

05-99389.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

05-99389

21. EXPEDIENTE N° 05-99389

54. TÍTULO "COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR EL ASMA U OTRAS
ENFERMEDADES ALERGICAS O INFLAMATORIAS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/11 A61K 31/198

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO MADISON, ESTADO DE NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C.

V

PETITORIO


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 05099320 00000000 Folios: 242
Fecha (MM): 2005-09-30 17:11:23
Trámite: 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

04-10-05

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison,
Estado de New Jersey 07940, Estados Unidos
de América.Nacionalidad o Domicilio: Madison, Estado de
New Jersey, Estados Unidos de América.Lugar de Constitución: Estado de Delaware,
Estados Unidos de América.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
APODERADO

Nombre: ALICIA LLORED RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)Nombre: BOWMAN, Michael, R.; ELLIS, Debra; FOLLETTIE, Maximillian, T.;
WINKLER, Aaron; WILLIAMS, Cara; CHEN, Heng y LIU, Wei.Dirección: 63 Gloucester Road, Westwood, MA 02090; 1266 Pawtucket
Boulevard, Lowell, MA 01854; 12 Greensbrook Way, Belmont, MA 02478; 151
Mary Street, Arlington, MA 02474; 11 Observatory Road, Methuen, MA 01844;
129 North Street, #8, Newton, MA 02460 y 73 Blackmer Road, Sudbury,
MA 01776.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/006470

Fecha: 04/03/04

Publicación Internacional No. WO 2005/003164 A3

Fecha: 13/01/05

⑥

Título (54) "COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR EL ASMA
U OTRAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS O INFLAMATORIAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 15/11

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US

(32) Fecha

04/03/03
05/06/03

(31) Número de Solicitud

60/451,398
60/475,870

⑨

Comprobante de Pago No. 05-72,410

Fecha: Septiembre 19 de 2005

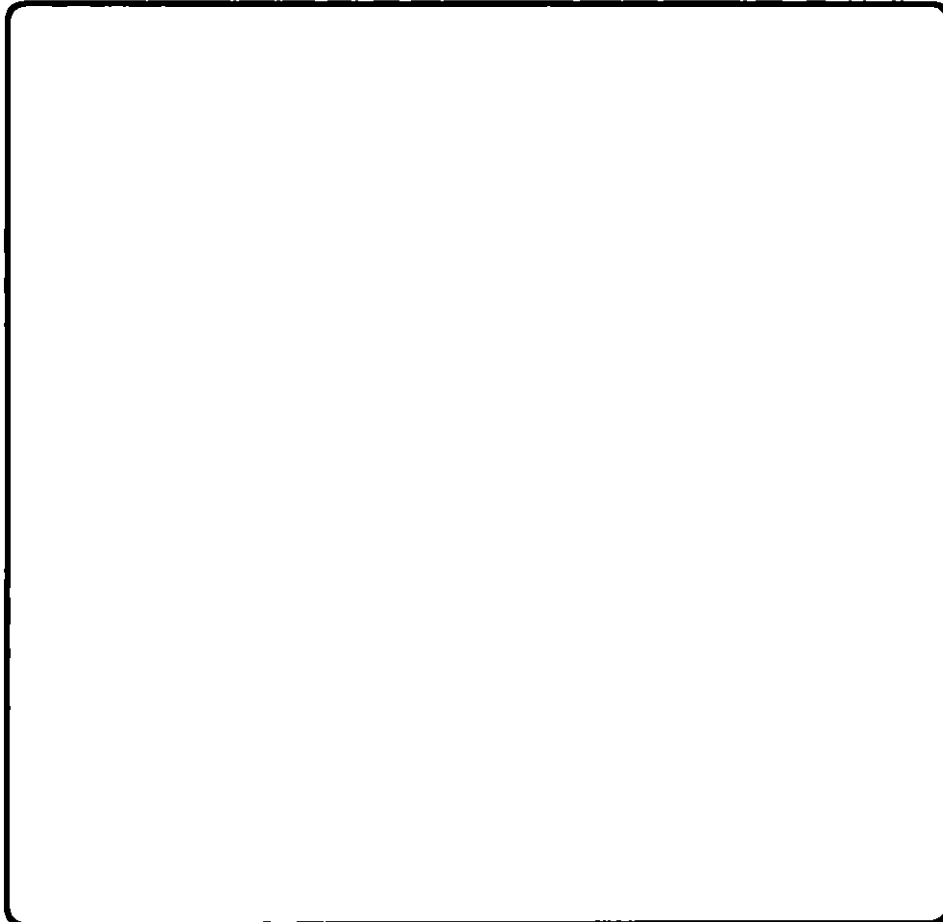
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☒ Otros reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, documentos de notificación de registro de cambio de inventores con su traducción y opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE ALICIA FLOREDA RICAURTE

FIRMA

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 72,410
FECHA : SEPTIEMBRE 19 DE 2005

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05093309 00000000
Fecha (MM): 2005-09-30 17:11:23
Tramite : 014 PCT-PATENT 378 FASE NNCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2809 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	39307498	19/09/2005	5,427,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

wye-h
4

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-11-09-582
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (sociedad), documento también escrito en inglés y en español.

Marilyn L. Mitchell
Notario Público, Estado de New Jersey
Mi Comisión Expira el 6 de febrero de 2005

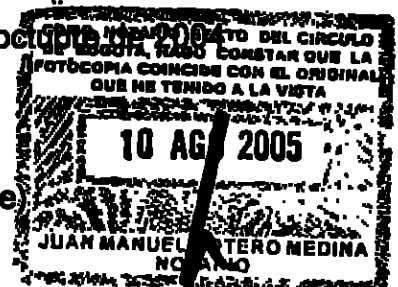
APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por Marilyn L. Mitchell
3. actuando como Notario Público de New Jersey
4. lleva el sello/estampilla de Marilyn L. Mitchell, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, New Jersey
 6. el día 7 de octubre de 2004
 7. por John E McCormac, CPA, Tesorero de New Jersey
 8. No. A210247
 9. Sello/Estampilla
 10. Firma: (ilegible)
- Hay un sello dorado.



Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de noviembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

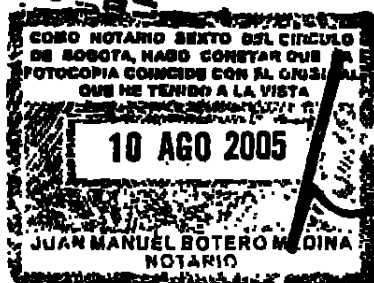
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

283161
Anita Escobar
SU FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DE SEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2004 NOV 10 12:40

UES
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



wyeth
5.

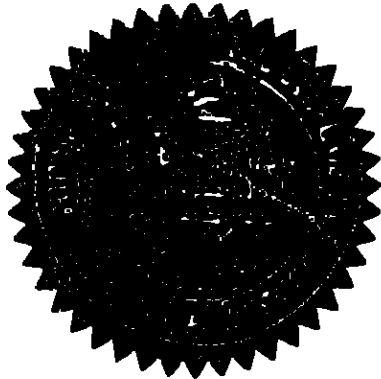
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

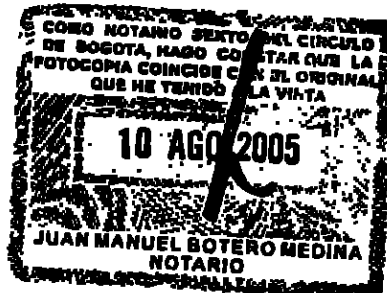
1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L MITCHELL
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 7TH DAY OF OCTOBER 2004
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A210247
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac



Los abajo firmados, WYETH, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

The undersigned, WYETH, a corporation organized and existing under the laws of State of Delaware, United States of America.

con domicilio en Five Giralda Farms, Madison, Estado de New Jersey 07940, Estados Unidos de América

domiciled at Five Giralda Farms, Madison, State of New Jersey 07940, United States of America

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; Instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistirse, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Doctors ALICIA LLÓREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

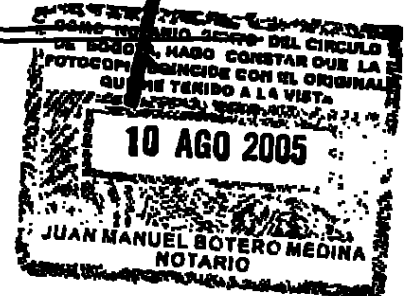
Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Dado y firmado

Given and signed this: 6th day of October 2004 Wyeth


William H. Cainan
Assistant Secretary



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

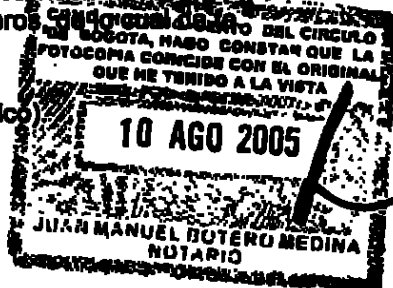
Estados Unidos de América
Estado de New Jersey {ss
Condado de Morris

Hoy 6 de Octubre de 2004 compareció
William H. Calnan, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es

de WYETH la compañía nombrada en el documento
que antecede, una sociedad debidamente organizada
y existente conforme a las leyes del Estado de
Delaware, Estados Unidos de América, domiciliada
en la ciudad de Madison, Condado de Morris,
Estado de New Jersey, Estados Unidos de América,
legalmente constituida para un período de duración
que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social;
conforme a las leyes del Estado de Delaware,
Estados Unidos de América; que el declarante está
autorizado por dicha Compañía para conferir este
poder; que el sello estampado por él al pie de tal
poder, en nombre y en representación de la
expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que
el objeto para el cual se confiere este instrumento
está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
Incorporación firmados en Madison, Estado de New
Jersey, con fecha 4 Febrero, 1926, y
certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos.

Notary Public (Notario Público)



NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of New Jersey {as
County of Morris

On this 6th day of October 2004, personally
came, William H. Calnan
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he is the
Assistant Secretary of WYETH the company named
within, a Corporation organized and existing under
the laws of State of Delaware, United States of
America, domiciled at the City of Madison, County of
Morris, State of New Jersey, United States of
America, legally constituted for a period of tenure not
yet expired, which exercises its corporate purposes
according to the laws of State of Delaware, United
States of America; that the deponent is authorized by
said Company to confer this power of attorney; that
the seal affixed hereunto by the deponent in the
name and on behalf of said Corporation is the
corporate seal thereof; and that the purpose for which
this instrument is granted is included within the
corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Wilmington, Delaware U.S.A. under date of
February 4, 1926, and hereby certifies that under the
laws of said State the foregoing acknowledgment is
sufficient proof that the facts therein contained are
true, which he attests.

Marilyn L. Mitchell

MARILYN L. MITCHELL
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY
My Commission Expires February 6, 2005

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

**No. SOLICITUD
INTERNACIONAL :**

PCT/US2004/006470 (51) INT. CL.:

C12N 15/11

(21) No. SOLICITUD:

(22) FECHA DE

PRESENTACIÓN: 30-09-2005

(71) SOLICITANTE: WYETH

(30) PRIORIDAD:

**(31) No. DE SOLICITUD: 60/451,396
60/475,870**

(72) INVENTOR/ES:

**BOWMAN, Michael, R.; ELLIS,
Debra; FOLLETTIE, Maximillian,
T.; WINKLER, Aaron; WILLIAMS,
Cara; CHEN, Heng y LIU, Wei.**

(32) FECHA DE

**PRESENTACIÓN: 04-03-2003
05-06-2003**

(33) PAÍS:

US

**(74) REPRESENTANTE
LEGAL:**

ALICIA LLOREDA RICAURTE

(54) TÍTULO:

**"COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR EL ASMA U OTRAS
ENFERMEDADES ALÉRGICAS O INFLAMATORIAS"**

(57) RESUMEN:

Reivindicación número 1.-

Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un agente capaz de inhibir una actividad o expresión de un componente que no es NOS de una vía metabólica de la arginina.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 031896-29001	PARA FUTURAS ACCIONES		Ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.
Solicitud internacional No. PCT/US2004/006470	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 04/03/2004	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año)	
Solicitante WYETH			

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 10 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ La búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☒ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla No. IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

Folios 8 y 9 tarjetas Cir

Casilla No. 1 Secuencia(s) de nucleótido y/o aminoácido (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótido y/o aminoácido revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre las bases de:
 - a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencia
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
 - b. formato del material
 - ☒ en formato escrito
 - ☒ en un formato legible en computador
 - c. tiempo de presentación/suministro
 - ☒ contenido en la solicitud internacional como fue presentada
 - ☒ presentado junto con la solicitud internacional en un formato legible en computador
 - ☐ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda
2. ☐ Además, en el caso que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o además una tabla relacionada ha sido presentada o suministrada, las declaraciones requeridas que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud como fue presentada, o no va más allá de la solicitud como fue presentada, como en forma apropiada, fueron suministradas.
3. Comentarios adicionales:

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

ver INFORMACIÓN ADICIONAL hoja PCT/ISA/210
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

ver hoja adicional

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☒ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

todas las 5, 6, 9, 10, 12, 17 totalmente; todas las 1-4, 8, 13-16, 20 parcialmente en cuanto a que estas reivindicaciones se refieren a invenciones listadas bajo 1 (1.1 y 1.2) y 3 en la Forma PCT/ISA/206 (hoja extra)
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
☒ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

CONTINUACION DE INFORMACION ADICIONAL PCT/ISA/210**Continuación de la Casilla II.1**

Aunque las reivindicaciones 1-6, 8-10 y 12-14 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

Aunque las reivindicaciones 15-17 están dirigidas a un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

CONTINUACION DE INFORMACION ADICIONAL PCT/ISA/210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional ha encontrado múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. reivindicaciones: 5, 9, 18, 19 todas totalmente; 1-4, 8, 13-17, 20 todas parcialmente

- 1.1. reivindicaciones 5, 9 todas parcialmente; 1-4, 8, 13-17, 20 todas parcialmente

Un método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un mamífero que tiene una enfermedad alérgica o inflamatoria (respiratoria), en donde el agente inhibe una actividad o expresión (por interferencia del ARN o el mecanismo antisentido) de un componente de una vía metabólica de la arginina en un tejido afectado por la enfermedad, y el componente es la arginasa. Un método para identificar un agente, de conformidad con la reivindicación 15, en cuanto a que el componente es la arginasa.

La composición farmacéutica relacionada a éste.

- 1.2. reivindicaciones: 18, 19 todas totalmente

Un método de conformidad con las reivindicaciones 18 y 19.

2. reivindicaciones: 1, 2, 11, 20 todas parcialmente

Un método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un mamífero que tiene una enfermedad alérgica o inflamatoria (respiratoria), en donde el agente es la alfa-difluorometilornitina e inhibe una actividad de un componente de una vía metabólica de la arginina en un tejido afectado por la enfermedad, el componente es la arginasa.

La composición farmacéutica relacionada a éste.

3. reivindicaciones: 6, 10, 12 todas totalmente; 1-4, 8, 13-17, 20 todas parcialmente

Un método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un mamífero que tiene una enfermedad alérgica o inflamatoria (respiratoria), en donde el agente inhibe una actividad o expresión de un componente de una vía metabólica de arginina en un tejido afectado por la enfermedad, y el componente es un transportador de aminoácido catiónico.

Un método para identificar un agente, de conformidad con la reivindicación 15, en cuanto a que el componente es un transportador de aminoácido catiónico.

La composición farmacéutica relaciona a éste.

4. reivindicaciones: 7 totalmente; 1-4, 8, 11, 13-16, 20 todas parcialmente

CONTINUACION DE INFORMACION ADICIONAL PCT/ISA/210

Un método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un mamífero que tiene una enfermedad alérgica o inflamatoria (respiratoria), en donde el agente inhibe una actividad o expresión de un componente de una vía metabólica de la arginina en un tejido afectado por la enfermedad, y el componente está corriente abajo de una arginasa en la vía.

Un método para identificar un agente, de conformidad con la reivindicación 15, en cuanto a que el componente es diferente de la arginasa y un transportador de aminoácido catiónico.

La composición farmacéutica relacionada a éste.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

IPC 7 C12N15/11 A61K31/198 A61K31/7088 A61K49/00 C12Q1/68
A61P11/06

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C12N A61K C12Q A61P

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Internacional

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X Y	WO 03/073990 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER (US) ROTHENBERG MARC ZIMMERMANN NIV) 12 de Septiembre de 2003 (2003-09-12) página 3, párrafo 13-17 - página 4 página 22, párrafo 65 página 23, párrafo 67 página 24 - página 25 página 30, párrafo 100	1-6, 8-10, 13-20 2-4, 6, 8, 10, 12, 14
X Y	WO 03/078578 A (LSU MEDICAL CENTER (US); OCHOA A.C.; OCHOA J.B; POPESCU; ZEA; RODRIGUEZ) 25 de Septiembre de 2003 (2003-09-25) página 2 página 16 página 21 el documento completo	1-6, 8-10, 13-17, 20 3

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica al cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

10 de Febrero de 2005

Nombre y dirección de correo de la ISA
Oficina de Patentes Europea, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

04.03.2005

Funcionario autorizado

Macchia, G

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470

15

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	MEURS H. Y COL.: "Arginasa y asma: novedosas percepciones dentro de la homeostasis del óxido nítrico y la hipersensibilidad de las vías respiratorias" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, Vol. 24, No. 9, Septiembre de 2003 (2003-09), páginas 450-455, XP004454445 AMSTERDAM, NL ISSN: 0165-6147	1-5, 8, 9, 13-17, 20
Y	el documento completo	3
X	WO 00/44766 A (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION (US); MACLEOD CAROL L.) 3 de Agosto de 2000 (2000-08-03) citado en la solicitud	1, 13, 20
Y	el documento completo	2-4, 6, 8, 10, 14
Y	SCHNORR O. Y COL.: "La importancia de la expresión del transportador de aminoácido catiónico en piel humana" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, Vol. 120, No. 6, Junio de 2003 (2003-06), páginas 1016-1022, XP002316908 el documento completo	12
X	ZIMMERMANN N. Y COL.: "Diseccción de asma experimental con análisis de microensayo de ADN indentifica arginasa en la patogénesis del asma" THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Vol. 111, No. 12, Junio de 2003 (2003-06), páginas 1863-1874, XP002303441 el documento completo	1-6, 13-20
X	MEURS H. Y COL.: "La actividad incrementada de arginasa sustenta la deficiencia inducida por alergen de óxido nítrico cNOS-derivado e hipersensibilidad de las vías respiratorias" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, Vol. 136, 2002, páginas 391-398, XP002303442 el documento completo	1-5, 8, 9, 13-17, 20
X	KLASEN S. Y COL.: "Los glucocorticoides inhiben la regulación ascendente inducida por lipopodisacárido de arginasa en macrófagos alveolares de rata" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, Vol. 132, 2001, páginas 1349-1357, XP002303443 el documento completo	1, 2, 5, 13-17, 20
	-/-	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470**C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	MORRIS C. R. Y COL.: "Actividad elevada de arginasa y biodisponibilidad limitada de arginasa: una característica común del asma y la enfermedad de célula falciforme" BLOOD, Vol. 102, No. 11, 16 de Noviembre de 2003 (2003-11-16), página 764A, XP008038019 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology; San Diego, CA, USA; Diciembre 06-09, 2003 el documento completo	
E	WO 2004/073623 A (CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND (US) MORRIS CLAUDIA R) 2 de Septiembre de 2004 (2004-09-02) el documento completo	1-5, 13, 14, 20
A	HAMMERMANN R. Y COL.: "Las proteínas catiónicas inhiben la captación de L-Arginina en macrófagos alveolares de rata y células epiteliales traqueales" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 21, 1999, páginas 155-162, XP002316909 el documento completo	12
A	MEURS H. Y COL.: "Deficiencia de óxido nítrico en la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por poli-cación" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, Vol. 126, 1999, páginas 559-562, XP002316910 el documento completo	12
A	SHAHANA S. Y COL.: "Efectos de la proteína catiónica poli-L-arginina sobre las células epiteliales de las vías respiratorias in vitro" MEDIATORS OF INFLAMMATION, Vol. 11, 2002, páginas 141-148, XP008042773 el documento completo	12
A	JONES H. Y COL.: "Una comparación de las respuestas cutáneas inducidas por alérgeno y policación en el conejo" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, Vol. 133, 2001, páginas 1181-1189, XP008042783 el documento completo	12

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
 Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
 PCT/US2004/006470

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes			Fecha de publicación
WO 03073990 A	12-09-2003	AU	2003213633	A1	16-09-2003
		CA	2477400	A1	12-09-2003
		WO	03073990	A2	12-09-2003
		US	2003166562	A1	04-09-2003
WO 03078578 A	25-09-2003	AU	2003218099	A1	29-09-2003
		WO	03078578	A2	25-09-2003
		US	2004057926	A1	25-03-2004
WO 0044766 A	03-08-2000	US	6784163	B1	31-08-2004
		AU	2739400	A	18-08-2000
		WO	0044766	A1	03-08-2000
WO 2004073623 A	02-09-2004	WO	2004073623	A2	02-09-2004

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 031896-29001	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/006470	International filing date (day/month/year) 04/03/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year)
Applicant WYETH		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 10 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/006470

19

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/006470

20

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
**5, 6, 9, 10, 12, 17 all totally; 1-4, 8, 13-16, 20 all partially
insofar as these claims relate to inventions listed under 1 (1.1 and 1.2) and 3 in Form PCT/ISA/206 (extra sheet)**
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Continuation of Box II.1**

Although claims 1-6, 8-10 and 12-14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 15-17 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 5, 9, 18, 19 all totally; 1-4, 8, 13-17, 20 all partially

- 1.1. claims: 5, 9 all totally; 1-4, 8, 13-17, 20 all partially

A method comprising administering a therapeutically effective amount of an agent to a mammal which has an allergic or inflammatory (respiratory) disease, wherein said agent inhibits an activity or expression (by RNA interference or antisense mechanism) of a component of an arginine metabolic pathway in a tissue affected by the disease, and said component is arginase.

