombinante a las células cultivadas y los modelos de ratón. Los experimentos demuestran que la arginasa I extracelular puede ejercer potentes efectos antiinflamatorios sobre las células inmunitarias. Los experimentos de transferencia de los medios condicionados derivados de macrófagos inocentes PTEN^{-/-}, que contienen altas cantidades de arginasa I, mostraron una expresión reducida de citocinas polarizadoras de células T proinflamatorias en células cultivadas y modelos animales.

La invención descrita en la presente descripción proporciona una arginasa I recombinante para su uso en el tratamiento de una afección ósea en un sujeto, en donde la afección ósea se selecciona del grupo que consiste en: osteoporosis; inflamación en el hueso; enfermedad de Paget; osteogénesis imperfecta; displasia fibrosa; y osteomielitis; opcionalmente en donde la afección ósea es osteoporosis asociada con una disfunción de los osteoclastos. La descripción demuestra que una consecuencia funcional de la expresión mantenida de la arginasa I en un sistema fisiológico es la formación de un entorno hipoinflamatorio, por la función disminuida de los efectos fisiopatológicos mediados por células *T in vitro e in vivo*. El hallazgo proporciona un método robusto y efectivo para la modulación de un sistema inmunológico. Dicha modulación proporciona un tratamiento efectivo para una variedad de afecciones inmunitarias, como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide. Además, la modulación del sistema inmunológico con una arginasa recombinante de la descripción puede usarse junto con los procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, para proporcionar un entorno hipoinflamatorio que reduce la probabilidad de rechazo de células/tejidos durante el trasplante de órganos.

En algunos casos, la arginasa I humana recombinante pegilada purificada modula la inflamación mediante la inhibición de la polarización de las células T. En algunos casos, la arginasa I humana recombinante pegilada purificada inhibe la polarización de las células T mediante la modulación de la liberación de citocinas.

En la presente descripción también se describe una composición farmacéutica que comprende una proteína arginasa I humana recombinante purificada conjugada con al menos un oligómero de polietilenglicol. En algunos casos, el, al menos uno, oligómero de polietilenglicol es un metoxipoli(etilenglicol).

La descripción también demuestra un papel funcional de las arginasas en la fisiología ósea. La formación del hueso es un procedimiento multicomplejo que incluye muchas etapas, y cada una de ellas se presenta como una diana potencial para la intervención terapéutica. La inflamación también puede interferir con la capacidad del cuerpo de un vertebrado para reparar la masa ósea. En algunos aspectos, la descripción demuestra que la expresión de la arginasa I se pierde durante la osteoclastogénesis, y la adición de una arginasa I recombinante durante la diferenciación de osteoclastos puede modular al menos la osteoclastogénesis. La descripción también demuestra que el bloqueo si la osteoclastogénesis depende de las funciones catalíticas de la arginasa I recombinante. Los hallazgos sugieren que la modulación de la expresión de la arginasa puede proporcionar un tratamiento efectivo para una variedad de afecciones óseas, incluida la osteoporosis. La modulación de la expresión de la arginasa I también puede proporcionar un tratamiento efectivo para la osteoporosis al reducir la inflamación crónica en el hueso, que puede ser un factor agravante en la osteoporosis.

Usos en el tratamiento de trastornos inmunitarios, enfermedades óseas y cánceres.

Los métodos, composiciones y kits pueden usarse para tratar, detener, revertir o mejorar una enfermedad. En todos los casos, la enfermedad es una afección ósea seleccionada del grupo que consiste en: osteoporosis; inflamación en el hueso; enfermedad de Paget; osteogénesis imperfecta; displasia fibrosa; y osteomielitis. En algunos casos, la modulación se logra mediante la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de una proteína arginasa recombinante. En algunos casos, la proteína es una arginasa I humana recombinante.

La arginasa I es un modulador importante de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Una pluralidad de sujetos afectados por trastornos del sistema inmunológico y cánceres pueden beneficiarse del uso de una arginasa I humana recombinante. Los sujetos pueden ser humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja como ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores, tales como ratas, ratones y cobayas, y similares. Un sujeto puede ser de cualquier edad. Los sujetos pueden ser, por ejemplo, adultos mayores, adultos, adolescentes, preadolescentes, niños, párvulos, bebés.

También se reconoce en la presente descripción el potencial terapéutico de una proteína arginasa recombinante en el tratamiento de varias afecciones óseas, tales como osteoporosis o la inflamación en los huesos. La resistencia y la integridad del esqueleto de los vertebrados. *por ejemplo*, el esqueleto humano, depende de un delicado equilibrio entre la resorción ósea por los osteoclastos y la formación ósea por los osteoblastos. En la osteoporosis, este equilibrio se desplaza a favor de los osteoclastos y la resorción ósea supera la formación ósea. En algunos casos, una proteína arginasa recombinante, o un fragmento de la misma, puede cambiar el equilibrio entre la formación de osteoclastos y osteoblastos.

La actividad de una pluralidad de células en el sistema inmunológico puede modularse por una arginasa I recombinante. Ejemplos no limitantes de células cuya actividad puede modularse por la arginasa I recombinante incluyen: células B; CD4; CD8; glóbulos, que incluyen glóbulos rojos y glóbulos blancos; células dendríticas, que incluyen células dendríticas presentadoras de antígenos; macrófagos; células B de memoria; células T de memoria; monocitos; células asesinas naturales; granulocitos neutrófilos; células T colaboradoras; y células T citotóxicas. La actividad de una pluralidad de células adicionales también puede modularse por una arginasa I recombinante. Ejemplos no limitantes de células cuya actividad puede modularse por la arginasa I recombinante incluyen células madre hematopoyéticas, osteoclastos, osteoblastos, osteoprogenitores, osteocitos y precursores o derivados de los mismos.

En algunos casos, la condición ósea se asocia con una mala regulación de la función de los osteoclastos o los osteoblastos.

El tratamiento puede comprender tratar a un sujeto (por ejemplo, un paciente con una enfermedad y/o un animal de laboratorio con una afección) con una arginasa de la descripción. La enfermedad puede ser una enfermedad autoinmunitaria. La enfermedad puede ser una enfermedad inflamatoria. El sujeto puede ser un ser humano. Se puede proporcionar tratamiento al sujeto antes del inicio clínico de la enfermedad. Se puede proporcionar tratamiento al sujeto después del inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento se puede proporcionar al sujeto después de 1 día, 1 semana, 6 meses, 12 meses o 2 años después del inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento se puede proporcionar al sujeto durante más de 1 día, 1 semana, 1 mes, 6 meses, 12 meses, 2 años o más después del inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento se puede proporcionar al sujeto durante menos de 1 día, 1 semana, 1 mes, 6 meses, 12 meses o 2 años después del inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento también puede incluir tratar a un ser humano en un ensayo clínico. Un tratamiento puede comprender administrar a un sujeto una composición farmacéutica, tal como una o más de las composiciones farmacéuticas descritas a lo largo de la descripción. Un tratamiento puede comprender modular los niveles de arginina endógena *in vivo*.

Arginasas recombinantes mutantes.

La expresión sostenida de las proteínas arginasa I puede usarse clínicamente para proporcionar un entorno hipoinflamatorio *in vitro* y *in vivo* (Se describe con más detalle, por ejemplo, en el Ejemplo 1, y las Figuras 1-6). Sin embargo, un desafío que se encuentra al formular una arginasa purificada con fines terapéuticos es la formación de agregados de proteínas en solución debido a la formación de enlaces disulfuro intercatenarios. Para superar algunos de los desafíos en la preparación de una arginasa purificada que sea adecuada para la administración clínica, se realizaron una serie de mutaciones en la secuencia de una arginasa I humana de tipo salvaje. En la Tabla 1 se describen varios mutantes de la arginasa I humana diseñados para reducir la agregación de una arginasa I recombinante purificada en solución. La Tabla 1 también describe varias secuencias de arginasa I humana que comprenden una etiqueta molecular (SEQ ED NO: 9-16).

Tabla 1	
SEQ ID NO:	Secuencia
1	MSAKSRTIGIIGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQECDVKDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWWTPCIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYITEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LACFGLAREG NHKPIDYLNPK
2	MSAKSRTIGIIGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQECDVKDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWWTPCIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LAAFGLAREG NHKPIDYLNPK
3	MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQECDVKDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWWTPAIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LACFGLAREG NHKPIDYLNPK
4	MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWWTPCIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LACFGLAREG NHKPIDYLNPK
5	MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQECDVKDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWWTPAIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYITEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LAAFGLAREG NHKPIDYLNPK
6	MSAKSRTIGIIGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWWTPCIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LAAFGLAREG NHKPIDYLNPK
7	MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWWTPAIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK

ES 3 013 745 T3

		VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LACFGLAREG NHKPIDYLNPK
5	SEQ ID NO: 8	MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWTPAIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LAAFGlareg NHKPIDYLNPK
10		
15	SEQ ID NO: 9	MHHHHHH MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWTPCIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYITEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LACFGLAREG NHKPIDYLNPK
20		
25	SEQ ID NO: 10	MHHHHHH MSAKSRTIGIIGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWTPCIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LAAFGlareg NHKPIDYLNPK
30		
35	SEQ ID NO: 11	MHHHHHH MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWTPAIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LACFGLAREG NHKPIDYLNPK
40		
45	SEQ ID NO: 12	MHHHHHH MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWTPCIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LACFGLAREG NHKPIDYLNPK
50		
55	SEQ ID NO: 13	MHHHHHH MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWTPAIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYITEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LAAFGlareg NHKPIDYLNPK
60		
65	SEQ ID NO: 14	MHHHHHH MSAKSRTIGIIGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWTPCIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT LAAFGlareg NHKPIDYLNPK
	SEQ ID NO: 15	MHHHHHH MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKK GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWTPAIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG

	GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPPEEVT RTVNTAVAIT LACFGLAREG NHKPIDYLNPK
SEQ ID NO: 16	MHHHHHH MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQEADVVDY GDLPFADIPN DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKN GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP GFSWVTPAIS AKDIVYIGLR DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPPEEVT RTVNTAVAIT LAAFGLAREG NHKPIDYLNPK

Una Arginasa recombinante mutante puede comprender una o más mutaciones. Las modificaciones de aminoácidos adecuadas para mejorar la reología de una arginasa I pueden ser mutaciones conservadoras o no conservadoras. Se puede realizar una mutación de manera que el aminoácido codificado se modifique a un aminoácido polar, no polar, básico o ácido. Una arginasa recombinante puede ser una arginasa humana de tipo salvaje. Una arginasa recombinante puede ser una arginasa humana mutada. Se puede generar una arginasa I recombinante a partir de ADN recombinante, por ejemplo, con técnicas de ingeniería biomolecular. Una arginasa I purificada puede ser una arginasa que se extrae de un extracto crudo, como un lisado de células completas. Una arginasa I recombinante purificada puede ser una arginasa I que se purifica a partir, por ejemplo, del extracto crudo de un sistema biológico diseñado para expresar la arginasa I recombinante.

La Tabla 1 describe secuencias de proteínas de varias arginasas I humanas recombinantes mutantes. SEQ ID NO: 1 corresponde a una arginasa humana de tipo salvaje. Las SEQ ID NO 2-8 son las secuencias mutadas de SEQ ID NO: 1. la SEQ ID NO: 2 comprende una mutación C303 → A303. la SEQ ID NO: 3 comprende una mutación C168 → A168. la SEQ ID NO: 4 comprende una mutación C45 → A45. la SEQ ID NO: 5 comprende las mutaciones dobles C303 → A303 y C168 → A168. la SEQ ID NO: 6 comprende las mutaciones dobles C303 → A303 y C45 → A45. la SEQ ID NO: 7 comprende las mutaciones dobles C168 → A168 y C45 → A45. la SEQ ID NO: 8 comprende las mutaciones triples C303 → A303, C168 → A168 y C45 → A45.

Una arginasa I humana recombinante puede tener una etiqueta molecular modificada por ingeniería genética en la secuencia de ácido nucleico recombinante. Una etiqueta molecular puede facilitar la purificación de una arginasa recombinante de un sistema de expresión crudo. Una etiqueta molecular puede ser, por ejemplo, una etiqueta de polihistidina, una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST), una etiqueta de proteína de unión a maltosa (MBP) o una etiqueta de proteína de unión a quitina (CBP). En algunas modalidades, una etiqueta molecular comprende una etiqueta de polihistidina. Una etiqueta molecular puede estar presente, por ejemplo, en el extremo amino o en el extremo carboxilo de una arginasa recombinante.

La Tabla 1 también describe secuencias de proteínas de varias arginasas humanas recombinantes mutantes que comprenden una etiqueta molecular. la SEQ ID NO: 9 corresponde a una arginasa humana de tipo salvaje que comprende una etiqueta de polihistidina. las SEQ ID NO: 10-16 son secuencias mutadas de SEQ ID NO: 1 que comprende una etiqueta. la SEQ ID NO: 10 comprende una etiqueta de polihistidina y una mutación C303 → A303. la SEQ ID NO: 11 comprende una etiqueta de polihistidina y una mutación C168 → A168. la SEQ ID NO: 12 comprende una etiqueta de polihistidina y una mutación C45 → A45. la SEQ ID NO: 13 comprende una etiqueta de polihistidina, las mutaciones dobles C303 → A303 y C168 → A168. la SEQ ID NO: 14 comprende una etiqueta de polihistidina, las mutaciones dobles C303 → A303 y C45 → A45. la SEQ ID NO: 15 comprende una etiqueta de polihistidina, las mutaciones dobles C168 → A168 y C45 → A45. la SEQ ID NO: 16 comprende una etiqueta de polihistidina, las mutaciones triples C303 → A303, C168 → A168 y C45 → A45. En algunos casos, una arginasa humana recombinante terapéutica puede ser un fragmento funcional de una arginasa descrita en la Tabla 1.

Una arginasa recombinante, o un fragmento funcional de la misma, se puede expresar/producir, por ejemplo, *in vivo* a partir de células bacterianas, células de insectos, células de mamíferos, células sintéticas o *in vitro* a partir de sistemas libres de células o síntesis química. Una arginasa I recombinante puede codificarse mediante cualquier combinación de codones en el código degenerado. En algunas modalidades, los nucleótidos se reemplazan mediante la toma de nota del código genético de manera que un codón se cambia a un codón diferente que codifica el mismo residuo de aminoácido. En algunas realizaciones, alterar la identidad de un residuo de cisteína como se describe en Tabla 1 puede resultar en una reducción de la agregación de proteínas en solución de: aproximadamente 2 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %.

En algunas modalidades, alterar la identidad de un residuo de cisteína como se describe en la Tabla 1 puede resultar en no más de 1 % de agregación, no más de 2 % de agregación, no más de 5 % de agregación, no más de 10 % de agregación, no más de 15 % de agregación, no más de 20 % de agregación, no más de 25 %

de agregación, no más de 30 % de agregación, no más de 35 % de agregación, no más de 40 % de agregación, no más de 45 % de agregación, no más de 50 % de agregación, no más de 55 % de agregación, no más de 60 % de agregación, no más de 65 % de agregación, no más de 70 % de agregación, no más de 75 % de agregación, no más de 80 % de agregación, no más de 85 % de agregación, no más de 90 % de agregación o no más de 95 % de agregación en solución.

En algunos casos, alterar la identidad de uno o más aminoácidos puede reducir el perfil de agregación de una arginasa I recombinante en solución. En algunos casos, una arginasa I recombinante, o un fragmento funcional de la misma, comprende 1 mutación de aminoácido, 2 mutaciones de aminoácidos, 3 mutaciones de aminoácidos, 4 mutaciones de aminoácidos, 5 mutaciones de aminoácidos, 6 mutaciones de aminoácidos, 7 mutaciones de aminoácidos, 8 mutaciones de aminoácidos, 9 mutaciones de aminoácidos, 10 mutaciones de aminoácidos, 11 mutaciones de aminoácidos, 12 mutaciones de aminoácidos, 13 mutaciones de aminoácidos, 14 mutaciones de aminoácidos, 15 mutaciones de aminoácidos, 16 mutaciones de aminoácidos, 17 mutaciones de aminoácidos, 18 mutaciones de aminoácidos, 19 mutaciones de aminoácidos, 20 mutaciones de aminoácidos, 21 mutaciones de aminoácidos, 22 mutaciones de aminoácidos, 23 mutaciones de aminoácidos, 24 mutaciones de aminoácidos, 25 mutaciones de aminoácidos, 26 mutaciones de aminoácidos, 27 mutaciones de aminoácidos, 28 mutaciones de aminoácidos, 29 mutaciones de aminoácidos, 30 mutaciones de aminoácidos, 31 mutaciones de aminoácidos, 32 mutaciones de aminoácidos, 33 mutaciones de aminoácidos, 34 mutaciones de aminoácidos, 35 mutaciones de aminoácidos, 36 mutaciones de aminoácidos, 37 mutaciones de aminoácidos, 38 mutaciones de aminoácidos, 39 mutaciones de aminoácidos, 40 mutaciones de aminoácidos, 41 mutaciones de aminoácidos, 42 mutaciones de aminoácidos, 43 mutaciones de aminoácidos, 44 mutaciones de aminoácidos, 45 mutaciones de aminoácidos, 46 mutaciones de aminoácidos, 47 mutaciones de aminoácidos, 48 mutaciones de aminoácidos, 49 mutaciones de aminoácidos o 50 mutaciones de aminoácidos.

Una arginasa recombinante, o un fragmento funcional de la misma, puede purificarse, por ejemplo, a partir de células bacterianas, células de insectos, células de mamíferos, células sintéticas o de sistemas libres de células. En algunas modalidades, la arginasa recombinante está parcialmente purificada. En algunas modalidades, la arginasa recombinante es sustancialmente pura. En algunas modalidades, la arginasa recombinante es al menos un 95 % pura. En algunas modalidades, la arginasa recombinante tiene una pureza del 99 %.

Una arginasa recombinante purificada, o un fragmento funcional de la misma, puede ser al menos 1 % pura, al menos 2 % pura, al menos 3 % pura, al menos 4 % pura, al menos 5 % pura, al menos 6 % pura, al menos al menos 7 % pura, al menos 8 % pura, al menos 9 % pura, al menos 10 % pura, al menos 11 % pura, al menos 12 % pura, al menos 13 % pura, al menos 14 % pura, al menos 15 % pura, al menos 16 % pura, al menos 17 % pura, al menos 18 % pura, al menos 19 % pura, al menos 20 % pura, al menos 21 % pura, al menos 22 % pura, al menos 23 % pura, al menos 24 % pura, al menos 25 % pura, al menos 26 % pura, al menos 27 % pura, al menos 28 % pura, al menos 29 % pura, al menos 30 % pura, al menos 31 % pura, al menos al menos 32 % pura, al menos 33 % pura, al menos 34 % pura, al menos 35 % pura, al menos 36 % pura, al menos 37 % pura, al menos 38 % pura, al menos 39 % pura, al menos 40 % pura, al menos 41 % pura, al menos 42 % pura, al menos 43 % pura, al menos 44 % pura, al menos 45 % pura, al menos 46 % pura, al menos 47 % pura, al menos 48 % pura, al menos 49 % pura, al menos 50 % pura, al menos 51 % pura, al menos 52 % pura, al menos 53 % pura, al menos 54 % pura, al menos 55 % pura, al menos 56 % pura, al menos 57 % pura, al menos 58 % pura, al menos 59 % pura, al menos 60 % pura, al menos 61 % pura, al menos 62 % pura, al menos 63 % pura, al menos 64 % pura, al menos 65 % pura, al menos 66 % pura, al menos 67 % pura, al menos 68 % pura, al menos 69 % pura, al menos 70 % pura, al menos 71 % pura, al menos 72 % pura, al menos 73 % pura, al menos 74 % pura, al menos al menos 75 % pura, al menos 76 % pura, al menos 77 % pura, al menos 78 % pura, al menos 79 % pura, al menos 80 % pura, al menos 81 % pura, al menos 82 % pura, al menos 83 % pura, al menos 84 % pura, al menos 85 % pura, al menos 86 % pura, al menos 87 % pura, al menos 88 % pura, al menos 89 % pura, al menos 90 % pura, al menos 91 % pura, al menos 92 % pura, al menos 93 % pura, al menos 94 % pura, al menos 95 % pura, al menos 96 % pura, al menos 97 % pura, al menos 98 % pura, al menos 99 % pura, al menos 99,1 % pura, al menos 99,2 % pura, al menos 99,3 % pura, al menos 99,4 % pura, al menos 99,5 % pura, al menos 99,6 % pura, al menos 99,7 % pura, al menos 99,8 % pura o al menos 99,9 % pura.

Arginasas recombinantes pegiladas.

Una arginasa, o un fragmento funcional de la misma, se puede modificar con una o más moléculas de polietilenglicol (PEG). La unión covalente de un oligómero de PEG(s) a un fármaco o proteína terapéutica puede reducir la inmunogenicidad y la antigenicidad de la arginasa I recombinante del sistema inmunológico del sujeto. La unión covalente de un oligómero de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede aumentar el tamaño hidrodinámico de la arginasa recombinante, que puede prolongar la vida media de una arginasa I humana recombinante pegilada en solución. Los oligómeros de PEG para su uso en la presente invención pueden ser, por ejemplo, $-(CH_2CH_2O)_n-$ o $-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$, pero también pueden incluir polialquilenglicoles que

incluyen, pero sin limitarse a, polipropileno- o polibutilenglicoles, metoxipoli(etilenglicol) o ácido propiónico de metoxipoli(etilenglicol) (ácido de mPEG) donde n puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 400.

Una arginasa, o un fragmento funcional de la misma, se puede modificar con varios tipos de moléculas de PEG. En algunas modalidades, un oligómero de PEG es el propionato de succinimidilo de metoxipoli(etilenglicol) (mPEG-SPA). En algunas modalidades, un oligómero de PEG es un ácido propiónico de metoxipoli(etilenglicol) (ácido mPEG). En algunos casos, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína arginasa I humana recombinante purificada y al menos un oligómero de polietilenglicol. En algunos casos, la proteína arginasa I humana recombinante pegilada comprende al menos dos oligómeros de polietilenglicol. En algunos casos, el oligómero de polietilenglicol pesa desde aproximadamente 20 kilodaltons hasta aproximadamente 40 kilodaltons. En algunos casos, la proteína arginasa I humana recombinante pegilada comprende desde aproximadamente 4 moléculas de polietilenglicol hasta aproximadamente 13 oligómeros de polietilenglicol. En algunos casos, el oligómero de polietilenglicol pesa alrededor de 5 kilodaltons.

La unión covalente de una arginasa, o un fragmento funcional de la misma, a un polímero polietilenglicol de interés puede cambiar las características fisicoquímicas de la arginasa. Ejemplos de características fisicoquímicas que pueden alterarse al unirse a un PEG incluyen la inmunogenicidad, la actividad biológica *in vitro* e *in vivo*, la tasa de absorción y la biodisponibilidad, la biodistribución, los perfiles farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) y la toxicidad. En algunas modalidades, una arginasa pegilada tiene una inmunogenicidad reducida. Los -NH₂, -COOH, -OH, -SH y enlaces disulfuro son ejemplos de grupos químicos en la cadena lateral de aminoácidos de una arginasa que podrían reaccionar con un oligómero de PEG. La amina en el extremo N-terminal y el grupo carboxilo en el extremo C-terminal también pueden reaccionar con un oligómero de PEG.

Los reactivos de PEG para la pegilación de proteínas pueden ser PEG activados. Los PEG activados pueden usarse para la pegilación de una amina, la pegilación de un tiol o la pegilación de un N-terminal. Los reactivos de PEG están disponibles comercialmente en diferentes longitudes, formas y química, lo que les permite reaccionar con grupos funcionales particulares de proteínas para su unión covalente. Ejemplos no limitantes de proveedores comerciales de PEG incluyen NOF Corporation (Japón); SunBio (Corea del Sur); Chirotech Technology Limited (Reino Unido); JenKem (China); Creative PEGWorks (EE. UU.), Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), Dendritech (Midland, MI) o Polysciences™ (Warrington, PA).

Ejemplos no limitantes de PEG disponibles comercialmente adecuados para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, los disponibles de Nektar Therapeutics, San Carlos, CA, tales como mPEG-NH₂ (PM aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 20 kDa), α-metilbutanoato de succinimidilo de metoxi-PEG (SMB), SMB-PEG-SMB, propionato de succinimidilo de metoxi-PEG (mPEG-SPA), PEG ramificado N-hidroxisuccinimida (mPEG2-NHS), mPEG-CM-HBA-NHS, NHS-HBA-CM-PEG-CM-HBA-NHS, mPEG-ButirALD, ButirALD-PEG-ButirALD, PEG ramificado ButirALD (mPEG2-ButirALD), ortopiridilítoéster (mPEG-OPTE), mPEG maleimida (MAL), MAL-PEG-MAL, PEG maleimida ramificado (mPEG2-MAL), maleimida bifurcada (mPEG-MAL2 y mPEG2-MAL2), mPEG-orto-piridilidisulfuro (mPEG-OPSS), OPSS-PEG-OPSS, mPEG-SH, SH-PEG-SH, ácido de PEG-amina, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, MAL-PEG-NHS, vinilsulfona-PEG-NHS, éster de acrilato-PEG-NHS.

Ejemplos no limitantes de PEG que pueden usarse en la pegilación de aminas incluyen, por ejemplo, los PEG fabricados por Jenken Technology USA, tales como: Ésteres de PEG NHS en forma de Y, PEG carboxilo en forma de Y, éster de glucosa de PEG NHS, éster de galactosa de PEG NHS, éster de carboximetilo succinimidilo de metoxi-PEG, metoxi-PEG carboxilo, butanoato de succinimidilo de metoxi-PEG, hexanoato de succinimidilo de metoxi-PEG, ácido hexanoico de succinimidilo de metoxi-PEG, succinamida de succinimidilo de metoxi-PEG, glutaramida de succinimidilo de metoxi-PEG, carbonato de succinimidilo de metoxi-PEG, carbonato de nitrofenilo de metoxi-PEG, succinato de succinimidilo de metoxi-PEG, glutarato de succinimidilo de metoxi-PEG. Ejemplos no limitantes de PEG que pueden usarse en la pegilación de tiol incluyen PEG maleimida en forma de Y, metoxi-PEG maleimida, metoxi-PEG vinilsulfona, metoxi-PEG tiol. Ejemplos no limitantes de PEG que pueden usarse en la pegilación N-terminal incluyen, por ejemplo, PEG fabricados por Jenken Technology USA, tales como: aldehído de PEG en forma de Y, acetaldehído de PEG en forma de Y, propionaldehído de PEG en forma de Y, metoxi-PEG propionaldehído.