A method for identifying an agent, as claimed in claim 15, insofar as the component is arginase.

Pharmaceutical composition related thereto.

- 1.2. claims: 18, 19 all totally

A method as claimed in claims 18 and 19.

2. claims: 1, 2, 11, 20 all partially

A method comprising administering a therapeutically effective amount of an agent to a mammal which has an allergic or inflammatory (respiratory) disease, wherein said agent is alpha-difluoromethylornithine and inhibits an activity of a component of an arginine metabolic pathway in a tissue affected by the disease, said component being arginase.

Pharmaceutical composition related thereto.

3. claims: 6, 10, 12 all totally; 1-4, 8, 13-17, 20 all partially

A method comprising administering a therapeutically effective amount of an agent to a mammal which has an allergic or inflammatory (respiratory) disease, wherein said agent inhibits an activity or expression of a component of an arginine metabolic pathway in a tissue affected by the disease, and said component is a cationic amino acid transporter.

A method for identifying an agent, as claimed in claim 15, insofar as the component is a cationic amino acid transporter.

Pharmaceutical composition related thereto.

4. claims: 7 totally; 1-4, 8, 11, 13-16, 20 all partially

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method comprising administering a therapeutically effective amount of an agent to a mammal which has an allergic or inflammatory (respiratory) disease, wherein said agent inhibits an activity or expression of a component of an arginine metabolic pathway in a tissue affected by the disease, and said component is downstream of an arginase in the pathway.

A method for identifying an agent, as claimed in claim 15, insofar as the component is other than arginase and a cationic amino acid transporter.

Pharmaceutical composition related thereto.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

24

national Application No
PCT/US2004/006470

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 A61K31/198 A61K31/7088 A61K49/00 C12Q1/68
A61P11/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K C12Q A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/073990 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER (US) ROTHENBERG MARC ZIMMERMANN NIV) 12 September 2003 (2003-09-12)	1-6, 8-10, 13-20
Y	page 3, paragraph 13-17 - page 4 page 22, paragraph 65 page 23, paragraph 67 page 24 - page 25 page 30, paragraph 100	2-4, 6, 8, 10, 12, 14
X	WO 03/078578 A (LSU MEDICAL CENTER (US); OCHOA A.C; OCHOA J.B; POPESCU; ZEA; RODRIGUEZ) 25 September 2003 (2003-09-25)	1-6, 8-10, 13-17, 20
Y	page 2 page 16 page 21 the whole document	3
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 2005

Date of mailing of the international search report

04 03 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

26

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MEURS H. ET AL.: "Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, vol. 24, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 450-455, XP004454445 AMSTERDAM, NL ISSN: 0165-6147	1-5,8,9, 13-17,20
Y	the whole document	3
X	WO 00/44766 A (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION (US); MACLEOD CAROL L.) 3 August 2000 (2000-08-03) cited in the application	1,13,20
Y	the whole document	2-4,6,8, 10,14
Y	SCHNORR O. ET AL.: "The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 120, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 1016-1022, XP002316908	12
X	the whole document	
X	ZIMMERMANN N. ET AL.: "Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis" THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 111, no. 12, June 2003 (2003-06), pages 1863-1874, XP002303441	1-6, 13-20
X	the whole document	
X	MEURS H. ET AL.: "Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 136, 2002, pages 391-398, XP002303442	1-5,8,9, 13-17,20
X	the whole document	
X	KLASEN S. ET AL.: "Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 132, 2001, pages 1349-1357, XP002303443	1,2,5, 13-17,20
	the whole document	
	----- -/--	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORRIS C.R. ET AL.: "Elevated arginase activity and limited arginine bioavailability: a common feature of asthma and sickle cell disease" BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 764A, XP008038019 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology; san Diego, CA, USA; December 06-09, 2003 the whole document	
E	WO 2004/073623 A (CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND (US) MORRIS CLAUDIA R) 2 September 2004 (2004-09-02) the whole document	1-5,13, 14,20
A	HAMMERMAN R. ET AL.: "Cationic proteins inhibit L-Arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 21, 1999, pages 155-162, XP002316909 the whole document	12
A	MEURS H. ET AL.: "Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 126, 1999, pages 559-562, XP002316910 the whole document	12
A	SHAHANA S. ET AL.: "Effects of the cationic protein poly-L-arginine on airway epithelial cells in vitro" MEDIATORS OF INFLAMMATION, vol. 11, 2002, pages 141-148, XP008042773 the whole document	12
A	JONES H. ET AL.: "A comparison of allergen and polycation induced cutaneous responses in the rabbit" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 133, 2001, pages 1181-1189, XP008042783 the whole document	12

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

page 3 of 3

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/US2004/006470

26

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORRIS C.R. ET AL.: "Elevated arginase activity and limited arginine bioavailability: a common feature of asthma and sickle cell disease" BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 764A, XP008038019 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology; san Diego, CA, USA; December 06-09, 2003 the whole document	
E	WO 2004/073623 A (CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND (US) MORRIS CLAUDIA R) 2 September 2004 (2004-09-02) the whole document	1-5,13, 14,20
A	HAMMERMANN R. ET AL.: "Cationic proteins inhibit L-Arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 21, 1999, pages 155-162, XP002316909 the whole document	12
A	MEURS H. ET AL.: "Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 126, 1999, pages 559-562, XP002316910 the whole document	12
A	SHAHANA S. ET AL.: "Effects of the cationic protein poly-L-arginine on airway epithelial cells in vitro" MEDIATORS OF INFLAMMATION, vol. 11, 2002, pages 141-148, XP008042773 the whole document	12
A	JONES H. ET AL.: "A comparison of allergen and polycation induced cutaneous responses in the rabbit" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 133, 2001, pages 1181-1189, XP008042783 the whole document	12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

b. Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/006470

27

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 03073990	A	12-09-2003	AU	2003213633 A1		16-09-2003
			CA	2477400 A1		12-09-2003
			WO	03073990 A2		12-09-2003
			US	2003166562 A1		04-09-2003
WO 03078578	A	25-09-2003	AU	2003218099 A1		29-09-2003
			WO	03078578 A2		25-09-2003
			US	2004057926 A1		25-03-2004
WO 0044766	A	03-08-2000	US	6784163 B1		31-08-2004
			AU	2739400 A		18-08-2000
			WO	0044766 A1		03-08-2000
WO 2004073623	A	02-09-2004	WO	2004073623 A2		02-09-2004

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional(43) Fecha de Publicación Internacional
13 de Enero de 2005 (13.01.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/003164 A3(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/11,
A61K 31/198, 31/7088, 49/00, C12Q 1/68, A61P 11/06

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2004/006470

(22) Fecha de Registro Internacional: 4 de Marzo de 2004
(04.03.2004)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
60/451,396 4 de Marzo de 2003 (04.03.2003) US
60/475,870 5 de Junio de 2003 (05.06.2003) US

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): WYETH [US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): BOWMAN, Michael, R. [US/US]; 63 Gloucester Road, Westwood, MA 02090 (US). ELLIS, Debra [US/US]; 1266 Pawtucket Boulevard, Lowell, MA 01854 (US). FOLLETTIE, Maximillian, T. [US/US]; 12 Greensbrook Way, Belmont, WA 02478 (US). WINKLER, Aaron [US/US]; 151 Mary Street, Arlington, MA 02474 (US). WILLIAMS, Cara [US/US]; 11 Observatory Road, Methuen, MA 01844 (US). CHEN, Heng [US/US]; 129 North Street, #8, Newton, MA 02460 (US). LIU, Wei; 73 Blackmer Road, Sudbury, MA 01776 (US).

(74) Agente: VANDYKE, Raymond; Nixon Peabody LLP, 401 9th Street N.W., Washington, DC 20004 (US).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:

12 de Mayo de 2005

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR EL ASMA U OTRAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS O INFLAMATORIAS

(57) Resumen: La presente invención proporciona las composiciones y métodos útiles para detectar o tratar el asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias. En un aspecto, los métodos de la presente invención incluyen la inhibición de la actividad o expresión de un componente de una vía metabólica de la arginina en tejidos afectados por el asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias. En muchas modalidades, el componente que es inhibido es un transportador de aminoácido catiónico, una arginasa o un componente corriente abajo de la vía de la arginasa. En muchas otras modalidades, la actividad o expresión del componente es inhibida por un agente que se enlaza al componente. En otras muchas modalidades, la actividad o expresión del componente es inhibida por un agente que se enlaza a un polinucleótido que codifica para el componente.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 January 2005 (13.01.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/003164 A3

(51) International Patent Classification²: C12N 15/11,
A61K 31/198, 31/7088, 49/00, C12Q 1/68, A61P 11/06

(21) International Application Number:
PCT/US2004/006470

(22) International Filing Date: 4 March 2004 (04.03.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60451,396 4 March 2003 (04.03.2003) US
60475,870 5 June 2003 (05.06.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BOWMAN,
Michael, R. [US/US]; 63 Gloucester Road, Westwood,
MA 02090 (US). ELLIS, Debra [US/US]; 1266 Paw-
tucket Boulevard, Lowell, MA 01854 (US). FOLLETTIE,
Maximilian, T. [US/US]; 12 Greensbrook Way, Belmont,
MA 02478 (US). WINKLER, Aaron [US/US]; 151 Mary
Street, Arlington, MA 02474 (US). WILLIAMS, Cara
[US/US]; 11 Observatory Road, Methuen, MA 01844
(US). CHEN, Heng [US/US]; 129 North Street, #8,
Newton, MA 02460 (US). LIU, Wei; 73 Blackmer Road,
Sudbury, MA 01776 (US).

(74) Agent: VAN DYKE, Raymond; Nixon Peabody LLP, 401
9th Street N.W., Washington, DC 20004 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Burmian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Euro-
pean (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
12 May 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR DIAGNOSING AND TREATING ASTHMA OR OTHER ALLERGIC OR
INFLAMMATORY DISEASES

(57) Abstract: The present invention provides compositions and methods useful for detecting or treating asthma or other allergic
or inflammatory diseases. In one aspect, the methods of the present invention include inhibiting the activity or expression of a
component of an arginine metabolic pathway in tissues affected by asthma or other allergic or inflammatory diseases. In many
embodiments, the component being inhibited is a cationic amino acid transporter, an arginase, or a component downstream of the
argase. In many other embodiments, the activity or expression of the component is inhibited by an agent that binds to the component.
In still many other embodiments, the activity or expression of the component is inhibited by an agent that binds a polynucleotide
encoding the component.

WO 2005/003164 A3

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO DE UN CAMBIO

(Regla 92bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:

VAN DYKE, Raymond
Nixon Peabody LLP
401 9th Street N.W.
Washington, DC 20004
Estados Unidos de América

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
25 de Enero de 2005 (25.01.2005)

Archivo de referencia del solicitante o agente
031896-29001

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470

Fecha de registro internacional (día/mes/año)
4 de Marzo de 2004 (04.03.2004)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección

BOWMAN, Michael, R.
VAN DYKE, Raymond
ELLIS, Debra
FOLLETTIE, Maximillian, T.

País de Nacionalidad

País de Residencia

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☐ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección

País de Nacionalidad

País de Residencia

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

Las personas identificadas en la Casilla 1 han sido registradas ahora como solicitantes para los Estados Unidos de América solamente e inventores para todos los Estados designados.

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☒ las Oficinas designadas relacionadas
☒ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☐ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímil No. (41-22) 338.89.75

Funcionario autorizado
Margret GODBERSEN (Fax 338 8976)

Teléfono No. (41-22) 338 9328

PATENT COOPERATION TREATY

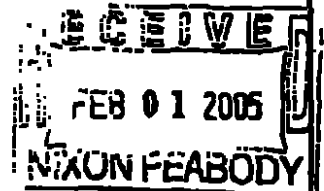
PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

VAN DYKE, Raymond
Nixon Peabody LLP
401 9th Street N.W.
Washington, DC 20004
United States of America



Date of mailing (day/month/year)

25 January 2005 (25.01.2005)

Applicant's or agent's file reference

031896-29001

International application No.

PCT/US2004/006470

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

04 March 2004 (04.03.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

BOWMAN, Michael, R.
VAN DYKE, Raymond
ELLIS, Debra
FOLLETTIE, Maximillian, T.

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The persons identified in Box 1 have now been recorded as applicants for the United States
of America only and inventors for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the designated Offices concerned



the International Searching Authority



the elected Offices concerned



the International Preliminary Examining Authority



other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.88.75

Authorized officer

Margret GODBERSEN (Fax 338 897 5)

Telephone No. (41-22) 338 9328

Form PCT/IB/306 (March 1994)

006577989

30-AUG-2005 18:39

9736607973

P.02

23

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

**NOTIFICACION DEL REGISTRO
DE UN CAMBIO**

(Regla 92bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:

VAN DYKE, Raymond
Nixon Peabody LLP
401 9th Street N.W.
Washington, DC 20004
Estados Unidos de América

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
25 de Enero de 2005 (25.01.2005)

Archivo de referencia del solicitante o agente
031896-29001

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470

Fecha de registro internacional (día/mes/año)
4 de Marzo de 2004 (04.03.2004)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección

WINKLER, Aaron
WILLIAMS, Cara
CHEN, Heng
LIU, Wei

País de Nacionalidad

País de Residencia

No. Teléfono

No. Facsímil

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☐ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección

País de Nacionalidad

País de Residencia

No. Teléfono

No. Facsímil

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

Las personas identificadas en la Casilla 1 han sido registradas ahora como solicitantes para los Estados Unidos de América solamente e Inventores para todos los Estados designados.

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☒ las Oficinas designadas relacionadas
☒ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☐ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímil No. (41-22) 338.89.75

Funcionario autorizado

Margret GODBERSEN (Fax 338 8976)

Teléfono No. (41-22) 338 9328

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

VAN DYKE, Raymond
Nixon Peabody LLP
401 9th Street N.W.
Washington, DC 20004
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 25 January 2005 (25.01.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 031896-29001	
International application No. PCT/US2004/006470	International filing date (day/month/year) 04 March 2004 (04.03.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent ☐ the common representative
Name and Address WINKLER, Aaron WILLIAMS, Cara CHEN, Heng LIU, Wei	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: The persons identified in Box 1 have now been recorded as applicants for the United States of America only and inventors for all designated States.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned	
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.89.75	Authorized officer Margret GODBERSEN (Fax 338 8975) Telephone No. (41-22) 338 8328
--	--

Form PCTAB/306 (March 1994)

006577983

TOTAL P.03

P.03

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220		PCT OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)																									
		Fecha de correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)																									
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación																									
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/006470	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 04.03.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año)																									
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C12N15/11, A61K31/198, A61K31/7088, A61K49/00, C12Q1/68, A61P11/06																											
Solicitante WYETH																											
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table border="0"> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. I</td> <td>Bases de la opinión</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table> 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.				☒	Casilla No. I	Bases de la opinión	☒	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☒	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☒	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☒	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases de la opinión																									
☒	Casilla No. II	Prioridad																									
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																									
☒	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																									
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación																									
☒	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																									
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																									
☒	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																									
Nombre y dirección de correo de la ISA: Oficina Europea de Patentes - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Funcionario Autorizado Macchia, G Teléfono No. +31 70 340-4078																									

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.

☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
 - a. tipo de material:

☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:

☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:

☒ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470

Casilla No. II Prioridad

1. ☐ El siguiente documento no se ha presentado:

☐ copia de la solicitud anterior cuya prioridad se ha reivindicado (Regla 43bis.1 y 66.7(a)).

☐ traducción de la solicitud anterior cuya prioridad se ha reivindicado (Regla 43bis.1 y 66.7(b)).

Por consiguiente, no ha sido posible considerar la validez de la reivindicación de prioridad. Sin embargo, se ha establecido esta opinión sobre el supuesto de que la fecha relevante es la fecha de la prioridad reivindicada.

2. ☐ Se ha establecido esta opinión como si no se hubiese reivindicado ninguna prioridad debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de prioridad es inválida (Reglas 43bis.1 y 64.1). Por consiguiente, para los fines de esta opinión, se considera que la fecha de registro internacional indicada anteriormente es la fecha relevante.

3. ☒ No ha sido posible considerar la validez de la prioridad reivindicada porque una copia del documento de prioridad no estaba disponible para el ISA en el momento en que se condujo la búsqueda (Regla 17.1). Esta opinión, sin embargo, ha sido establecida sobre la suposición de que la fecha relevante es la fecha de prioridad reivindicada.

4. Observaciones adicionales, si es necesario:

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1-17, 20

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 1-6, 8-10, 12-17, con respecto a aplicabilidad industrial, se refieren a la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

- ☒ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos. 1-6, 13-17, 20 todas parcialmente son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):

ver hoja separada

- ☒ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. 1-6, 13-17, 20 todas parcialmente son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.

- ☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos. 1-6, 13-17, 20 todas parcialmente (ver punto III.2); 1-4, 7, 8, 11, 13-16, 20, en cuanto a que se refieren a las invenciones 2 y 4 como se listan en la forma PCT/ISA/206

- ☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita

☐ no se ha proporcionado

☐ no cumple con el estándar

el formato legible por computador

☐ no se ha proporcionado

☐ no cumple con el estándar

- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

- ☐ Ver la hoja separada para más detalles

Casilla No. IV Falta de unidad de invención

1. ☒ En respuesta a la invitación (Forma PCT/ISA/206) para pagar derechos adicionales, el solicitante ha:
- ☒ pagado derechos adicionales.
 - ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta.
 - ☐ no pagado derechos adicionales.
2. ☐ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se ha cumplido con y escogió no invitar al solicitante a pagar derechos adicionales.
3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es
- ☐ se ha cumplido.
 - ☒ no se ha cumplido por las siguientes razones:
ver hoja separada
4. Por consiguiente, este reporte ha sido establecido con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional:
- ☐ todas las partes.
 - ☒ las partes que se relacionan con las reivindicaciones Nos. 5, 6, 9, 10, 12, 18, 19 todas totalmente; 1-4, 8, 13-17, 20 todas parcialmente, en cuanto a que estas reivindicaciones se refieren a las invenciones 1.1, 1.2 y 3, como se listan en la forma PCT/ISA/206

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración
- | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| Novedad (N) | Si: Reivindicaciones 9, 10, 12 |
| | No: Reivindicaciones 1-6, 8, 13-20 |
| Nivel Inventivo (IS) | Si: Reivindicaciones |
| | No: Reivindicaciones 1-6, 8-10, 12-20 |
| Aplicabilidad Industrial (IA) | Si: Reivindicaciones 20 |
| | No: Reivindicaciones |
2. Citaciones y explicaciones
- ver hoja separada

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

**Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/006470**

Casilla No. VI Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Reglas 43bis.1 y 70.10)
y/o
2. Revelaciones no escritas (Reglas 43bis.1 y 70.9)
ver forma 210

Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, descripción, y dibujos o sobre la pregunta de si las reivindicaciones están completamente soportadas por la descripción, son hechas:

ver hoja separada

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: MEURS H. et al.: "Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness" **TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES**, vol. 24, no. 9, 2003, páginas 450-455;
- D2: MEURS H. et al.: "Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness" **BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, vol. 136, 2002, páginas 391-398;
- D3: ZIMMERMANN N. et al.: "Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis" **THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION**, vol. 111, no. 12, Junio 2003, páginas 1863-1874;
- D4: KLASSEN S. et al.: "Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages" **BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, vol. 132, 2001, páginas 1349-1357;
- D5: WO 03/073990 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER (US) ROTHENBERG M.; ZIMMERMANN N.) 12 Septiembre 2003;
- D6: WO 03/078578 A (LSU MEDICAL CENTER (US); OCHOA A.C.; OCHOA J.B.; POPESCU M.; ZEA A.H.; RODRÍGUEZ P.C.) 25 Septiembre 2003;
- D7: WO 00/44766 A (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION (US); MACLEOD Carol L.) 3 Agosto 2000;
- D8: SCHNORR O. et al.: "The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin" **JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY**, vol. 120, no. 6, Junio 2003, páginas 1016-1022;
- D9: HAMMERMANN R. et al.: "Cationic proteins inhibit L-Arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells" **AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY**, vol. 21, 1999, páginas 155-162;
- D10: MEURS H. et al.: "Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity" **BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, vol. 126, 1999, páginas 559-562;
- D11: SHAHANA S. et al.: "Effects of the cationic protein poly-L-arginine on airway epithelial cells *in vitro*" **MEDIATORS OF INFLAMMATION**, vol. 11, 2002, páginas 141-148;
- D12: JONES H. et al.: "A comparison of allergen and polycation induced cutaneous responses in the rabbit" **BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, vol. 133, 2001, páginas 1181-1189.

Re Item III

No establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

III.1). Las reivindicaciones 1-6, 8-10 y 12-17 se refieren a la materia de interés considerada por esta Autoridad como cubierta por las provisiones de la Regla 67.1(iv) del PCT. En consecuencia, no será formulada ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia de interés de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT).

III.2). La actual reivindicación 1 se refiere a un método que involucra un agente definido por referencia a una característica o propiedad deseada, a saber que inhibe una actividad de expresión de un componente (arginasa o transportador de aminoácido catiónico) de una vía metabólica de la arginina en un tejido afectado por una enfermedad alérgica o inflamatoria, el componente no es una sintasa de óxido nítrico.

Las reivindicaciones 2, 3 y 13, como se anexan a la reivindicación 1, caracterizan además la o las enfermedades involucradas en la reivindicación 1 y el mamífero en cuestión, respectivamente.

Las reivindicaciones 4, 14 y 15 especifican una característica deseable adicional o propiedad para dicho agente: la capacidad para enlazarse al componente (arginasa o transportador de aminoácido catiónico) o al polinucleótido que codifica para el componente (arginasa o transportador de aminoácido catiónico).

Las reivindicaciones 5 y 6 como se anexan a la reivindicación 4, caracterizan además el componente.

La reivindicación 16, como se anexa a la reivindicación 15, intenta definir además una gente en términos de un método para su selección, clasificación o producción.

La reivindicación 17, como se anexa a la reivindicación 15, caracteriza adicionalmente al componente.

La reivindicación 20 se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente definido por referencia a una característica o propiedad deseable, a saber que es capaz de inhibir una actividad o expresión de un componente no NOS (arginasa o transportador de aminoácido catiónico) de una vía metabólica de la arginina.

Las reivindicaciones cubren todos los agentes que tienen estas características o propiedades, mientras que la solicitud proporciona apoyo dentro del significado del Artículo 6 del PCT y/o la descripción dentro del significado del Artículo 5 del PCT únicamente para un número muy limitado de tales agentes (ver partes relevantes en la descripción).

En el presente caso, las reivindicaciones carecen así de apoyo, y la solicitud carece de descripción, de modo que es imposible una búsqueda significativa y la opinión sobre la totalidad del alcance reclamado.

Independientemente del razonamiento anterior, las reivindicaciones 1-6, 13-17 y 20 también carecen de claridad (Artículo 6 del PCT). Se realiza un intento para definir un agente por referencia a un resultado que va a ser logrado y, para la reivindicación 16, por referencia a un método de selección, clasificación o producción.

Nuevamente, esta falta de claridad en el presente caso es tal como para hacer posible una búsqueda significativa sobre la totalidad del alcance reclamado.

En consecuencia, la búsqueda y la presente opinión ha sido restringida a aquellas partes de las reivindicaciones que parecen ser al menos en parte claras, apoyadas y descritas, a saber aquellas partes relacionadas a las moléculas antisentido, siARNs y anticuerpos.

III.3). El Solicitante ha pagado los derechos de búsqueda adicionales requeridos, únicamente para la tercera invención, como se lista en la forma PCT/ISA/206.

Por lo tanto, no ha sido establecido ningún Reporte de Búsqueda Internacional para la materia de interés relacionada a las invenciones 2 y 4 como se listan en la forma PCT/ISA/206.

En consecuencia, no es establecida ninguna opinión para la materia de interés relacionada a la invención diferente de las invenciones 1.1, 1.2 y 3.

Re Item IV

Falta de unidad de invención

IV.1). El concepto común subyacente a las invenciones descritas en la presente solicitud, es que los componentes de la vía metabólica de la arginina estén involucrados en la patogénesis de las enfermedades alérgicas e inflamatorias (respiratorias), tales como el asma. Este concepto común no es novedoso (Regla 13.1 del PCT).

Los documentos D1 y D2 describen un papel para la arginasa en la patofisiología del asma. Ambos documentos sugieren la aplicación de los inhibidores de arginasa selectivos en la terapia del asma (D1: ver en particular página 452 y las notas concluyentes. D2: ver en particular la discusión).

Los documentos D3 y D5 identifican la arginasa I, la arginasa II y el transportador 2 de aminoácido catiónico, como particularmente prominentes entre los genes de firma del asma. Los autores concluyen que *estos resultados proporcionan una base para dirigirse farmacológicamente al metabolismo de la arginina en trastornos alérgicos* (D3 y D5: extracto y pasajes relevantes a todo lo largo de los documentos completos). D5 describe también el uso de los compuestos antisentido de la arginasa en la terapia del asma (D5: página 22).

El documento D4 describe que la arginasa puede jugar un papel en la hiperrespuesta de las vías respiratorias y que *los glucocorticoides inhiben la supra-regulación inducida por LPS de la actividad de la arginasa, un efecto que puede contribuir a los efectos benéficos de los glucocorticoides en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias* (D4: extracto y pasajes relevantes a todo lo largo del artículo completo).

El documento D6 describe el uso de las moléculas antisentido de arginasa en la terapia de las enfermedades pulmonares tales como COPD (D6: páginas 2 y 21).

IV.2). A la luz de esta técnica anterior, el problema subyacente a la presente solicitud es la provisión de objetivos (adicionales), con el fin de derivar los inhibidores para terapia. Las soluciones, como se describen y se reclaman en la presente solicitud, pueden ser resumidas como la provisión de tres (grupos de) objetivos (por ejemplo, arginasa, transportador de aminoácido catiónico, componente(s) corriente abajo de una arginasa en la vía metabólica de la arginina) e inhibidores relacionados a éste.

Respecto a la arginasa, a la luz de la técnica anterior disponible, la característica técnica especial, dentro del significado de la Regla 13.2 del PCT, de cada uno de los componentes que se dirigen a la arginasa es la naturaleza del "componente" mismo.

Los componentes que actúan por interferencia del ARN, el mecanismo antisentido y los anticuerpos, fueron no obstante agrupados conjuntamente, a favor del Solicitante.

IV.3). Debido al hecho de que era ya conocido que los componentes de la vía metabólica de la arginina estaban involucrados en la patogénesis de enfermedades alérgicas e inflamatorias (respiratorias), tales como el asma, debido a la diferencia en las estructuras primarias de los "componentes", que no son compartidas entre las invenciones, debido a la diferencia en la estructura y la naturaleza de los agentes reclamados, y debido al hecho de que ninguna otra característica técnica puede ser distinguida la cual, a la luz de la técnica anterior, podría ser considerada como especial, la característica técnica común, el ISA es de la opinión de que no existe concepto inventivo único subyacente a la pluralidad de invenciones reclamadas de la presente solicitud, en el sentido de la Regla 13.2 del PCT.

Re Item V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración

- V.1). Los documentos D1 y D2 describen un papel para la arginasa en la patofisiología del asma. Ambos documentos sugieren la aplicación de los inhibidores de arginasa selectivos, tales como nor-NOHA en la terapia del asma (D1: ver en particular páginas 452-453 y las notas concluyentes; D2: ver en particular la discusión).

El documento D1 establece en la página 453 que *el incremento en la expresión y la actividad de la arginasa...puede estar involucrado en la remodelación de las vías respiratorias inducidas por la inflamación, en el asma crónico...* Además de esto, D1 establece en la página 452 que *la poli-L-arginina inhibe la captación celular de la L-arginina por los transportadores de aminoácidos catiónicos específicos.*

El documento D2 describe también un método para probar la actividad de un inhibidor de arginasa específico (nor-NOHA) en un modelo de cobayo de asma alérgico (D2: ver pasajes relevantes a todo lo largo del documento completo).

- V.2). Los documentos D3 y D5 identifican, a través de análisis de microarreglo de ADN, la arginasa I, la arginasa II y el transportador 2 de aminoácido catiónico, particularmente prominentes entre los genes de firma del asma. Los autores concluyen que *estos resultados proporcionan una base para dirigirse farmacológicamente al metabolismo de la arginina en trastornos alérgicos* (D3 y D5: extracto y pasajes relevantes a todo lo largo de los documentos completos). D5 describe también el uso de la arginasa y los compuestos antisentido de CAT2 en la terapia del asma (D5: páginas 22 y 30).

- V.3). El documento D6 describe el uso de las moléculas antisentido de la arginasa y de los inhibidores de CAT2 en la terapia de las enfermedades pulmonares tales como COPD (D6: páginas 2, 16 y 21).

- V.4). La materia de interés de las reivindicaciones 1-6, 8 y 13-20 es por lo tanto no novedosa (Artículo 33(2) del PCT; ver también las notas bajo el inciso VIII.1).

- V.5). Las reivindicaciones 4-6 (en cuanto a que éstas se refieren a un método que involucra un agente capaz de enlazarse a la arginasa o a un transportador de aminoácido catiónico), 8 (en cuanto a que ésta se refiere a un método que involucra un agente que inhibe la expresión de la arginasa o de un transportador de aminoácido catiónico por interferencia del ARN), 9, 10, 12 y 14-17 (en cuanto a que se refieren a un método que involucra un agente capaz de enlazarse a la arginasa o a un transportador de aminoácido catiónico) cumplen los requerimientos del Artículo 33(2) del PCT debido a que su materia de interés no fue descrita en la técnica anterior disponible.
- V.6). Ambos documentos D5 y D6 pueden ser considerados como representantes del estado más relevante de la técnica. Estos documentos describen un papel para la arginasa y del transportador 2 de aminoácidos catiónicos en la patofisiología del asma y otras enfermedades pulmonares tales como COPD, como ya se comentó bajo los puntos previos V.2) y V.3), de los cuales difiere la materia de interés de las reivindicaciones 4-6, 8-10, 12 y 14-17, en que un agente capaz de enlazarse al componente (arginasa o transportador de aminoácido catiónico), las moléculas de siARNs, lisina o los polipéptidos catiónicos, son utilizados en los métodos discutidos en estas reivindicaciones.

El problema que va a ser resuelto por la presente invención puede ser por lo tanto considerado como la provisión de inhibidores de arginasa selectivos o del transportador de aminoácido catiónico y los métodos relacionados para su identificación.

La solución propuesta en las reivindicaciones 4-6, 8-10, 12 y 14-17 de la presente solicitud no puede ser considerada como poseedora de una nivel inventivo (Artículo 33(3) del PCT) por las siguientes razones: la sugerencia de los documentos D5 y D6 podría ser tomada por la persona experta en la técnica como un incentivo para identificar inhibidores específicos adicionales. A este respecto, se debe notar que el uso de las moléculas de siARN o de anticuerpos específicos para bloquear la actividad de un polipéptido/enzima es bien conocido por la persona de experiencia en la técnica, y bien establecido en el campo técnico.

Como un asunto de hecho, el documento D7 describe los métodos para inhibir el transporte de aminoácido catiónico por medio de la tecnología antisentido y anticuerpos específicos para el transportador de CAT2, aplicado a la terapia del cáncer y otras enfermedades. (D7: ver pasajes relevantes a todo lo largo del documento completo).

Podría ser por lo tanto obvio para la persona de experiencia en la técnica, con respecto a las sugerencias indicadas en los documentos D5-D7, y con respecto también al hecho de que un modelo animal de asma alérgico era disponible de D2, para probar las moléculas de siARN o los anticuerpos específicos, con el fin de identificar inhibidores de arginasa específicos, adicionales, o inhibidores adicionales de un transportador de aminoácidos catiónicos.

Al hacer esto, la persona experta en la técnica habría llegado a un resultado que cae dentro del alcance de las reivindicaciones 4-6, 8-10 y 14-17 sin intervención de ninguna habilidad inventiva, con una actitud positiva y con una expectativa razonable de éxito, requiriendo nada extraordinario, siendo todo un asunto de conveniencia técnica.

V.7). Además de esto, debe remarcarse que es conocido de la técnica anterior que la lisina es un inhibidor o transportador 2 de aminoácidos catiónicos, como a partir del documento D8 (D8: extracto y pasajes relevantes a todo lo largo del documento completo).

Sería por lo tanto obvio, a saber cuando va a ser logrado el mismo resultado, el probar la lisina como un agente terapéutico para enfermedades donde va a ser inhibida la actividad de un transportador de aminoácidos catiónicos, o a partir de la enseñanza de D5 o D6, llegando de este modo a un resultado que cae dentro del alcance de la reivindicación 12.

V.8). La misma nota puede aplicar, en principio, también para la materia de interés de la reivindicación 12, concerniente a un método que involucra un polipeptido catiónico. Se sabe de la técnica anterior que la poli-L-arginina es un inhibidor de un transportador de aminoácido catiónico, como a partir del documento D1 (D1: página 452) y D9 (D9: ver pasajes relevantes a todo lo largo del documento completo).

No obstante, a partir de la enseñanza de los documentos D10-D12, parece que el tratamiento con poli-L-arginina induce la hiper-reactividad de las vías respiratorias, o las respuestas inflamatorias (D10-D12: ver pasajes relevantes a todo lo largo del documento completo).

Esta inconsistencia entre el efecto descrito y reclamado en la presente solicitud, y aquel descrito en D10-D12, conduce a dudas de si los polipéptidos catiónicos podrían en verdad resolver o no el problema técnico establecido.

Si los polipéptidos catiónicos fallan en verdad en resolver el problema técnico establecido, no podría ser reconocido ningún nivel inventivo para la materia de interés de la reivindicación 12 (Artículo 33(3) del PCT).

V.9). La materia de interés de las reivindicaciones 4-6, 8-10, 12 y 14-17 no involucra por lo tanto ningún nivel inventivo (Artículo 33(3) del PCT).

V.10). La posibilidad de aplicabilidad industrial de las reivindicaciones 18-20 es reconocida (Artículo 33(4) del PCT).

V.11). Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 1-6, 8-10 y 12-14 sobre la cuestión de si éstas son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad puede también ser dependiente de la formulación de las reivindicaciones. El EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia de interés de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, no obstante, las reivindicaciones para un compuesto conocido para el primer uso en el tratamiento médico, y el uso de tal compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Re Item VI
Ciertos documentos citados

Ciertos documentos publicados

Solicitud No.	Fecha de	Fecha de	Fecha de prioridad
Patente No.	publicación	presentación	(reivindicación válida)
	(día/mes/año)	(día/mes/año)	(día/mes/año)
WO 2004/073623	2 Septiembre 2004	13 Febrero 2004	14 Febrero 2003

Re Item VIII
Ciertas observaciones en la solicitud internacional

VIII.1). La presente reivindicación 1 se refiere a un método que involucra un agente definido por referencia a una característica o propiedad deseable, a saber que éste inhibe una actividad o expresión de un componente (arginasa o transportador de aminoácido catiónico) de una vía metabólica de la arginina en un tejido afectado por una enfermedad alérgica o inflamatoria, dicho componente no es una sintasa del óxido nítrico.

Las reivindicaciones 2, 3 y 13, como se anexan a la reivindicación 1, caracterizan además la o las enfermedades mencionadas en la reivindicación 1 y el mamífero en cuestión, respectivamente.

Las reivindicaciones 4, 14 y 15 especifican una característica o propiedad deseable adicional para dicho agente: la capacidad para enlazarse al componente (arginasa o transportador de aminoácido catiónico) o al polinucleótido que codifica para el componente (arginasa o transportador de aminoácido catiónico).

Las reivindicaciones 5 y 6, como se anexan a la reivindicación 4, caracterizan además al componente.

La reivindicación 16, como se anexa a la reivindicación 15, intenta definir además un agente en términos de un método para su selección, clasificación o producción.

La reivindicación 17, como se anexa a la reivindicación 15, caracteriza además al componente.

La reivindicación 20 se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente definido por referencia a una característica o propiedad deseable, a saber que es capaz de inhibir una actividad o expresión de un componente no NOS (arginasa o transportador de aminoácido catiónico) de una vía metabólica de la arginina.

Las reivindicaciones cubren todos los agentes que tienen esta característica o propiedad, mientras que la solicitud proporciona apoyo dentro del significado del Artículo 6 del PCT y/o la descripción dentro del significado del Artículo 5 del PCT únicamente para un número muy limitado de tales agentes (anticuerpos, moléculas antisentido y siARN, los agentes mencionados en la página 15 de la presente solicitud).

Por lo tanto, los requerimientos de los Artículos 5 y 6 del PCT no son cumplidos, ya que la materia de interés de las reivindicaciones 1-6, 13-17 y 20 no es suficientemente descrita y apoyada.

Independientemente del razonamiento anterior, las reivindicaciones 1-6, 13-17 y 20 también carecen de claridad (Artículo 6 del PCT). Se realiza un intento para definir un agente por referencia a un resultado que va a ser logrado y, para la reivindicación 16, por referencia a un método de selección, clasificación o producción.

VIII.2) A partir de la enseñanza de los documentos D10-D12, ya discutidos bajo el punto V.8) previo, parece que el tratamiento con poli-L-arginina reduce la hiper-reactividad de las vías respiratorias, o las respuestas inflamatorias (D10-D12: ver pasajes relevantes a todo lo largo del documento completo), en vez de proporcionar un efecto positivo. Esta inconsistencia entre el efecto descrito y reclamado en la presente solicitud, y uno descrito en D10-D12, conduce a dudas respecto a la materia para la cual se busca la protección, haciendo de este modo no clara a la materia de interés de la reivindicación 12 (Artículo 6 del PCT).

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2004/006470

International filing date (day/month/year)
04.03.2004

Priority date (day/month/year)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C12N15/11, A61K31/198, A61K31/7088, A61K49/00, C12Q1/68, A61P11/08

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 56.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Authorized Officer

Macchia, G

Telephone No. +31 70 340-4078



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/US2004/006470

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☒ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/006470

Box No. II Priority

1. ☐ The following document has not been furnished:
 - ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. ☒ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.
4. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/006470

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 1-17, 20

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-6, 8-10, 12-17, with respect to industrial applicability, relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 1-6, 13-17, 20 all partially are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

- ☒ the claims, or said claims Nos. 1-6, 13-17, 20 all partially are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1-6, 13-17, 20 all partially (see point III.2); 1-4, 7, 8, 11, 13-16, 20, insofar as they relate to inventions 2 and 4 as listed in form PCT/ISA206

- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

- ☐ has not been furnished
- ☐ does not comply with the standard

the computer readable form

- ☐ has not been furnished
- ☐ does not comply with the standard

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/006470

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has:
- ☒ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest.
 - ☐ not paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 5, 6, 9, 10, 12, 18, 19 all totally; 1-4, 8, 13-17, 20 all partially, insofar as these claims relate to the inventions 1.1, 1.2 and 3, as listed in form PCT/ISA/206

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	9, 10, 12
	No: Claims	1-6, 8, 13-20
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-6, 8-10, 12-20
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	20
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/006470

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2004/006470

Reference is made to the following documents:

- D1: MEURS H. et al.: " Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness " TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, vol. 24, no. 9, 2003, pages 450-455;
- D2: MEURS H. et al.: " Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness " BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 136, 2002, pages 391-398;
- D3: ZIMMERMANN N. et al.: " Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis " THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 111, no. 12, June 2003, pages 1863-1874;
- D4: KLASSEN S. et al.: " Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages " BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 132, 2001, pages 1349-1357;
- D5: WO 03/073990 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER (US) ROTHENBERG M.; ZIMMERMANN N.) 12 September 2003;
- D6: WO 03/078578 A (LSU MEDICAL CENTER (US); OCHOA A.C.; OCHOA J.B.; POPESCU M.; ZEA A.H.; RODRIGUEZ P.C.) 25 September 2003;
- D7: WO 00/44766 A (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION (US); MACLEOD Carol L.) 3 August 2000;
- D8: SCHNORR O. et al.: " The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin " JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 120, no. 6, June 2003, pages 1016-1022;
- D9: HAMMERMAN R. et al.: " Cationic proteins inhibit L-Arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells " AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 21, 1999, pages 155-162;
- D10: MEURS H. et al.: " Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity " BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 126, 1999, pages 559-562;
- D11: SHAHANA S. et al.: " Effects of the cationic protein poly-L-arginine on airway epithelial cells *in vitro* " MEDIATORS OF INFLAMMATION, vol. 11, 2002, pages 141-148;
- D12: JONES H. et al.: " A comparison of allergen and polycation induced cutaneous responses in the rabbit " BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 133, 2001, pages 1181-1189.

Re Item III**Non-establishment of opinion with regard to novelty, Inventive step and Industrial applicability**

- III.1). Claims 1-6, 8-10 and 12-17 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).
- III.2). Present claim 1 relates to a method involving an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it inhibits an activity or expression of a component (arginase or cationic amino acid transporter) of an arginine metabolic pathway in a tissue affected by an allergic or inflammatory disease, said component not being a nitric oxide synthase.
- Claims 2, 3 and 13, as appended to claim 1, further characterize the disease(s) concerned in claim 1 and the mammal concerned, respectively.
- Claims 4, 14 and 15 specify a further desirable characteristic or property for said agent: the capability to bind to the component (arginase or cationic amino acid transporter) or to the polynucleotide encoding the component (arginase or cationic amino acid transporter).
- Claims 5 and 6, as appended to claim 4, further characterize the component.
- Claim 16, as appended to claim 15, further tries to define an agent in terms of a method for its selection, screening or production.
- Claim 17, as appended to claim 15, further characterize the component.
- Claim 20 relates to a pharmaceutically composition comprising an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it is capable of inhibiting an activity or expression of a non-NOS component (arginase or cationic amino acid transporter) of an arginine metabolic pathway.

The claims cover all agents having these characteristics or properties, whereas

the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents (see relevant parts in the description).

In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search and opinion over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, claims 1-6, 13-17 and 20 also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define an agent by reference to a result to be achieved and, for claim 16, by reference to a method of selection, screening or production.

Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search and present opinion has been restricted to those parts of the claims which appear to be at least in part clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antisense molecules, siRNAs and antibodies.

III.3). The Applicant has paid the required additional search fees only for the third invention, as listed in form PCT/ISA/206.

Therefore, no International Search Report has been established for the subject-matter related to the inventions 2 and 4 as listed in form PCT/ISA/206.

Consequently, no opinion is established for the subject-matter related to the inventions other than inventions 1.1, 1.2 and 3.

Re Item IV

Lack of unity of invention

IV.1). The common concept underlying the inventions disclosed in present application is that components of the arginine metabolic pathway are involved in the pathogenesis of allergic and inflammatory (respiratory) diseases, such as asthma. This common concept is not novel (Rule 13.1 PCT).

Documents D1 and D2 disclose a role for arginase in the pathophysiology of asthma. Both documents suggest application of selective arginase inhibitors in therapy of asthma (D1: see in particular page 452 and the concluding remarks. D2: see in particular the discussion).

Documents D3 and D5 identify arginase I, arginase II and the cationic amino acid transporter 2 as particularly prominent among the asthma signature genes. The authors conclude that *these results provide a basis for pharmacologically targeting arginine metabolism in allergic disorders* (D3 and D5: abstract and relevant passages throughout the entire documents). D5 discloses also the use of arginase antisense compounds in therapy of asthma (D5: page 22).