En algunos casos, una arginasa recombinante, o un fragmento funcional de la misma, puede tener un peso molecular pequeño en comparación con el oligómero de PEG al que está unido. El peso molecular de un oligómero de PEG puede ser, por ejemplo, no mayor de 100 kilodaltons (kDa), no mayor de 95 kilodaltons, no mayor de 90 kilodaltons, no mayor de 85 kilodaltons (kDa), no mayor de 80 kilodaltons (kDa), no mayor de 75 kilodaltons (kDa), no mayor de 70 kilodaltons (kDa), no mayor de 65 kilodaltons (kDa), no mayor de 60 kilodaltons (kDa), no mayor de 55 kilodaltons (kDa), no mayor de 50 kilodaltons (kDa), no mayor de 45 kilodaltons (kDa), no mayor de 40 kilodaltons (kDa), no mayor de 35 kilodaltons (kDa), no mayor de 30 kilodaltons (kDa), no mayor de 25 kilodaltons (kDa), no mayor de 20 kilodaltons (kDa), no mayor de 15 kilodaltons (kDa), no mayor de 10 kilodaltons (kDa), no mayor de 5 kilodaltons (kDa), no mayor de 1 kilodalton (kDa), o no mayor de 500 daltons (Da).

En algunos casos, el peso molecular de una molécula de PEG puede ser mayor de 500 daltons (Da), mayor de 1 kilodalton (kDa), mayor de 5 kilodaltons (kDa), mayor de 10 kilodaltons (kDa), mayor de 15 kilodaltons (kDa), mayor de 20 kilodaltons (kDa), mayor de 25 kilodaltons (kDa), mayor de 30 kilodaltons (kDa), mayor de 35 kilodaltons (kDa), mayor de 40 kilodaltons (kDa), mayor de 45 kilodaltons (kDa), mayor de 50 kilodaltons (kDa), mayor de 55 kilodaltons (kDa), mayor de 60 kilodaltons (kDa), mayor de 65 kilodaltons (kDa), mayor de 70 kilodaltons (kDa), mayor de 75 kilodaltons (kDa), mayor de 80 kilodaltons (kDa), mayor de 85 kilodaltons (kDa), mayor de 90 kilodaltons (kDa), mayor de 95 kilodaltons (kDa), mayor de 100 kilodaltons (kDa).

En algunos casos, el peso molecular de un oligómero de PEG puede ser de aproximadamente 1 kilodalton (kDa) a aproximadamente 5 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 1 kilodalton (kDa) a aproximadamente 10 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 10 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 20 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 10 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 30 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 10 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 40 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 10 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 50 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 20 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 30 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 20 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 40 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 20 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 50 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 30 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 40 kilodaltons (kDa), de aproximadamente 30 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 50 kilodaltons (kDa).

En algunas modalidades, el peso molecular de un oligómero de PEG es de aproximadamente 5 kilodaltons (kDa). En algunas modalidades, el peso molecular de un oligómero de PEG es de aproximadamente 20 kilodaltons (kDa) a aproximadamente 40 kilodaltons (kDa).

Las arginasas recombinantes modificadas con oligómero(s) de PEG.

En la presente descripción se describen oligómeros de PEG que pueden unirse a las arginasas recombinantes, tales como SEQ ID NO: 1-16 para modificar o mejorar las propiedades reológicas. Los oligómeros de PEG también pueden unirse a fragmentos funcionales de las arginasas recombinantes. Las mejoras pueden conducir a formulaciones mejoradas. Un oligómero de PEG puede unirse covalentemente a una arginasa recombinante. Un oligómero de PEG puede unirse al extremo N-terminal, al extremo C-terminal, o a través de una cadena lateral de la arginasa recombinante. Por ejemplo, un oligómero de PEG podría unirse a un extremo de la secuencia de aminoácidos de la arginasa recombinante, o podría unirse a una cadena lateral, tal como la cadena lateral de un residuo de lisina, serina, treonina, cisteína, tirosina, ácido aspártico, o ácido glutámico. La unión puede ser mediante un enlace amida, un enlace éster, un enlace éter, un enlace carbamato o un enlace tioéter.

En algunos casos, una molécula de polietilenglicol se conjuga con un residuo de cisteína de una arginasa I humana recombinante purificada. En algunos casos, una molécula de polietilenglicol se conjuga con un residuo de amina de una proteína arginasa I humana recombinante purificada. En algunos casos, una molécula de polietilenglicol se conjuga con el N-terminal de una proteína arginasa I humana recombinante purificada. La Figura 14 ilustra un proceso que se utilizó para evaluar la pegilación de una arginasa I humana recombinante.

Composiciones farmacéuticas.

Una composición farmacéutica puede ser una combinación de cualquier arginasa I recombinante descrita en la presente descripción con otros componentes químicos, tales como portadores, estabilizadores, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes. La composición farmacéutica facilita la administración de la arginasa recombinante a un organismo. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en cantidades terapéuticamente efectivas como composiciones farmacéuticas mediante varias formas y vías que incluyen, por ejemplo, la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, rectal, en aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar, transdérmica, vaginal, óptica, nasal y tópica. Una composición farmacéutica puede administrarse de manera local o sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de la arginasa recombinante directamente en un órgano, opcionalmente en un depósito.

Las inyecciones parenterales se pueden formular para inyección en bolo o infusión continua. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma adecuada para inyección parenteral como suspensión, solución o emulsión estériles en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen las soluciones acuosas de la(s) arginasa(s) recombinantes en forma soluble en agua. Las suspensiones de la(s) arginasa(s) recombinantes pueden prepararse como suspensiones oleosas para inyección. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen los aceites grasos tales como el aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como el oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad y/o reducen la agregación de la(s) arginasa(s) recombinante(s) para permitir la preparación de

soluciones de alta concentración. Alternativamente, las arginasas recombinantes pueden liofilizarse o estar en forma de polvo para reconstituirse con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes de su uso. En algunas modalidades, una arginasa recombinante pegilada purificada se administra por vía intravenosa.

La(s) arginasa(s) recombinante(s) puede(n) administrarse por vía tópica y puede(n) formularse en una variedad de composiciones administrables por vía tópica, tales como soluciones, suspensiones, lociones, geles, pastas, barras medicinales, bálsamos, cremas y ungüentos. Estas composiciones farmacéuticas pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

Al poner en práctica el uso proporcionado en la presente descripción, se administran cantidades terapéuticamente efectivas de la(s) arginasa(s) recombinante(s) descrita(s) en la presente descripción en composiciones farmacéuticas a un sujeto que padece una afección que afecta el sistema inmunológico. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero como un ser humano. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar ampliamente en dependencia de la gravedad de la enfermedad, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia de los compuestos usados y otros factores.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse mediante el uso de uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación puede modificarse en dependencia de la vía de administración elegida. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos descritos en la presente descripción pueden fabricarse, por ejemplo, mediante procesos de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o compresión. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y los compuestos descritos en la presente descripción como base libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable.

Los métodos para la preparación de arginasa(s) recombinantes que comprenden los compuestos descritos en la presente descripción incluyen la formulación de las arginasa(s) recombinantes con uno o más excipientes o portadores inertes, farmacéuticamente aceptables para formar una composición sólida, semisólida o líquida. Las composiciones sólidas incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, píldoras y supositorios. Las composiciones líquidas incluyen, por ejemplo, soluciones en las que se disuelve una arginasa(s) recombinante, emulsiones que comprenden una arginasa(s) recombinante o una solución que contiene liposomas, micelas o nanopartículas que comprenden una arginasa(s) recombinante como se describe en la presente descripción. Las composiciones semisólidas incluyen, por ejemplo, geles, suspensiones y cremas. Las composiciones pueden estar en soluciones o suspensiones líquidas, las formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en un líquido antes de su uso, o como emulsiones. Estas composiciones también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y otros aditivos farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos no limitantes de excipientes farmacéuticamente aceptables pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, decimonovena edición (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania 1975; Liberman, H.A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, séptima edición (Lippincott Williams & Wilkins 1999).

Métodos de administración.

Las composiciones farmacéuticas que contienen arginasa(s) recombinantes, o fragmentos funcionales de arginasas recombinantes, descritas en la presente descripción, pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones pueden administrarse a un sujeto que ya padece una enfermedad o afección, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad o afección, o para curar, sanar, mejorar o aliviar la condición. También puede(n) administrarse arginasa(s) recombinante(s) para disminuir la probabilidad de desarrollar, contraer o empeorar una afección. Las cantidades efectivas para este uso pueden variar en base a la gravedad y el curso de la enfermedad o afección, la terapia previa, el estado de salud del sujeto, el peso y la respuesta a los fármacos y el criterio del médico tratante. En algunas modalidades, la enfermedad inflamatoria es una inflamación crónica o aguda en un hueso. En algunas modalidades, la arginasa recombinante purificada es una arginasa I humana recombinante pegilada. En algunas modalidades, la arginasa I humana es la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, o la SEQ ID NO: 16. En algunas modalidades, la arginasa I humana recombinante pegilada comprende la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la

SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, o la SEQ ID NO: 16.

Pueden administrarse múltiples arginasa(s) recombinantes en cualquier orden o simultáneamente. En algunos casos, pueden administrarse múltiples fragmentos funcionales de las arginasas recombinantes en cualquier orden o simultáneamente. Si simultáneamente, las múltiples arginasa(s) recombinantes pueden proporcionarse en una forma única y unificada, como una inyección intravenosa, o en múltiples formas, por ejemplo, como múltiples inyecciones intravenosas o píldoras. Las arginasa(s) recombinantes pueden empaquetarse juntas o por separado, en un solo paquete o en una pluralidad de paquetes. Una o todas las arginasa(s) recombinantes pueden administrarse en múltiples dosis. Si no es simultáneo, el tiempo entre las múltiples dosis puede variar hasta aproximadamente un mes.

Los compuestos y composiciones descritos en la presente descripción se pueden empaquetar como un kit. Un kit puede incluir instrucciones escritas sobre el uso de los compuestos y las composiciones.

Las arginasas recombinantes, o fragmentos funcionales de las mismas, descritas en la presente descripción, pueden administrarse antes, durante o después de la aparición de una enfermedad o afección, y el momento de administración de la composición que contiene una arginasa(s) recombinantes puede variar. Por ejemplo, la(s) arginasa(s) recombinante(s) pueden usarse como profiláctico y se pueden administrar de forma continua a sujetos con propensión a padecer afecciones o enfermedades con el fin de disminuir la probabilidad de aparición de la enfermedad o afección. La(s) arginasa(s) recombinante(s) pueden administrarse a un sujeto durante o tan pronto como sea posible después del inicio de los síntomas. La administración de la(s) arginasa(s) recombinante(s) puede iniciarse inmediatamente dentro del inicio de los síntomas, dentro de las primeras 3 horas desde el inicio de los síntomas, dentro de las primeras 6 horas desde el inicio de los síntomas, dentro de las primeras 24 horas del inicio de los síntomas, dentro de las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas, o dentro de cualquier período de tiempo desde el inicio de los síntomas. La administración inicial puede ser por cualquier vía práctica, tal como por cualquier vía descrita en la presente descripción mediante el uso de cualquier formulación descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, la administración de una arginasa humana recombinante pegilada de la descripción es una administración intravenosa. Puede administrarse una arginasa(s) recombinante(s) tan pronto como sea posible después de que se detecte o sospeche la aparición de una enfermedad o afección inmunitaria, y durante el tiempo necesario para el tratamiento de la enfermedad inmunitaria, tales como, por ejemplo, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas, de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 1 mes, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 meses. En algunas modalidades, puede administrarse una arginasa(s) recombinante(s) durante al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 96 horas, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, o al menos 5 años. La duración del tratamiento puede variar para cada sujeto. En algunas modalidades, la pegilación de la arginasa recombinante modula la vida media de la arginasa recombinante *in vivo*.

Dosis.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden estar en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración única de dosis precisas. En forma de dosis unitaria, la formulación se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas de uno o más compuestos. La dosis unitaria puede estar en forma de un paquete que contiene cantidades discretas de la formulación. Ejemplos no limitantes son comprimidos o cápsulas empaquetadas, y polvos en viales o ampulas. Las composiciones de suspensión acuosa pueden empaquetarse en contenedores de dosis única que no se pueden volver a cerrar. Los contenedores que se pueden volver a cerrar de dosis múltiples pueden usarse, por ejemplo, en combinación con un conservante o sin un conservante. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica no comprende un conservante. Las formulaciones para la inyección parenteral pueden presentarse en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampulas o en contenedores de dosis múltiples, con un conservante.

Una arginasa(s) recombinante(s), o un fragmento funcional de las mismas, descrita en la presente descripción, puede estar presente en una composición en un intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2000 mg; de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 350 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 450 mg, de aproximadamente 450 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente

500 mg a aproximadamente 550 mg, de aproximadamente 550 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 600 mg a aproximadamente 650 mg, de aproximadamente 650 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 700 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 750 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 850 mg, de aproximadamente 850 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 900 mg a aproximadamente 950 mg, o de aproximadamente 950 mg a aproximadamente 1000 mg.

Una arginasa(s) recombinante(s), o un fragmento funcional de la misma, descrita en la presente descripción, puede estar presente en una composición en una cantidad de aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 850 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 950 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1050 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1150 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1250 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1350 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1450 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1550 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1650 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1750 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1850 mg, aproximadamente 1900 mg, aproximadamente 1950 mg, o aproximadamente 2000 mg.

La dosis terapéuticamente efectiva de una arginasa recombinante pegilada, o un fragmento funcional de la misma, puede ser de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 10 ng/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 100 ng/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 250 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1750 mg/kg, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 100 ng/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 250 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 1750 mg/kg, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1750 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 1750 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 1750 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 500 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 500 mg/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 500 mg/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de

aproximadamente 500 mg/kg a aproximadamente 1750 mg/kg, de aproximadamente 500 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 750 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 750 mg/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 750 mg/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 750 mg/kg a aproximadamente 1750 mg/kg, de aproximadamente 750 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 1000 mg/kg a aproximadamente 1250 mg/kg, de aproximadamente 1000 mg/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 1000 mg/kg a aproximadamente 1750 mg/kg, o de aproximadamente 1000 mg/kg a aproximadamente 2.000 mg/kg.

En algunas modalidades, la cantidad terapéuticamente efectiva de una arginasa I humana recombinante pegilada purificada, o un fragmento funcional de la misma, es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En algunas modalidades, la cantidad terapéuticamente efectiva de arginasa I humana recombinante pegilada purificada es de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. En algunas modalidades, la cantidad terapéuticamente efectiva de arginasa I humana recombinante pegilada purificada, o un fragmento funcional de la misma, es mayor que 100 mg/kg.

Medidas farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos pueden obtenerse mediante varias técnicas experimentales. Los componentes del perfil farmacocinético y farmacodinámico apropiados que describen una composición particular pueden variar debido a las variaciones en el metabolismo del fármaco en diferentes sujetos. Los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos pueden basarse en la determinación de los parámetros medios de un grupo de sujetos. El grupo de sujetos incluye cualquier número razonable de sujetos adecuados para determinar una media representativa, por ejemplo, 5 sujetos, 10 sujetos, 15 sujetos, 20 sujetos, 25 sujetos, 30 sujetos, 35 sujetos, o más. La media se determina mediante el cálculo del promedio de todas las mediciones del sujeto para cada parámetro medido.

Se puede modular una dosis para lograr un perfil farmacocinético o farmacodinámico deseado, tal como un perfil sanguíneo deseado o efectivo, como se describe en la presente descripción. Para caracterizar mejor la cinética enzimática de la arginasa I humana recombinante *in vitro*, se midió la K_m , V_{max} , K_{cat} y K_{cat}/K_m de cinco arginasas recombinantes diferentes. El resumen del estudio de cinética enzimática de cinco arginasas recombinantes humanas se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2				
Mutante	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}^* \text{ml}^{-1} * \text{min}^{-1}$)	K_{cat} (sec^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{sec}^{-1}$)
SEQ ID NO: 1	2,37	0,037	546,4	229,8
SEQ ID NO: 5	1,80	0,027	397	220,4
SEQ ID NO: 6	2,19	0,034	498	226,7
SEQ ID NO: 8	2,59	0,038	562,8	216,8
SEQ ID NO: 7	2,02	0,032	470,8	232,9

Los parámetros farmacocinéticos pueden ser cualquier parámetro adecuado para describir los perfiles plasmáticos de una arginasa I recombinante o un fragmento funcional de la misma. Por ejemplo, el perfil farmacocinético puede obtenerse en un momento después de la dosificación de, por ejemplo, aproximadamente cero minutos, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 6 minutos, aproximadamente 7 minutos, aproximadamente 8 minutos, aproximadamente 9 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 11 minutos, aproximadamente 12 minutos, aproximadamente 13 minutos, aproximadamente 14 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 16 minutos, aproximadamente 17 minutos, aproximadamente 18 minutos, aproximadamente 19 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 21 minutos, aproximadamente 22 minutos, aproximadamente 23 minutos, aproximadamente 24 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 26 minutos, aproximadamente 27 minutos, aproximadamente 28 minutos, aproximadamente 29 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 31 minutos, aproximadamente 32 minutos, aproximadamente 33 minutos, aproximadamente 34 minutos, aproximadamente 35 minutos, aproximadamente 36 minutos, aproximadamente 37 minutos, aproximadamente 38 minutos, aproximadamente 39 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 41 minutos, aproximadamente 42 minutos, aproximadamente 43 minutos, aproximadamente 44 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 46 minutos, aproximadamente 47 minutos, aproximadamente 48 minutos,

aproximadamente 49 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 51 minutos, aproximadamente 52 minutos, aproximadamente 53 minutos, aproximadamente 54 minutos, aproximadamente 55 minutos, aproximadamente 56 minutos, aproximadamente 57 minutos, aproximadamente 58 minutos, aproximadamente 59 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente cero horas, aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 5,5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 6,5 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 7,5 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 8,5 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 9,5 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 10,5 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 11,5 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 12,5 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 13,5 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 14,5 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 15,5 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 16,5 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 17,5 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 18,5 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 19,5 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 20,5 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 21,5 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 22,5 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 23,5 horas, o aproximadamente 24 horas.

Los parámetros farmacocinéticos pueden ser cualquier parámetro adecuado para describir una arginasa I recombinante o un fragmento funcional de la misma. La C_{máx} puede ser, por ejemplo, no menos de aproximadamente 1 µg/mL; no menos de aproximadamente 5 µg/mL; no menos de aproximadamente 10 µg/mL; no menos de aproximadamente 15 µg/mL; no menos de aproximadamente 20 µg/mL; no menos de aproximadamente 25 µg/mL; no menos de aproximadamente 50 µg/mL; no menos de aproximadamente 75 µg/mL; no menos de aproximadamente 100 µg/mL; no menos de aproximadamente 200 µg/mL; no menos de aproximadamente 300 µg/mL; no menos de aproximadamente 400 µg/mL; no menos de aproximadamente 500 µg/mL; no menos de aproximadamente 600 µg/mL; no menos de aproximadamente 700 µg/mL; no menos de aproximadamente 800 µg/mL; no menos de aproximadamente 900 µg/mL; no menos de aproximadamente 1000 µg/mL; no menos de aproximadamente 1250 µg/mL; no menos de aproximadamente 1500 µg/mL; no menos de aproximadamente 1750 µg/mL; no menos de aproximadamente 2000 µg/mL; o cualquier otra C_{máx} apropiada para describir un perfil farmacocinético de una arginasa descrita en la presente descripción. La C_{máx} puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 5000 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 4500 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 4000 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 3500 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 3000 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 2500 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 2000 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 1500 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 1000 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 900 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 800 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 700 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 600 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 500 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 450 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 400 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 350 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 300 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 250 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 200 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 150 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 125 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 100 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 90 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 80 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 70 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 60 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 50 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 40 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 30 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 20 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 10 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 5 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 4000 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 3000 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 2000 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 1500 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 1000 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 900 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 800 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 700 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 600 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 500 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 400 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 300 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 200 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 100 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 50 µg/mL; de aproximadamente 25 µg/mL a aproximadamente 500 µg/mL; de aproximadamente 25 µg/mL a aproximadamente 100 µg/mL; de aproximadamente 50 µg/mL a aproximadamente 500 µg/mL; de aproximadamente 50 µg/mL a aproximadamente 100 µg/mL; de aproximadamente 100 µg/mL a aproximadamente 500 µg/mL; de aproximadamente 100 µg/mL a aproximadamente 400 µg/mL; de aproximadamente 100 µg/mL a aproximadamente 300 µg/mL; o de aproximadamente 100 µg/mL a aproximadamente 200 µg/mL.

El $t_{\text{máx}}$ de una arginasa I, o un fragmento funcional de la misma, descrita en la presente descripción puede ser, por ejemplo, no mayor de aproximadamente 0,5 horas, no mayor de aproximadamente 1 hora, no mayor de aproximadamente 1,5 horas, no mayor de aproximadamente 2 horas, no mayor de aproximadamente 2,5 horas, no mayor de aproximadamente 3 horas, no mayor de aproximadamente 3,5 horas, no mayor de aproximadamente 4 horas, no mayor de aproximadamente 4,5 horas, no mayor de aproximadamente 5 horas, o cualquier otro $t_{\text{máx}}$ apropiado para describir un perfil farmacocinético de un compuesto descrito en la presente descripción. El $t_{\text{máx}}$ puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 horas a aproximadamente 24 horas; de aproximadamente 0,1 horas a aproximadamente 0,5 horas; de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 1 hora; de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1,5 horas; de aproximadamente 1,5 horas a aproximadamente 2 horas; de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 2,5 horas; de aproximadamente 2,5 horas a aproximadamente 3 horas; de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 3,5 horas; de aproximadamente 3,5 horas a aproximadamente 4 horas; de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 4,5 horas; de aproximadamente 4,5 horas a aproximadamente 5 horas; de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 5,5 horas; de aproximadamente 5,5 horas a aproximadamente 6 horas; de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 6,5 horas; de aproximadamente 6,5 horas a aproximadamente 7 horas; de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 7,5 horas; de aproximadamente 7,5 horas a aproximadamente 8 horas; de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 8,5 horas; de aproximadamente 8,5 horas a aproximadamente 9 horas; de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 9,5 horas; de aproximadamente 9,5 horas a aproximadamente 10 horas; de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 10,5 horas; de aproximadamente 10,5 horas a aproximadamente 11 horas; de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 11,5 horas; de aproximadamente 11,5 horas a aproximadamente 12 horas; de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 12,5 horas; de aproximadamente 12,5 horas a aproximadamente 13 horas; de aproximadamente 13 horas a aproximadamente 13,5 horas; de aproximadamente 13,5 horas a aproximadamente 14 horas; de aproximadamente 14 horas a aproximadamente 14,5 horas; de aproximadamente 14,5 horas a aproximadamente 15 horas; de aproximadamente 15 horas a aproximadamente 15,5 horas; de aproximadamente 15,5 horas a aproximadamente 16 horas; de aproximadamente 16 horas a aproximadamente 16,5 horas; de aproximadamente 16,5 horas a aproximadamente 17 horas; de aproximadamente 17 horas a aproximadamente 17,5 horas; de aproximadamente 17,5 horas a aproximadamente 18 horas; de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 18,5 horas; de aproximadamente 18,5 horas a aproximadamente 19 horas; de aproximadamente 19 horas a aproximadamente 19,5 horas; de aproximadamente 19,5 horas a aproximadamente 20 horas; de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 20,5 horas; de aproximadamente 20,5 horas a aproximadamente 21 horas; de aproximadamente 21 horas a aproximadamente 21,5 horas; de aproximadamente 21,5 horas a aproximadamente 22 horas; de aproximadamente 22 horas a aproximadamente 22,5 horas; de aproximadamente 22,5 horas a aproximadamente 23 horas; de aproximadamente 23 horas a aproximadamente 23,5 horas; o de aproximadamente 23,5 horas a aproximadamente 24 horas.

El AUC_(0-inf.) de una arginasa I, o un fragmento funcional de la misma, descrito en la presente descripción puede ser, por ejemplo, no menos de aproximadamente 100 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 125 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 150 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 175 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 200 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 250 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 300 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 350 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 400 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 500 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 600 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 700 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 800 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 900 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 1000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 2000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 3000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 4000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 5000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 6000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 7000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 8000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 9000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 10000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 11 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 12 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 13 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 14 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 15 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 16 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 17 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 18 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 19 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 20 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 21 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 22 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 23 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 24 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 25 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 26 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 27 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 28 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 29 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 30 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 31 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 32 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 33 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 34 000 µg·h/mL, no menos de aproximadamente 35 000 µg·h/mL, o cualquier otra AUC_(0-inf.) apropiado para describir un perfil farmacocinético de una arginasa descrita en la presente descripción.

El AUC_(0-inf.) de una Arginasa I, o un fragmento funcional de la misma, descrita en la presente descripción puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1000 µg•h/mL a aproximadamente 1250 µg•h/mL; de aproximadamente

1250 µg·h/mL a aproximadamente 1500 µg·h/mL; de aproximadamente 1500 µg·h/mL a aproximadamente 1750 µg·h/mL; de aproximadamente 1750 µg·h/mL a aproximadamente 2000 µg·h/mL; de aproximadamente 2000 µg·h/mL a aproximadamente 2500 µg·h/mL; de aproximadamente 2500 µg·h/mL a aproximadamente 3000 µg·h/mL; aproximadamente 3000 µg·h/mL a aproximadamente 3500 µg·h/mL; aproximadamente 3500 µg·h/mL a aproximadamente 4000 µg·h/mL; aproximadamente 4000 µg·h/mL a aproximadamente 4500 µg·h/mL; aproximadamente 4500 µg·h/mL a aproximadamente 5000 µg·h/mL; aproximadamente 5000 µg·h/mL a aproximadamente 5500 µg·h/mL; aproximadamente 5500 µg·h/mL a aproximadamente 6000 µg·h/mL; aproximadamente 6000 µg·h/mL a aproximadamente 6500 µg·h/mL; aproximadamente 6500 µg·h/mL a aproximadamente 7000 µg·h/mL; aproximadamente 7000 µg·h/mL a aproximadamente 7500 µg·h/mL; aproximadamente 7500 µg·h/mL a aproximadamente 8000 µg·h/mL; aproximadamente 8000 µg·h/mL a aproximadamente 8500 µg·h/mL; aproximadamente 8500 µg·h/mL a aproximadamente 9000 µg·h/mL; aproximadamente 9000 µg·h/mL a aproximadamente 9500 µg·h/mL; aproximadamente 9500 µg·h/mL a aproximadamente 10 000 µg·h/mL; aproximadamente 10 000 µg·h/mL a aproximadamente 20 000 µg·h/mL; aproximadamente 20 000 µg·h/mL a aproximadamente 30 000 µg·h/mL; aproximadamente 30 000 µg·h/mL a aproximadamente 40 000 µg·h/mL; aproximadamente 40 000 µg·h/mL a aproximadamente 50 000 µg·h/mL; aproximadamente 50 000 µg·h/mL a aproximadamente 60 000 µg·h/mL; aproximadamente 60 000 µg·h/mL a aproximadamente 70 000 µg·h/mL; de aproximadamente 70 000 µg·h/mL a aproximadamente 80 000 µg·h/mL; de aproximadamente 80 000 µg·h/mL a aproximadamente 90 000 µg·h/mL; o de aproximadamente 90 000 µg·h/mL a aproximadamente 100 000 µg·h/mL.

[illegible]

aproximadamente 160 µg/mL, no menos de aproximadamente 165 µg/mL, no menos de aproximadamente 170 µg/mL, no menos de aproximadamente 175 µg/mL, no menos de aproximadamente 180 µg/mL, no menos de aproximadamente 185 µg/mL, no menos de aproximadamente 190 µg/mL, no menos de aproximadamente 195 µg/mL, no menos de aproximadamente 200 µg/mL, no menos de aproximadamente 205 µg/mL, no menos de aproximadamente 210 µg/mL, no menos de aproximadamente 215 µg/mL, no menos de aproximadamente 220 µg/mL, no menos de aproximadamente 225 µg/mL, no menos de aproximadamente 230 µg/mL, no menos de aproximadamente 235 µg/mL, no menos de aproximadamente 240 µg/mL, no menos de aproximadamente 245 µg/mL, no menos de aproximadamente 250 µg/mL, o cualquier otra concentración plasmática de un compuesto descrito en la presente descripción.

La concentración plasmática puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 2 µg/mL; de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 5 µg/mL; de aproximadamente 5 µg/mL a aproximadamente 10 µg/mL; de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 25 µg/mL; de aproximadamente 25 µg/mL a aproximadamente 50 µg/mL; de aproximadamente 50 µg/mL a aproximadamente 75 µg/mL; de aproximadamente 75 ng/mL a aproximadamente 100 µg/mL; de aproximadamente 100 µg/mL a aproximadamente 150 µg/mL; de aproximadamente 100 µg/mL a aproximadamente 200 µg/mL de aproximadamente 150 µg/mL a aproximadamente 200 µg/mL; de aproximadamente 200 µg/mL a aproximadamente 250 µg/mL; de aproximadamente 250 µg/mL a aproximadamente 300 µg/mL; de aproximadamente 300 µg/mL a aproximadamente 350 µg/mL; de aproximadamente 350 µg/mL a aproximadamente 400 µg/mL; de aproximadamente 400 µg/mL a aproximadamente 450 µg/mL; de aproximadamente 450 µg/mL a aproximadamente 500 µg/mL; de aproximadamente 500 µg/mL a aproximadamente 600 µg/mL; de aproximadamente 600 µg/mL a aproximadamente 700 µg/mL; de aproximadamente 700 µg/mL a aproximadamente 800 µg/mL; de aproximadamente 800 µg/mL a aproximadamente 900 µg/mL; de aproximadamente 900 µg/mL a aproximadamente 1000 µg/mL; de aproximadamente 1000 µg/mL a aproximadamente 1100 µg/mL; de aproximadamente 1100 µg/mL a aproximadamente 1200 µg/mL; de aproximadamente 1200 µg/mL a aproximadamente 1300 µg/mL; de aproximadamente 1300 µg/mL a aproximadamente 1400 µg/mL; de aproximadamente 1400 µg/mL a aproximadamente 1500 µg/mL; de aproximadamente 1500 µg/mL a aproximadamente 1600 µg/mL; de aproximadamente 1600 µg/mL a aproximadamente 1700 µg/mL; de aproximadamente 1700 µg/mL a aproximadamente 1800 µg/mL; de aproximadamente 1800 µg/mL a aproximadamente 1900 µg/mL; o de aproximadamente 1900 µg/mL a aproximadamente 2000 µg/mL.

Ejemplo 1. Modulación del sistema inmunológico con arginasa I recombinante.

Los siguientes experimentos se realizaron para caracterizar la función de una arginasa purificada en la modulación de una afección inmunológica, como una afección asociada con una inflamación.

Materiales y Métodos.

Ratones: ratones con PTEN flanqueado por sitios loxP descritos por Tak W. Mak (Suzuki, A. y otros 2001. T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 14: 523-534). Los ratones LysM cre se describieron originalmente por Clausen y otros (Clausen, B. E. y otros Transgenic Res. 8: 265-277). Se realizaron experimentos controlados por compañeros de camada con ratones de tipo salvaje con 8-12 semanas de edad, con PTEN flanqueado por sitios loxP cre positivos y cre negativos sobre un fondo C57Bl/6, que se retrocruzaron durante al menos 10 generaciones. Se usaron ratones DBA en los experimentos de artritis inducida por colágeno. Todos los animales fueron criados y alojados en una instalación SPF de la Universidad Médica de Viena con un ciclo de 12 h/12 h día/noche y temperatura constante. Se usaron ratones de ambos sexos y no se encontraron diferencias específicas de género.

Genotipaje: los ratones se marcaron en la oreja de 3-4 semanas después del nacimiento. El ADN del tejido de la oreja lisado (tampón de lisis con proteinasa K) se sometió a PCR directa mediante el uso de la polimerasa GoTaq (Promega™). Se realizaron PCR específicas con los siguientes cebadores: Cebador de PTEN: directo, 5'-CTCCTCTACTCCATTCTTCCC-3', inverso, 5'-ACTCCACCAATGAACAAAC-3'; cebador de cre: directo, 5'-TCGCGATTATCTTCTATCTTCAG-3', inverso, 5'-GCTCGACCAGTTTAGTTACCC-3'.

Preparación y cultivo de macrófagos primarios: se generaron macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato mediante la inyección de 2 mL de tioglicolato al 4 % (Sigma™) en la cavidad peritoneal seguido de lavado peritoneal con medio vacío 3 días después. Los macrófagos aislados se sembraron a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio RPMI-1640 (Invitrogen™) complementado con FCS al 10 %, penicilina/estreptomizina/fungizona al 1 %, L-glutamina al 1 %, y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Se permitió que las células se recuperaran durante la noche y las estimulaciones *in vitro* se llevaron a cabo mediante la complementación del cultivo de macrófagos con los siguientes agentes y citocinas: Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* 0111:B4 100 ng/mL ultrapuro (Invivogen™), 100 nM de wortmanina (Sigma™), N-hidroxi-L-arginina 10 o 200 pM (Calbiochem™) o 5 ng/mL de IL-4/IL-13 de ratón recombinante (R&D Systems™). Las estimulaciones se llevaron a cabo durante 3, 8 o 24 horas para la extracción de ARN, el ensayo ABCD o el aislamiento de proteínas y la medición de citocinas, respectivamente.

Preparación y cultivo de células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC): se lavaron las células de médula ósea de los fémures y tibias de los ratones indicados y se cultivaron en medio RPMI completo complementado con 20 ng/mL de GM-CSF de ratón recombinante (R&D Systems™) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. La mitad del medio se reemplazó con medio fresco complementado con 20 ng/mL de GM-CSF el día 3 y el día 6 después del aislamiento. Las células dendríticas (DC) se recolectaron y activaron el día 7 y el estado de maduración se determinó por citometría de flujo mediante el uso de anticuerpos conjugados fluorescentes contra CD80 (PE-Cy5™) y MHC-IE (PerCP-eFluor 710™) (eBioscience™). Las muestras se incubaron con la mezcla de anticuerpos durante 15 min a 4 °C y subsecuentemente se adquirieron en un citómetro de flujo LSRII (Beckton Dickinson™). Los datos se analizaron mediante el uso del programa FlowJo™ Software 10.0 (Treestar™).

Inmunotransferencia: las células se homogeneizaron y lisaron en tampón de Laemmli. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de poli(acrilamida) desnaturante al 10 %, que se tiñó con azul Coomassie Brilliant (Thermo Scientific Pierce™) después de la electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF™, Millipore™) y, después del bloqueo con leche seca al 5 %/Tween 20 al 0,1 %, se incubaron durante la noche con anticuerpo primario. Se usaron los siguientes anticuerpos: anti-arginasa 1 de pollo (amablemente proporcionado por el Dr. Morris), anticuerpos de conejo contra iNOS (NEB™), PTEN, STAT6, pSTAT6 (Cell Signaling Technology™), C/EBPβ (Santa Cruz Biotech) o β-actina (Sigma™). Después de la incubación durante 2 h a temperatura ambiente (TA) con el respectivo anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y después del revelado con SuperSignal West Femto (Pierce™), las señales se detectaron mediante el uso de quimioluminiscencia (generador de imágenes de quimioluminiscencia FluorChem HD2, Alpha Innotech™). Las bandas se analizaron de acuerdo con su peso molecular.

Ensayo del Complejo avidina-biotina ADN (ABCD): las células se lisaron con tampón de lisis (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, glicerol al 10 %, NP-40 al 0,5 %, DTT 1 mM, inhibidor de proteasa), se sometieron a ultrasonidos (6 impulsos durante 2 segundos), se centrifugaron y los sobrenadantes se incubaron con tampón H (HEPES 20 mM pH 7,9, KCl 50 mM, glicerol al 20 %, DTT 1 mM, NP-40 al 0,1 %), 2 µg de oligo 5'-biotinilado y 20 µg de ADN de esperma de arenque durante 5 min a 37 °C seguido de incubación en hielo durante 1 h. Para el control del competidor (comp) se añadió un exceso de oligo no biotinilado de 10 veces. El control negativo (nc) contenía lisado celular, ADN de esperma de arenque y tampón H. Se añadieron perlas de estreptavidina-agarosa equilibradas con tampón H (Novagen™) a las muestras arrastradas y controles y luego se incubaron durante 30 min a 4 °C en un rotador. Las perlas se centrifugaron, se lavaron varias veces con tampón H, se hirvieron en tampón Laemmli y se separaron mediante SDS-PAGE. Se detectó la C/EBPβ mediante transferencia Western (Santa Cruz Biotech™). Los oligos 5'-biotinilados y no biotinilados se solicitaron a MicroSynth: C/EBPβ_dir. TAT TAG CCA ATA TTA GCC AAT ATT AGC CAA TAT TAG CCA, C/EBPβ_inv: TGG CTA ATA TTG GCT AAT ATT GGC TAA TAT TGG CTA ATA.

Aislamiento de ARN total, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR): Las células se homogeneizaron y aislaron con Trifast Reagent (PEQLAB Biotechnology GmbH™) según las instrucciones del fabricante. Los ADNc se transcribieron mediante el uso del kit de transcripción inversa de ADNc High Capacity (Fermentas™) como se indica en el manual de instrucciones. La expresión de ARNm se cuantificó por PCR en tiempo real mediante el uso de mezcla maestra Fast SYBR Green (Applied Biosystems™) con el sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems™) y los cebadores en la Tabla 3. Las muestras se analizaron por duplicado en dependencia de la calidad de sus curvas de fusión. Los niveles de genes diana se normalizaron a HPRT o GAPDH y se describieron como veces de la inducción de células no estimuladas.

TABLA 3		
Diana	Directo (5' a 3')	Inverso (5' a 3')
PTEN	ACA CCG CCA AAT TTA ACT GC	TAC ACC AGT CCG TCC CTT TC
Arginasa 1	GTC AAG AAC CCA CGG TCT GT	CTG GTT GTC AGG GGA GTG TT
Ym-1	TTT CTC CAG TGT AGC CAT CCT T	TCT GGG TAC AAG ATC CCT GAA
Fizz-1	CTG GAT TGG CAA GAA GTT CC	CCC TTC TCA TCT GCA TCT CC
Estabilina-1	CCC TCC TTC TGC TCT GTG TC	CAA ACT TGG TGT GGA TGT CG

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA): Los niveles en el sobrenadante de las citocinas seleccionadas secretadas por linfocitos o macrófagos se midieron mediante el uso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) disponible comercialmente (todos de eBioscience) para la cuantificación de IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-12/23 (p40/subunidad común) e IL-17A de acuerdo con el protocolo del

fabricante. Se analizaron las IL-6 e IL-12/23 en los sobrenadantes de los macrófagos 24 h después de la estimulación con LPS. Se midieron la IL-2, el IFN- γ y la IL-17A en los sobrenadantes recogidos en el día 4 de las reacciones leucocitarias mixtas alogénicas y de esplenocitos y linfocitos reestimulados de ratones inmunizados con la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG). Brevemente, las placas se recubrieron con anticuerpo de captura, se bloquearon y se cargaron las muestras diluidas y estándares para la incubación durante la noche. A continuación, las placas se incubaron con anticuerpo de detección y luego con estreptavidina-HRP (R&D Systems™) para el desarrollo de la peroxidasa de micropocillos de 2 componentes TMB.

Inducción de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) y reestimulación *ex vivo*: Los ratones se asignaron a 4 grupos, cada uno de los cuales consistía en 4 a 8 ratones (ver el diseño del estudio en la Tabla 4). Brevemente, para la inmunización se inyectaron a los ratones 150 μ L de una emulsión que contenía partes iguales de MOG₃₅₋₅₅ (1 mg/mL, Charite Berlin™) e IFA (Sigma™) complementado con 10 mg/mL de Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco™).

En el momento de la inmunización y el segundo día después de la inmunización, se administraron 200 ng de toxina pertussis (Calbiochem™) por la vía intraperitoneal. Para la administración *in vivo* de arginasa I humana recombinante purificada se inyectaron por vía intravenosa 10 mg/kg de peso corporal en los días -4 y -2 antes de la inmunización, o con 10 mg/kg o 1 mg/kg de peso corporal en los días -4, -2 antes, y 5 y 7 después de la inmunización. Los ratones se observaron diariamente en busca de signos clínicos. La progresión de la EAE se dividió en 4 etapas clínicas: grado 0: sin signos, grado 1: cola flácida completa, grado 2: paraparesia severa, grado 3: tetraparesia, grado 4: estado moribundo. Para la estimulación *ex vivo*, se aislaron linfocitos y esplenocitos y se estimularon con 30 μ g/mL del péptido MOG afín durante 3 días para el análisis de la proliferación y las mediciones de citocinas.

Reacción leucocitaria mixta (MLR): Las CD de tipo salvaje se generaron como se describe. Una parte de las células se estimuló con 30 μ g/mL de arginasa I humana recombinante purificada (SEQ ID NO: 9) durante 24 h en el día 6 de diferenciación, la otra parte actuó como control no estimulado. La MLR se realizó el día 7 de diferenciación en ausencia de la arginasa I humana recombinante purificada (SEQ ID NO: 9), que se eliminó mediante un lavado preciso. En resumen, todas las células se activaron y cargaron con LPS (100 ng/mL, Invitrogen™) y ovoalbúmina (50 μ g/mL, Sigma™) durante 4 horas, se lavaron y se cultivaron conjuntamente con células OT-II. Se aislaron las células T respondedoras de los bazo de ratones OT-II mediante la clasificación de células magnéticas positivas mediante el uso de un kit de aislamiento de células pan T (Miltenyi Biotec™), marcadas con CFSE 7 μ M/ 1×10^7 células de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma™). Las CD (100 000 células) se lavaron y se sembraron en placas de 48 pocillos junto con células T respondedoras (500 000 células) en un volumen total de 500 μ L. El día 3 del cocultivo, se recogieron las células, se fijaron y se sometieron a tinción intracelular. Para la proliferación, las células se recolectaron en tubos TruCount y se analizaron para la dilución de CFSE.

Fenotipaje de células T CD4* por citometría de flujo: Las células se aislaron de cultivos de MLR *in vitro* el día 3 y se reestimularon con PMA/ionomicina (Sigma™) junto con Golgi-Stop (BD Biosciences™) y se analizaron para determinar citocinas intracelulares. Se usaron los siguientes anticuerpos para la tinción de citocinas: CD4 - PerCP antirratón (clon RM4-5, BD Pharmingen™), CD25 - PE-Cy7 (clon PC61.5), IL-2 - eFlour® 450 (clon JES6-5H4), IL-10 - Alexa Flour® 647 (clon JES5-16E3), IL-17A - PE-Cy7 (clon 17B7), IFN γ -PE (clon XMG1.2, todos de eBioscience™). La adquisición de células y el análisis de datos se realizaron en un citómetro de flujo LSR 2 (BD Biosciences™) y el programa FlowJo™ versión 10.0 (Treestar™).

Estadísticas: La significación estadística de los datos se calculó mediante el uso de una prueba t de Student bilateral para datos independientes. Se utilizó el análisis ANOVA de dos vías para analizar dos grupos a lo largo del tiempo. El análisis estadístico se realizó mediante el uso del programa GraphPad Prism (GraphPad™ Software, La Jolla, EE. UU.). Los resultados se presentan como la media $\pm$ la desviación estándar. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos (los valores de p se expresaron de la siguiente manera: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Resultados.

Para caracterizar mejor la respuesta biológica cruzada entre la expresión de la arginasa I y la activación de las células inmunitarias, se investigó el perfil de expresión del ARNm de arginasa I en diferentes condiciones. Se identificaron niveles aumentados de ARNm de arginasa I en un análisis amplio del genoma de células dendríticas deficientes en PTEN y células de control derivadas de la camada. La Figura 1 ilustra la regulación positiva de la arginasa I por LPS en macrófagos. En la Figura 1, los macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato (tPM) se indujeron con LPS de *E.coli* O111:B4 durante 8 h y 24 h. La expresión de la arginasa I aumentó a nivel de ARNm 8 horas después de la estimulación con LPS (Figura 1, Panel A) y a nivel de proteínas dentro de las 24 horas posteriores a la inducción con LPS (Figura 1, Panel B). Estos puntos de tiempo se seleccionaron para un análisis adicional de la expresión de la arginasa I mediada por LPS en dependencia de la vía de señalización de PI3K/PTEN en macrófagos.

La alta expresión de la arginasa I en los macrófagos deficientes en PTEN sugirió que uno o más componentes de las vías de transducción de señales implicadas en la inmunidad innata podrían regular, o ser reguladas, por la expresión de la arginasa I. La Figura 2 ilustra un aumento en la expresión de la arginasa I acompañado de la pérdida de PTEN. La Figura 2, panel A ilustra la marcada regulación positiva del ARNm de arginasa I en macrófagos peritoneales vírgenes no estimulados deficientes en PTEN. Estos experimentos se realizaron en macrófagos peritoneales residentes y en macrófagos peritoneales estériles inducidos por inflamación (Figura 2, paneles B y C). De acuerdo con la expresión del ARNm de arginasa I regulada positivamente, se observaron niveles aumentados de ARNm para la estabilina 1 en tPM PTEN^{-/-} no estimulados (Figura 2, panel D), y expresión reducida de YM1 y FIZZ (Figura 2, paneles E y F). También se confirmó el aumento en la expresión de proteínas de la arginasa I en las células PTEN negativas. Para evaluar más a fondo la función de la arginasa I en respuesta a eventos de señalización inducidos por LPS, se analizaron los niveles de expresión de la arginasa I a los niveles de ARNm y proteínas 24 horas después de la activación con LPS (Figura 2, paneles H e I). Los macrófagos de tipo salvaje recolectados de los ratones control de la camada mostraron una ligera regulación positiva de la arginasa I. Notablemente, la expresión del marcador M1 prominente iNOS también se incrementó en los macrófagos deficientes en PTEN estimulados con LPS.

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para estudiar más a fondo los mecanismos de una función inmunorreguladora más amplia de la arginasa I en las células inmunitarias: 1) se estimularon macrófagos de tipo salvaje con LPS; 2) la estimulación se inhibió con el inhibidor fúngico de PI3K wortmanina, que se ha informado que mejora la síntesis de citocinas tras la inducción con LPS *in vitro* e *in vivo* (Guha, M. y N. Mackman. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 277: 32124-32132); Schabbauer, G. y otros 2004. PI3K-Akt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1963-1969); y con 3) el inhibidor de la arginasa N-hidroxi-nor-L-arginina (L-nor-Arg). La inhibición de la arginasa I mejoró significativamente la producción de IL-6 en macrófagos (Figura 2, panel J). Los efectos del inhibidor específico de la arginasa sobre la disminución de la producción de citocinas de PTEN^{-/-} los macrófagos también se evaluaron en comparación con los macrófagos de tipo salvaje. De hecho, se encontró un restablecimiento significativo, pero solo parcial, de la producción de IL-6 de tipo salvaje tras el tratamiento con L-nor-Arg en tPM deficientes en PTEN (Figura 2, panel K).

La inhibición farmacológica de la arginasa y la ablación del fenotipo antiinflamatorio en las tPM que sobreexpresan la arginasa deficiente en PTEN respaldan la afirmación de que la arginasa I contribuye a la modulación de las respuestas inflamatorias mediada por PI3K.

La delección de PTEN en macrófagos regula positivamente el factor de transcripción C/EBP β , que es crucial para la activación del promotor de la arginasa I. Para dilucidar el mecanismo molecular responsable de la regulación génica mediada por PTEN de la arginasa I, se analizaron varios factores de transcripción (TF) candidatos potenciales. El regulador más prominente de la arginasa I es STAT 6, que es activado por IL-4 y/o IL-13 en macrófagos (Gordon, S. y F. O. Martinez. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604). Los tPM no estimulados, ya sean células deficientes en PTEN o células de tipo salvaje derivadas de animales control compañeros de camada, no mostraron ningún cambio evidente en el contenido de proteína total de STAT6 o STAT6 activado medido por los anticuerpos STAT6 fosfoespecíficos. Otro factor de transcripción candidato es C/EBP β , que se ha demostrado que contribuye a la regulación de la arginasa I mediada por el receptor de reconocimiento de patrones (El Kasmi, K. C. et al. 2008. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* 9: 1399-1406).

Para caracterizar los mecanismos de modulación de la expresión de la arginasa I mediante la modulación de los factores aguas arriba, se analizaron la regulación de C/EBP β por PTEN, y la subsecuente regulación positiva constitutiva de la arginasa I por C/EBP β . La Figura 3 ilustra la función de C/EBP β en macrófagos deficientes en PTEN. La Figura 3, panel A ilustra la regulación positiva de la proteína C/EBP β en tPM deficientes en PTEN. La Figura 3, panel B ilustra que se obtuvo el mismo resultado para dos isoformas de C/EBP β , LAP y LAP*. Se observó una inducción adicional del factor de transcripción dentro de las 8 horas posteriores a la inducción por LPS. Sin embargo, no pudimos identificar una regulación positiva adicional de C/EBP β por la delección de PTEN tras la activación de TLR4 al menos en el momento evaluado (8 h). Dado que la expresión máxima de la arginasa I se observa 24 h después de la inducción de LPS, no se puede excluir que la expresión diferencial de C/EBP β pueda ocurrir antes en los macrófagos deficientes en PTEN activados.

Debido al hecho de que C/EBP β es un factor de transcripción que actúa sobre elementos de ADN específicos, se investigó la unión de C/EBP β al elemento potenciador de la arginasa que contiene varios sitios de unión de consenso de TF diferentes. Se usó un ensayo de unión de ADN acoplado a avidina biotina (ABCD) para evaluar las propiedades de unión de ADN de C/EBP β mediante el uso de oligos biotinilados que abarcan el sitio de consenso de C/EBP β dentro del potenciador de arginasa 3,8 kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. La idoneidad de este sistema experimental se probó en células HEK que sobreexpresan C/EBP β . El C/EBP β sobreexpresado se unió efectivamente al oligo que podría precipitarse junto con el factor de

transcripción, en particular la isoforma LAP*, unido a él. A continuación, se analizaron los efectos de la deficiencia de PTEN sobre la unión al ADN de C/EBP β en macrófagos. Primero se verificó la presencia de C/EBP β en los lisados usados para los ensayos de unión de ABCD. La misma entrada para el ensayo de ABCD se determinó al probar nuevamente contra GAPDH (Figura 3, panel C). El análisis de la unión de TF al oligo arginasa sugiere que, además del aumento de los niveles de proteína, se produjo una unión mejorada de C/EBP β . LAP* se identificó como la isoforma dominante que se une al oligo potenciador de la arginasa (Figura 3, panel D).

Estos datos sugieren un mecanismo potencial para la regulación de PI3K/PTEN de la expresión de arginasa I a través de C/EBP β .

Ejemplo 2. Actividad extracelular de la arginasa I.