Document D4 discloses that arginase may play a role in airway hyperresponsiveness and that *glucocorticoids inhibit LPS-induced up-regulation of arginase activity, an effect which may contribute to the beneficial effects of glucocorticoids in the treatment of inflammatory airways diseases* (D4: abstract and relevant passages throughout the entire article).

Document D6 discloses the use of arginase antisense molecules in therapy of pulmonary diseases such as COPD (D6: pages 2 and 21).

IV.2). In the light of this prior art, the problem underlying present application is the

provision of (further) targets, in order to derive inhibitors for therapy. The solutions, as disclosed and claimed in present application, can be summarised as the provision of three (groups of) targets (*i.e.* arginase, cationic amino acid transporter, component(s) downstream of an arginase in the arginine metabolic pathway) and inhibitors related thereto.

Concerning arginase, in the light of the available prior art, the special technical feature, within the meaning of Rule 13.2 PCT, of each of the components targeting arginase is the nature of the " component " itself.

Components acting by RNA interference, antisense mechanism and antibodies were however grouped together, in favour of the Applicant.

IV.3). Due to the fact that it was already known that components of the arginine metabolic pathway were involved in the pathogenesis of allergic and inflammatory (respiratory) diseases, such as asthma, due to the difference in the primary structures of the " components ", which are not shared among the inventions, due to the difference in the structure and nature of the agents claimed, and due to the fact that no other technical feature can be distinguished which, in the light of the prior art, could be regarded as special, common technical feature, the ISA is of the opinion that there is no single inventive concept underlying the plurality of claimed inventions of the present application in the sense of Rule 13.2 PCT.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial

applicability; citations and explanations supporting such statement

- V.1). Documents D1 and D2 disclose a role for arginase in the pathophysiology of asthma. Both documents suggest application of selective arginase inhibitors, such as nor-NOHA, in therapy of asthma (D1: see in particular pages 452-453 and the concluding remarks; D2: see in particular the discussion).

Document D1 states on page 453 that *increase in expression and activity of arginase ... might be involved in inflammation-induced airway remodelling in chronic asthma* In addition to this, D1 states on page 452 that *poly-L-arginine inhibit the cellular uptake of L-arginine by specific cationic amino acid γ transporters*

Document D2 discloses also a method of testing the activity of a specific arginase inhibitor (nor-NOHA) in a guinea-pig model of allergic asthma (D2: see relevant passages throughout the entire document).

- V.2). Documents D3 and D5 identifies, through DNA microarray analysis, arginase I, arginase II and the cationic amino acid transporter 2 as particularly prominent among the asthma signature genes. The authors conclude that *these results provide a basis for pharmacologically targeting arginine metabolism in allergic disorders* (D3 and D5: abstract and relevant passages throughout the entire documents). D5 discloses also the use of arginase and CAT2 antisense compounds in therapy of asthma (D5: pages 22 and 30).

- V.3). Document D6 discloses the use of arginase antisense molecules and of CAT2 inhibitors in therapy of pulmonary diseases such as COPD (D6: pages 2, 16 and 21).

- V.4). The subject-matter of claims 1-6, 8 and 13-20 is therefore not novel

(Article 33(2) PCT; see also the remarks under Item VIII.1).

V.5). Claims 4-6 (insofar as it refers to a method involving an agent capable of binding to arginase or to a cationic amino acid transporter), 8 (insofar as it refers to a method involving an agent inhibiting expression of arginase or of a cationic amino acid transporter by RNA interference), 9, 10, 12 and 14-17 (insofar as they refer to a method involving an agent capable of binding to arginase or to a cationic amino acid transporter) meet the requirements of Article 33(2) PCT because their subject-matter was not disclosed in the available prior art.

V.6). Both documents D5 and D6 can be considered to represent the most relevant state of the art. These documents disclose a role for arginase and of the cationic amino acid transporter 2 in the pathophysiology of asthma and other pulmonary diseases such as COPD, as already commented under previous points V.2) and V.3), from which the subject-matter of claims 4-6, 8-10, 12 and 14-17 differs, in that an agent capable of binding to the component (arginase or cationic amino acid transporter), siRNAs molecules, lysine or cationic polypeptides are used in the methods concerned in these claims.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of further selective arginase or cationic amino acid transporter inhibitors and related methods for their identification.

The solution proposed in claims 4-6, 8-10, 12 and 14-17 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons: the suggestion of documents D5 and D6 would be taken by the person skilled in the art as an incentive to identify further specific inhibitors. In this respect, it should be remarked that the use of siRNA molecules or of specific antibodies to block the activity of a polypeptide/enzyme is well known to the person skilled in the art and well established in the technical field.

As a matter of fact, document D7 discloses methods of inhibiting cationic amino acid transport by means of antisense and antibody technology specific for the CAT2 transporter, applied to the therapy of cancer and other diseases. (D7: see relevant passages throughout the entire document).

It would therefore be obvious to the person skilled in the art, having regard to the suggestions indicated in documents D5-D7, and having regard also to the fact that an animal model of allergic asthma was available as from D2, to test siRNA molecules or specific antibodies in order to identify further specific arginase inhibitors, or further inhibitors of a cationic amino acid transporter.

By doing so, the person skilled in the art would have arrived at a result falling within the scope of claims 4-6, 8-10 and 14-17 without intervention of any inventive skill, with a positive attitude and with a reasonable expectation of success, requiring nothing extraordinary, all being a matter of technical convenience.

V.7). In addition to this, it should be remarked that it is known from the prior art that lysine is an inhibitor of cationic amino acid transporter 2, as from document D8 (D8: abstract and relevant passages throughout the entire document).

It would therefore be obvious, namely when the same result is to be achieved, to test lysine as a therapeutic agent for diseases where the activity of a cationic amino acid transporter is to be inhibited, as from the teaching of D5 or D6, thus arriving at a result falling within the scope of claim 12.

V.8). The same remark might apply, in principle, also to the subject-matter of claim 12 concerning a method involving a cationic polypeptide: it is known from the prior art that poly-L-arginine is an inhibitor of a cationic amino acid transporter, as from document D1 (D1: page 452) and D9 (D9: see relevant passages throughout the

entire document).).

However, from the teaching of documents D10-D12, it seems that treatment with poly-L-arginine induces airway hyperreactivity, or inflammatory responses (D10-D12: see relevant passages throughout the entire document).

This inconsistency between the effect disclosed and claimed in present application, and the one disclosed in D10-D12, leads to doubts whether cationic polypeptides would indeed solve the stated technical problem.

Should cationic polypeptides indeed fail to solve the stated technical problem, no inventive step could be acknowledged for the subject-matter of claim 12 (Article 33(3) PCT).

V.9). The subject-matter of claims 4-6, 8-10, 12 and 14-17 does therefore not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

V.10). The industrial applicability of claims 18-20 is acknowledged (Article 33(4) PCT).

V.11). For the assessment of the present claims 1-6, 8-10 and 12-14 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 2004/073623	2 September 2004	13 February 2004	14 February 2003

Re Item VIII

Certain observations on the international application

VIII.1). Present claim 1 relates to a method involving an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it inhibits an activity or expression of a component (arginase or cationic amino acid transporter) of an arginine metabolic pathway in a tissue affected by an allergic or inflammatory disease, said component not being a nitric oxide synthase.

Claims 2, 3 and 13, as appended to claim 1, further characterize the disease(s) concerned in claim 1 and the mammal concerned, respectively.

Claims 4, 14 and 15 specify a further desirable characteristic or property for said agent: the capability to bind to the component (arginase or cationic amino acid transporter) or to the polynucleotide encoding the component (arginase or cationic amino acid transporter).

Claims 5 and 6, as appended to claim 4, further characterize the component.

Claim 16, as appended to claim 15, further tries to define an agent in terms of a method for its selection, screening or production.

Claim 17, as appended to claim 15, further characterize the component.

Claim 20 relates to a pharmaceutically composition comprising an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it is capable of inhibiting an activity or expression of a non-NOS component (arginase or cationic amino acid transporter) of an arginine metabolic pathway.

The claims cover all agents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents (antibodies, antisense and siRNA molecules, the agents mentioned on page 15 of present application).

Therefore, the requirements of Articles 5 and 6 PCT are not met since the subject-matter of claims 1-6, 13-17 and 20 is not sufficiently disclosed and supported.

Independent of the above reasoning, claims 1-6, 13-17 and 20 also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define an agent by reference to a result to be achieved and, for claim 16, by reference to a method of selection, screening or production.

VIII.2). From the teaching of documents D10-D12, already discussed under previous point V.8), it seems that treatment with poly-L-arginine induces airway hyperreactivity, or inflammatory responses (D10-D12: see relevant passages throughout the entire document), rather than providing a positive effect. This inconsistency between the effect disclosed and claimed in present application, and the one disclosed in D10-D12, leads to doubts concerning the matter for which protection is sought, thus rendering the subject-matter of claim 12 unclear (Article 6 PCT).

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR EL ASMA U
OTRAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS O INFLAMATORIAS**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente invención proporciona las composiciones y métodos útiles para detectar o tratar el asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias. En un aspecto, los métodos de la presente invención incluyen la inhibición de la actividad o expresión de un componente de una vía metabólica de la arginina en tejidos afectados por el asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias. En muchas modalidades, el componente que es inhibido es un transportador de aminoácido catiónico, una arginasa o un componente corriente abajo de la vía de la arginasa. En muchas otras modalidades, la actividad o expresión del componente es inhibida por un agente que se enlaza al componente. En otras muchas modalidades, la actividad o expresión del componente es inhibida por un agente que se enlaza a un polinucleótido que codifica para el componente.

10

15

20

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR EL ASMA U
OTRAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS O INFLAMATORIAS**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a las composiciones y métodos útiles para el diagnóstico o tratamiento del asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias que está caracterizada por episodios recurrentes de obstrucción reversible de las vías respiratorias e hiper-respuesta de las vías respiratorias (AHR). Las manifestaciones clínicas típicas incluyen
15 insuficiencia de la respiración, resuello, tos y tensión del pecho que pueden llegar amenazar la vida o ser fatales. Mientras que las terapias existentes se enfocan a reducir el broncoespasmo sintomático de la inflamación pulmonar, existe una conciencia creciente del papel de la remodelación de las
20 vías respiratorias a largo plazo en el deterioro pulmonar acelerado en los asmáticos. La remodelación de las vías respiratorias se refiere a un número de características patológicas que incluyen el músculo liso epitelial y la hiperplasia y/o metaplasia de los miofibroblastos, fibrosis
25 subepitelial y deposición de matriz. Los procesos dan

Ref.:166652

colectivamente como resultado hasta aproximadamente 300% de engrosamiento de las vías respiratorias en casos de asma fatal. A pesar del progreso considerable que ha sido realizado en elucidar la patofisiología del asma, la
5 prevalencia, morbilidad, y mortalidad de la enfermedad se ha incrementado durante las pasadas dos décadas. En 1995, en los Estados Unidos únicamente, cerca de 1.8 millones de visitas médicas de emergencia, 466,000 hospitalizaciones y 5,429 muertes fueron directamente atribuidas al asma.

10 Se acepta en general que el asma alérgico es iniciado por una reacción inflamatoria inapropiada a los alérgenos llevados por el aire. Los pulmones de los asmáticos demuestran una infiltración intensa de linfocitos, mastocitos y eosinófilos. Un gran cúmulo de evidencia ha
15 demostrado que esta respuesta inmune es impulsada por las células T CD4⁺ que expresan un perfil de citocina T_H2. Un modelo murino de asma involucra la sensibilización del animal a la ovoalbúmina (OVA) seguido por la distribución intratraqueal del reto con OVA. Este procedimiento genera
20 una reacción inmune de T_H2 en el pulmón del ratón e imita cuatro respuestas patofisiológicas mayores observadas en el asma humano, incluyendo IgE suprarregulada en suero (atopia), eosinofilia, secreción excesiva de moco, y AHR. La citocina IL-13, expresada por los basófilos, mastocitos, células T
25 activadas y células NK, juega un papel central en la

respuesta inflamatoria a OVA en pulmones de ratón. La instilación pulmonar directa de IL-13 murino promueve cuatro de las patologías relacionadas al asma y, de manera contraria, la presencia de un antagonista soluble de IL-13
5 (sIL-13R α 2-Fc) bloqueó completamente la síntesis de moco de las células en forma de copa y la AHR hacia la acetilcolina. De este modo, la señalización mediada por IL-13 es suficiente para promover cuatro fenotipos patofisiológicos relacionados al asma, y es requerida para la hipersecreción del moco y la
10 AHR inducida en el modelo de ratón.

La IL-13 biológicamente activa se enlaza específicamente a una cadena IL-13R α 1 de enlace de baja afinidad y a un complejo multimérico de alta afinidad compuesto de IL-13R α 1 e IL-4R, un componente compartido del
15 complejo de señalización de IL-4. El complejo de alta afinidad es expresado en una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo poblaciones de monocitos-macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, células endoteliales, fibroblatos, músculo liso de las vías respiratorias y células
20 epiteliales de las vías respiratorias. La ligadura mediada por IL-13 del complejo receptor funcional, da como resultado la activación dependiente de la fosforilación de las cinasas JAK1 y JAK1 ó Tyk-2 y de las proteínas IRS1/2. La activación de la cascada de la vía de IL-13 dispara el reclutamiento,
25 fosforilación y al final la translocación nuclear del

activador transcripcional Stat6. Un número de estudios fisiológicos demuestran la incapacidad del reto con OVA pulmonar para promover fenotipos relacionados a la patología mayor, incluyendo la infiltración de eosinófilos, hipersecreción de moco e
5 hiper-reactividad de las vías respiratorias en ratones homocigotos para el alelo nulo en Stat6^{-/-}. Estudios genéticos recientes han demostrado una conexión entre los alelos humanos específicos de IL-13 y sus componentes de señalización con el asma y la atopía, demostrando el papel
10 crítico de esta vía en la enfermedad humana.

IL-13 también se enlaza a una cadena receptora adicional, IL-13R α 2, expresada en humanos y en ratones con función biológica todavía no definida. IL-13R α 2 murina se enlaza a IL-13 con una afinidad aproximadamente 100 veces
15 mayor (Kd de 0.5 a 1.2 nM) con relación a IL-13R α 1 permitiendo la construcción de un potente antagonista de IL-13 soluble, sIL-13R α 2-Fc. sIL-13R α 2-Fc ha sido utilizado como un antagonista en una variedad de modelos de enfermedad para demostrar el papel de IL-13 en la fibrosis hepática
20 inducida por la esquistosomiasis y la formación de granuloma, sobrevivencia inmune del tumor así como en el modelo de asma por reto con OVA.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es un término basatante amplio utilizado para describir la

obstrucción del flujo de aire que está asociada principalmente con el enfisema y la bronquitis crónica. El enfisema provoca daño pulmonar irreversible por el debilitamiento y rompimiento de los sacos de aire dentro de los pulmones. Como resultado, la elasticidad del tejido pulmonar se pierde, provocando que las vías respiratorias se colapsen y ocurra la obstrucción del flujo de aire. La bronquitis crónica es una enfermedad inflamatoria que comienza en las vías respiratorias pequeñas dentro de los pulmones, y gradualmente avanza a las vías respiratorias más grandes. Esta incrementa el moco en las vías respiratorias y las infecciones bacterianas en los tubos bronquiales, lo cual, a su vez, impide el flujo de aire.

La COPD afecta a diez millones de norteamericanos y es un problema de salud serio en los Estados Unidos. Un estudio de prevalencia en 1998 sugirió que tres millones de norteamericanos han sido diagnosticados con enfisema y nueve millones son afectados por bronquitis crónica. La COPD es la cuarta causa principal de muerte en los Estados Unidos en 1998 y representó 112,584 muertes en 1998. La COPD también representó un estimado de 668,362 casos hospitalarios en 1998.

La terapia actual para el asma y COPD incluye el uso de broncodilatadores, corticoesteroides e inhibidores de leucotrieno. Los tratamientos comparten la misma meta

terapéutica de broncodilatación, reducción de la inflamación y facilitación de la expectoración. Muchos de tales tratamientos, incluyen efectos colaterales no deseados y pierden efectividad después de ser utilizados por un periodo 5 de tiempo. Adicionalmente, únicamente los agentes limitados para la intervención terapéutica son disponibles para disminuir el proceso de remodelación de las vías respiratorias que ocurre en los asmáticos. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad para un entendimiento 10 molecular incrementado del asma y COPD y, una necesidad para la identificación de nuevas estrategias terapéuticas para combatir estas enfermedades complejas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención identifica numerosos genes 15 que son expresados de manera diferente en tejidos pulmonares de asmáticos en comparación a los tejidos pulmonares no asmáticos. Los genes identificados de este modo incluyen los miembros de la vías metabólicas de la arginina, tales como el gen transportador 2 de aminoácido catiónico (CAT2) y el gen 20 tipo 1 de arginasa (ARG1). Estos genes son objetivos farmacológicos potenciales para el tratamiento del asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias.

En un aspecto, la presente invención proporciona los métodos para tratar enfermedades alérgicas o 25 inflamatorias. Los métodos incluyen la administración de una

cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un mamífero que tiene una enfermedad alérgica o inflamatoria, donde el agente inhibe la actividad o expresión de un componente de la vía metabólica de la arginina en los tejidos afectados por la enfermedad. El componente que es inhibido no es una sintasa del óxido nítrico (NOS). En muchas modalidades, el componente que es inhibido es una arginasa (por ejemplo, arginasa tipo I) o una proteína corriente abajo de la misma. Los ejemplos de las proteínas corriente abajo incluyen, pero no están limitadas a, ornitina-descarboxilasa, ornitina-aminotransferasa, ornitina-transcarbamilasa, espermidina-sintasa, y espermina-sintasa. En un caso, la S-adenosilmetionina-descarboxilasa, la cual está involucrada en la biosíntesis de las poliaminas, puede ser también inhibida. En otra modalidad más, el componente que es inhibido es un transportador de aminoácido catiónico (por ejemplo, transportador 2 de aminoácido catiónico).

Las enfermedades alérgicas o inflamatorias adecuadas para la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, asma, hiper-respuesta de las vías respiratorias, remodelación crónica de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y artritis. Otras enfermedades asociadas con las disfunciones o anomalías en el metabolismo de la arginina pueden ser también tratadas por la presente invención. En muchas modalidades, las

enfermedades alérgicas o inflamatorias son enfermedades respiratorias. La administración de un agente terapéutico de la presente invención inhibe la actividad o la expresión de un componente de una vía metabólica de la arginina en tejidos pulmonares, con lo cual se mejora o se eliminan los síndromes asociados con las enfermedades.

Los agentes terapéuticos adecuados para la presente invención incluyen, pero no están limitados a, polinucleótidos capaces de inhibir la expresión del componente diana u objetivo por interferencia del ARN o un mecanismo antisentido, los anticuerpos reactivos con el componente objetivo, los inhibidores de una función biológica del componente objetivo, u otros moduladores que pueden enlazarse al componente objetivo o los polinucleótidos que codifican para el mismo (por ejemplo, ARNm, o secuencias genómicas, incluyendo las secuencias reguladoras no traducidos 3' ó 5'). En muchas modalidades, la actividad o la expresión es inhibida al nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional, o post-traduccional. En muchas otras modalidades, los agentes inhibitorios pueden disminuir la actividad o la expresión del componente objetivo por al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más en comparación a la actividad original o el nivel de expresión.

En una modalidad, los agentes terapéuticos de la presente invención codifican o comprenden las secuencias de ARNsi que están dirigidas a CAT2, ARG1, u otros genes que codifican corriente abajo de la arginasa. En otra modalidad
5 más, los agentes terapéuticos son expresados a partir de vectores de terapia con genes. En muchos casos, los vectores de terapia con genes están bajo el control de un promotor específico del tejido o de células. En un ejemplo, el promotor es específico del pulmón. Los ejemplos de
10 promotores específicos del pulmón, incluyen pero no están limitados a, el promotor el gen de la proteína surfactante B específica de células epiteliales del pulmón, y el promotor CC10 específico de células Clara. En otro ejemplo más, el promotor es específico de monocitos o de macrófagos. Los
15 ejemplos de promotores específicos de macrófagos incluyen pero no están limitados a, el promotor proximal del gen del receptor de acetil-LDL humano (SRA) y aquellos descritos en Ross et al., *J. Biol. Chem.*, 273:6662-6669, 1998).

En otra modalidad más, los agentes terapéuticos de
20 la presente invención son seleccionados de lisina, poli-L-lisina, poli-L-arginina, u otros polipéptidos catiónicos que pueden inhibir los transportadores de aminoácidos catiónicos. En una modalidad adicional, el agente terapéutico es la α -difluorometilornitina que inhibe la función de la ornitina-
25 descarboxilasa. En otra modalidad más, el agente terapéutico

es un antagonista de IL-13 o un anticuerpo anti-IL-antagonista. En un ejemplo, el agente terapéutico es un receptor de IL-13 soluble.

Los agentes terapéuticos de la presente invención
5 pueden ser formulados para ser compatibles con sus rutas pretendidas de administración. Los ejemplos de rutas de administración incluyen, pero no están limitadas a, la administración parenteral, enteral y tópica. Por ejemplo, un agente terapéutico de la presente invención puede ser
10 administrado vía las rutas intracutánea, epicutánea, inhalativa, oral, rectal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica, transdérmica, transmucosal, u otras rutas apropiadas. En una modalidad, el agente terapéutico es administrado por medio de inhalación.
15 Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser administrado en la forma de un rocío de aerosol proveniente de un recipiente o surtidor presurizado que contiene un propelente adecuado (por ejemplo, dióxido de carbono) o nebulizador.

En una modalidad, el mamífero que se trata es un
20 humano que tiene asma u otra enfermedad alérgica o inflamatoria.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona los métodos útiles para identificar o evaluar los fármacos para el tratamiento del asma u otras enfermedades
25 alérgicas o inflamatorias. Los métodos incluyen poner en

contacto una molécula candidata con un tejido afectado por asma u otra enfermedad alérgica o inflamatoria, y determinando si la molécula candidata puede mejorar o eliminar un síndrome de enfermedad o fenotipo en el tejido.

5 La molécula candidata inhibe la actividad o la expresión de un componente no NOS de una vía metabólica de una arginina en el tejido. Los componentes no NOS ejemplares incluyen, pero no están limitados a, arginasa o transportador de aminoácido catiónico. Los tejidos adecuados para el uso en la presente
10 invención incluyen, pero no están limitados a, tejidos/células de modelos animales de la enfermedad, tejidos/células aislados de modelos animales, o cultivos de células que imitan ciertos aspectos (por ejemplo, perfiles de expresión, de los tejidos/células afectados por la
15 enfermedad. En un ejemplo, un efecto terapéutico de una molécula candidata es evaluado por una prueba clínica humana.

En una modalidad, la molécula candidata se selecciona o es generada con base en un diseño racional de fármaco, basado en la estructura. Las moléculas capaces de
20 interactuar con un componente no NOS de una vía metabólica de la arginina, son identificadas. Estas moléculas son luego puestas en contacto con tejidos afectados por asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias para determinar si éstas pueden mejorar o eliminar síndromes o fenotipos de
25 enfermedad. En otra modalidad más, son utilizados métodos de

selección de alto rendimiento o bibliotecas de compuestos para identificar los fármacos candidatos.

La presente invención también caracteriza los métodos útiles para detectar, diagnosticar o monitorizar el asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias. Los métodos incluyen la detección de un perfil de expresión de al menos un gen en una muestra biológica de un mamífero, y comparando el perfil de expresión a un perfil de expresión de referencia del gen, para determinar si el mamífero tiene o está en riesgo de una enfermedad alérgica o inflamatoria. En muchos casos, el gen codifica para un componente no NOS de una vía metabólica de la arginina.

En una modalidad, la enfermedad alérgica o inflamatoria es el asma o COPD. La muestra biológica puede ser una muestra pulmonar. Puede ser también utilizado moco, sangre u otros tipos de muestras. En otra modalidad más, el perfil de expresión de referencia es un perfil de expresión promedio del gen metabólico de la arginina en tejidos libres de enfermedad. El perfil de expresión de referencia puede ser también un perfil de expresión del gen metabólico de la arginina en tejidos afectados por la enfermedad. En otra modalidad más, el gen metabólico de la arginina se selecciona de ARG1 o CAT2. Los materiales utilizados para la detección o diagnóstico del asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias pueden ser incluidos en un equipo.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas que son útiles para el tratamiento del asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias. Las composiciones farmacéuticas incluyen un
5 portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que es capaz de inhibir una actividad o expresión de un componente no NOS de una vía metabólica de la arginina. En muchas modalidades, el agente puede enlazarse al componente no NOS, o un
10 polinucleótido que codifica para el mismo. En un ejemplo, el componente no NOS es codificado por ARG1 o CAT2.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se volverán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada: La descripción detallada y
15 los ejemplos específicos, al tiempo que indican las modalidades preferidas, son dados a manera de ilustración únicamente, ya que varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención se volverán aparentes para aquellos expertos en la técnica a partir de esta descripción
20 detallada. Además, los ejemplos demuestran el principio de la invención y no debe esperarse que ilustren específicamente la aplicación de esta invención a todos los ejemplos de infecciones donde ésta obviamente sea útil para aquellos expertos en la técnica anterior.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras son proporcionadas para fines de ilustración y no de limitación. Esta solicitud incorpora por referencia las figuras 1, 6, 8 y 9 de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos, presentada el 4 de marzo del 2004 y titulada "Composiciones y Métodos para Diagnosticar y Tratar el Asma u otras Enfermedades Alérgicas o Inflammatorias" (por Michael R. Bowman, et al.).

La figura 1 es una representación gráfica que muestra que CAT2 y la arginasa tipo I (ARG1) son coinducidas en ratones Balb/c por alérgeno (OVA) e IL-13 murina recombinante (IL-13). En resumen, los ratones Balb/c fueron sensibilizados a la OVA mediante inyección intraperitoneal en el día 0, retados por inyección intratraqueal (IT) ya sea del vehículo (solución salina amortiguada con fosfato (PBS)) u OVA en los días 14 y 25, y los pulmones cosechados en el día 28. Adicionalmente, ratones Balb/c intactos fueron tratados IT ya sea con PBS o IL-13 por 3 días consecutivos y los pulmones cosechados a las 72 horas. El ARN pulmonar total fue aislado y analizado para la expresión del ARNm utilizando la tecnología GeneChip (Affymetrix) como se describe en el ejemplo 1. La frecuencia del ARNm es expresada como partes por millón.

La figura 2 es una representación gráfica que muestra que la expresión de ARG1 es inducida en ratones

Balb/c por alérgeno (OVA) e IL-13 murina recombinante (IL-13). En resumen, los ratones Balb-c fueron sensibilizados a OVA mediante inyección intraperitoneal en el día 0, retados por inyección intratraqueal (IT) ya sea del vehículo (solución salina amortiguada con fosfato PBS)) u OVA en los días 14 y 25, y los pulmones cosechados en el día 28. Adicionalmente, ratones Balb/c intactos fueron tratados IT ya sea con PBS o IL-13 por 3 días consecutivos, y los pulmones cosechados a las 72 horas. El ARN pulmonar total fue aislado y analizado para la expresión de ARNm utilizando la tecnología GeneChip (Affymetrix) como se describe en el ejemplo 1. La frecuencia del ARNm es expresada como partes por millón.

La figura 3 es una representación gráfica que muestra que el gen ARG1 es inducido por OVA o la expresión de IL-13 mediada por el adenovirus en ratones Balb/c. En resumen, ratones Balb/c fueron intratraquealmente inoculados con la IL-13 murina de expresión de adenovirus recombinante, o la fosfatasa alcalina secretada murina (SEAP) en el día 0, y los pulmones cosechados en el día 3. Ratones control fueron tratados con PBS, OVA, o IL-13 como se describe en la figura 1. La frecuencia del ARNm es expresada como partes por millón.

La figura 4 es una representación gráfica que muestra que el gen ARG1 es inducido por la expresión de IL-13

mediada por el adenovirus, en ratones C57bl/6. En resumen, ratones C57bl/6 fueron intratraquealmente inoculados con la IL-13 murina de expresión de adenovirus recombinante, o la fosfatasa alcalina secretada murina (SEAP) en el día 0, y los pulmones cosechados en el día 3. La frecuencia del ARNm es expresada como partes por millón.

La figura 5 es una representación gráfica que muestra que la captación de arginina es óptimamente inducida por LPS/IL-13 en la línea de células de macrófagos murinos RAW264.7. En resumen, los macrófagos RAW264.7 fueron inducidos para expresar diversos niveles de CAT2 mediante tratamiento por 24 horas con LPS y/o IL-13. El transporte de arginina en presencia o ausencia de L-lisina competente fue evaluado en un periodo de tres minutos en una concentración final de arginina de 400 μ M como se describe en el ejemplo 3. La captación de arginina específica (CPM/mg de lisado de proteína) es expresado como un porcentaje de aquella medida en células no estimuladas.

La figura 6 es una representación gráfica que muestra que CAT2 y ARG1 son coinducidos por lipopolisacáridos (LPS)/IL-13 en la línea de células de macrófagos murinos RAW264.7. En resumen, las células RAW264.7 fueron tratadas con 10 ng/ml de IL-13 y/o 1 μ g/ml de LPS. El ARN total aislado de las células por 24 horas después del tratamiento fue analizado para ARG1 y la expresión del ARNm específica de

la isoforma de CAT utilizando la reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) cuantitativa en tiempo real, TaqMan como se describe en el ejemplo 2. La frecuencia del ARNm normalizada por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) fue estimada a partir de los números de ciclo de umbral utilizando los métodos de Fink et al. (Fink et al., Nat. Medicine, 4:1329-1333, 1998) y expresados como copias/copia de GAPDH.

La figura 7 es una representación gráfica que muestra que la captación de arginina es inhibida por lisina 20 mM en las células de macrófagos murinos RAW264.7 tratadas con LPS/IL-13. En resumen, las células RAW264.7 fueron expuestas a medio solo (Control) o condiciones de inducciones de CAT2 (LPS/IL-13) por 24 horas, y fueron luego evaluadas para el transporte de arginina en un periodo de tres minutos a una concentración final de arginina de 100 μ M. La adición de la lisina 20 mM inhibidora de CAT competitiva al amortiguador de transporte, abolió todo el transporte de arginina saturable en el control en las células tratadas con LPS/IL-13.

La figura 8 es una representación gráfica que muestra que la producción de urea en las líneas de células de macrófagos murinos RAW264.7 es inhibida por la lisina 20 mM. En resumen, los macrófagos RAW264.7 expuestos a medio solo (Control) o las condiciones inductoras de CAT2 (LPS/IL-13)

por 24 horas fueron luego equilibradas por 2 horas del amortiguador de arginina. Después de un periodo de incubación de 24 horas en presencia o ausencia de L-lisina competente en el amortiguador de transporte de arginina que
5 contiene una concentración final de arginina de 400 μ M, se evaluó la producción de urea como se describe en el ejemplo 4. La producción de urea es expresada como μ g de urea en el sobrenadante/mg de la proteína de lisado celular.

La figura 9 es una representación gráfica muestra
10 que la contracción traqueal de la rata inducida por carbacol, es inhibida por glicina 100 mM. En resumen, los explantes traqueales de rata fueron preincubados por 15 a 20 horas ya sea con el medio o el medio que contiene L-lisina 100 mM. Las traqueas fueron luego lavadas y la contracción fue medida
15 en una solución de Krebs-Henseleit en presencia o ausencia de L-lisina 100 mM. Las tensiones fueron calculadas como mg de tensión/mg de traquea y expresadas como la media y el error estándar del % de contracción máxima (por ejemplo, la contracción evocada por carbacol 10^{-5} M en ausencia de
20 lisina).

La figura 10 es una representación gráfica que muestra que la inducción de la expresión de ARG1 requiere el receptor de IL-4. En resumen, ratones suprimidos en el gen del receptor de IL-4 (IL4R-/-) y ratones suprimidos en el gen
25 IL-4 (IL4-/-) sensibilizados a OVA, o tratados con PBS o IL-

13, como se describe en la figura 1. El ARN pulmonar total fue aislado y analizado para la expresión del ARNm utilizando la tecnología GeneChip (Affymetrix) como se describe en el ejemplo 1. La frecuencia del ARNm es expresada como partes
5 por millón.

La figura 11 compara la contracción traqueal en ratones suprimidos en el gen de CAT-2, a aquella en ratones de tipo silvestre. CATS2-KO denota los ratones suprimidos en el gen de CAT2.

10 La figura 12 es una representación gráfica que muestra que la expresión del ARNm de ARG1 se incrementa después de la instilación pulmonar directa de rIL-13 o el reto intratraqueal con el alérgeno ovoalbúmina. El bloqueo de la señalización de IL-13 por la administración de sIL-
15 13R α 2.Fc inhibe 67% de la expresión de ARNm de ARG1 inducida. El bloqueo de IL-13 utilizando el receptor soluble sIL-13R α 2.Fc inhibe la producción de moco inducida por el alérgeno, y la hiper-respuesta de las vías respiratorias (AHR).

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a las composiciones y métodos útiles para el diagnóstico y tratamiento del asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias. En un aspecto, los métodos de la presente
25 invención incluyen la inhibición de la actividad o expresión

del componente de una vía metabólica de la arginina en tejidos afectados por asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias. En muchas modalidades, el componente que es inhibido es un transportador de aminoácido catiónico, una arginasa o un componente corriente abajo de la arginasa. La inhibición de la actividad o expresión de estos componentes reduce o elimina el síndrome o fenotipo de la enfermedad en los tejidos afectados. La presente invención también proporciona los métodos para identificar los agentes terapéuticos para el tratamiento del asma u otras enfermedades alérgicas o inflamatorias.

Diversos aspectos de la invención son descritos en detalle adicional en las siguientes subsecciones. No se pretende que el uso de las subsecciones limite la invención; las subsecciones pueden aplicar a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a no ser que se establezca de otro modo.

CAT2, ARG1 y Enfermedades Inflamatorias

El reto con OVA intratraqueal en ratones sensibilizados genera una reacción inmune de T_H2 en el pulmón, que imita diversas características fisiológicas del asma alérgica humana. La evidencia significativa ha demostrado el papel central de la transducción de señales mediada por IL-13 en este modelo de enfermedad animal. Fueron utilizados arreglos de oligonucleótidos para perfilar

los cambios transcripcionales en el tejido pulmonar de ratón después del reto intratraqueal con OVA o instilación pulmonar directa de IL-13. Como se muestra en las figuras 1-4, las frecuencias de ARNm de CAT2 y/o ARG1 son significativamente incrementadas cuando los ratones fueron tratados ya sea con OVA o IL-13. De igual modo, CAT2 y ARG1 son también co-inducidos en células de macrófagos murinos RAW264.7 tratadas con una combinación de lipopolisacárido (LPS) e IL-13 (figuras 5 y 6). La expresión de CAT2 y ARG1 inducida es asociada con un incremento en el transporte de arginina (figura 7) pero también un incremento en la producción de urea en células RAW264.7 (figura 8), sugiriendo la activación de la vía de la arginasa. Estudios adicionales revelaron que el incremento en la captación de arginina y la producción de urea puede ser inhibida utilizando un inhibidor competitivo de CAT2, lisina (figuras 7 y 8). Además, la contracción traqueal inducida por el carbacol es también inhibida por la lisina (figura 9), o una supresión genética del gen de CAT2 (figura 11), sugiriendo además el involucramiento de CAT2 en la patofisiología de las enfermedades inflamatorias. Además, la inducción de la expresión de ARG1 requiere que el receptor IL-4 sea demostrado en la figura 10. Al final, la administración de IL13R α 2.Fc soluble, bloquea la señalización de IL-13 la cual, a su vez, inhibe la expresión del ARNm del ARG1.

La arginina es un aminoácido semi-esencial que es metabolizado a moléculas reguladoras importantes. La arginina es transportada hacia las células del músculo liso vascular (SMC) por la familia de proteínas transportadoras de aminoácido catiónico (CAT) donde ésta es metabolizada a óxido nítrico, poliaminas, o prolina. Los mediadores inflamatorios, factores de crecimiento, y las fuerzas hemodinámicas estimulan el transporte de la arginina en SMC vascular mediante la inducción de la expresión del gen de CAT. Las citocinas inflamatorias también inducen la expresión de la sintasa de NO inducible (iNOS) y dirigen el metabolismo de la arginina hacia el gas antiproliferativo, NO. En contraste, la tensión mecánica cíclica bloquea la actividad de iNOS y ODC y estimula la expresión del gen de la arginasa I, dirigiendo el metabolismo de la arginina hacia la formación de L-prolina y colágeno.

El tejido no hepático, el cual es incapaz de reciclar la arginina, el transportador de CAT2 suprarregulado suministra la actividad de arginasa incrementada con un suministro suficiente el sustrato, arginina. Este incremento en la actividad de arginasa es parte de una vía bioquímica crítica para procesos patogénicos tales como la fibrosis, hiper-respuesta de las vías respiratorias, hiperplasia de células en forma de copa, apoptosis asociado con tensión oxidativa, e inflamación de las vías respiratorias, que son

comúnmente encontradas en enfermedades inflamatorias. En consecuencia, la inhibición del transporte de CAT2 de la arginina bloqueará la vía de la arginasa no hepática inducida, al tiempo que prescinde el ciclo de la urea hepática, que también utiliza arginasa, pero es capaz de reciclar la arginina como un sustrato.

Las Características Bioquímicas y Biológicas de CAT2.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de CAT2 humano (también conocido como SLC7A2) se describen en las SEQ ID Nos.: 1 y 2, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de CAT2 murinos se describen en las SEQ ID Nos.: 3 y 4, respectivamente.

El ADNc de CAT2 humano (SEQ ID No.: 1) fue aislado de una biblioteca de ADNc de intestino humano. La secuencia nucleotídica de la región de codificación predice una proteína de 658 aminoácidos (SEQ ID No.: 2) con un peso molecular calculado de 71,699. Ya que el 91% de los residuos son idénticos a aquellos del CAT2 de ratón, el CAT2 humano parece ser una contraparte humana del CAT2 de ratón. En el análisis de transferencia o manchado de Northern (Northern blot, por sus acepción en inglés), estuvo presente un transcripto simple de ARNm de CAT2 humano (9.0 kb) en diversos tejidos. El más alto nivel de expresión fue observado en músculo esquelético, y el más bajo nivel en el riñón. Las gráficas de hidropatía indicaron que la proteína

traducida se predice que tiene 14 dominios transmembranales con tres sitios potenciales de N-glucosilación. El gen CAT2 humano fue asignado al cromosoma humano 8p21.3-p22.

El análisis de la organización genómica reveló que
5 CAT2 humano consiste de 12 exones traducidos y más principalmente de 2 exones no traducidos. El gen CAT2 codifica para 2 isoformas proteínas, CAT2 y CAT2B, que resultan del empalme alternado mutuamente exclusivo (exón 7 para CAT2A y exón 6 para CAT2B). La estructura del gen de
10 CAT2 humano está estrechamente relacionado a la estructura de CAT1 humano, sugiriendo que éstos pertenecen a una familia de genes comunes.

En el ratón, el gen CAT2 es transcrito a partir de cinco promotores distintos dispersos sobre un espacio de 18
15 kb, lo cual da como resultado varias isoformas de ARNm de CAT2 distintas, debido a la iniciación transcripcional en promotores distintos. La isoforma adyacente al promotor más distal es encontrada en todos los tejidos y en todos los tipos celulares previamente mostrados que expresan CAT2 de
20 ratón, mientras que las otras isoformas de 5'UTR son más específicas de tejido en su expresión. La utilización de algunos o todos de los cinco promotores putativos fue documentada en clones de células de linfoma, hígado y músculo esquelético. Los promotores que contienen TATA y que
25 contienen TATA ricos en (G + C) parecen controlar la

expresión del gen CAT2 de ratón. Se sugirió que las múltiples isoformas del ARNm de CAT2 permiten la regulación transduccional flexible de este gen transportador de aminoácidos catiónicos.

5 Ya que CAT2 juega un papel importante en la producción de NO, que es un radical libre altamente reactivo que está asociado con una variedad de enfermedades que incluyen el cáncer, la inhibición de CAT2 ha sido propuesta como un tratamiento para las enfermedades caracterizadas por
10 niveles indeseables de NO. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No.5,866,123 a MacLeod describe un método para inhibir la expresión de CAT2 por un anticuerpo producido contra la proteína CAT2 de ratón. La solicitud de Patente Internacional WO 00/44766 también describe los métodos para
15 inhibir la expresión de CAT2 por la tecnología antisentido y de anticuerpo.

Características Bioquímicas y Biológicas de ARG1

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de ARG1 se describen en las SEQ ID Nos.: 5 y 6, respectivamente.
20 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de ARG1 murino se describen en las SEQ ID Nos.: 7 y 8, respectivamente.

La arginasa cataliza la hidrólisis de la arginina a ornitina y urea. Existen al menos dos isoformas de arginasa de mamífero (tipos I y II) que difieren en su distribución
25 tisular, localización subcelular, reactividad cruzada

inmunológica y función fisiológica. ARG1 codifica para la isoforma tipo I, que es una enzima citosólica y expresadamente predominantemente en el hígado como un componente del ciclo de la urea. ARG1 funciona como un
5 trímero de tres subunidades idénticas. La deficiencia elevada de esta enzima da como resultado la argininemia, un trastorno recesivo autosómico caracterizado por hiperamonemia.

La estructura de ARG1 de rata trimérico ha sido
10 determinada a una resolución de 2.1-Å (Kanyo et al., Nature 383:554-55, 1966). Una característica clave de la estructura es una novedosa porción de oligomerización en forma de S en el extremo carboxilo de la proteína, que es mediadora aproximadamente del 54% de los contactos intermonómeros.
15 Arg-308, localizada dentro de esta porción de oligomerización, nuclea una serie de enlaces salinos intramonoméricos e intermonoméricos. En contraste a la enzima trimérica tipo silvestre, las variantes R308A, R308E, y R308K de ARG1 de rata existen como especies monoméricas,
20 como es determinado por la filtración en gel y la ultracentrifugación analítica, indicando que la mutación de Arg-308 desplaza el equilibrio para la disociación del trímero por al menos un factor de 10^5 . Las variantes de arginasa monoméricas son catalíticamente activas con valores de K_{cat}/K_m
25 que son de 13-17% del valor de la enzima de tipo silvestre.

Las variantes de ARG1 de rata son caracterizadas por estabilidad disminuida a la temperatura, con relación a la enzima de tipo silvestre. La estructura cristalina del complejo entre la arginasa humana y el análogo de ácido borónico de L-arginina, el ácido 2(S)-amino-6-boronohexanoico (ABH), ha sido determinada a una resolución de 1.7 Å (Cox et al., *Nat. Struct. Biol.* 6:1043-1047, 1999). Los análisis mutacionales han revelado también que los residuos de aminoácidos Lys-141, Glu-256, y Gly-235 son críticos para la función de ARG1 humano.

El gen de ARG1 humano ha sido clonado y la estructura determinada. El gen ARG1 humano es de 11.5 kilobases de longitud y está dividido en 8 exones. El sitio de tapa fue determinado por el trazado del mapa de la nucleasa S1 y la extensión de cebador. Una secuencia similar a "caja TATA" está localizada 28 bases corriente arriba (5') del sitio de tapa, y una secuencia similar a los sitios de enlace del factor de transcripción CTF/NF1, una proteína de enlace a la "caja CAAT" está localizada 72 bases corriente arriba (5'). En la región 5', las secuencias que se asemejan a los elementos que responden a glucocorticoides, los elementos que responden a la cAMP y las secuencias de núcleo aumentadora están también presentes. La región inmediatamente flanqueante de 5' del gen de ARG1 humano hasta la posición -105, es de 84% idéntica con el segmento

correspondiente del gen de rata. En esta región, el gen ARG1 humano, un área protegida por la ADN-asa-I y varios sitios de escisión hipersensibles fueron detectados mediante análisis de huella digital. El área protegida contiene la secuencia
5 similar a los sitios de enlace de CTF/NF1 y también se traslapa con la secuencia que se asemeja a los elementos que responden a glucocorticoides.