Para estudiar el sitio de acción celular de la arginasa I, se analizaron los sobrenadantes (SN) de los macrófagos peritoneales. Inesperadamente, se liberó la arginasa I en el espacio extracelular. Esto es lo contrario a la contraparte de la arginasa I iNOS.

Para evaluar más a fondo el papel de la arginasa I en la producción de citocinas y el potencial de las células presentadoras de antígenos para polarizar las células T, se transfirieron medios condicionados a células dendríticas diferenciadas de GM-CSF derivadas de médula ósea de tipo salvaje y se analizó su respuesta inflamatoria a LPS. La Figura 4 ilustra que la activación constitutiva de PI3K promueve la expresión y liberación de la arginasa I al espacio extracelular. Sorprendentemente, los datos indican una regulación negativa en los niveles de proteína de las citocinas polarizadoras de células T IL-6 e IL-12 p40, la subunidad común de IL-12 e IL-23 (más adelante indicada como IL-12/23), (Figura 4, panel D). A continuación, se intentó imitar un entorno fisiológico con alta expresión de medios acondicionados con arginasa I de macrófagos deficientes en PTEN, mediante el uso de la arginasa I humana recombinante purificada (recArgI). Para ello, se preincubaron células dendríticas estimuladas por LPS con la arginasa I humana recombinante purificada. Se detectaron niveles de expresión reducidos de IL-6 e IL-12/23 similares al tratamiento con medio condicionado. La disminución en la expresión fue más pronunciada en la expresión de IL-12/23 en comparación con la de IL-6 (Figura 4, panel E).

Para caracterizar adicionalmente la respuesta cruzada biológica entre la expresión de la arginasa I y la expresión de PTEN, se midió la expresión de la arginasa I e IL-4/IL-13 en células deficientes en PTEN. La deficiencia de PTEN conduce a niveles muy aumentados de expresión de la arginasa I, incluso en macrófagos tPM peritoneales no estimulados (Figura 4, panel A). Estos hallazgos fueron sorprendentes e inesperados. Para cuantificar los resultados, se analizaron los macrófagos derivados de 5 hermanos de camada de tipo salvaje y animales PTEN^{-/-}. Se detectó un aumento de más de 10 veces en la expresión de la arginasa I extracelular en macrófagos PTEN^{-/-} (Figura 4, paneles B y C). Además, se evaluó la secreción de arginasa I en respuesta a LPS y en paralelo a la activación combinada de IL-4 e IL-13. En ambos casos, se observa un aumento de la secreción en macrófagos deficientes en PTEN, que también se observó de forma limitada en células de tipo salvaje (Figura 4, paneles B parte inferior).

El resultado indica que la presencia de la arginasa I en el entorno extracelular de los macrófagos podría exhibir propiedades antiinflamatorias de forma paracrina.

Ejemplo 3. La arginasa I libre inhibe de forma potente la polarización de las células T.

Para analizar los efectos de la arginasa I humana recombinante sobre la presentación de antígenos y las propiedades de polarización de las células T, se acondicionaron previamente células dendríticas de tipo salvaje diferenciadas con GM-CSF derivadas de la médula ósea con arginasa I recombinante durante la noche antes de cargarlas con ovalbúmina (Ova) y estimularlas con LPS. Para evitar los efectos potenciales sobre las células T, recArgI se eliminó de las CD mediante múltiples etapas de lavado antes de cultivarlas junto con las células T OT-II aisladas en una relación 5:1. El tratamiento de las células dendríticas con arginasa I recombinante en una concentración de 30 μ g/mL no alteró la expresión superficial de los marcadores de activación de CD prototípicos CD80 y MHCII, medidos por citometría de flujo.

Los resultados de la MLR se evaluaron después de 3 días de cocultivo de CD y células T. La Figura 5 ilustra la inhibición de la polarización de las células T por la arginasa I. Se observó una reducción significativa de las células T CD4⁺ que expresan las citocinas distintivas de Th1 y Th17 IFN γ (Figura 5, paneles A y B) e IL17A (Figura 5, paneles D y E). Se observa que las células productoras de IL-17 estaban presentes, pero en pocas cantidades. Los análisis de las citocinas de las células T que se secretaron durante la MLR después del cebado con LPS/Ova revelan diferencias significativas en la liberación de IFN γ , mientras que la IL-17A no fue significativamente diferente (Figura 5, paneles C y F). Se evaluó la proliferación medida por dilución de CFSE en células T en división. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la presencia de la arginasa I recombinante (Figura 5, paneles G y H). Los datos sugieren que la arginasa I extracelular en presencia de células presentadoras de antígeno mejora el cebado de las células T, de esta manera se reduce la capacidad de polarizar preferentemente en las células Th1.

Para corroborar aún más esta hipótesis, se caracterizó la capacidad de la arginasa I recombinante para inhibir la polarización de las células T *in vivo* en un modelo clínicamente relevante para la enfermedad autoinmunitaria mediada por células T.

5 Ejemplo 4. La arginasa I recombinante en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por un sistema inmunológico desregulado. El modelo de ratón de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es un modelo animal reconocido en la técnica de esclerosis múltiple. Para estudiar la capacidad de una arginasa I recombinante para modular una respuesta inmunitaria, se caracterizó la respuesta de un modelo de ratón para la esclerosis múltiple tratado con una arginasa purificada. El ratón con EAE refleja algunas, pero no todas, las características de la patología autoinmunitaria humana (Lassmann, H. y H. J. van. 2011. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. FEBS Lett. 585: 3715-3723). Se indujo EAE en ratones de tipo salvaje mediante inmunización con el péptido MOG₃₅₋₅₅ en CFA (Lassmann, H. y H. J. van. 2011. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. FEBS Lett. 585: 3715-3723). Además, se administró la toxina pertussis.

La eficacia potencial de la arginasa I recombinante para mejorar la progresión de la enfermedad se caracterizó de la siguiente manera: para determinar un marco de tiempo de tratamiento, mientras la presentación de antígeno y la polarización de las células T aún estaban en curso, la arginasa se administró en dos concentraciones diferentes antes y poco después de la inmunización como se describió en la Tabla 4.

TABLA 4	
días (antes o después de la inmunización)	-4 -2 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Control	Sin tratamiento
Grupo 1: recArgI 10mg/kg	* * * *
Grupo 2: recArgI 1mg/kg	* * * *
Grupo 3: recArgI pre 10mg/kg	* *

La Figura 6 ilustra los resultados de un tratamiento de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) con la arginasa I humana recombinante. El grupo de control desarrolló signos visibles de EAE después de 12 días, que aumentaron aún más hasta el día 17. El pretratamiento con la arginasa I recombinante (10 mg/kg) no tuvo ningún efecto sobre la evolución de la enfermedad (Figura 6, panel C). En contraste, el pre- y postratamiento con la arginasa I recombinante (10 mg/kg) se caracterizó por una reducción significativa en el inicio, así como también en la magnitud de la enfermedad (Figura 6, panel A). En el mismo diseño experimental, se evaluó una dosis mínima terapéuticamente efectiva de una arginasa I pegilada (SEQ ID NO: 9) (1 mg/kg). El tratamiento retrasó la aparición de la enfermedad, pero el tratamiento con la dosis más baja de arginasa pegilada I no inhibió significativamente la progresión y la gravedad de la enfermedad (Figura 6, panel B).

Para analizar la respuesta de las células T específicas de MOG a nivel molecular, se recolectaron los bazo y el ganglio linfático de drenaje (inguinal) y se reestimularon los esplenocitos y las células de los ganglios linfáticos, derivados de ratones con EAE de control y tratados con arginasa humana recombinante, *in vitro* con el péptido MOG₃₅₋₅₅. La reestimulación de las células sin activación adicional por estímulos exógenos condujo a un marcado aumento en la secreción de IFN γ e IL-17A en los sobrenadantes (ver control vs. control + MOG en la Figura 6, paneles D-G). Curiosamente, se encontraron diferencias muy significativas en la reducción los niveles de IFN γ (Figura 6, paneles D y E) e IL-17A (Figura 6, paneles F y G) en los grupos de pre- y postratamiento (1 mg/kg así como también 10 mg/kg de la arginasa I recombinante) en particular en el ganglio linfático de drenaje. Estos datos sugieren que el tratamiento con la arginasa I recombinante en la fase de presentación del antígeno, al menos en la concentración más alta, mitiga eficientemente la patología de EAE en ratones a través de una disminución en la capacidad de las células T CD4⁺ para producir las citocinas IFN γ e IL-17A indispensables para el desarrollo de EAE.

Ejemplo 5. La arginasa I recombinante en el tratamiento de la artritis reumatoide.

La artritis es una afección autoinmunitaria asociada con diversos niveles de dolor, hinchazón, rigidez de las articulaciones y, a veces, un dolor constante alrededor de las articulaciones. Hay más de 100 formas diferentes

de artritis, incluida la artritis reumatoide, la artritis psoriásica las enfermedades autoinmunitarias relacionadas. La artritis séptica está provocada por la infección en la articulación.

La principal queja de las personas que padecen artritis es el dolor articular. El dolor suele ser una constante y puede localizarse en la articulación afectada. El dolor de la artritis se debe a la inflamación que ocurre alrededor de la articulación, daño a la articulación por enfermedad, desgaste diario y desgarre de la articulación, distensiones musculares causadas por la inflamación. Para evaluar el papel de una arginasa I humana recombinante en el tratamiento de la artritis, se midieron varios parámetros clínicos de ratones artríticos tratados con la proteína recombinante. La Figura 7 representa los gráficos que miden varios parámetros clínicos de ratones artríticos tratados con la arginasa I humana recombinante. La Figura 7, panel A ilustra la variación porcentual en el peso de los ratones que recibieron solución salina, 1 mg/kg/p o 10 mg/kg/p de la arginasa I humana recombinante. La Figura 7, panel B es un gráfico que representa el título de anticuerpos contra α -colágeno de tipo II (unidades arbitrarias) de ratones que recibieron los tratamientos descritos anteriormente. La Figura 7, paneles C y D son las mediciones de dos parámetros clínicos diferentes de los mismos ratones descritos anteriormente, inflamación de las patas y resistencia del agarre. Los resultados sugieren que el tratamiento semanal de ratones artríticos con la arginasa I humana recombinante mejora la enfermedad, pero no previene la progresión de la enfermedad. La Figura 8 es una fotografía que ilustra la reducción de la inflamación de las patas en ratones artríticos con arginasa I humana recombinante humana. La Figura 8, panel A ilustra la inflamación de un ratón artrítico que recibió tratamiento solo con solución salina. La Figura 8, panel B ilustra la inflamación de un ratón artrítico que recibió tratamiento con 10 mg/kg de arginasa I recombinante humana pegilada. La cuantificación estadística de los datos sugiere que el tratamiento de ratones artríticos con 1 mg/kg y 10 mg/kg de arginasa I humana recombinante reduce la inflamación de las patas, medida por la disminución del diámetro de la articulación de la muñeca.

La Figura 9 corresponde a gráficos que ilustran la cuantificación de diferentes citocinas en ratones artríticos. Los animales en las Figuras 9 y 10 se trataron con inmunización con colágeno, que promovió la artritis en los ratones. Los paneles A y B de la Figura 9 indican que solo se observa una disminución modesta en los niveles de IL17A e IL12/23 en los ratones tratados con la arginasa I humana recombinante. El panel C de la Figura 9 ilustra la reducción de la liberación sistémica de la citocina inflamatoria interleucina 6 (IL-6) en ratones artríticos tratados con una arginasa I humana recombinante. Los paneles A-C de la Figura 10 indican que los niveles de citocinas proinflamatorias no cambian en la artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones DBA. Como comparación con el tratamiento de la artritis, la Figura 11 ilustra la puntuación clínica de un modelo de ratón de encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) tratado con arginasa I humana recombinante humana (para más detalles, ver el Ejemplo 1). Los resultados indican que una arginasa I humana recombinante purificada puede tratar efectivamente afecciones del sistema inmunológico.

Para evaluar los efectos de la arginasa recombinante en el marco de la presentación de antígenos *in vivo*, la liberación de citocinas y la polarización de las células T, se utilizaron experimentos de clasificación de células activadas por fluorescencia para caracterizar las poblaciones de células inmunitarias en ratones con EAE. El tratamiento con arginasa se realizó después de que la enfermedad progresara a un fenotipo de parálisis parcial de las extremidades traseras e indicó que el tratamiento con al menos la arginasa recombinante de SEQ ID NO. 9 podría promover una recuperación más rápida. La Figura 12 representa el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia de poblaciones de células inmunitarias en ratones con EAE tratados con arginasa I humana recombinante. La Figura 13 representa los resultados de experimentos de clasificación de células activadas por fluorescencia que indican que el tratamiento con la arginasa I humana recombinante previene la proliferación de células T.

Ejemplo 6. Formulaciones pegiladas de la arginasa I humana recombinante.

Los experimentos *in vitro* e *in vivo* señalan las propiedades inmunomoduladoras de la arginasa I extracelular. Para formular, evaluar y optimizar las composiciones farmacéuticas para la administración de la arginasa I humana recombinante *in vivo*, se llevaron a cabo varios experimentos que caracterizan la pegilación de la arginasa I recombinante. La pegilación es el proceso de unión covalente de cadenas de polímero de polietilenglicol (PEG) a otra molécula. La unión covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede reducir la inmunogenicidad y antigenicidad de la arginasa I recombinante del sistema inmunológico del sujeto y aumentar el tamaño hidrodinámico de la arginasa recombinante, lo que puede prolongar la vida media de una arginasa I humana recombinante pegilada *in vivo*.

La Figura 14 es un esquema de un proceso utilizado para optimizar una composición farmacéutica que comprende una arginasa I humana recombinante. Se probaron tres métodos diferentes de unión covalente de moléculas de PEG de diferentes tamaños a moléculas de arginasa I recombinante. Con fines ilustrativos, la Figura 14 describe la unión de distintas moléculas de PEG a la SEQ ID NO: 1 mediante distintos métodos, pero debe entenderse que la estrategia de optimización de la pegilación se aplica a cualquiera de las SEQ ID NOS. 1-16. La Figura 14 ilustra tres métodos de unión covalente de cadenas de polímeros de PEG a, por ejemplo, SEQ ID No. 1, específicamente, conjugación de amina -NH₂, conjugación de cisteína (-SH) y modificación de

N-terminal. La pegilación de varias arginasas humanas recombinantes mutantes en residuos específicos se optimizó como se describió en la Figura 14.

La Tabla 5 resume la pegilación de varias arginasas humanas recombinantes mutantes por conjugación de cisteína (-SH). La Figura 15 muestra los niveles de agotamiento de arginina sérica en ratas Sprague Dawley obtenidos con las arginasas pegiladas descritas en la Tabla 5 con una dosis intravenosa única de 3 mg/kg.

TABLA 5				
SEQ ID NO.	MAL-PEG MW	Productos pegilados	Síto de pegilación	No. de PEG
SEQ ID NO: 2	20K	M1-20K (45)	Cys45	1
		M1-20K (168)	Cys168	1
		M1-20K (45/168)	Cys 45 & Cys168	2
SEQ ID NO: 2	30K	M1-30K (45)	Cys45	1
		M1-30K (168)	Cys168	1
		M1-30K (45/168)	Cys 45 & Cys168	2
SEQ ID NO: 5	40K	M2-40K (45)	Cys45	1
SEQ ID NO: 6	40K	M3-40K (168)	Cys168	1

La vida media $T_{1/2}$, la concentración plasmática máxima después de la administración del fármaco C_{max} , y la integral de la curva concentración-tiempo después de la administración de una dosis única AUC de pegilada de la SEQ ID NO. 2, la SEQ ID NO. 5, la SEQ ID NO. 6 y la SEQ ID NO. 9. En la Tabla 6 se muestran las arginasas pegiladas modificadas con -SH en seis ratas diferentes. Cada medición se obtuvo después de la administración de una dosis intravenosa única de 3 mg/kg (media $\pm$ DE; n = 6).

TABLA 6				
Productos pegilados	$T_{1/2}$ (horas)	C_{max} (μ g/ml)	AUC ₀₋₆ (h* μ g/ml)	AUC ₀₋₂₄ (h* μ g/ml)
M1-20K (45/168)	28,8 $\pm$ 4,5	41,5 $\pm$ 9,5	1599,2 $\pm$ 183,8	1614,8 $\pm$ 188,8
M1-30K (45/168)	28,4 $\pm$ 8,4	32,4 $\pm$ 3,1	1113,6 $\pm$ 116,8	1192,9 $\pm$ 121,2
M2-40K (45)	27,5 $\pm$ 3,1	45,2 $\pm$ 5,1	2063,9 $\pm$ 161,5	2080,5 $\pm$ 163,8
M3-40K (168)	15,1 $\pm$ 0,6	82,7 $\pm$ 32,0	524,6 $\pm$ 32,6	541,1 $\pm$ 34,2
SEQ ID NO: 9	31,5 $\pm$ 5,3	48,9 $\pm$ 12,6	1626,2 $\pm$ 631,8	1675,6 $\pm$ 644,7

La Tabla 7 resume la pegilación de varias arginasas humanas recombinantes mutantes por conjugación de amina (-NH₂). La Figura 16 es un gráfico que ilustra el agotamiento de arginina sérica por la arginasa I humana recombinante con varias arginasas pegiladas en residuos de Lys. La Figura 17 es un gráfico que ilustra el grado de pegilación de varias proteínas arginasa I humana recombinante por conjugación de amina (-NH₂).

TABLA 7

SEQ ID NO.	SPA-PEG MW	Productos de pegilación	Sitios de pegilación	Relación de pegilación (MALDI-ToF)
SEQ ID NO: 5	5K	M2-5K(Lys)	Lys, NH ₂	6-12
SEQ ID NO: 6	5K	M3-5K(Lys)	Lys, NH ₂	6-12
SEQ ID NO: 8	5K	M4-5K(Lys)	Lys, NH ₂	6-12
SEQ ID NO: 7	5K	M7-5K(Lys)	Lys, NH ₂	6-12

La vida media $T_{1/2}$, la concentración plasmática máxima después de la administración del fármaco C_{max} , y la integral de la curva concentración-tiempo después de la administración de una dosis única AUC de varias arginasas pegiladas modificadas por amina (-NH₂) en seis ratas diferentes se muestran en la Tabla 8. Cada medición se obtuvo después de la administración de una dosis intravenosa única de 3 mg/kg (media $\pm$ DE; n = 6). Los datos farmacocinéticos en ratas indican que la pegilación de la arginasa I humana recombinante en múltiples sitios con PEG de bajo peso molecular, como el propionato de succinimidilo de metoxipoli(etilenglicol) (mPEG-SPA) puede proporcionar una reducción efectiva de la arginina *in vivo*.

TABLA 8

Productos pegilados	$T_{1/2}$ (horas)	C_{max} (μ g/ ml.)	AUC ₀₋₂₄ (h* μ g/ ml.)	AUC _{INF} (h* μ g/ ml.)
SEQ ID NO: 1 (pegilada con mPEG-SPA 5K)	43,8 $\pm$ 4,4	42,2 $\pm$ 3,6	1918,7 $\pm$ 271,0	2687,0 $\pm$ 290,2
M2-5K(Lys)	40,7 $\pm$ 13,2	36,0 $\pm$ 6,0	1585,0 $\pm$ 184,8	2505,6 $\pm$ 534,8
M3-5K(Lys)	53,5 $\pm$ 14,2	34,4 $\pm$ 7,4	2675,3 $\pm$ 560,4	3577,4 $\pm$ 865,8
M4-5K(Lys)	59,5 $\pm$ 9,9	34,7 $\pm$ 8,7	2265,7 $\pm$ 659,8	3147,8 $\pm$ 673,0
M7-5K(Lys)	50,5 $\pm$ 13,0	56,5 $\pm$ 11,0	4574,6 $\pm$ 1268,2	4939,5 $\pm$ 1308,1
SEQ ID NO: 9 (pegilada con mPEG-SPA 5K)	35,5 $\pm$ 2,6	63,2 $\pm$ 5,1	3430,3 $\pm$ 361,5	3578,5 $\pm$ 415,1

Además, se midieron los parámetros de cinética enzimática para varias arginasas mutantes como se describió en la Tabla 9. En resumen, la modificación de las arginasas humanas recombinantes con PEG de pequeño peso molecular no da como resultado una reducción de la actividad enzimática.

TABLA 9				
Productos pegilados	K _m (mM)	V _{máx.} ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	K _{cat} (sec^{-1})	K _{cat/K_m} ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)
M1-20K (45/168)	1,76	0,0196	286,5	162,4
M1-30K (45/168)	1,92	0,0249	363,1	188,8
M2-40K (45)	1,87	0,0252	367	196,1
M3-40K (168)	2,07	0,0263	383,1	185,1
M2-5K(Lys)	2,03	0,0254	370	180,8
M3-5K(Lys)	2,03	0,0345	503,2	246,9
M7-5K(Lys)	1,79	0,0314	459,2	255,2
SEQ ID NO: 9	2,12	0,0293	426,8	202,3

La Figura 18 es un gráfico que ilustra el análisis de epítomos de una arginasa I humana recombinante pegilada.

Ejemplo 7. La arginasa I recombinante en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias humanas.

Como se describió en ejemplos anteriores, la arginasa I funciona como una proteína inmunomoduladora a niveles intra- y extracelulares. La interferencia farmacológica con el agotamiento de L-arginina mediado por la arginasa puede mejorar efectivamente la inflamación, el dolor y la rigidez de las articulaciones en modelos reconocidos en la técnica de esclerosis múltiple y artritis reumatoide (Ejemplos 4 y 5).

La artritis reumatoide (AR) se caracteriza como una enfermedad inflamatoria, crónica en la que el sistema inmunológico destruye las articulaciones sinoviales y las estructuras accesorias. Debido a la naturaleza progresiva de la AR, esta afección autoinmunitaria puede causar complicaciones extraarticulares dentro de varios sistemas de órganos. La administración de una arginasa I recombinante de la presente descripción puede usarse para el tratamiento de la artritis reumatoide en un ser humano.

Cualquiera de las arginasas humanas recombinantes descritas en las SEQ ID NO: 1 a 16 pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un ser humano, tal como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide. La arginasa purificada se puede pegilar. En algunas modalidades, la arginasa purificada se pegila mediante la conjugación de una amina con un oligómero de propionato de succinimidilo de metoxipoli(etilenglicol) (mPEG-SPA) que pesa aproximadamente 5 kDa (Ejemplo 6). En otras modalidades, la arginasa purificada puede pegilarse con cualquier otro oligómero de PEG adecuado.

La pegilación de la arginasa purificada puede proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de la AR que tiene baja inmunogenicidad, por ejemplo, la pegilación de la arginasa I humana recombinante en múltiples sitios con PEG de bajo peso molecular, como (oligómeros de mPEG-SPA de 5 kDa) redujo efectivamente la exposición de los epítomos lo que dio como resultado un tratamiento efectivo con baja inmunogenicidad. Pueden usarse varios oligómeros de PEG descritos en la presente descripción para reducir efectivamente la exposición de los epítomos de una arginasa de la descripción.

Ejemplo 8. La arginasa I recombinante en el trasplante de órganos.

La inmunosupresión amortigua una respuesta inmunitaria anormal en enfermedades autoinmunitarias, pero también puede reducir una respuesta inmunitaria normal para prevenir el rechazo de órganos o células trasplantados. Los fármacos inmunomoduladores son importantes en el tratamiento del trasplante de órganos. Cualquiera de las arginasas humanas recombinantes descritas en las SEQ ID NO: 1-16 pueden usarse como inmunomodulador en el manejo del trasplante de órganos. En algunas modalidades, la arginasa recombinante está pegilada. En algunas modalidades, la arginasa recombinante se pegila mediante conjugación de amina con un oligómero de propionato de succinimidilo de metoxipoli(etilenglicol) (mPEG-SPA) que pesa aproximadamente 5 kDa. En otras modalidades, la arginasa purificada puede pegilarse con cualquier otro oligómero de PEG adecuado. La pegilación de la arginasa recombinante puede proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de la AR que tiene baja inmunogenicidad: la pegilación de la arginasa I humana recombinante en múltiples sitios con PEG de bajo peso molecular, tal como (oligómeros de 5 kDa mPEG-SPA) puede reducir efectivamente la exposición de los epítomos que da como resultado la reducción de la

inmunogenicidad. Pueden usarse varios oligómeros de PEG descritos en la presente descripción para reducir efectivamente la exposición de los epítomos de una arginasa de la descripción.

Ejemplo 9. Tratamiento de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) con arginasa humana recombinante I.

El ratón de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es un modelo de esclerosis múltiple reconocido en la técnica. La EAE también se usa ampliamente como modelo animal de enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T.

Para investigar la efectividad del tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una arginasa recombinante, la efectividad de una arginasa I humana recombinante pegilada, SEQ ID NO: 9, se investigó la modulación del ARNm y la expresión de proteínas de Interferón gamma e IL-17A en células T estimuladas (el protocolo de tratamiento y el aislamiento de células T fue como se describió en el Ejemplo 1). La Figura 19 ilustra los niveles de expresión del ARNm de IFN γ e IL-17A de células T reestimuladas con la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) inhibidas con arginasa I humana purificada. La Figura 20 ilustra los niveles de expresión de proteínas IFN γ e IL-17A de células T reestimuladas con la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) inhibidas con arginasa humana purificada I. Las Figuras 19 y 20 ilustran una reducción significativa en los niveles de ARNm y proteínas de IFN γ e IL-17A en las células T estimuladas con MOG.

La Figura 21 ilustra mejoras en las puntuaciones clínicas de ratones con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) tratados con arginasa I humana recombinante. En este experimento, las células presentadoras de antígeno se trataron con arginasa I humana recombinante pegilada, SEQ ID NO: 9, *ex vivo* y se trasplanta de nuevo a ratones con EAE. La Figura 21, Panel A, ilustra la puntuación clínica de los ratones con EAE que no se desafiaron con CFA y pertussis antes de recibir células presentadoras de antígeno estimuladas *ex vivo*. La Figura 21, Panel A, ilustra una mejora retardada en la puntuación clínica de los ratones que no se habían desafiado con CFA y pertussis. La Figura 21, Panel B, ilustra la puntuación clínica de ratones con EAE que se desafiaron con CFA y pertussis antes de recibir células presentadoras de antígeno estimuladas *ex vivo*. La Figura 21, Panel B, ilustra una mejora más rápida de la puntuación clínica.

Ejemplo 10. Modulación de la diferenciación de osteoclastos con arginasa I humana recombinante.

En el hueso sano, la formación y resorción ósea son procesos implicados en la remodelación normal del hueso. En el proceso de remodelación, las células llamadas osteoclastos reabsorben los tejidos óseos, mientras que las células llamadas osteoblastos depositan tejido óseo nuevo. Los osteoclastos son importantes en la remodelación, mantenimiento y reparación de los huesos del esqueleto vertebral. Por ejemplo, la disfunción de los osteoclastos se ha asociado con la osteoporosis.

Se empleó un ensayo de diferenciación de osteoclastos para evaluar la capacidad de la arginasa humana recombinante descrita en la SEQ ID NO: 9 para modular la diferenciación de osteoclastos. La Figura 22 es un esquema de un ensayo de diferenciación de osteoclastos. El día 0 del ensayo de diferenciación, se aislaron células de la médula ósea de ratones machos con técnicas estándar, es decir, se lavaron las células de médula ósea con PBS de la fibia, se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 10 cm y se trataron con 100 ng/mL de M-CSF. Después de 3 días de diferenciación inducida por M-CSF, las células se recolectaron y se sembraron en placas a una densidad de 100 000 células/mL. Las células en placas se trataron subsecuentemente con 50 ng/mL de RANKL y 30 ng/mL de M-CSF. Los días 7-8 del protocolo de diferenciación, los osteoclastos se tiñeron con TRAP y se contaron. La Figura 23, Panel A es un gráfico que enumera el número de osteoclastos con al menos tres núcleos que se contaron en un ensayo de diferenciación de osteoclastos. Como se muestra en la Figura 23, Panel A, las células de médula ósea se trataron con arginasa recombinante I los días 3 y 6 del protocolo de diferenciación y junto con la incubación con RANKL. La Figura 23, Panel B es una imagen de microscopía representativa que ilustra la tinción con fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) de células en placa de control (no tratada) y células que se trataron con 300 ng/mL de la arginasa humana recombinante de SEQ ID NO: 9. La tinción TRAP es un marcador de osteoclastos. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM y n = dos ratones por grupo, y corresponden a dos experimentos independientes. Se realizaron tres réplicas técnicas en cada experimento independiente. * representan p < 0.05, *** representan p < 0.001. B.

Los niveles de expresión de ARNm de arginasa I endógena se monitorearon mediante qPCR en diferentes puntos de tiempo durante el protocolo de diferenciación. La Figura 24 es un gráfico que ilustra los niveles de expresión de arginasa I en las células de control los días 3 y 7 del protocolo de diferenciación en comparación con los niveles del gen de control constitutivo de HPRT. La secuencia de los cebadores de la arginasa usados se describe en la Tabla 3. La Figura 24 ilustra que la expresión de la arginasa I se pierde durante la osteoclastogénesis. Los niveles de ARN mensajero de la arginasa I disminuyen después de la adición de RANKL en el día 3 de la diferenciación de osteoclastos. Los datos de la Figura 24 se presentan como media $\pm$ SEM y n = 5 ratones por grupo, y son dos experimentos independientes combinados. * Representa p < 0.05.

Para evaluar la capacidad de la arginasa I recombinante para modular la diferenciación de los osteoclastos, las dosis aumentadas de la arginasa humana recombinante de SEQ ID NO: 9 se agregaron a diferentes placas de Petri los días 3 y 6 del protocolo de diferenciación. El protocolo experimental usado es el siguiente (un mínimo de tres placas de Petri diferentes recibieron cada tratamiento): a) una placa de control no se trató con arginasa humana recombinante; b) se trató una primera placa experimental con una dosis de 1 ng/mL de arginasa humana recombinante los días 3 y 6 del protocolo de diferenciación; c) se trató una segunda placa experimental con una dosis de 10 ng/mL de arginasa humana recombinante los días 3 y 6 del protocolo de diferenciación; d) se trató una tercera placa experimental con una dosis de 100 ng/mL de arginasa humana recombinante los días 3 y 6 del protocolo de diferenciación; e) se trató una quinta placa experimental con una dosis de 1000 ng/mL (1 µg/mL) de la arginasa humana recombinante los días 3 y 6 del protocolo de diferenciación. La Figura 25 ilustra que la adición de arginasa I humana recombinante (SEQ ID NO. 9) durante los días 3 y 6 de diferenciación de osteoclastos puede modular la formación de osteoclastos. La Figura 25, Panel A muestra que la adición de 1000 ng/mL de arginasa I humana recombinante (SEQ ID NO. 9) inhibió la formación de osteoclastos. La Figura 25, Panel B ilustra fotografías de microscopía representativas de las células tratadas con las dosis de la arginasa I humana recombinante (SEQ ID NO. 9) descritas en a)-e). Una arginasa I humana recombinante (SEQ ID NO. 9) puede bloquear la osteoclastogénesis de una manera dependiente de la dosis a concentraciones entre 100 y 300 ng/mL. La Figura 25, Panel B ilustra que las células incubadas con 1000 ng/mL aparecen morfológicamente como macrófagos TRAP negativos a pesar de la incubación con RANKL. Los datos de la Figura 25 se presentan como media $\pm$ SEM y n = 6 ratones por grupo, y son tres experimentos independientes combinados, *** representa p < 0,001.

Para evaluar los efectos directos de la arginasa I humana recombinante (SEQ ID NO. 9) en la modulación de la diferenciación de osteoclastos, se realizó el protocolo de diferenciación descrito anteriormente con la adición de la arginasa I humana recombinante no tratada, desnaturalizada e inactivada enzimáticamente (SEQ ID NO. 9). El ensayo evaluó la capacidad de la arginasa I desnaturalizada e inactivada enzimáticamente para promover o inhibir la formación de osteoclastos. La enzima arginasa I se desnaturalizó a) por calor (70 °C 10 min) o b) se inactivó enzimáticamente con 300 µM del inhibidor nor-NOHA. A continuación, se añadieron las arginasas a placas separadas el día 3 del protocolo de diferenciación. La Figura 26 ilustra el número de osteoclastos diferenciados que podrían enumerarse en un ensayo de diferenciación complementado con arginasa I humana recombinante (SEQ ID NO. 9) desnaturalizada y tratada con N(omega)-hidroxi-nor-arginina (nor-NOHA) en comparación con una placa de control no tratada. Se observaron recuentos normales de osteoclastos, lo que sugiere que la disponibilidad de arginina es un requisito previo para la formación de osteoclastos. Los datos en la Figura 26 se presentan como media $\pm$ SEM y n = 2 ratones por grupo, y son representativos de un experimento. La Figura 26 demuestra que el bloqueo de la osteoclastogénesis depende de las funciones catalíticas de la arginasa I.

Los osteoclastos se forman mediante la fusión de muchas células derivadas de los monocitos circulantes en la sangre, que se derivan de las células madre hematopoyéticas. Para evaluar el papel de la arginasa I en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas, se realizó el protocolo de diferenciación descrito anteriormente con la adición de 1 µg/mL de arginasa I humana recombinante el día 0. La Figura 27 demuestra que la adición de una dosis de 1 µg/mL de arginasa I recombinante a células madre hematopoyéticas el día 0 del protocolo de diferenciación no influye en la formación de osteoclastos. Los datos en la Figura 27 se presentan como media $\pm$ SEM y n = 4 ratones por grupo. Los datos muestran una combinación de dos experimentos independientes.

Para evaluar los efectos de dosis de 10 µg/mL de arginasa I humana recombinante en células madre hematopoyéticas, se realizó el protocolo de diferenciación descrito anteriormente con la adición de 10 µg/mL de arginasa I humana recombinante los días 0 y el día 6. La Figura 28 ilustra que la adición de una dosis de 10 µg/mL de arginasa I humana recombinante en células madre hematopoyéticas (día 0 de diferenciación; "d0") puede interferir con la formación de osteoclastos. Además, la adición de una dosis de 1 µg/mL de arginasa I humana recombinante en células que se han diferenciado durante 6 días (día 6 de diferenciación; "d6") aún puede interferir con la formación de osteoclastos. Los datos en la Figura 28 se presentan como media $\pm$ SEM y n = 2 ratones por grupo, y son representativos de un experimento.

Para evaluar los efectos de diferentes dosis de arginasa I humana recombinante en los niveles de expresión de genes implicados en la osteoclastogénesis, se midieron los niveles de ARNm de genes relevantes de osteoclastogénesis después de 7 días de diferenciación (con y sin incubación con arginasa I humana recombinante). La Figura 29 ilustra los cambios en los niveles de expresión de los genes de TRAP, RANK, NFAT c1 y c-FOS durante la diferenciación con y sin arginasa I humana recombinante. Los niveles de ARN mensajero de RANK, NFATc1 y c-FOS aumentan después de la adición de 100 ng/mL de arginasa I humana recombinante, lo que indica un efecto estimulante de las concentraciones más bajas de arginasa I. La adición de 1000 ng/mL de arginasa I humana recombinante se correlaciona con una fuerte regulación negativa de los genes TRAP, RANK, NFAT c1 y c-FOS. Los datos en la Figura 29 se presentan como media $\pm$ SEM y n = 4 ratones por grupo, y son dos experimentos independientes combinados.

Ejemplo 11. *Modulación de las afecciones óseas con arginasa I humana recombinante in vivo.*

Se creó un modelo de ratón de osteoporosis mediante la extracción de los ovarios de ratones hembras de 10 semanas de edad. El procedimiento indujo menopausia artificial y pérdida ósea en los ratones y proporcionó un modelo *in vivo* para el estudio de la osteoporosis. Hasta 30 mg/kg de las arginasas humanas recombinantes descritas en las SEQ ID NO: 9 se administró a los ratones dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron y evaluaron 4 semanas después del inicio del tratamiento. Se realizó un análisis histológico de las tibias para evaluar el volumen y la destrucción ósea. La presencia de los osteoblastos y osteoclastos en este modelo de enfermedad se evaluó mediante el uso del programa OsteoMeasure (OsteoMetrics Inc., Atlanta).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una arginasa I recombinante para su uso en el tratamiento de una afección ósea en un sujeto, en donde la afección ósea se selecciona del grupo que consiste en: osteoporosis; inflamación en el hueso; enfermedad de Paget; osteogénesis imperfecta; displasia fibrosa; y osteomielitis; opcionalmente en donde la afección ósea es osteoporosis asociada con una disfunción de los osteoclastos.

2. La arginasa I recombinante para el uso de la reivindicación 1, en donde la arginasa I recombinante está pegilada.

3. La arginasa I recombinante para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el oligómero de PEG pesa aproximadamente 5 kDa.

4. La arginasa I recombinante para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el oligómero de PEG es propionato de succinimidilo de metoxipoli(etilenglicol) (mPEG-SPA).

5. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la arginasa I recombinante se emplea a razón de 1 mg/kg a 100 mg/kg, 10 mg/Kg a 100 mg/Kg, o más de 100 mg/Kg del peso del ser humano.

6. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la arginasa I recombinante proporciona una concentración plasmática de arginina en el sujeto que es inferior a 120 μ M, inferior a 80 μ M o inferior a 10 μ M.

7. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la administración es intravenosa.

8. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la arginasa I recombinante es al menos 95 % pura o al menos 99 % pura.

9. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la arginasa I recombinante se administra al sujeto al menos una vez durante un período de 24 horas.

10. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el sujeto es un ser humano.

11. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la arginasa I recombinante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16.

12. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la arginasa I recombinante es arginasa I humana.

13. La arginasa I recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la arginasa I recombinante se une covalentemente a una cadena de polímero de PEG mediante conjugación de amina, conjugación de cisteína (SH) o modificación N-terminal, con un oligómero de PEG.

14. La arginasa I recombinante para el uso de la reivindicación 1, en donde la arginasa I recombinante está en una forma de dosificación unitaria.