Un número de procedimientos de ensayo han sido desarrollados para medir la actividad de la arginasa. Por
10 ejemplo, Greenberg describió un ensayo enzimático en Arginase, The Enzymes 4, editado por P. Boyer, H. Lardy, y K. Myrbarck, Academic Press, NY, 257, 1960. Geyer et al., describieron un ensayo para la arginasa en homogeneizados de tejidos (Greyer et al., *Anal. Biochem.* 39:412, 1971).
15 Nishibe y Makino reportaron un método de ensayo automatizado para la arginasa de eritrocitos (Nishibe et al., *Anal. Biochem.* 43:357. 1971). Fue también descrito un microensayo (Hirsch-Kolb et al., *Anal. Biochem.* 35:60, 1970). La mayoría de los métodos están basados en la determinación
20 colorimétrica del nitrógeno de la urea liberado durante la hidrólisis de la arginina.

La sobre-expresión de la arginasa ha sido detectable en pacientes con carcinoma colorrectal (Porembska et al., *Cancer* 94: 2930-2934, 2002). La actividad
25 incrementada de la arginasa ha estado asociada con la

deficiencia inducida por alergen^{os} del ^{óxido} n^ítrico derivado de cNOS y la hiper-respuesta de las vías respiratorias (Meurs et al., *Br. J. Pharmacol.* 136:391-398, 2002).

Inhibición de la Actividad de la Arginasa

5 La actividad de la arginasa puede ser inhibida por muchos aminoácidos, tales como valina, lisina, leucina, isoleucina, prolina y treonina, así como análogos y derivados de arginina tales como L-canavanina (Can) y L-ornitina (Orn). Todos estos aminoácidos funcionan como inhibidores
10 competitivos. La ornitina y la urea, los productos de la reacción catalizada por la arginasa, también funcionan como inhibidores competitivos de la arginasa. La inhibición competitiva por los productos ornitina y urea indica un mecanismo aleatorio de rápido equilibrio para la enzima.

15 La actividad de la arginasa está asociada con un Mn⁺⁺ fuertemente enlazado, cuya acción catalítica puede ser estimulada por la adición de un Mn⁺⁺ enlazado más débilmente, para generar una forma de enzima completamente activada. No obstante, a pesar de este requerimiento para cationes
20 divalentes agregados en la activación de la arginasa, los quelantes de metales como EDTA y el citrato no inhiben la enzima. De este modo, parece que el sitio de enlace al metal no es fácilmente accesible al solvente. Por otra parte, la actividad de arginasa es inhibida por un borato, el cual se
25 comporta como un inhibidor no competitivo S-hiperbólico I-

hiperbólico, y no tuvo efecto sobre la interacción de la enzima con los inhibidores competitivos L-ornitina ($K_i = 2 \pm 0.5$ mM), L-lisina ($K_i = 2.5 \pm 0.4$ mM), y cloruro de guanidinio ($K_i = 100 \pm 10$ mM). Se ha propuesto que el borato se enlaza en estrecha proximidad al Mn^{++} débilmente enlazado, e interfiere con su acción estimuladora. Se sugirió además que la inhibición del borato surge a partir de la quelación del Mn^{++} en el centro de Mn^{++} binuclear, desplazando de este modo una molécula de agua enlazada al metal que es responsable del ataque nucleofílico sobre el carbono del guanidinio (Carvajal et al., *J. Inorg. Biochem.* 77:163-167, 1999). Otros experimentos también demuestran que el borato y la urea se enlazan de una manera mutuamente exclusiva, mientras que la L-ornitina y el borato pueden enlazarse simultáneamente a la enzima.

Los efectos inhibitorios de aniones, tales como N_3^- , NO_2^- , BO_3^{3-} , SCN^- , CH_3COO^- , SO_4^{2-} , ClO_4^- , $H_2PO_4^-$, CN^- , I^- , Br^- , Cl^- y F^- , sobre la hidrólisis de la L-arginina (L-Arg) por la arginasa de hígado de rata (RLA) han sido estudiados (Pethe et al., *J. Inorg. Biochem.* 88:397-402, 2002). Entre todos estos aniones, únicamente el F^- mostró un efecto inhibitorio claro al nivel mM. La inhibición de RLA por F^- es reversible y no competitiva hacia L-Arg que se enlaza con un valor de $K(i)$ de 1.3 ± 0.5 mM a pH 7.4. Este efecto es dependiente del pH ya que el valor de IC_{50} de F^- hacia RLA se incrementa

de 1.2 a 19 mM cuando se incrementa el pH de 7 a 10. Otro estudio más ha confirmado que el fluoruro es un inhibidor no competitivo de la arginasa de hígado de rata. Este estudio mostró también que el cloruro provocó inhibición del sustrato
5 de la arginasa de hígado de rata a concentraciones de sustrato por arriba de 4 mM (Tormanen CD, *J. Inorg. Biochem.* 93:243-246, 2003).

N(omega)-hidroxi-L-arginina (L-NOHA) es uno de los inhibidores de arginasa más poderosos reportados hasta ahora
10 ($K_i = 150 \mu\text{M}$). Los otros productos de la sintasa de NO están ya sea sin efecto (NO_2^- ; NO_3) o inhibidores mucho más débiles (L-Cit y NO) de la arginasa. Los productos derivados de una posible hidrólisis de L-Arg (L-Orn y urea) o de L-NOHA (L-Cit, hidroxiiurea e hidroxilamina) son también inactivos hacia
15 la arginasa a concentraciones hasta de 2 mM. La configuración de L-NOHA es importante ya que D-NOHA es mucho menos activa, y sus grupos funcionales $-\text{COOH}$ libre y $\alpha\text{-NH}_2$ son requeridos para el reconocimiento de la arginasa hepática. La L-NOHA es también un potente inhibidor de la
20 actividad de arginasa de homogeneizados de hígado de rata y de macrófagos murinos (IC_{50} de 150 y 450 μM , respectivamente) (Buga et al., *Am. J. Physiol.*, 271:H1988-1998, 1996).

Otro inhibidor específico de arginasa, N(omega)-hidroxi-L-nor-arginina (nor-NOHA), es aproximadamente 40
25 veces más potente que L-NOHA al inhibir la hidrólisis de L-

arginina a L-ornitina catalizada por los macrófagos murinos no estimulados (valores de IC_{50} 12 $\pm$ 5 y 400 $\pm$ 50 μ M, respectivamente). La estimulación de los macrófagos murinos con interferón gamma y lipopolisacárido (IFN-gamma + LPS) da como resultado expresión clara de un NOS inducible (iNOS) y a un incremento en la actividad de la arginasa: Nor-NOHA es también un potente inhibidor de la arginasa en macrófagos estimulados con IFN-gamma + LPS (valor de IC_{50} 10 $\pm$ 3 μ M). En contraste a NOHA, nor-NOHA no es ni un sustrato ni un inhibidor para iNOS y éste aparece como una herramienta útil para estudiar las interacciones entre la arginasa y NOS (Tenu et al., *Nitric Oxide*, 3:427-438, 1999).

Otros inhibidores de arginasa encontrados en años recientes incluyen: N omega-hidroxi-D,L-indospicina y 4-hidroxiamidino-D,L-fenilalanina, que inhiben la arginasa hepática y la arginasa en los macrófagos alveolares (Hey et al., *Br. J. Pharmacol.* 121:395-400, 1997); el ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico (ABH), el cual fue encontrado aproximadamente 250 veces más potente que L-NOHA al inhibir la actividad de arginasa en esfínter anal interno (Baggio et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290:1409-1416, 1999); y la α -difluorometilornitina (DFMO), que es comúnmente utilizada como un inhibidor irreversible específico de la ornitina-decarboxilasa, pero también muestra un efecto inhibitorio sobre el flujo de L-arginina a través de la arginasa en

células intactas (Selamnia et al., *Biochem. Pharmacol.* 55:1241-1245, 1998). Estos inhibidores de arginasa pueden tener implicaciones patofisiológicas y terapéuticas importantes en enfermedades que involucran actividad elevada
5 de la arginasa.

Una alternativa a la inhibición directa de la actividad de la arginasa, es la inhibición de las vías de transducción de señales que conducen a la activación de la actividad de la arginasa o la expresión de arginasa. Por
10 ejemplo, la patogénesis relacionada a la actividad elevada de arginasa puede ser mejorada por la administración del receptor de IL-13 (IL-13R). Como se describió al principio, IL-13 es una citocina inmunorreguladora secretada predominantemente por las células TH2 activadas. En los
15 últimos años, se ha vuelto evidente que IL-13 es un mediador clave en la patogénesis de la inflamación alérgica. En ratones, la señalización mediada por IL-13 es suficiente para promover los cuatro fenotipos patofisiológicos relacionados al asma, y es requerida para la hipersecreción del moco y AHR
20 inducida. Dada la importancia de IL-13 como una molécula efectora, la regulación al nivel de sus receptores puede ser un mecanismo importante para modular la respuesta de IL-13 y por lo tanto la propagación de la respuesta alérgica.

IL-13 comparte una subunidad receptora común con
25 IL-4, por ejemplo, la subunidad alfa del receptor de IL-4

(IL-4R α). La caracterización de ratones deficientes en IL-13, ratones deficientes en IL-4, y ratones deficientes en el receptor alfa de IL-4 (IL-4R α (-/-)) han demostrado papeles no redundantes para IL-13. IL-13 media sus efectos mediante la
5 interacción con un sistema complejo de receptores comprendido de IL-4R α y dos proteínas de enlace a IL-13, a saber, IL-13R α 1 e IL-13R α 2. Los receptores de IL-13 son expresados sobre las células B, basófilos, eosinófilos, mastocitos, células endoteliales, fibroblastos, monocitos, macrófagos,
10 células epiteliales respiratorias y células del músculo liso.

No obstante, los receptores de IL-13 funcionales no han sido demostrados sobre las células T humanas o de ratón. De manera contraria a IL-4, IL-13 no parece ser importante en la diferenciación inicial de las células T CD4 en células
15 tipo TH2 sino más bien parece ser importante en la fase efectora de la inflamación alérgica. Esta evaluación es apoyada además por muchas observaciones *in vivo*, incluyendo la administración de IL-13 que da como resultado la inflamación alérgica, sobreexpresión de IL-13 específica del
20 tejido, en los pulmones de ratones transgénicos dio como resultado la inflamación de las vías respiratorias e hipersecreción de moco, el bloqueo de IL-13 abolió la inflamación alérgica independientemente de IL-4, e IL-13 parece ser más importante que IL-4 en la hipersecreción de

moco. En consecuencia, IL-13 es un novedoso objetivo terapéutico, atractivo para la intervención farmacológica en trastornos alérgicos. La administración de IL-13R podría inhibir potencialmente o incluso bloquear las vías de
5 señalización de IL-13, prevenir la expresión de ARG1 inducida por IL-13, y mejorar las patologías relacionadas al asma.

ARG1 y CAT2 como Marcadores para las Enfermedades Inflamatorias

La presente invención identifica que CAT2 y ARG1
10 son sobreexpresados en el tejido pulmonar de un modelo animal de asma. En consecuencia, estos genes o sus productos de expresión pueden ser utilizados como marcadores para enfermedades inflamatorias tales como el asma o COPD. Los niveles de expresión de estos genes pueden ser detectados
15 mediante el uso, por ejemplo, de RT-PCR, arreglos de ácido nucleico o inmunoensayos. Los ejemplos de formatos de inmunoensayo incluyen, pero no son limitados a, látex u otra aglutinación de partícula, electroquimioluminiscencia, ELISAs, RIAs, ensayos en emparejado o inmunométricos,
20 fluorescencia resuelta en el tiempo, ensayos de flujo lateral, polarización de fluorescencia, citometría de flujo, ensayos inmunohistoquímicos, transferencias de Western, y chips proteómicos. Los niveles del ARNm o de la proteína CAT2 y ARG1 pueden ser detectados en fluidos corporales o en
25 muestras de tejido.

Los marcadores pueden ser utilizados para proporcionar información de diagnóstico o de pronóstico en una muestra objetivo particular, o para evaluar la eficacia de un tratamiento o terapia de las enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, la comparación de los niveles de expresión de CAT2 y ARG1 en diferentes etapas de la progresión de la enfermedad, proporciona un método para el pronóstico a largo plazo, incluyendo la supervivencia. El polimorfismo de los genes CAT2 y ARG1 puede ser también indicador de una susceptibilidad del sujeto a las enfermedades inflamatorias.

En otro ejemplo más, la eficacia de un régimen de tratamiento particular puede ser evaluada, incluyendo si un fármaco particular actuará para mejorar el pronóstico a largo plazo en un paciente particular. El asma, COPD o la artritis son enfermedades complejas cuyas manifestaciones clínicas son diversas y variables. Los pacientes varían con respecto al curso de la enfermedad y a la respuesta a la terapia disponible, y estas variaciones más probablemente reflejan diferencias en el tipo de la enfermedad. Por lo tanto, una utilidad agregada de la presente invención es proporcionar métodos para identificar a los pacientes que más probablemente responden a un curso de tratamiento.

Aunque el análisis de expresión y diferenciación inicial fue realizado en un modelo de ratón, es bien

apreciado que un gen disfuncional que conduce a la enfermedad en animales puede también, cuando sea disfuncional en humanos, conducir a un síndrome similar en humanos. De este modo es pretendido específicamente por la presente invención y entendido que la presente invención abarca específicamente los genes CAT2 y ARG1 humano. Los homólogos de CAT2 y ARG1 provenientes de otros organismos pueden ser también útiles en el uso de modelos animales para el estudio del asma, COPD, u otras enfermedades inflamatorias. Los homólogos de ARG1 y CAT2 provenientes de otros organismos pueden ser obtenidos mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica.

Tratamiento de Enfermedades Inflamatorias mediante Inhibición de las Actividades CAT2 o ARG1

Las secuencias genómicas CAT2 o ARG1, los promotores, exones, intrones, transcritos de ARN, o proteínas codificadas pueden ser objetivos para un tratamiento o agente terapéutico. Estos pueden ser también utilizados para generar vectores de terapia génica que inhiben la expresión de CAT2 y/o ARG1 o las actividades de las proteínas CAT2 y/o ARG1.

Sin limitación respecto al mecanismo, la invención está basada en parte en el principio de que la inhibición de la expresión de CAT2 y/o ARG1 o la actividad de los mismos, puede mejorar las enfermedades inflamatorias tales como el asma o COPD. Los inhibidores de CAT2 y/o ARG1 pueden ser

también eficaces en el tratamiento de la fibrosis, la hiper-
respuesta de las vías respiratorias, la hiperplasia de
células en forma de copa, la inflamación de vías
respiratorias, y la tensión oxidativa. La inhibición puede
5 ocurrir a los niveles transcripcional, post-transcripcional,
traduccional o post-traduccional. Por ejemplo, el promotor
de CAT2 o ARG1 o el ARNm de los mismos puede ser dirigido
para inhibir la transcripción o la traducción,
respectivamente. El procesamiento post-traduccional de las
10 proteínas CAT2 o ARG1 tales como la glucosilación y la
dimerización, puede ser también dirigido.

El descubrimiento del patrón de expresión de CAT2 y
ARG1 en el modelo de ratón con asma permite la selección de
agentes de prueba con la meta de modular la expresión de CAT2
15 y/o ARG1 o las actividades de CAT2 y/o ARG1. Los agentes de
prueba pueden ser seleccionados por su efecto sobre la
expresión de CAT2 y/o ARG1 a nivel del ARNm o de las
proteínas, o por su efecto sobre la actividad de los
productos de los genes CAT2 y/o ARG1.

20 En otra modalidad más, puede ser utilizado un
modulador de la expresión de CAT2 y/o ARG1 o las actividades
de CAT2 y/o ARG1 pueden ser utilizadas como un agente
terapéutico para el asma, COPD y otras enfermedades
inflamatorias. El modulador puede ser un polinucleótido tal
25 como una ribozima o un ARNi, un polipéptido tal como un

mutante de CAT2 y/o ARG1 que tiene un efecto negativo dominante sobre una actividad de CAT2 y/o ARG1 de tipo silvestre, un vector de terapia génica viral o no viral, o cualquier otra molécula o biomolécula pequeña que sea capaz de
5 inhibir la actividad de CAT2 y/o ARG1 o la expresión del gen de CAT2 y/o ARG1. Tal modulador puede ser formulado en composiciones farmacéuticas para el uso en la presente invención.

Sondas, Cebadores, Secuencias Antisentido y ARNi

Un aspecto de la presente invención pertenece a las
10 sondas o cebadores polinucleotídicos para detectar o cuantificar los productos de los genes CAT2 o ARG1 en muestras biológicas. Las sondas/cebadores de CAT2 o ARG1 pueden ser derivados de cualquier porción de los genes de CAT2 o ARG1. Las sondas/cebadores pueden tener cualquier
15 longitud deseable. Por ejemplo, las sondas pueden tener 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400 o más nucleótidos consecutivos. En muchas modalidades, las sondas pueden hibridarse bajo condiciones exigentes o altamente exigentes a un transcrito de ARN, o el
20 complemento del mismo, de los genes de CAT2 o ARG1.

Los ejemplos de condiciones de diferente exigencia de hibridación son listados en la Tabla 1. Las condiciones altamente exigentes son aquellas que son al menos tan exigentes como las condiciones A-F; las condiciones exigentes
25 son al menos tan exigentes como las condiciones G-L; y las

condiciones de exigencia reducida son al menos tan exigentes como las condiciones M-R. Como se utiliza en la Tabla 1, la hibridación es llevada a cabo bajo una condición de hibridación dada por aproximadamente 2 horas, seguido por dos lavados de 15 minutos bajo las condiciones de lavado correspondientes.

Tabla 1. Condiciones de Exigencia

10	Condición de Exigencia	polinucleótido Híbrido	Longitud del Híbrido (pb) ¹	Temperatura de Hibridación y Amortiguador ^H	Temperatura de Lavado y Amortiguador ^H
	A	ADN:ADN	>50	65°C; 1xSSC o 42°C; 1xSSC, 50% de formamida	65°C; 0.3xSSC
	B	ADN:ADN	<50	T _B [*] ; 1xSSC	T _B [*] ; 1xSSC
15	C	ADN:ARN	>50	67°C; 1xSSC o 45°C; 1xSSC, 50% de formamida	67°C; 0.3xSSC
	D	ADN:ARN	<50	T _D [*] ; 1xSSC	T _D [*] ; 1xSSC
	E	ARN:ARN	>50	70°C; 1xSSC o 50°C; 1xSSC, 50% de formamida	70°C; 0.3xSSC
	F	ARN:ARN	<50	T _F [*] ; 1xSSC	T _F [*] ; 1xSSC
20	G	ADN:ADN	>50	65°C; 4xSSC o 42°C; 4xSSC, 50% de formamida	65°C; 1xSSC
	H	ADN:ADN	<50	T _H [*] ; 4xSSC	T _H [*] ; 4xSSC

5

10

I	ADN:ARN	>50	67°C; 4xSSC o 45°C; 4xSSC, 50% de formamida	67°C; 1xSSC
J	ADN:ARN	<50	T _J *; 4xSSC	T _J *; 4xSSC
K	ARN:ARN	>50	70°C; 4xSSC o 50°C; 4xSSC, 50% de formamida	67°C; 1xSSC
L	ARN:ARN	<50	T _L *; 2xSSC	T _L *; 2xSSC
M	ADN:ADN	>50	50°C; 4xSSC o 40°C; 6xSSC, 50% de formamida	50°C; 2xSSC
N	ADN:ADN	<50	T _N *; 6xSSC	T _N *; 6xSSC
O	ADN:ARN	>50	55°C; 4xSSC o 42°C; 6xSSC, 50% de formamida	55°C; 2xSSC
P	ADN:ARN	<50	T _P *; 6xSSC	T _P *; 6xSSC
Q	ARN:ARN	>50	60°C; 4xSSC o 45°C; 6xSSC, 50% de formamida	60°C; 2xSSC
R	ARN:ARN	<50	T _R *; 4xSSC	T _R *; 4xSSC

15 ¹: La longitud del híbrido es aquella anticipada para la o
las regiones hibridadas de los polinucleótidos de
hibridación. Cuando se hibrida un polinucleótido a un
polinucleótido diana u objetivo de secuencia desconocida, se
asume que la longitud del híbrido es aquella del
20 polinucleótido de hibridación. Cuando los polinucleótidos de
secuencia conocida son hibridados, la longitud del híbrido
puede ser determinada mediante el alineamiento de las
secuencias de los polinucleótidos e identificación de la
región o regiones de complementariedad óptima de secuencias.

25 ^H: SSPE (1xSSPE es NaCl 0.15M, NaH₂PO₄ 10 mM y EDTA 1.25 mM,

pH 7.4) puede ser sustituido por SSC (1xSSC es NaCl 0.15 M y citrato de sodio 15 mM) en los amortiguadores de hibridación y lavado.

$T_h^* - T_R^*$: La temperatura de hibridación para los híbridos se anticipa que es menor que 50 pares de bases de longitud si es de 5 a 10°C menor que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m es determinada de acuerdo a las siguientes ecuaciones. Para los híbridos menores de 18 pares de bases de longitud, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\# \text{ de bases A} + \text{T}) + 4(\# \text{ de bases G} + \text{C})$.
10 Para los híbridos entre 18 y 49 pares de bases de longitud, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10} \text{Na}^+) + 0.41(\% \text{ G} + \text{C}) - (600/N)$, donde N es el número de bases en el híbrido, y Na^+ es la concentración molar de los iones sodio en el amortiguador de hibridación (Na^+ para 1xSSC = 0.165 M).

15 Otro aspecto más de la invención pertenece a los polinucleótidos que codifican para los mutantes de CAT2 y ARG1 que contienen cambios en los residuos de aminoácidos. Tales mutantes pueden competir con las proteínas CAT2 y ARG1 de tipo silvestre e inhibir la actividad de las proteínas
20 CAT2 y ARG1 de tipo silvestre. Una molécula polinucleotídica aislada que codifica para un CAT2 mutante y un gen ARG1, puede ser creada mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos dentro de la secuencia nucleotídica del polinucleótido, tal que una
25 o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos

son introducidas dentro de la proteína codificada. Tales técnicas son bien conocidas en la materia. Las mutaciones pueden ser introducidas dentro de un gen CAT2 y un gen ARG1 mediante técnicas estándares, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Alternativamente, las mutaciones pueden ser introducidas aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación del gen CAT2 y ARG1 o el ADNc de los mismos, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden ser seleccionados para la actividad biológica para identificar los mutantes que son capaces de inhibir la actividad de la proteína de tipo silvestre (el mutante negativo dominante). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede ser expresada recombinantemente y la actividad de la proteína puede ser determinada.

Un polinucleótido puede ser además modificado para incrementar la estabilidad *in vivo*. Posibles modificaciones incluyen, pero no están limitadas a, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3'; el uso de fosforotioato o 2-o-metilo en vez de los enlaces fosfodiésterasa en la cadena principal; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wibutosina, así como las formas acetil-, metil-, tio- y otras formas modificadas de adenina, histidina, guanina, timina y uridina.

Otro aspecto de la invención pertenece a las moléculas polinucleotídicas aisladas que son antisentido a los genes de CAT2 o ARG1 o sus transcritos. Un polinucleótido "antisentido" comprende una secuencia
5 nucleotídica que es complementaria a un polinucleótido en "sentido" que codifica para una proteína, por ejemplo, complementario a la hebra de codificación de una molécula de ADNc de doble hebra o complementaria a una secuencia de ARNm. En consecuencia, un polinucleótido antisentido puede formar
10 enlaces de hidrógeno con un polinucleótido en sentido. El polinucleótido antisentido puede ser complementario a una hebra de codificación completa de los genes de CAT2 o ARG1 de la invención, o únicamente a una porción de los mismos. En una modalidad, una molécula polinucleotídica antisentido es
15 antisentido a una "región de codificación" de la hebra de codificación de una secuencia nucleotídica de la invención. En otra modalidad más, la molécula polinucleotídica antisentido es antisentido a una "región de no codificación" de la hebra de codificación de una secuencia nucleotídica de
20 la invención.

Los polinucleótidos antisentido de la invención pueden ser diseñados de acuerdo a las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. La molécula polinucleotídica antisentido puede ser complementaria a la región de
25 codificación completa de un ARNm correspondiente a un gen de

la invención. Este puede ser también un oligonucleótido que está antisentido únicamente a una porción de la región de codificación o no codificación. Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 5 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 nucleótidos de longitud. Un polinucleótido antisentido de la invención puede ser construido utilizando síntesis química y reacciones de ligadura enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polinucleótido antisentido (por 10 ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede ser químicamente sintetizado utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos diversamente modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas, o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre 15 los polinucleótidos antisentido y en sentido, por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina, pueden ser utilizados. Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden ser utilizados para generar el polinucleótido antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5- 20 bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1- 25 metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-

metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-
 metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-
 metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo,
 beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-
 5 metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, ácido
 uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo,
 queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo,
 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-
 oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w,
 10 y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el polinucleótido
 antisentido puede ser producido biológicamente utilizando un
 vector de expresión dentro del cual ha sido subclonado un
 polinucleótido en una orientación antisentido (por ejemplo,
 el ARN transcrito a partir del polinucleótido insertado,
 15 estará en una orientación antisentido a un polinucleótido
 objetivo de interés, descrito posteriormente en la siguiente
 subsección).

Las moléculas polinucleotídicas antisentido de la
 invención son típicamente administradas a un sujeto o
 20 generadas *in situ* tal que éstas se hibridan con o se enlazan
 al ARNm celular y/o al ADN genómico que codifica para una
 proteína CAT2 y una proteína ARG1 para inhibir con esto la
 expresión de la proteína, por ejemplo, mediante la inhibición
 de la transcripción y/o la traducción. La hibridación puede
 25 ser mediante complementariedad de nucleótidos convencional,

para formar un dúplex estable, o por ejemplo, en los casos de una molécula polinucleotídica antisentido que se enlaza a los dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el canal mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una

5 ruta de administración de las moléculas polinucleotídicas antisentido de la invención incluye la inyección directa en un sitio tisular (por ejemplo, intestino o sangre). Alternativamente, las moléculas polinucleotídicas antisentido pueden ser

10 modificadas para dirigirse a células seleccionadas y luego administradas sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden ser modificadas tal que éstas se enlazan específicamente a los receptores o antígenos

15 expresados sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo, mediante el enlace de las moléculas polinucleotídicas antisentido a péptidos o anticuerpos que se enlazan a los receptores o antígenos de la superficie celular. Las moléculas

20 polinucleotídicas antisentido pueden también ser distribuidas a las células utilizando los vectores descritos en la presente. Para lograr concentraciones intra-celulares suficientes de las moléculas antisentido, pueden ser utilizadas las

25 construcciones vector en las cuales es colocada la molécula

polinucleotídica antisentido bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

Otro aspecto más de la invención pertenece a una molécula polinucleotídica α -anomérica. La molécula polinucleotídica α -anomérica es capaz de formar híbridos de doble hebra específicos con un ARN de CAT2 y ARG1 en los cuales, de manera contraria a las unidades β usuales, las hebras corren paralelas a la otra. La molécula polinucleotídica α -anomérica puede también comprender un 2-o-metilribonucleótido o un análogo quimérico de ARN-ADN.

En otra modalidad más, el polinucleótido aislado es una ribozima. Las ribozimas son moléculas catalíticas de ARN con actividad de ribonucleasa que son capaces de escindir un polinucleótido de hebra simple, tal como un ARNm, al cual éstas tienen una región complementaria. De este modo, las ribozimas pueden ser utilizadas para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm del gen de CAT2 y/o de ARG1 para inhibir con esto la traducción del ARNm. Una ribozima que tiene especificidad para el gen CAT2 y ARG1 puede ser diseñada con base en la secuencia nucleotídica del gen de CAT2 y ARG1. Un ARNm transcrito a partir del gen de CAT2 y ARG1 puede ser utilizado para seleccionar un ARN catalítico que tiene una actividad de ribonucleasa específica a partir de un combinado de moléculas de ARN. Alternativamente, la

expresión del gen de CAT2 y ARG1 puede ser inhibida al dirigirse a las secuencias nucleotídicas complementarias a la región reguladora de estos genes (por ejemplo, el promotor y/o aumentadores) para
5 formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en células diana.

La expresión del gen de CAT2 y ARG1 puede ser también inhibida utilizando la interferencia de ARN (ARN_i). Esta es una técnica para el silenciamiento
10 génico post-trascripcional ("PTGS"), en el cual la actividad del gen diana es específicamente abolida con el ARN de doble hebra cognado ("dsARN"). En muchas modalidades, el dsARN de aproximadamente 21 nucleótidos, homólogos al gen objetivo, es
15 introducido dentro de la célula y es observada una reducción específica de secuencia en la actividad del gen. La interferencia del ARN proporciona un mecanismo de silenciamiento de genes al nivel del ARNm. Éste ofrece un procedimiento eficiente y ampliamente aplicable para la
20 supresión de un gen, así como para fines terapéuticos.

Las secuencias capaces de inhibir la expresión de los genes por interferencia del ARN pueden tener cualquier longitud deseada. Por ejemplo, la secuencia puede tener al menos 15, 20, 25 o más nucleótidos consecutivos. La
25 secuencia puede ser dsARN o cualquier otro tipo de

polinucleótido, con la condición de que la secuencia pueda formar un complejo de silenciamiento funcional para degradar el transcrito de ARNm objetivo o diana.

En una modalidad, la secuencia comprende o consiste de un ARN corto de interferencia (siARN). El siARN puede ser, por ejemplo, dsARN que tiene 19 a 25 nucleótidos. Los siARNs pueden ser producidos endógenamente mediante degradación de las moléculas de dsARN más largas por una nucleasa relacionada a la ARNasa III, denominada Dicer. Los siARNs pueden ser también introducidos dentro de una célula exógenamente o mediante transcripción de una construcción de expresión. Una vez formado, los siARNs se ensamblan con los componentes proteicos en complejos que contienen endorribonucleasa conocidos como complejos de silenciamiento inducido por ARN (RISCs). Un desenrollamiento generado por ATP del siARN activa los RISCs, que a su vez dirigen el transcrito de ARNm complementario mediante apareamiento de bases de Watson y Crick, con lo cual se rompe y se destruye el ARNm. La escisión del ARNm tiene lugar cerca de la parte intermedia de la región enlazada por la hebra de siARN. Esta degradación del ARNm específica de la secuencia da como resultado silenciamiento del gen.

Pueden ser empleadas al menos dos formas para lograr el silenciamiento del gen mediado por siARN. Primeramente, los siARNs pueden ser sintetizados *in vitro* e

introducidos dentro de las células para suprimir transitoriamente la expresión del gen. El siARN sintético proporciona una manera fácil y eficiente para conseguir el ARNi. El siARN son dúplex de oligonucleótidos mixtos cortos
5 que pueden incluir, por ejemplo, 19 nucleótidos con partes sobresalientes 3' de dinucleótidos simétricos. Utilizando los dúplex de siARN de 21 pares de bases, sintéticos (por ejemplo, 19 bases de ARN seguidas por una porción sobresaliente UU o dTdT 3'), el silenciamiento del gen
10 específico de la secuencia puede ser logrado en células de mamífero. Estos siARNs pueden suprimir específicamente la traducción del gen dirigida, en células de mamífero sin activación de la cinasa proteica dependiente del ADN (PKR) por dsARN más largo, lo cual puede dar como resultado
15 represión no específica de la traducción de muchas proteínas.

En segundo lugar, los siARNs pueden ser expresados in vivo a partir de los vectores. Este procedimiento puede ser utilizado para expresar establemente los siARNs en células o en animales transgénicos. En una modalidad, los
20 vectores de expresión del siARN son manipulados mediante ingeniería genética para impulsar la transcripción del siARN a partir de unidades de transcripción de polimerasa III (pol III). Las unidades de transcripción pol III son adecuadas para la expresión del siARN en forma de horquilla, ya que
25 éstas despliegan un sitio de terminación de la transcripción

rico en AT, corto, que conduce a la adición de porciones sobresalientes de 2 pb (por ejemplo, UU) a los siARNs en forma de horquilla -una característica que es útil para la función del siARN. Los vectores de expresión pol III pueden
5 ser también utilizados para crear ratones transgénicos que expresan el siARN.

En otra modalidad más, los siARNs pueden ser expresados de una manera específica de tejido. Bajo este procedimiento, los ARNs de doble hebra largos (dsARNs) son
10 primeramente expresados a partir de un promotor específico de tejido en los núcleos de las líneas celulares seleccionadas o en ratones transgénicos. Los dsARNs largos son procesados en siARNs en los núcleos (por ejemplo, los Dicer). Los siARNs salen de los núcleos y son mediadores del silenciamiento
15 específico del gen. Un procedimiento similar puede ser utilizado en conjunto con los promotores específicos de tejido para crear ratones suprimidos en un gen, específico de tejido. Cualquier porción sobresaliente dinucleotídica 3' tal como UU, puede ser utilizada para el diseño del siARN.
20 En algunos casos, los residuos de G en la porción sobresaliente son evitados debido al potencial para que el siARN sea escindido por la ARNasa en residuos de G de una sola hebra. Con respecto a la secuencia de siARN misma, se ha encontrado que los siARNs con un contenido de GC de 30 a
25 50% pueden ser más activos que aquellos con un contenido más

alto de G/C en ciertos casos. Además, ya que un tramo poli(T) de 4 a 6 nucleótidos puede actuar como una señal de terminación para el ARN pol III, los tramos de >4 Ts o As en la secuencia objetivo pueden ser evitados en ciertos casos
5 cuando se diseñan las secuencias que van a ser expresadas a partir del promotor pol III de ARN. Además, algunas regiones del ARNm pueden ser ya sea altamente estructuradas o enlazadas por proteínas reguladoras. De este modo, puede ser de auxilio seleccionar los sitios objetivo del siARN en
10 diferentes posiciones a lo largo de la longitud de la secuencia del gen. Finalmente, los sitios objetivo potenciales pueden ser comparados a la base de datos del genoma apropiado (humano, ratón, rata, etc.). Cualesquiera secuencias objetivo con más de 16 a 17 pares de bases
15 contiguas de homología a otras secuencias de codificación, pueden ser eliminadas de la consideración en ciertos casos.

En una modalidad, el siARN es diseñado para tener dos repeticiones invertidas separadas en una secuencia espaciadora corta y terminan con una sarta de Ts que sirven
20 como un sitio de terminación de la transcripción. Este diseño produce un transcrito de ARN que se predice va a plegarse en un siARN corto en forma de horquilla. La selección de la secuencia objetivo de siARN, la longitud de las repeticiones invertidas que codifican para el tallo de
25 una horquilla putativa, el orden de las repeticiones

invertidas, la longitud y la composición de la secuencia espaciadora que codifica para el rizo de la horquilla, y la presencia o ausencia de 5'-protuberancias, pueden variar para lograr resultados deseables.

5 Los objetivos de siARN pueden ser seleccionados mediante exploración de una secuencia de ARNm para los dinucleótidos AA y el registro de los 19 nucleótidos inmediatamente corriente abajo (3') de AA. Pueden ser también utilizados otros métodos para seleccionar los
10 objetivos de siARN. En un ejemplo, la selección de la secuencia objetivo de siARN es puramente empíricamente determinada (ver, por ejemplo, Sui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 99: 5515-5520, 2002), siempre y cuando la secuencia objetivo comience con GG y no comparta homología secuencial
15 significativa con otros genes como son analizados por la búsqueda BLAST. En otro ejemplo más, es empleado un método más elaborado para seleccionar las secuencias objetivo de siARN. Este procedimiento explota una observación de que cualquier sitio accesible en el ARNm endógeno puede ser
20 dirigido para la degradación por el método de oligodesoxirribonucleótido/ARNasa H (Lee et al., Nature Biotechnol. 20: 500-505, 2002).

En otra modalidad más, el casete de expresión de siARN en forma de horquilla es construido para contener la
25 hebra en sentido del objetivo, seguido por un espaciador

corto, la hebra antisentido del objetivo, y 5-6 Ts como terminador de la transcripción. El orden de las hebras en sentido y antisentido dentro de las construcciones de expresión de siARN puede ser alterado sin afectar las actividades del silenciamiento de genes del siARN en forma de horquilla. En ciertos casos, la invención del orden puede provocar reducción parcial en las actividades de silenciamiento de los genes.

La longitud de la secuencia nucleotídica que es utilizada como el tallo del casete de expresión de siARN puede estar en el intervalo, por ejemplo, de 19 a 29. El tamaño del rizo puede estar en el intervalo de 3 a 23 nucleótidos. Pueden ser también utilizadas otras longitudes y/o tamaños de rizo.

En otra modalidad más, una porción sobresaliente o protuberancia 5' en la construcción del siARN en forma de horquilla puede ser utilizada, con la condición de que el siARN en forma de horquilla sea funcional en el silenciamiento de genes. En otro ejemplo más, la porción sobresaliente 5' incluye aproximadamente 6 residuos nucleotídicos.

En otra modalidad adicional, las secuencias objetivo para el ARNi son fragmentos de secuencia de aproximadamente 21 mer seleccionados de las secuencias de codificación de CAT2 y ARG1, tales como las SEQ ID NOs: 1 y

5. Las secuencias objetivo pueden ser seleccionadas de cualquiera de las regiones ORF o regiones no ORF. El extremo 5' de cada secuencia objetivo tiene el dinucleótido "NA", donde "N" puede ser cualquier base y "A" representa adenina. La secuencia 19-mer remanente tiene un contenido de GC de entre 30% y 65%. En muchos ejemplos, la secuencia 19-mer remanente no incluye cuatro A o T consecutivos (por ejemplo, AAAA o TTTT), tres G o C consecutivas (por ejemplo, GGG o CCC), o siete "GC" en una hilera. Los ejemplos de las secuencias objetivo preparadas utilizando los criterios anteriormente descritos ("Criterios Relajados") se ilustran en la Tabla 2. Cada secuencia objetivo en la Tabla 2 tiene la SEQ ID NO: 3n, y las hebras en sentido y antisentido del siARN correspondientes tienen la SEQ ID NO: 3n+1 y la SEQ ID NO: 3n+2, respectivamente, donde n es un número entero positivo. Para cada secuencia de codificación CAT2 y ARG1 (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1 y 5, respectivamente), pueden ser seleccionadas las secuencias objetivo múltiples.

Pueden ser utilizados criterios adicionales para el diseño de la secuencia objetivo de ARNi. En un ejemplo, el contenido de GC de la secuencia 19-mer remanente está limitado a entre 35% y 55%, y

cualquier secuencia 19-mer que tenga tres A o T consecutivas (por ejemplo, AAA o TTT) o una secuencia palindrómica con 5 o más bases, es excluida. Además, la secuencia 19-mer puede ser seleccionada para tener baja
5 homología secuencial a otros genes humanos. En una modalidad, las secuencias objetivo potenciales son buscadas por BLASTN contra la base de datos de la secuencia grupal UniGene humana de NCBI. La base de datos UniGene humana contiene grupos no redundantes de grupos orientados por
10 genes. Cada grupo de UniGene incluye las secuencias que representan un gen único. Las secuencias 19-mer que no producen concordancia hacia otros genes humanos bajo la búsqueda BLASTN pueden ser seleccionadas. Durante la búsqueda, el valor e puede ser ajustado a un valor exigente
15 (tal como 10^{-1}). Además, la secuencia objetivo puede ser seleccionada de la región ORF, y es al menos de 75 pares de bases a partir de los codones de inicio y de detención. Los ejemplos de las secuencias objetivo preparadas utilizando estos criterios ("Criterios Exigentes") son demostrados en la
20 Tabla 2 (SEQ ID NO: $3n$, donde n es un número entero positivo). Las secuencias en sentido y antisentido del siARN (SEQ ID NO: $3n+1$ y SEQ ID NO: $3n+2$, respectivamente) para cada secuencia objetivo (SEQ ID NO: $3n$) son también proporcionadas.

Tabla 2. Secuencias Objetivo de ARNi y secuencias de siARN

5	SEQ ID NO: (secuencias de codificación)	Criterios Relajados (objetivo: SEQ ID NO: 3n; siARN sentido: SEQ ID NO: 3n+1; siARN antisentido: SEQ ID NO: 3n+2)	Criterios Exigentes (objetivo: SEQ ID NO: 3n; siARN sentido: SEQ ID NO: 3n+1; siARN antisentido: SEQ ID NO: 3n+2)
	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NOS: 9-725	SEQ ID NOS: 1,332-1,409
	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NOS: 726-1,331	SEQ ID NOS: 1,410-1,517

10 La efectividad de las secuencias de siARN puede ser
evaluada utilizando diversos métodos conocidos en la técnica.
Por ejemplo, una secuencia de siARN de la presente invención
puede ser introducida dentro de una célula que sobre-expresa
un gen de CAT2 o de ARG1. El polipéptido o el nivel del ARNm
15 del CAT2 o del ARG1 en la célula puede ser detectado. Un
cambio sustancial en el nivel de expresión del LRG antes y
después de la introducción de la secuencia de siARN, es
indicador de la efectividad de la secuencia de siARN en la
supresión de la expresión del gen de CAT2 o ARG1. En un
20 ejemplo, los niveles de expresión de otros genes son también
monitorizados antes y después de la introducción de la
secuencia de siARN. Una secuencia de siARN que tiene efecto
inhibitorio sobre la expresión de CAT2 o ARG1 pero no afecta
significativamente la expresión de otros genes, puede ser
25 seleccionada. En otro ejemplo más, múltiples secuencias de

siARN o de otras secuencias de ARNi pueden ser introducidas dentro de la misma célula diana. Estas secuencias de siARN o ARNi inhiben específicamente la expresión de los genes CAT2 o ARG1 pero no la expresión de otros genes. En otro ejemplo
5 más, siARN u otras secuencias de ARNi que inhiben la expresión del gen de CAT2 o de ARG1 y otro gen o genes, pueden ser utilizadas.

En otra modalidad más, las moléculas polinucleotídicas de la presente invención pueden ser
10 modificadas en la porción base, la porción azúcar o en la cadena principal de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridación o la solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la cadena principal de fosfato de desoxirribosa de las moléculas polinucleotídicas puede ser modificada para
15 generar polinucleótidos peptídicos. Como se utiliza en la presente, los términos "polinucleótidos peptídicos" o "PNAs" se refiere a miméticos de polinucleótido, por ejemplo, miméticos de ADN, en los cuales la cadena principal de fosfato de desoxirribosa es reemplazada por una cadena
20 principal de pseudopéptido, y únicamente son conservadas las cuatro nucleobases naturales. La cadena principal neutra de PNAs ha mostrado que permite la hibridación específica al ADN y al ARN bajo condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de los oligómeros de PNA puede ser realizada utilizando los
25 protocolos estándares de síntesis de péptidos en fase sólida.