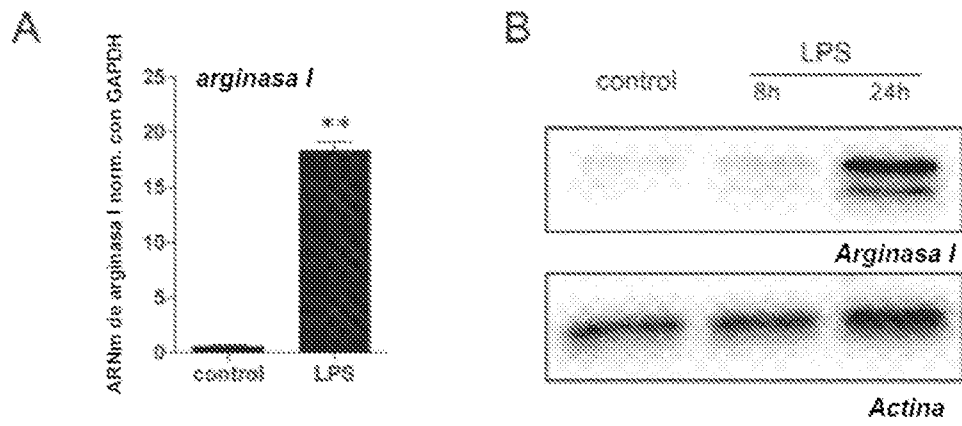


FIGURA 1

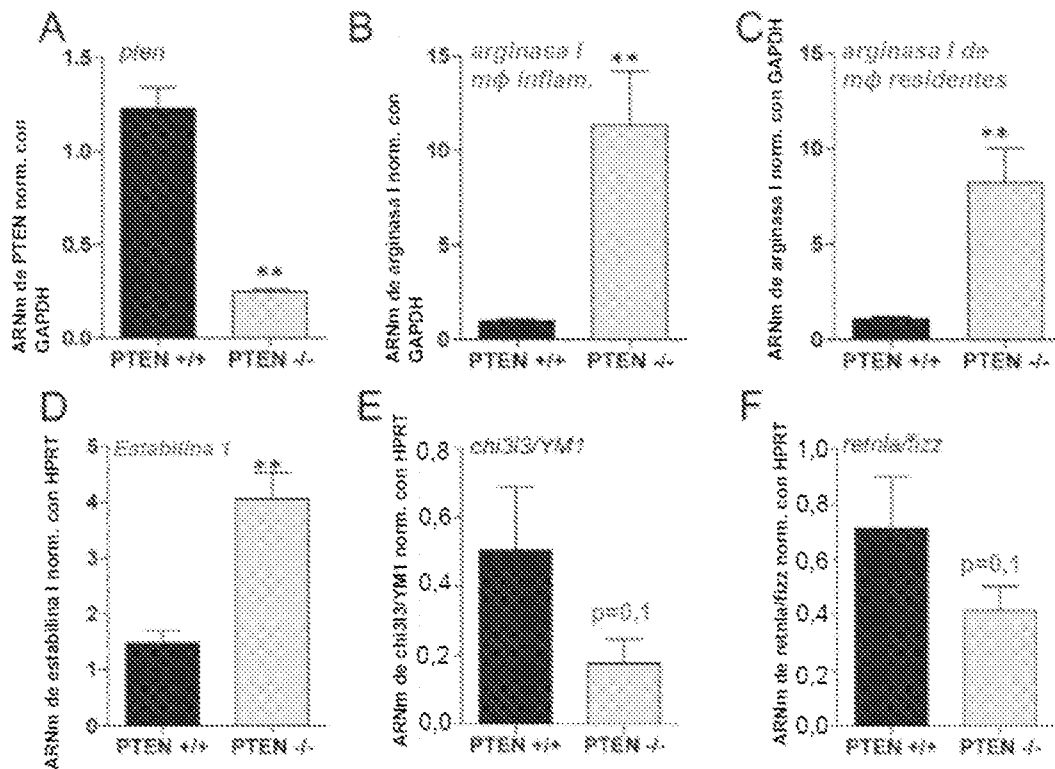


FIGURA 2A

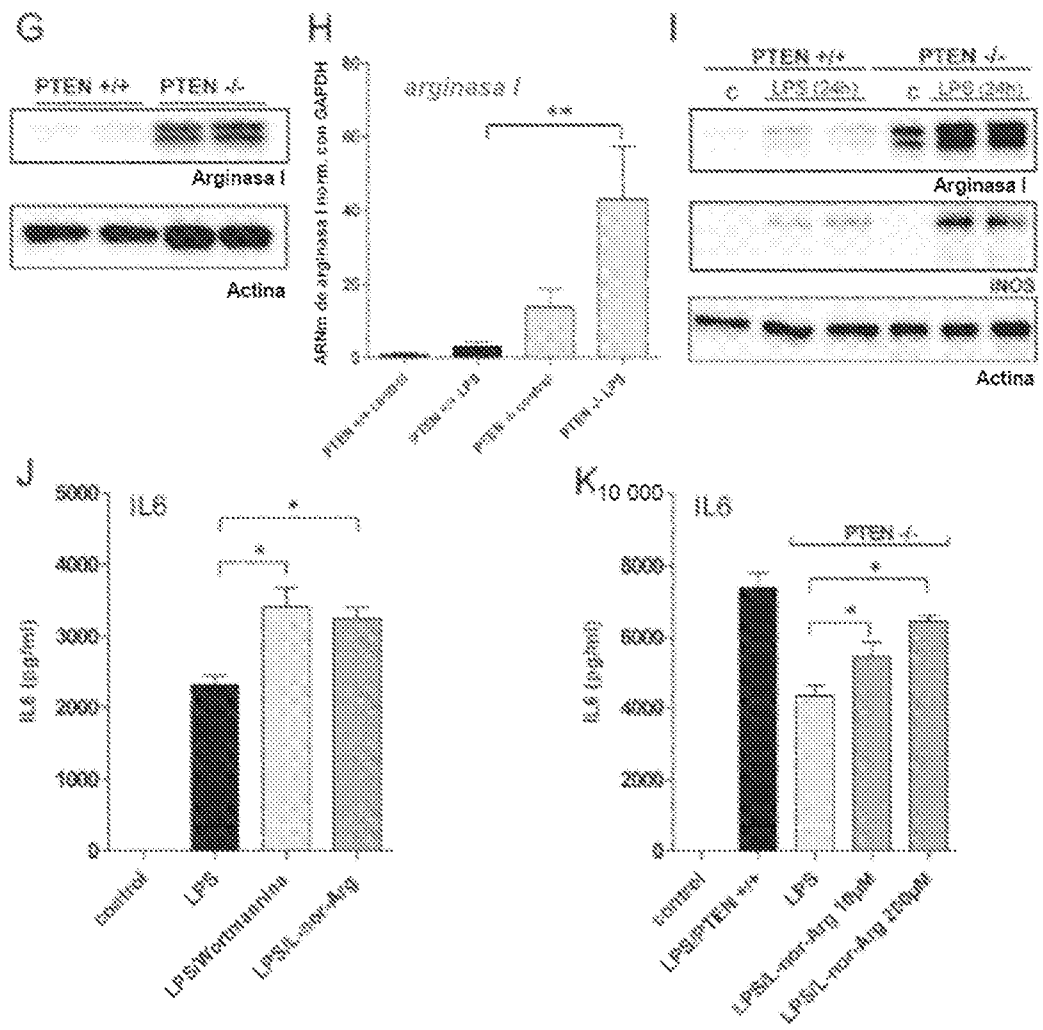


FIGURA 2B

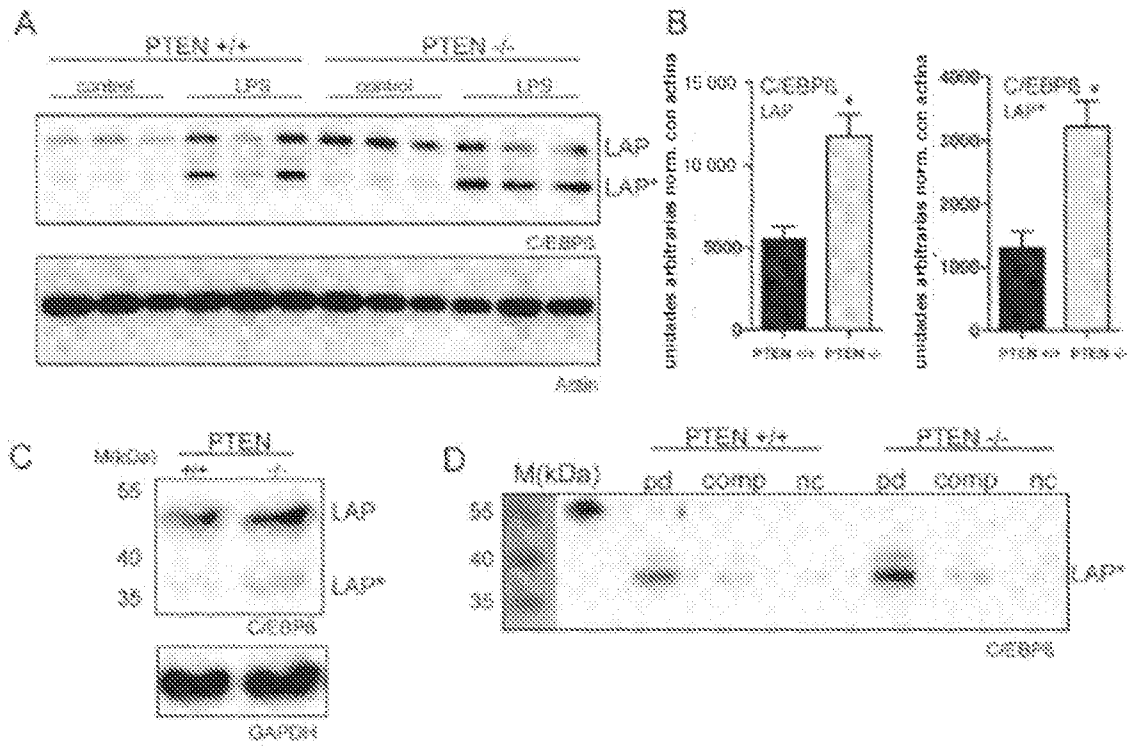


FIGURA 3

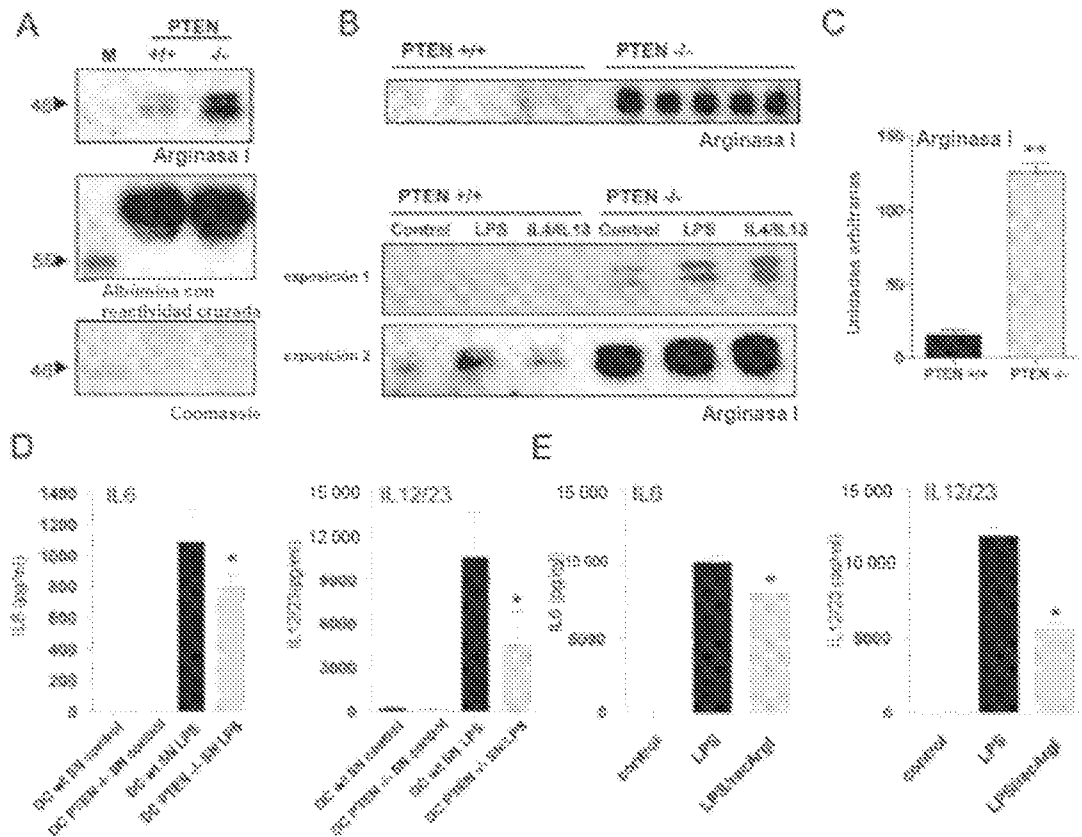


FIGURA 4

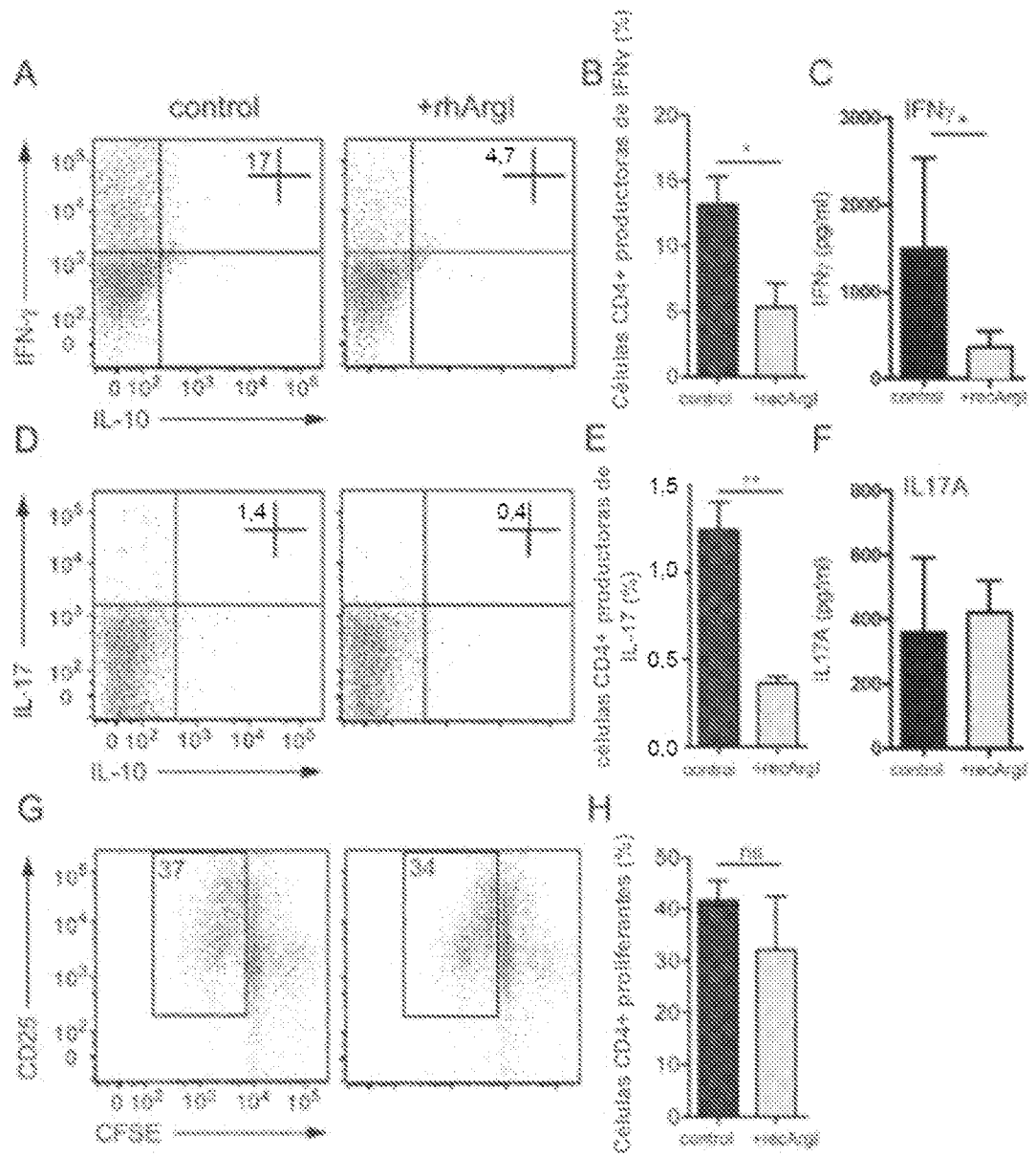


FIGURA 5

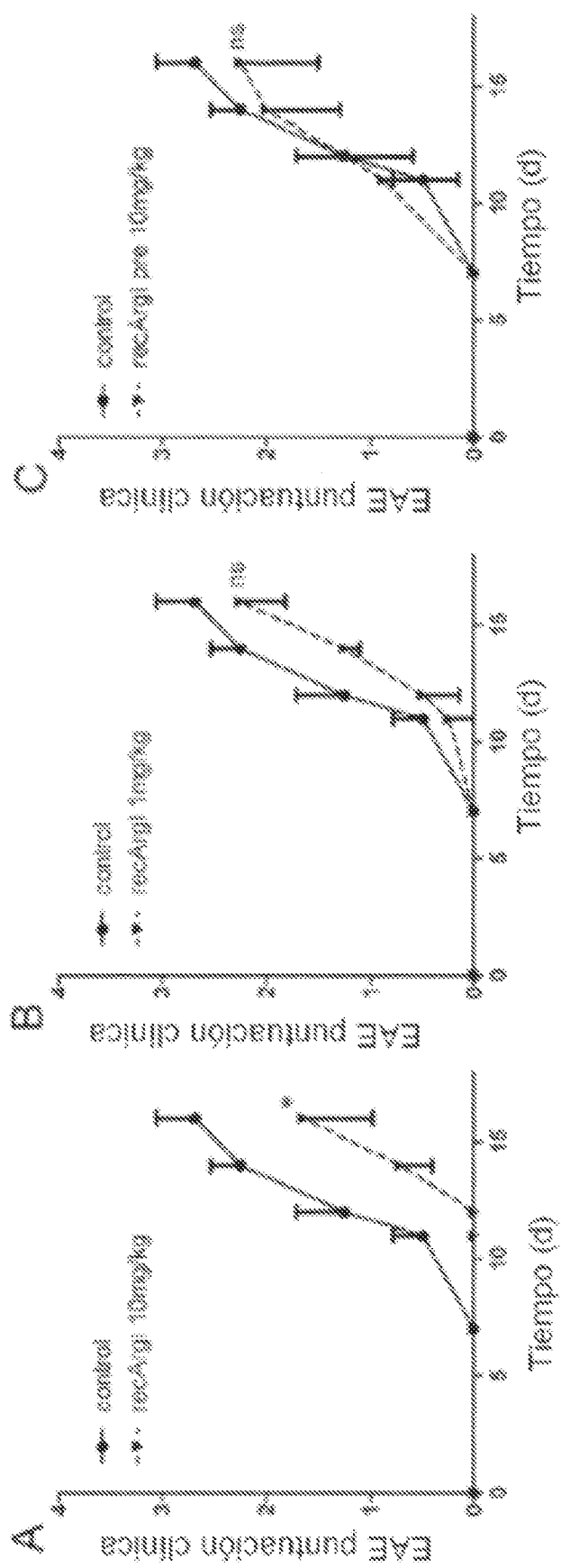


FIGURA 6A

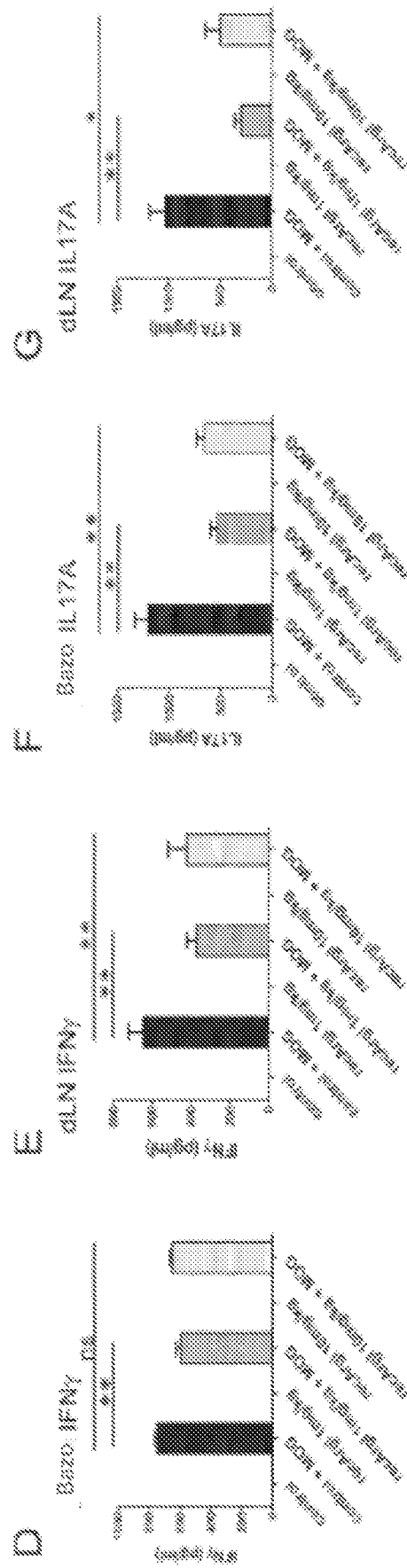


FIGURA 6B

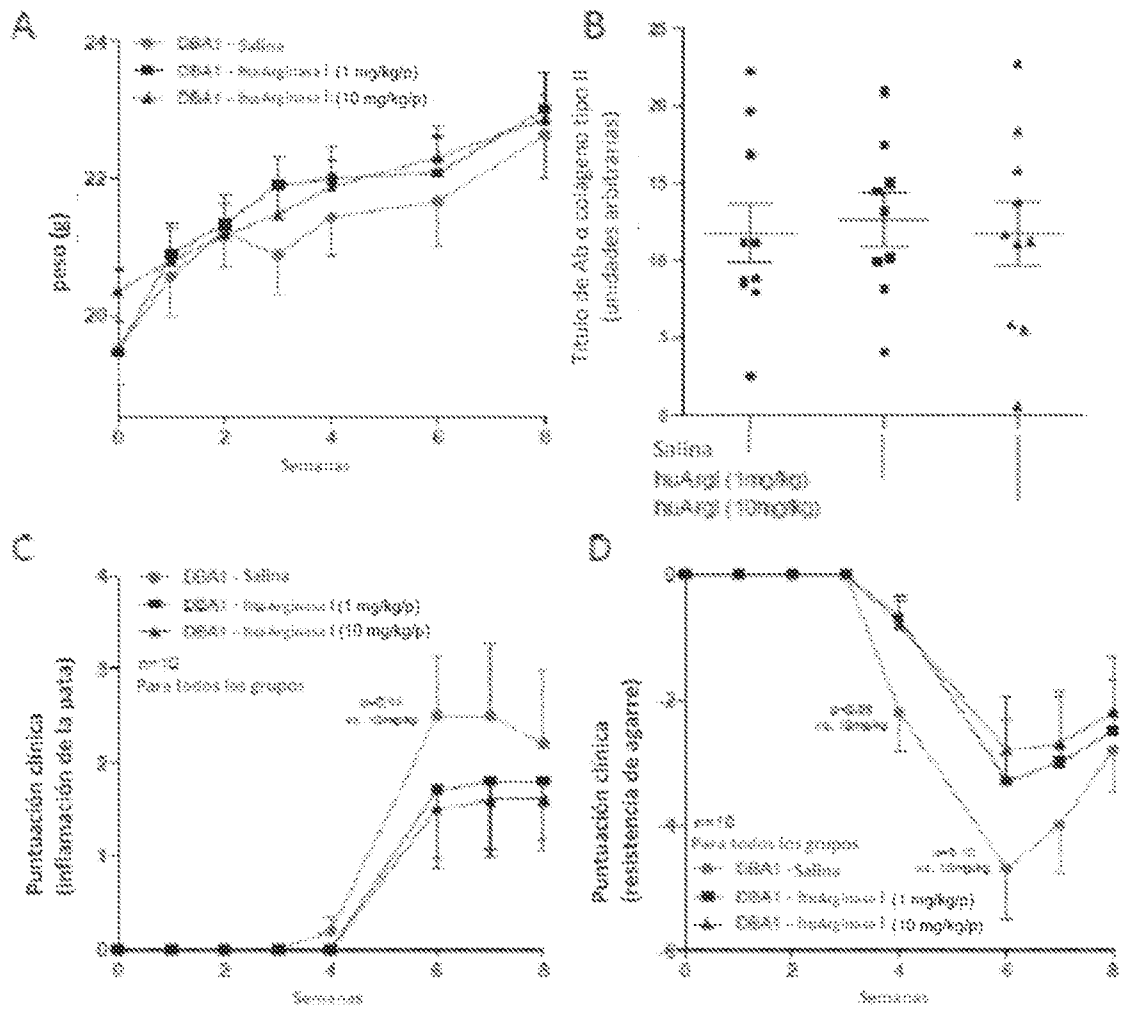


FIGURA 7

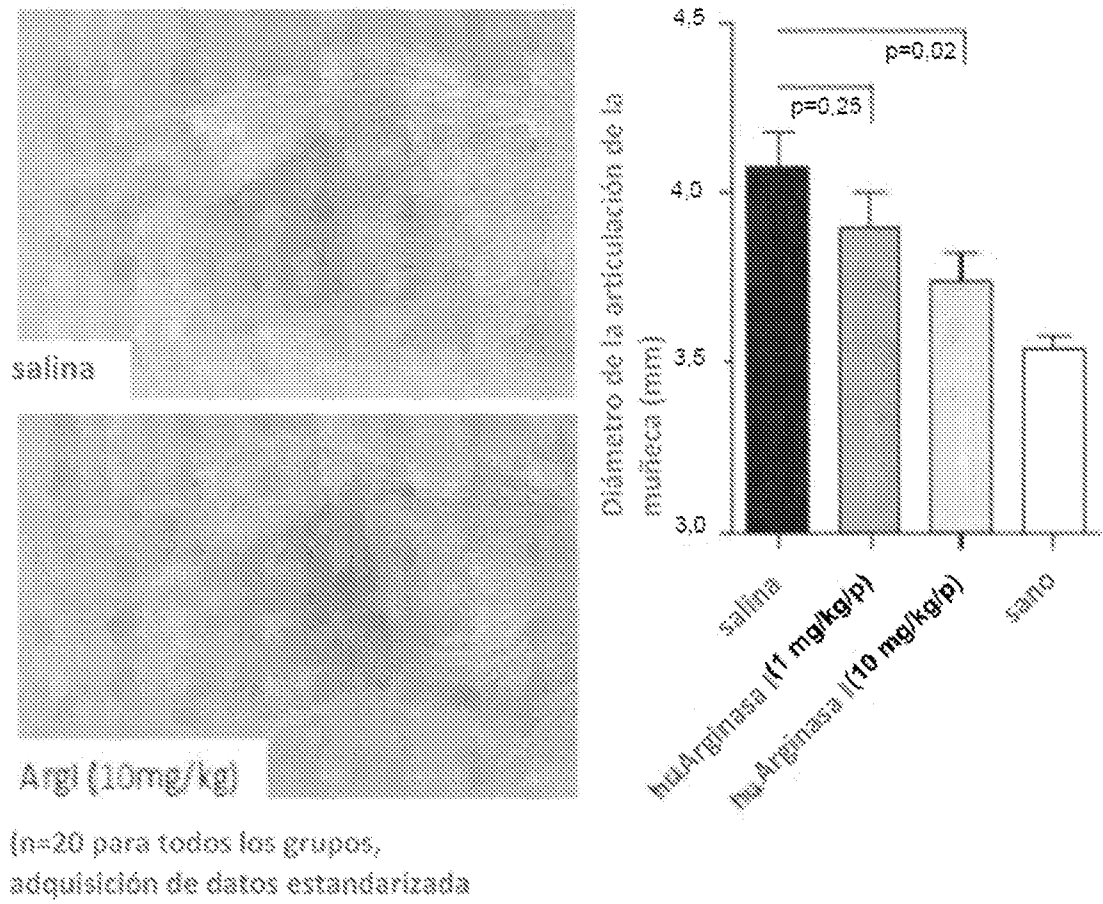


FIGURA 8

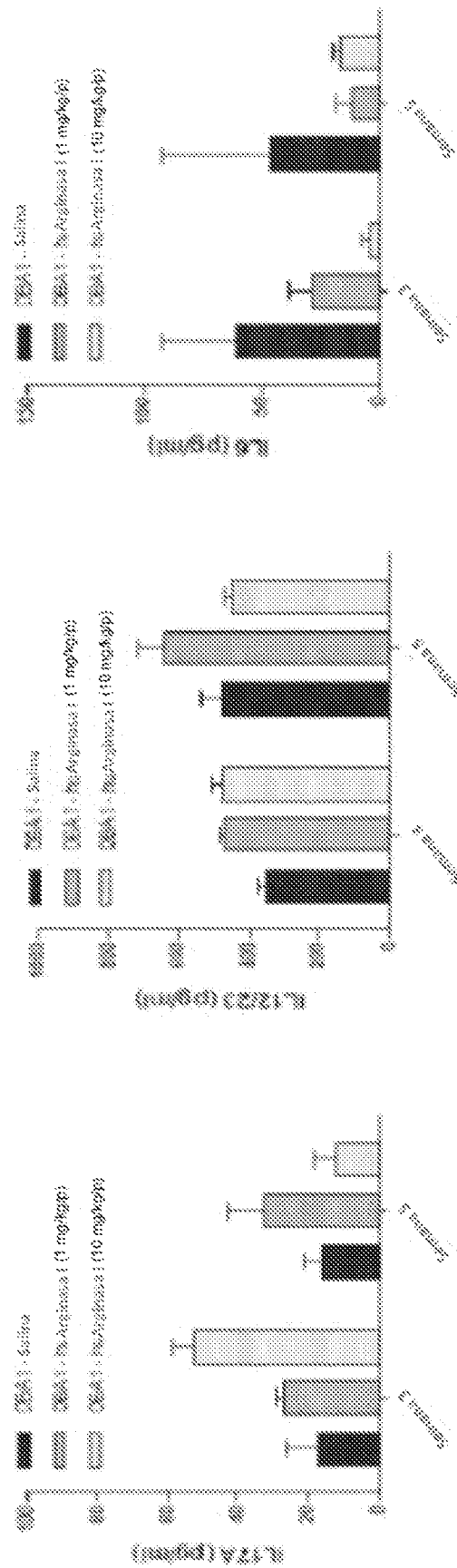


FIGURA 9

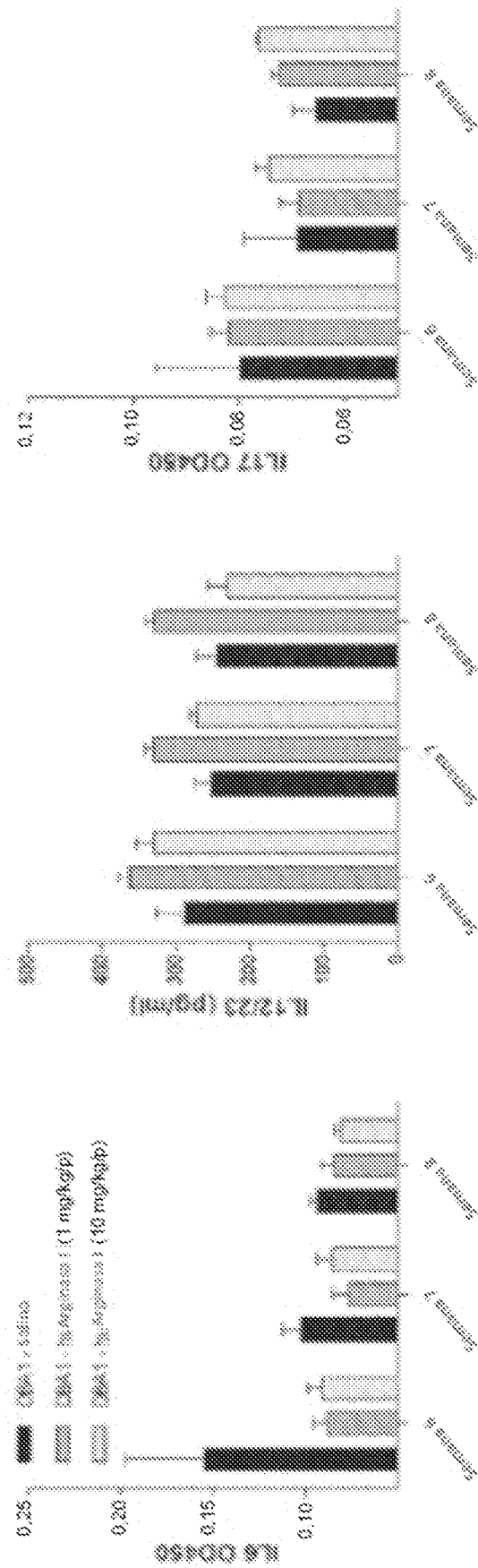


FIGURA 10

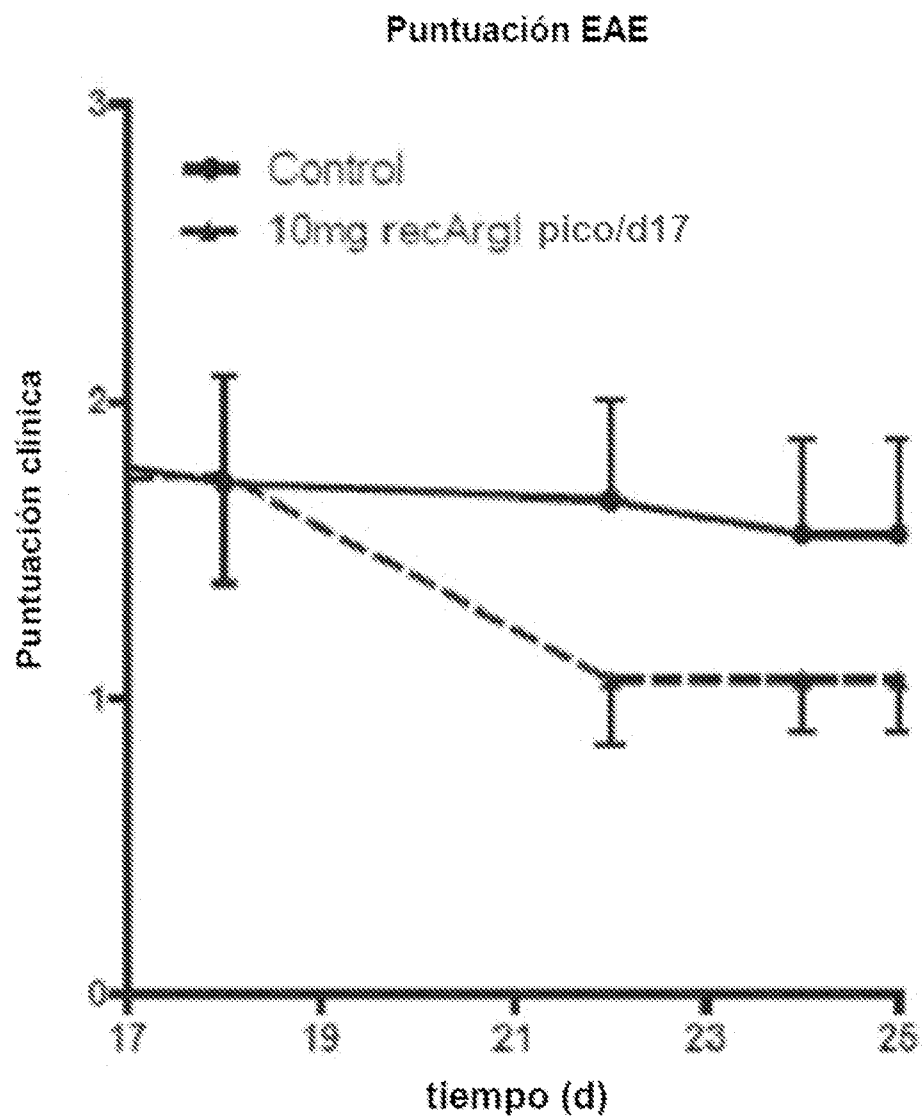


FIGURA 11

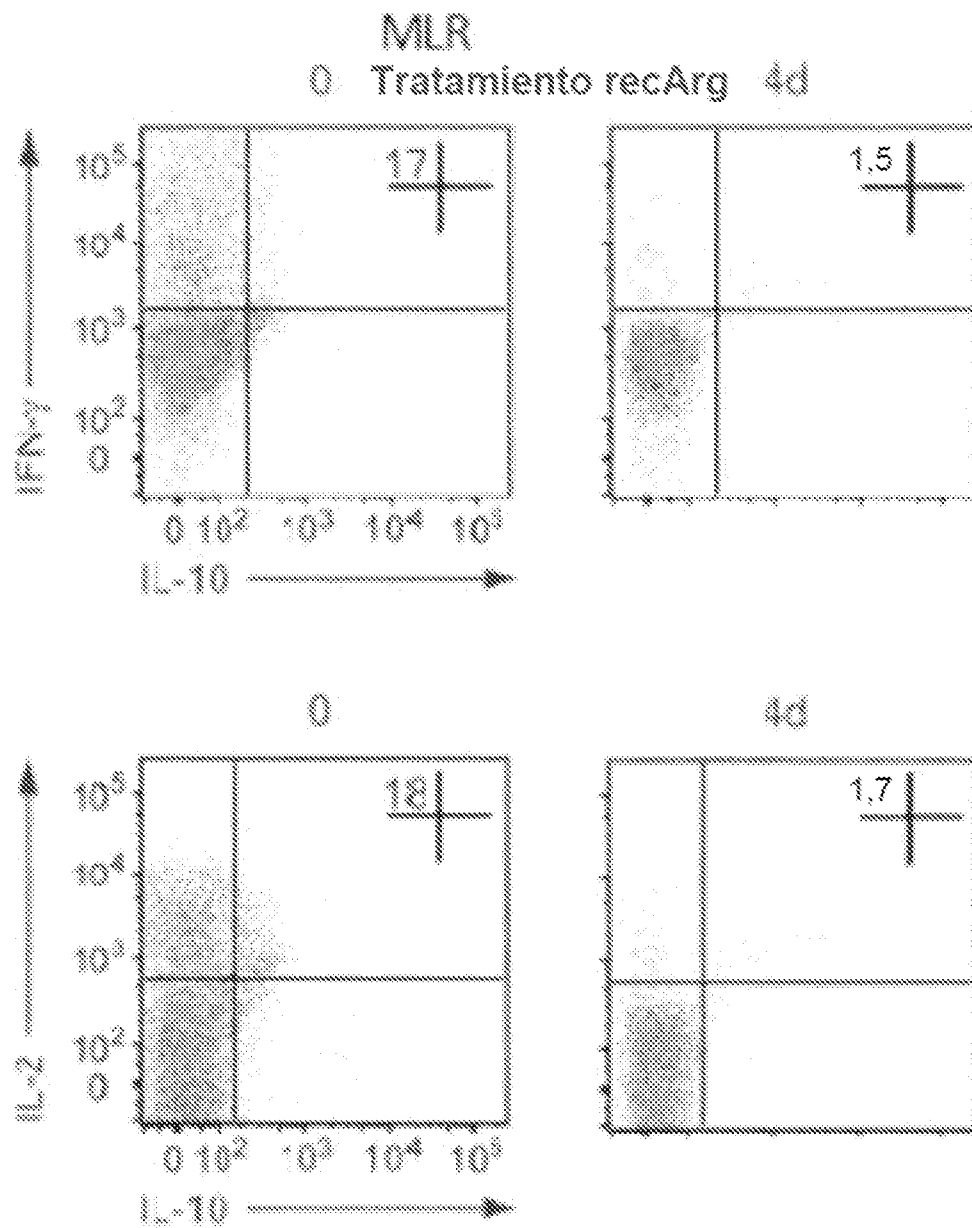


FIGURA 12A

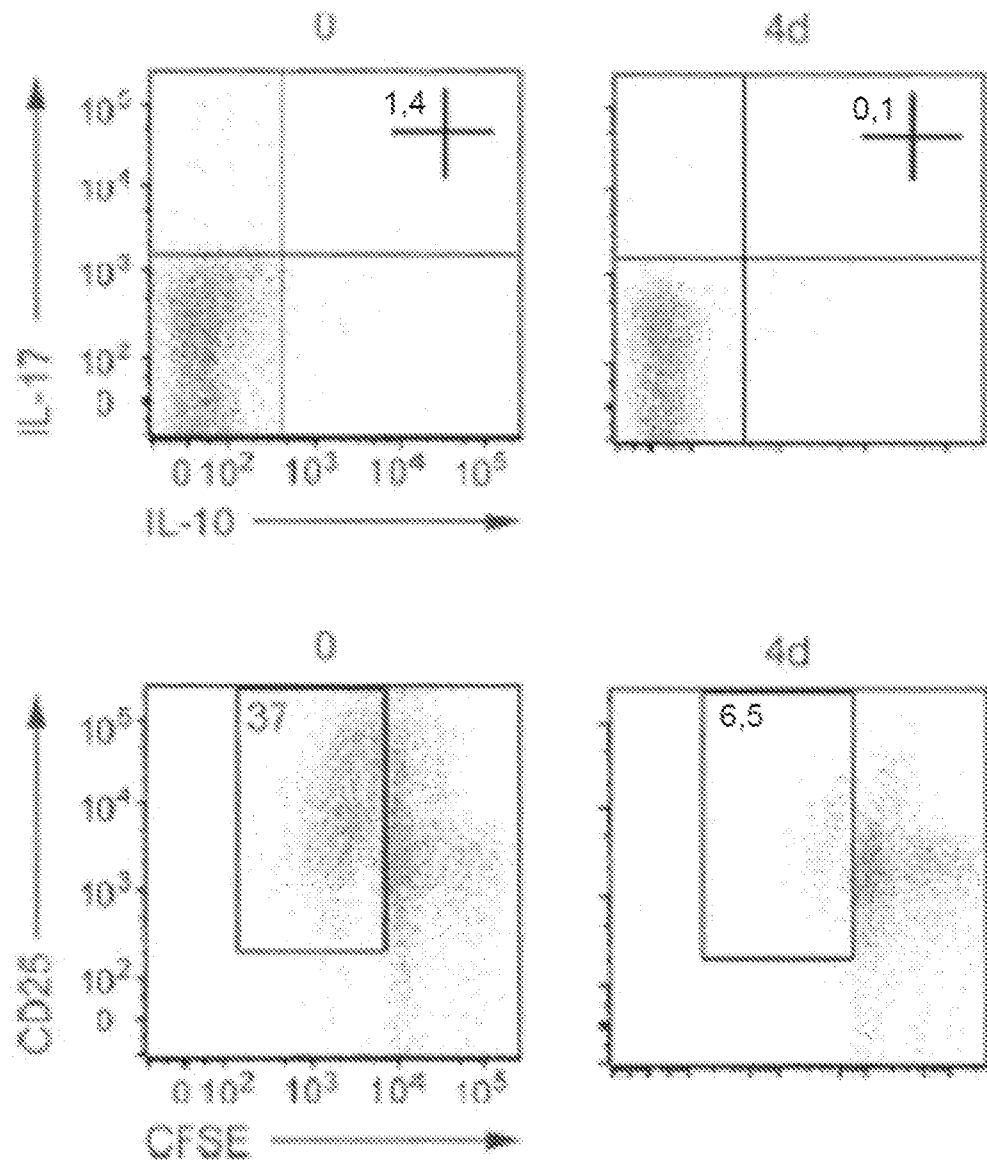


FIGURA 12B

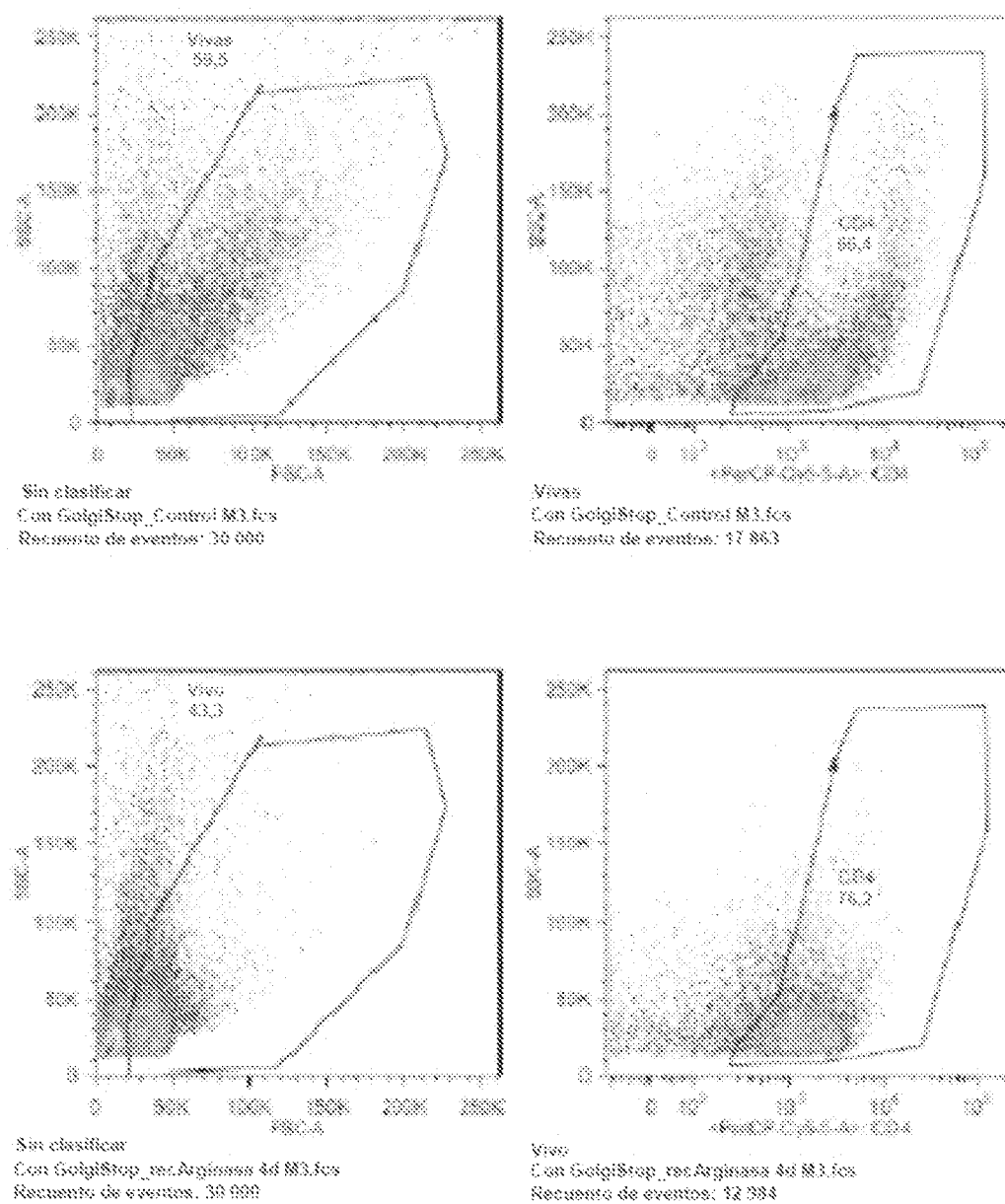
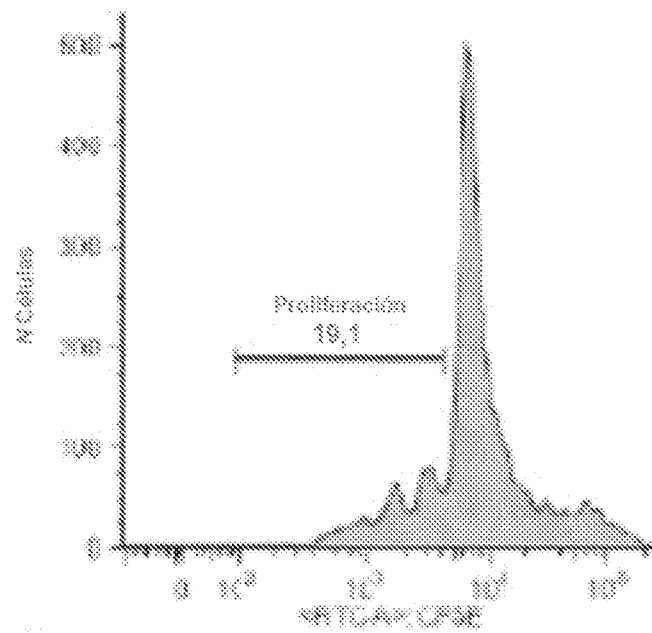
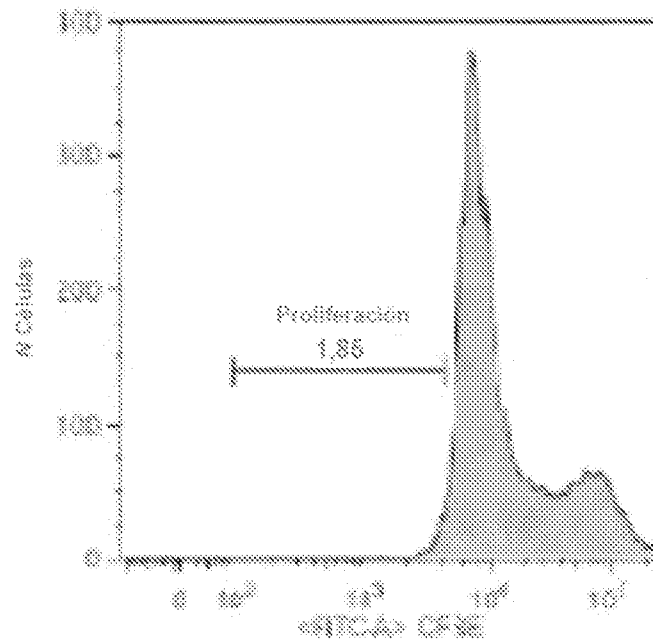


FIGURA 13A



CD4
Con GolgiStop_Control M3.fcs
Recuento de eventos: 11 854



CD4
Con GolgiStop_recArginasa 4d M3.fcs
Recuento de eventos: 5850

FIGURA 13B

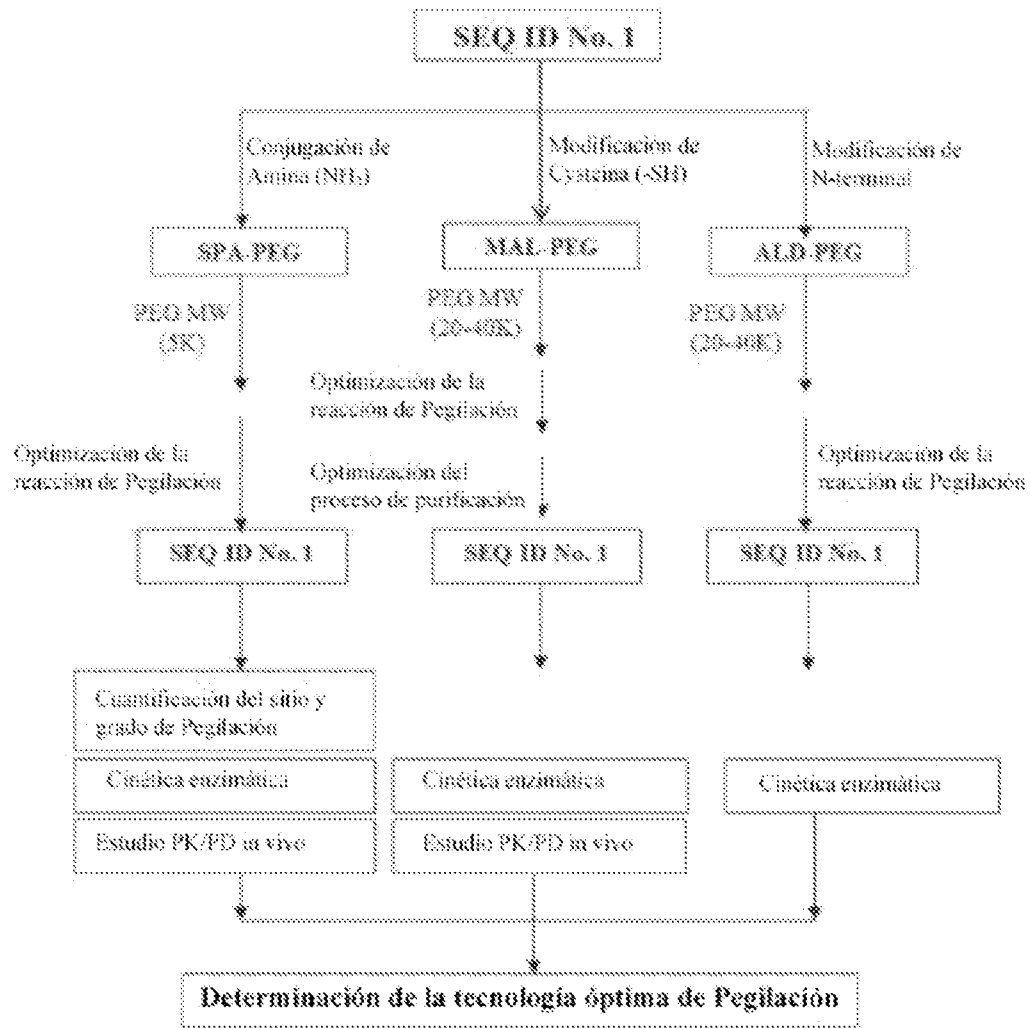


FIGURA 14

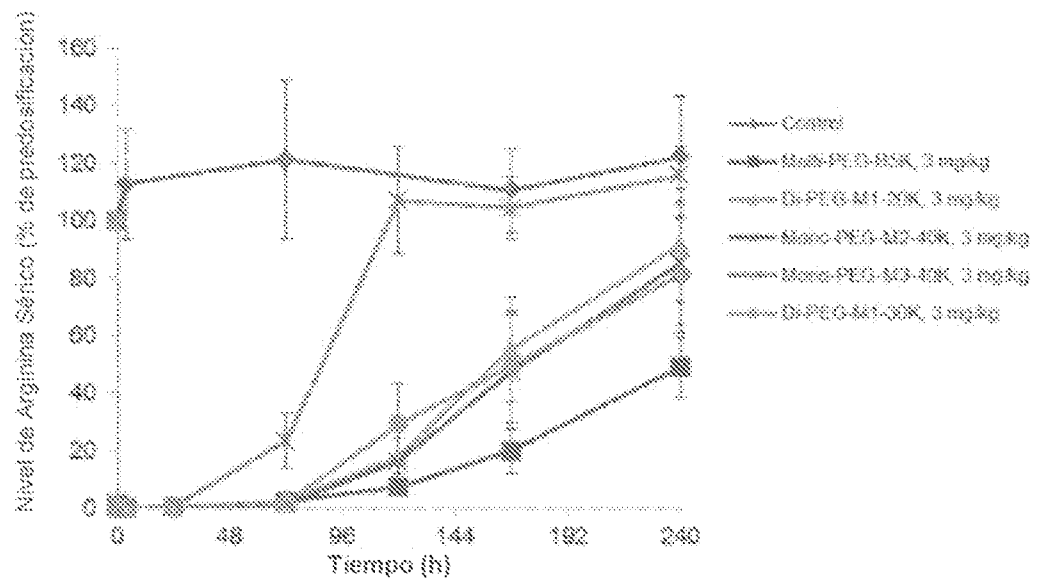


FIGURA 15

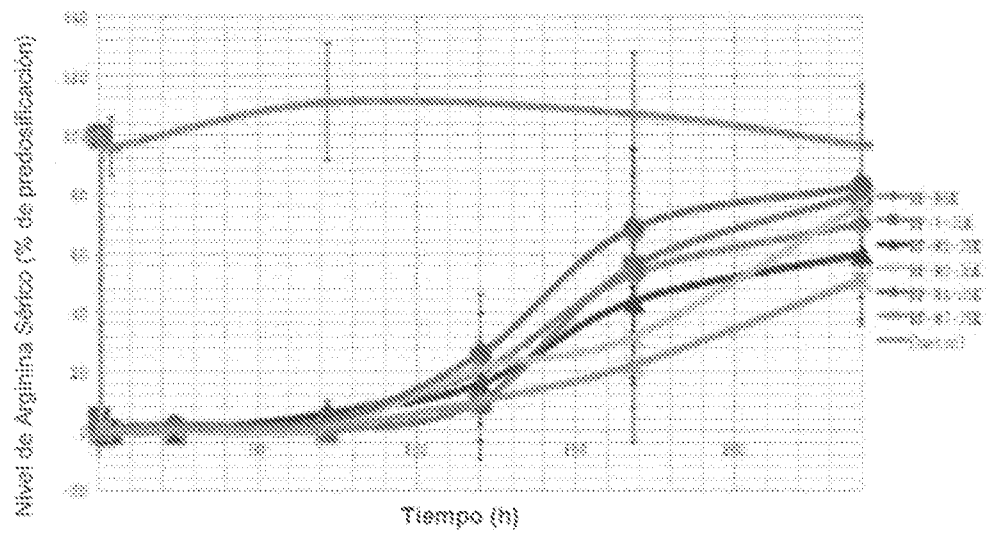


FIGURA 16

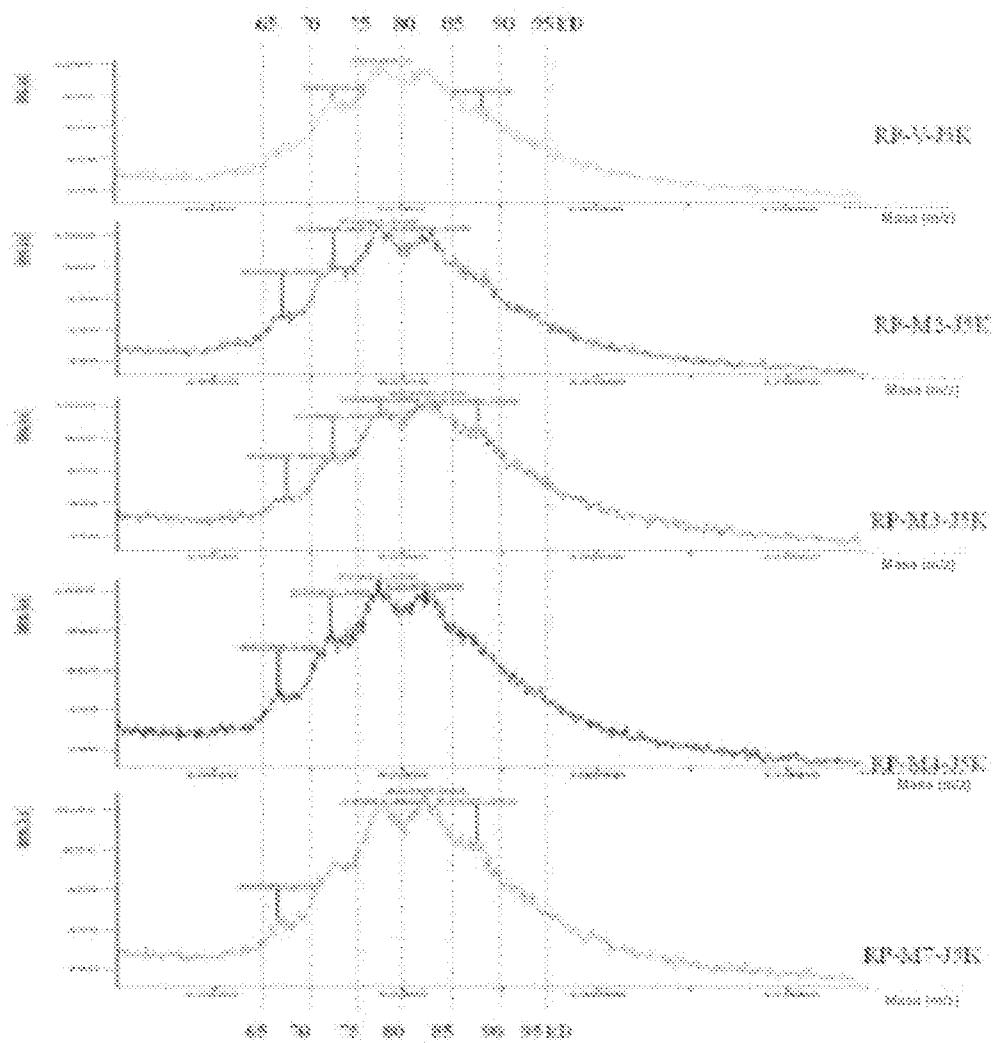


FIGURA 17

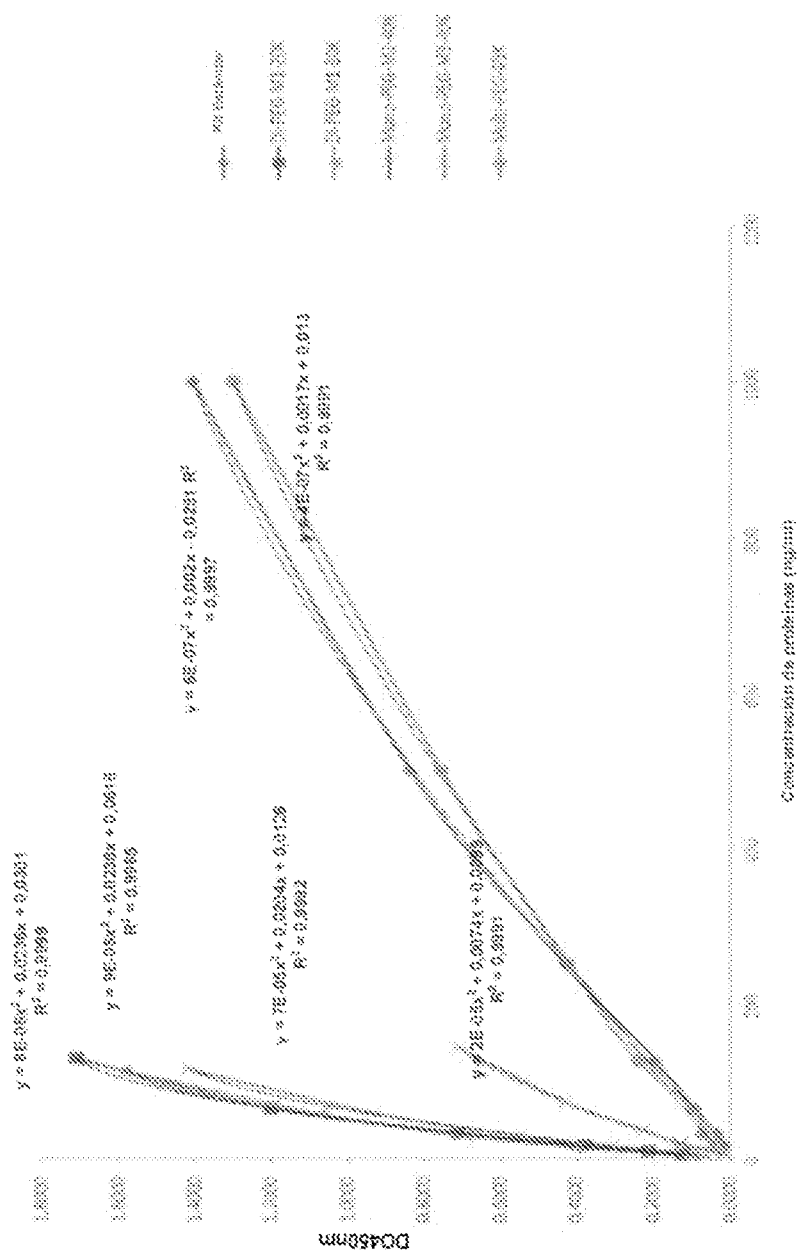


FIGURA 18

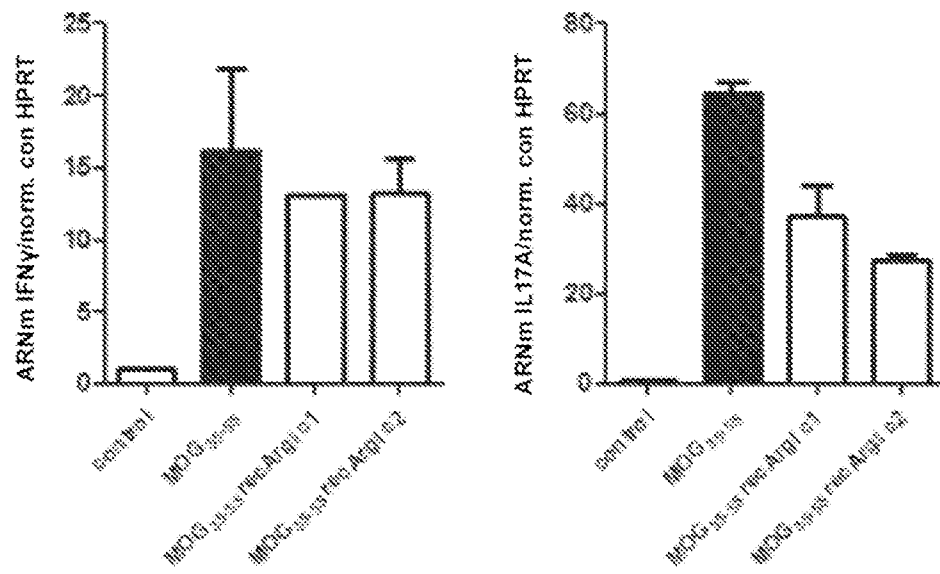


FIGURA 19

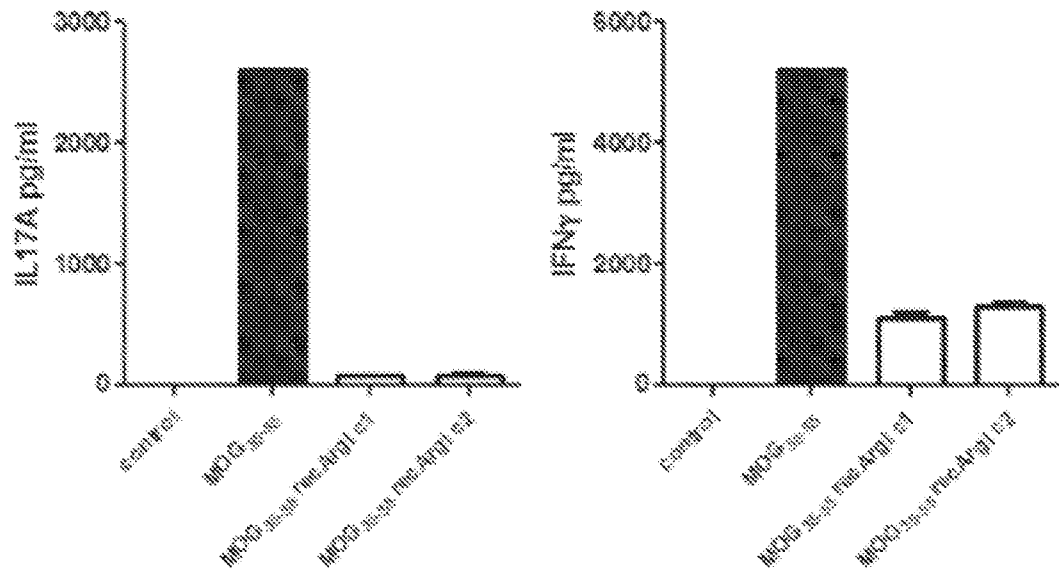


FIGURA 20

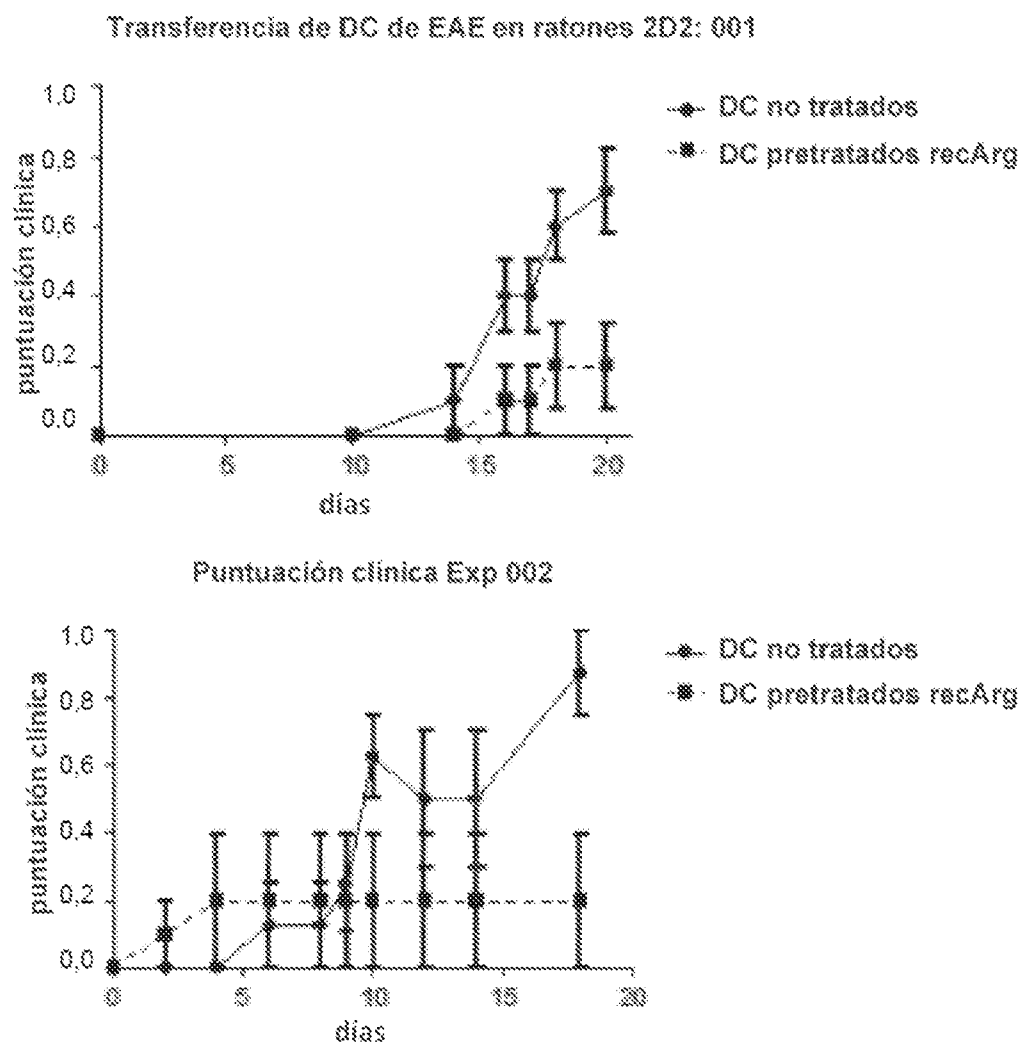


FIGURA 21

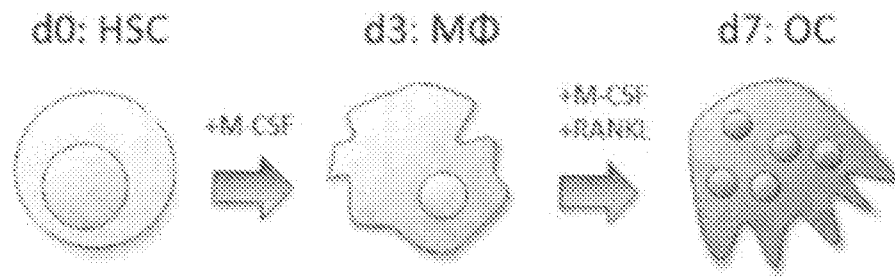


FIGURA 22

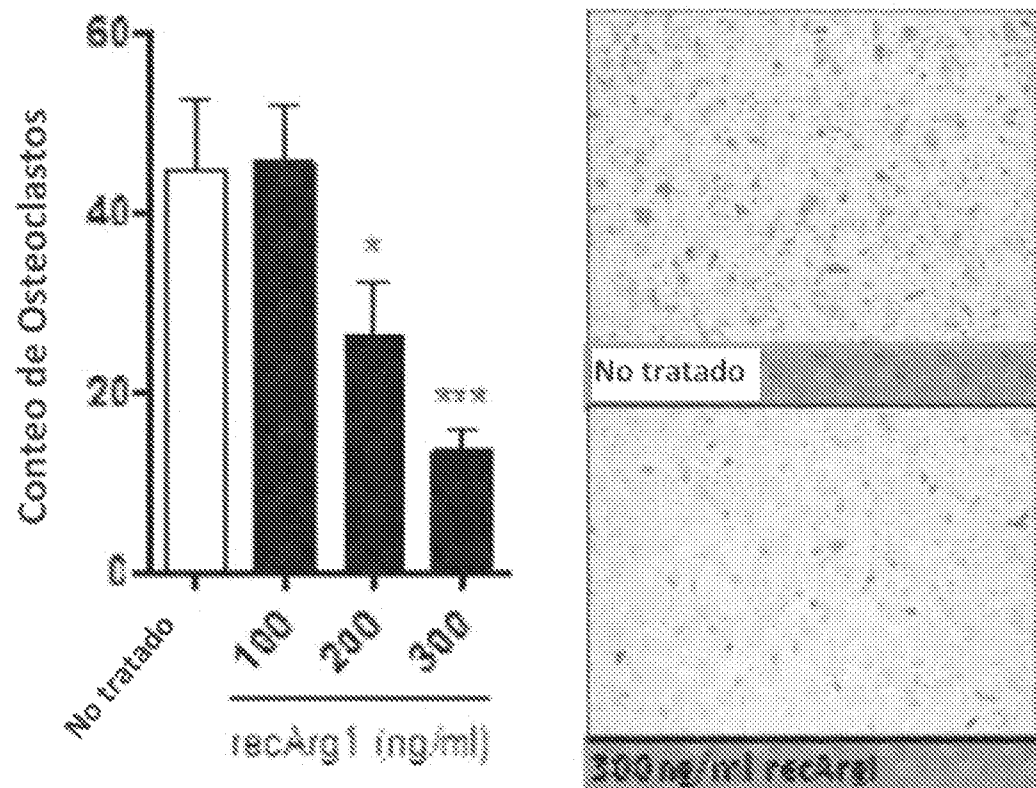


FIGURA 23

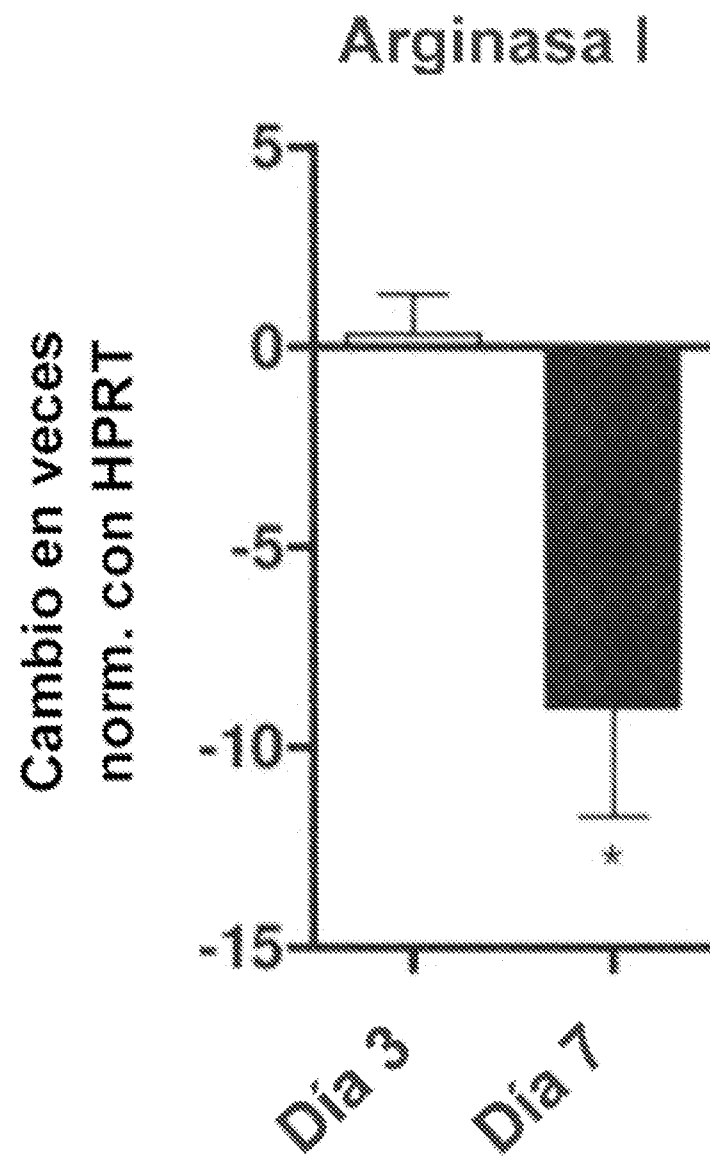
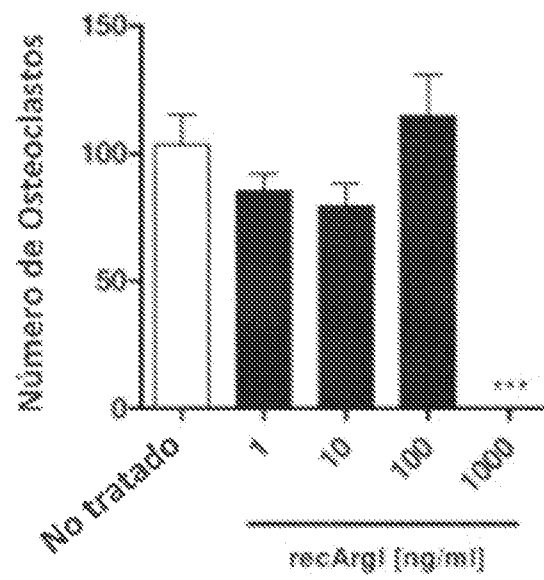


FIGURA 24

Panel A



Panel B

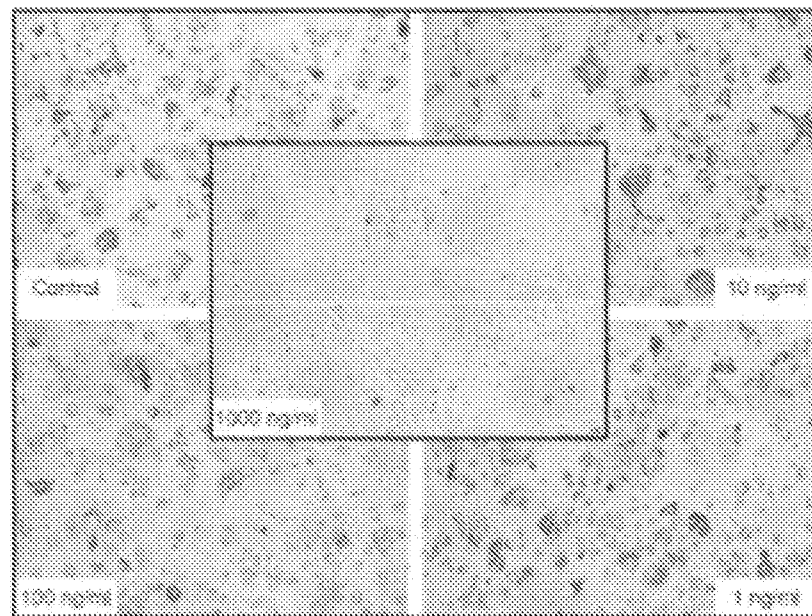


FIGURA 25

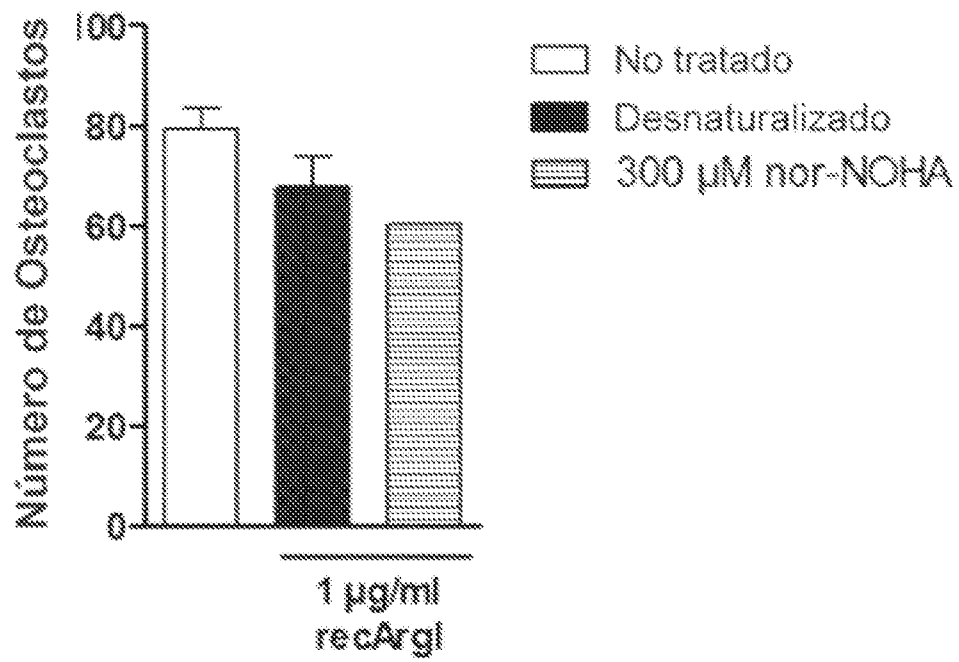


FIGURA 26

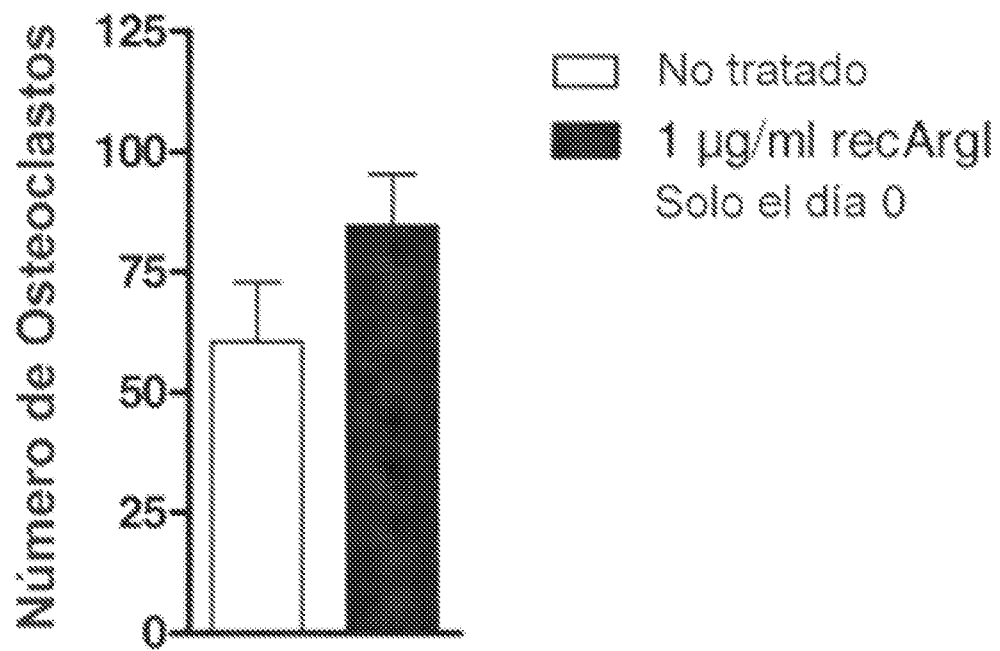


FIGURA 27

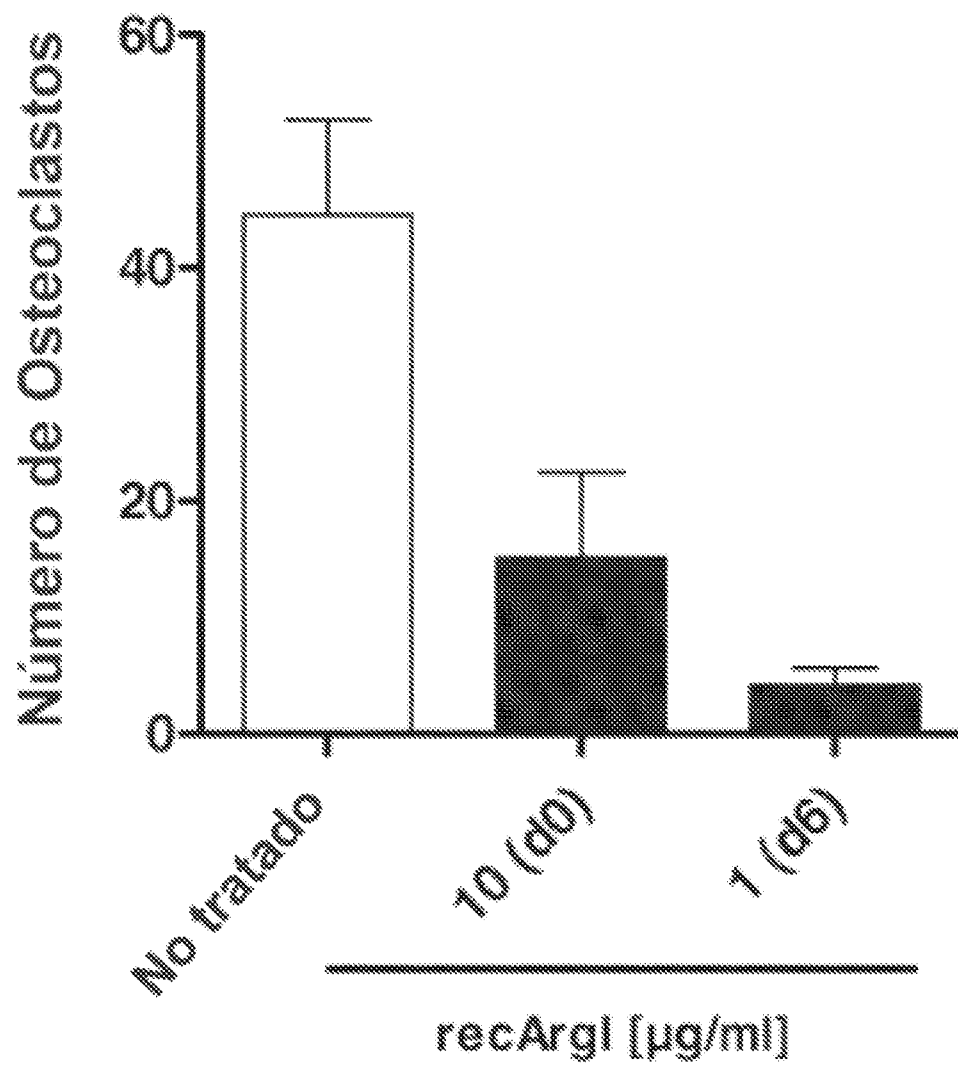


FIGURA 28

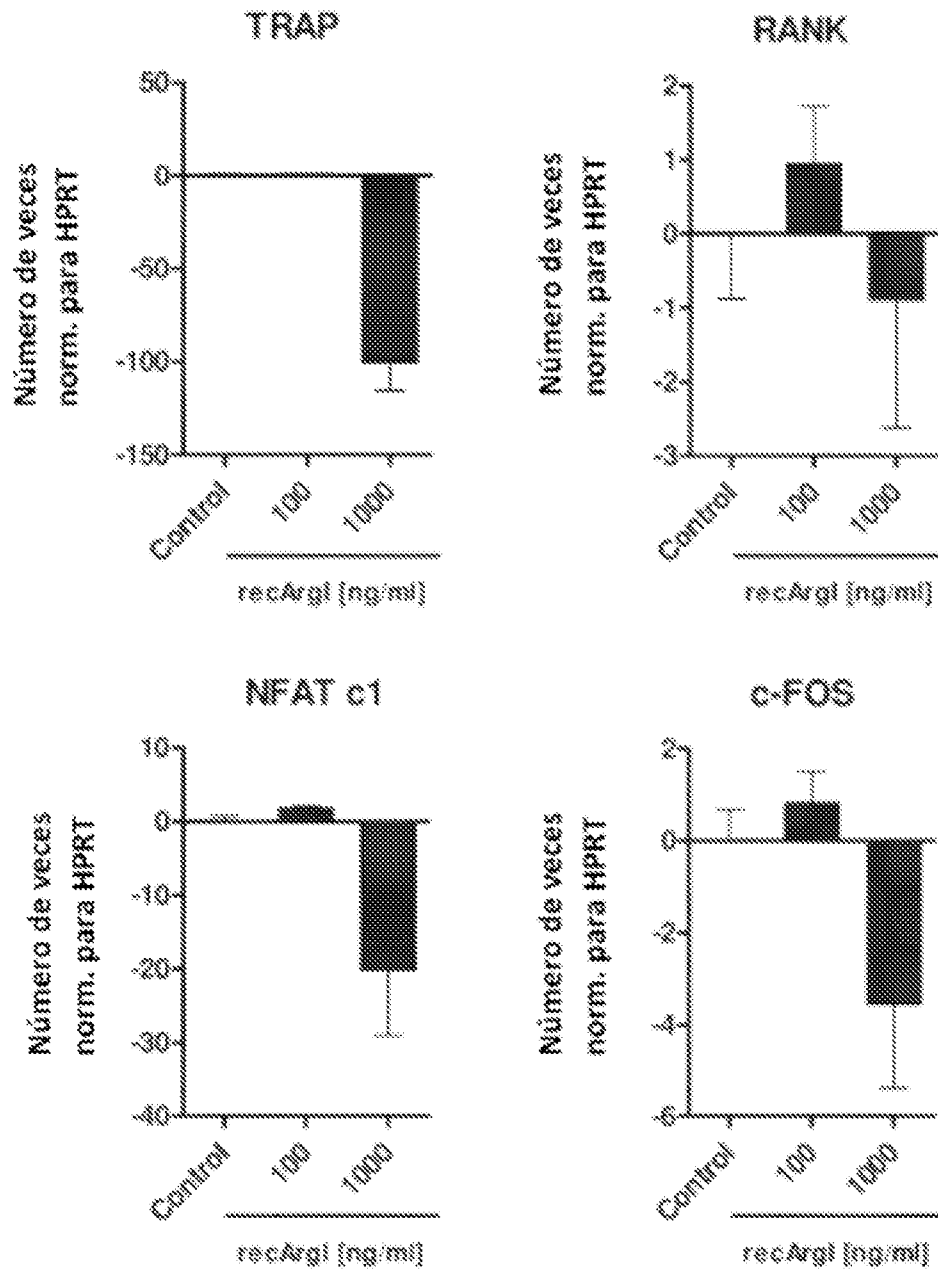


FIGURA 29