Los PNAs pueden ser utilizados en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, los PNAs pueden ser utilizados como agentes antisentido para la inhibición específica de la secuencia de la expresión de CAT2 o ARG1, 5 por ejemplo, mediante la inducción de la detención de la transcripción o de la traducción o inhibiendo la replicación. Los PNAs de las moléculas polinucleotídicas de la invención pueden también ser utilizados en el análisis de las mutaciones de par de bases simples en un gen, por ejemplo, 10 mediante abrazamiento por PCR dirigido a PNA, como enzimas de restricción artificiales cuando se utilizan en combinación con otras enzimas (por ejemplo, nucleasas S1) o como sondas o cebadores para el secuenciamiento o hibridación del ADN.

En otra modalidad más, los PNAs pueden ser 15 modificados (por ejemplo, para aumentar su estabilidad o captación celular), mediante el acoplamiento de grupos lipofílicos u otros grupos auxiliares a PNA, mediante la formación de quimeras de PNA-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de distribución de fármacos, 20 conocidas en la materia. Por ejemplo, las quimeras de PNA-ADN de las moléculas polinucleotídicas de la invención pueden ser generadas, las cuales pueden combinar las propiedades ventajosas de PNA y ADN. Tales quimeras permiten que las enzimas de reconocimiento del ADN (por ejemplo. polimerasas 25 de ADN), interactúan con la porción de ADN mientras que la

porción de PNA podría proporcionar alta afinidad y especificidad de enlace. Las quimeras de PNA-ADN pueden ser ligadas utilizando ligadores de longitudes apropiadas seleccionadas en términos de apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases, y orientación. La síntesis de las quimeras de PNA-ADN puede ser realizada. Por ejemplo, una cadena de ADN puede ser sintetizada sobre un soporte sólido utilizando la química de acoplamiento de fosforamidita, estándar y análogos de nucleósido modificados, por ejemplo, fosforamidita de 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina, puede ser utilizado como un espaciador entre el PNA y el extremo 5' del ADN. Los monómeros de PNA son luego acoplados de una manera gradual para producir una molécula quimérica con un segmento 5'PNA y un segmento 3'ADN. Alternativamente, las moléculas quiméricas pueden ser sintetizadas con un segmento de 5'ADN y un segmento de 3'PNA.

20 *Polipéptidos CAT2 y ARG1*

Varios aspectos de la invención pertenecen a los polipéptidos CAT2 y ARG1 mutados capaces de inhibir la actividad normal de los polipéptidos CAT2 o ARG1, así como fragmentos polipeptídicos adecuados para el uso como inmunógenos para producir

anticuerpos anti-CAT2 y anti-ARG1. En una modalidad, los polipéptidos CAT2 y ARG1 mutados (por ejemplo, mutantes negativos dominantes) son producidos mediante técnicas de ADN recombinante. Alternativamente, los
5 polipéptidos CAT2 y ARG1 mutados pueden ser sintetizados químicamente utilizando técnicas estándares de síntesis de péptido.

La presente invención también pertenece a las variantes de un CAT2 o un polipéptido ARG1 que
10 funcionan como antagonistas del polipéptido CAT2 o ARG1. En una modalidad, los antagonistas o agonistas de los polipéptidos de CAT2 o ARG1 son utilizados como agentes terapéuticos. Por ejemplo, los antagonistas para un polipéptido CAT2 o un
15 polipéptido ARG1 pueden disminuir la actividad de la proteína CAT2 o ARG1 y mejorar una enfermedad inflamatoria en un sujeto en donde la proteína CAT2 o ARG1 es sobre-expresada. Las variantes del polipéptido CAT2 o ARG1 pueden ser generadas mediante
20 mutagénesis, por ejemplo mutación puntual discreta o truncamiento de un gen de CAT2 o un gen de ARG1.

En ciertas modalidades, un antagonista de un polipéptido de CAT2 o ARG1 puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural del polipéptido
25 CAT2 o ARG1, por ejemplo, al modular competitivamente una

actividad del polipéptido CAT2 o ARG1. De este modo, los efectos biológicos específicos pueden ser promovidos mediante tratamiento con una variante de función limitada.

Los mutantes de un polipéptido CAT2 o ARG1 que
5 funcionan ya sea como agonistas de los polipéptidos CAT2 o ARG1 o como antagonistas del polipéptido CAT2 o ARG1, pueden ser identificados mediante selección de bibliotecas combinatorias mutantes. En ciertas modalidades, tales variantes pueden ser utilizadas, por ejemplo, como una
10 proteína terapéutica de la invención. Una biblioteca abigarrada de variantes de los polipéptidos de CAT2 y ARG1 puede ser producida, por ejemplo, al ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas tal que un grupo degenerado de secuencias
15 polipeptídicas de CAT2 o ARG1 potenciales es expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un grupo de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la visualización de fagos) que contiene el grupo de secuencias polipeptídicas de CAT2 o ARG1 en ésta. Existe una variedad
20 de métodos que pueden ser utilizados para producir bibliotecas de variantes potenciales del polipéptido CAT2 o ARG1 a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede ser realizada en un sintetizador automático de ADN, y el gen
25 sintético es luego ligado dentro de un vector de expresión

apropiado. El uso de un grupo degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican para el grupo deseado de secuencias polipeptídicas de CAT2 o ARG1 potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la técnica.

Además, las bibliotecas de fragmentos de una secuencia que codifica para la proteína, correspondiente a un gen de CAT2 o un gen de ARG1, pueden ser utilizadas para generar una población abigarrada de fragmentos polipeptídicos de CAT2 o ARG1 para la clasificación y selección subsecuentes de variantes de un polipéptido CAT2 o un polipéptido ARG1. En una modalidad, puede ser generada una biblioteca de fragmentos de la secuencia de codificación, mediante tratamiento de un fragmento de PCR de doble hebra de una secuencia que codifica para el gen CAT2 o ARG1, con una nucleasa bajo condiciones en donde ocurre la formación de muescas únicamente aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble hebra, renaturalizando el ADN para formar el ADN de doble hebra el cual puede incluir pares en sentido/antisentido a partir de diferentes productos amuestrados, removiendo las porciones de una sola hebra de dúplex reformados, mediante tratamiento con la nucleasa S1, y ligando la biblioteca de fragmentos resultante dentro de un vector de expresión. Mediante este método, puede ser derivada una biblioteca de expresión que codifica para los

fragmentos N-terminal, C-terminal e interno de diversos tamaños del polipéptido CAT2 o ARG1.

Son conocidas varias técnicas en la materia para clasificar los productos génicos de bibliotecas combinatorias elaboradas mediante mutaciones puntuales o truncamiento, y para clasificar las bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas más ampliamente utilizadas, las cuales son disponibles para el análisis de alto rendimiento, para clasificar bibliotecas grandes de genes, incluyen típicamente la clonación de la biblioteca de genes dentro de vectores de expresión replicables, la transformación de las células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores, y la expresión de los genes combinatorios bajo condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento del vector que codifica para el gen cuyo producto fue detectado. La mutagénesis de conjunto recursivo (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede ser utilizada en combinación con los ensayos de clasificación o selección para identificar las variantes de los polipéptidos CAT2 o ARG1 (Delgrave et al., *Protein Engineering* 6: 327-331, 1993).

Las porciones de un polipéptido CAT2 o un polipéptido ARG1 o variantes de un polipéptido CAT2 o ARG1 que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y en

general menos de 50 aminoácidos, pueden ser generadas por medios sintéticos, utilizando técnicas bien conocidas por aquellos de experiencia ordinaria en la materia. Por ejemplo, tales polipéptidos pueden ser sintetizados
5 utilizando cualquiera de las técnicas en fase sólida comercialmente disponible, tales como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, donde los aminoácidos son secuencialmente agregados a una cadena de aminoácidos en crecimiento. El equipo para la síntesis automatizada de
10 polipéptidos es comercialmente disponible de proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, California), y pueden ser operados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los métodos y composiciones para clasificar
15 inhibidores o activadores de proteínas, son conocidos en la técnica. Ver las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,980,281, 5,266,464, 5,688,635 y 5,877,007, que se incorporan por referencia en la presente.

Anticuerpos

20 De acuerdo con otro aspecto más, los anticuerpos específicos para las proteínas CAT2 o ARG1 pueden ser preparados. En muchas modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden enlazarse a las proteínas CAT2 o ARG1 con afinidades de enlace de no menos de 10^5 M^{-1} . Los
25 anticuerpos pueden ser, sin limitación, monoclonales,

policlonales, quiméricos, humanizados, scFv, Fv, Fab', Fab, o F(ab')₂.

Una proteína CAT2 o ARG1 de longitud completa puede ser utilizada o, alternativamente, la invención proporciona 5 fragmentos peptídicos antigénicos de la proteína CAT2 o ARG1 para el uso como inmunógenos. En muchas modalidades, los péptidos antigénicos de la proteína CAT2 o ARG1 comprenden al menos 8 residuos de aminoácidos, y abarcan los epitopos de la proteína 10 CAT2 o ARG1 tal que un anticuerpo producido contra el péptido, forma un complejo inmune específico con la proteína CAT2 o ARG1. En muchas otras modalidades, el péptido antigénico comprende al menos 8, 12, 16, 20 o más residuos de aminoácidos.

15 Las porciones inmunogénicas (epitopos) pueden ser identificadas en general utilizando técnicas bien conocidas. Tales técnicas incluyen la selección o clasificación de polipéptidos para la habilidad de reaccionar con anticuerpos específicos de antígeno, 20 antisueros y/o líneas de células T o clones. Tales antisueros y anticuerpos pueden ser preparados como se describe en la presente, y utilizando técnicas bien conocidas. Un epitopo de la proteína CAT2 o ARG1 es una porción que reacciona con tales 25 antisueros y/o células T a un nivel que no es

sustancialmente menor que la reactividad del polipéptido de longitud completa (por ejemplo, en un ensayo de ELISA y/o de reactividad a las células T). Tales epitopos pueden reaccionar dentro de tales
5 ensayos a un nivel T similar a o mayor que la reactividad del polipéptido de longitud completa. Tales clasificaciones pueden ser realizadas en general utilizando métodos bien conocidos por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. Por
10 ejemplo, un polipéptido puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido y puesto en contacto con suero del paciente para permitir el enlace de los anticuerpos dentro de los sueros al polipéptido inmovilizado. Los sueros no enlazados pueden ser luego removidos y
15 los anticuerpos enlazados detectados utilizando, por ejemplo, Proteína A Marcada con ^{125}I .

Los epitopos ejemplares abarcados por el péptido antigénico son regiones de la proteína CAT2 o ARG1 que están localizadas sobre la superficie del
20 polipéptido, por ejemplo, regiones hidrofílicas, así como regiones con alta antigenicidad.

Un inmunógeno CAT2 o ARG1 (por ejemplo, la proteína CAT2 o ARG1, un fragmento de la misma, o una proteína de fusión a CAT2 o ARG1) es utilizado típicamente para preparar
25 los anticuerpos mediante inmunización de un sujeto adecuado

(por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, los inmunógenos CAT2 o ARG1 recombinantemente expresados o un inmunógeno de CAT2 o ARG1 químicamente sintetizados. La preparación puede además incluir un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con la preparación inmunogénica induce una respuesta de anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1. Las técnicas para preparar, aislar y utilizar los anticuerpos monoclonales o policlonales anti-CAT2 o anti-ARG1, son bien conocidas en la materia.

En consecuencia, otro aspecto más de la invención pertenece a los anticuerpos monoclonales o policlonales anti-CAT2 o anti-ARG1. Los ejemplos de porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina incluyen los fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden ser generados mediante tratamiento del anticuerpo con una enzima tal como pepsina. La invención proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales que se enlazan a la proteína CAT2 o ARG1.

El título del anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1 en el sujeto inmunizado puede ser monitorizado sobre el tiempo mediante técnicas estándares, tales como con el ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando la

linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas murinos pueden ser elaborados mediante la fusión de linfocitos provenientes de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente
5 invención, con una línea celular de ratón inmortalizada. Los ejemplos de líneas celulares inmortales incluyen líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio
10 HAT"). Cualquiera de un número de líneas celulares de mieloma pueden ser utilizadas como un socio de fusión de acuerdo a las técnicas estándares, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp210-Ag14. Estas líneas de mieloma
15 son disponibles de la ATCC. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT son fusionadas a los esplenocitos de ratón utilizando polietilenglicol ("PEG"). Las células hibridomas resultantes de la fusión son luego seleccionadas utilizando el medio de
20 HAT, que mata las células de mieloma no fusionadas y no productivamente fusionadas (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días debido a que éstos no son transformados). Las células hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal son detectadas mediante clasificación
25 de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para los

anticuerpos que se enlazan a un polipéptido CAT2 o ARG1 específicamente, por ejemplo, utilizando un ensayo de ELISA estándar.

Alternativamente a la preparación de los hibridomas
5 que secretan anticuerpos monoclonales, puede ser identificado un anticuerpo monoclonal anti-CAT2 o anti-ARG1, y aislado mediante clasificación de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de visualización de fago de anticuerpo) con la proteína CAT2 o
10 ARG1 para aislar con esto los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se enlazan a la proteína CAT2 o ARG1. Los equipos para generar y clasificar las bibliotecas de visualización de fagos, son comercialmente disponibles (por ejemplo, el Sistema de Anticuerpo de Fago Recombinante de
15 Pharmacia, Catálogo No. 27-9400-01; y el Equipo de Visualización de Fago Stratagene SurfZAP^{MR}, Catálogo No. 240612).

Los anticuerpos anti-CAT2 o anti-ARG1 también incluyen los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena simple" o
20 "scFv". Los fragmentos scFv comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica simple. En general, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, que hacen posible que el scFv forme la
25 estructura deseada para el enlace al antígeno.

Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes anti-CAT2 o anti-ARG1, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que comprenden porciones humanas y no humanas, que pueden ser elaboradas utilizando técnicas de ADN recombinante estándares, y están dentro del alcance de la presente invención. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden ser producidos mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia.

Los anticuerpos humanizados pueden ser deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se enlazan al antígeno), que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del recipiente o paciente) en las cuales los residuos que forman una región de terminación complementaria (CDR) del recipiente, son reemplazados por residuos provenientes de un CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la estructura de Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos

no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden también comprender residuos que no son encontrados en el anticuerpo del recipiente ni en las secuencias de CDR o estructurales importadas. En general, el anticuerpo
5 humanizado comprenderá sustancialmente todo o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones constantes son aquellas de
10 una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede también incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), tal como aquella de una inmunoglobulina humana.

Tales anticuerpos humanizados pueden ser producidos
15 utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y cadena ligera humanos. Los ratones transgénicos son inmunizados de la manera normal con un antígeno seleccionado,
20 por ejemplo, toda o una porción de la proteína CAT2 o ARG1. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden ser obtenidos utilizando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reacomodan durante
25 la diferenciación de las células B, y subsecuentemente sufren

cambio de clase y mutación somática. De este modo, utilizando tal técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA e IgE terapéuticamente útiles.

Los anticuerpos humanizados que reconocen un
5 epitopo seleccionado pueden ser generados utilizando una técnica denominada como "selección guiada". En este procedimiento, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo murino, es utilizado para guiar la selección de un anticuerpo humanizado que
10 reconoce el mismo epitopo.

En una modalidad, los anticuerpos para la proteína CAT2 o ARG1 son capaces de reducir o eliminar la función biológica de la proteína CAT2 o ARG1. En muchos casos, puede ser obtenido al menos una disminución del 25% de la
15 actividad. En muchos otros casos, puede ser alcanzada al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más disminución en la actividad.

Un anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1 puede ser utilizado para aislar la proteína CAT2 o ARG1 o los mutantes
20 de la proteína CAT2 o ARG1 mediante técnicas estándares, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1 puede facilitar la purificación de una proteína CAT2 o ARG1 natural o mutante a partir de las células y de una proteína CAT2 o ARG1
25 recombinantemente producida, expresada en las células

hospederas. Además, un anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1 puede ser utilizado para detectar la proteína CAT2 o ARG1 (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular sobre la superficie celular) con el fin de evaluar la
5 abundancia y el patrón de expresión de la proteína CAT2 o ARG1. Los anticuerpos anti-CAT2 o anti-ARG1 pueden ser utilizados en diagnóstico para monitorizar los niveles de proteína en tejido, como parte de un procedimiento de prueba clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un
10 régimen de tratamiento dado. La detección puede ser facilitada mediante el acoplamiento (por ejemplo, enlace físico) del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales
15 luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos del grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y
20 avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o picoeritrina; un ejemplo de un material
luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales
25 bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina;

y los ejemplos de material radioactivo incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^3H .

Los anticuerpos anti-CAT2 o anti-ARG1 de la invención son también útiles para dirigir un material terapéutico a una célula o tejido que tiene expresión elevada de CAT2 o ARG1. Por ejemplo, un material terapéutico tal como un antagonista de CAT2 o ARG1 de molécula pequeña, puede ser enlazado al anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1 con el fin de dirigir el material terapéutico a la célula o tejido que tiene la expresión elevada de CAT2 o ARG1.

Un agente terapéutico puede ser acoplado (por ejemplo, covalentemente enlazado) a un anticuerpo monoclonal adecuado ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, vía un grupo ligador). Una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, sobre uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) sobre el otro.

Alternativamente, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico y un anticuerpo vía un grupo ligador. Un grupo ligador puede funcionar como un espaciador para distanciar un anticuerpo de un agente, con el fin de evitar

la interferencia con las capacidades de enlace. Un grupo ligador puede también servir para incrementar la reactividad química de un sustituyente sobre un agente o un anticuerpo, y de este modo incrementar la eficacia de acoplamiento. Un
5 incremento en la reactividad química puede también facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales sobre agentes, lo cual de otro modo no podría ser posible.

Será evidente para aquellos expertos en la técnica que puede ser empleada una variedad de reactivos
10 bifuncionales o polifuncionales, homo- y hetero-funcionales (tales como aquellos descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.), como el grupo ligador. El acoplamiento puede ser efectuado, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos
15 de carbohidrato oxidados. Existen numerosas referencias que describen tal metodología, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,671,958 a Rodwell et al.

Cuando un agente terapéutico es más potente cuando está libre de la porción de anticuerpo de los
20 inmunoconjugados de la presente invención, puede ser deseable utilizar un grupo ligador que es escindible durante o después de la internalización dentro de una célula. Ha sido descrito un número de diferentes grupos ligadores escindibles. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente a
25 partir de estos grupos ligadores incluye la escisión por

reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,489,710 a Spitler), mediante radiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,625,014 a Senter et al.), mediante hidrólisis de
5 las cadenas laterales de aminoácidos derivatizadas (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,638,045 a Kohn et al.), mediante hidrólisis mediada por complemento en suero (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,671,958 a Rodwell et al.), e hidrólisis catalizada por ácido (por
10 ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,569,789 a Blattler et al.).

Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una modalidad, múltiples moléculas de un agente son acopladas a una molécula de anticuerpo. En otra
15 modalidad más, más de un tipo de agente puede ser acoplado a un anticuerpo. No obstante de la modalidad particular, los inmunoconjugados con más de un agente pueden ser preparados en una variedad de formas. Por ejemplo, más de un agente puede ser acoplado directamente a una molécula de anticuerpo,
20 o los ligadores que proporcionan sitios múltiples para el acoplamiento, pueden ser utilizados.

Vectores

Otro aspecto más de la invención pertenece a los vectores que contienen polinucleótidos que codifican para los
25 polipéptidos CAT2 o ARG1 o porciones de los mismos. Los

vectores pueden ser plásmidos o vectores virales.

Los vectores de expresión de la invención pueden ser diseñados para la expresión de los polipéptidos CAT2 o ARG1 en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, los polipéptidos CAT2 o ARG1 pueden ser expresados en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura, o células de mamífero. En ciertas modalidades, tal proteína puede ser utilizada, por ejemplo, como una proteína terapéutica de la invención. Alternativamente, el vector de expresión puede ser transcrito y traducido *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladores del promotor T7, y la polimerasa T7.

En otra modalidad más, el vector de expresión de mamífero que incluye los elementos reguladores específicos de tejido, son utilizados para expresar los polinucleótidos de interés. Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica y pueden incluir promotores epiteliales específicos de células. Otros ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido, adecuados incluyen el promotor de albúmina específica del hígado, promotores específicos linfoides, promotores de receptores de células T e inmunoglobulinas, promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamento), promotores específicos del páncreas y promotores específicos

de glándula mamaria (por ejemplo, promotor de suero de leche). Los promotores regulados por el desarrollo son también abarcados, por ejemplo, el promotor de α -fetoproteína.

5 La invención también proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica ya sea para un polipéptido CAT2 o un polipéptido ARG1 clonado dentro del vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN es
10 operativamente enlazada a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión (mediante transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que esté antisentido al ARNm correspondiente ya sea al gen de CAT2 o al gen de ARG1 de la invención. Las secuencias reguladores
15 operativamente enlazadas a un polinucleótido clonado en la orientación antisentido, pueden ser elegidas para dirigir la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos celulares. Por ejemplo, promotores o aumentadores virales, o secuencias reguladoras pueden ser
20 elegidos para dirigir la expresión constitutiva, específica del tejido o específica del tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el cual se producen los polinucleótidos antisentido bajo el
25 control de una región reguladora de alta eficiencia. La

actividad del promotor/aumentador puede ser determinada por el tipo de célula dentro del cual es introducido el vector.

La invención proporciona además vehículos de distribución de genes para la distribución de los polinucleótidos a las células, tejidos o un mamífero para la expresión. Por ejemplo, una secuencia polinucleotídica de la invención puede ser administrada ya sea localmente o sistémicamente en un vehículo de distribución de genes. Estas construcciones pueden utilizar procedimientos de vectores virales o no virales en la modalidad *in vivo* o *ex vivo*. La expresión de tal secuencia de codificación puede ser inducida utilizando promotores endógenos de mamífero o heterólogos. La expresión de la secuencia de codificación *in vivo* puede ser ya sea constituida o regulada. La invención incluye vehículos de distribución de genes capaces de expresar los polinucleótidos contemplados. El vehículo de distribución de genes puede ser, por ejemplo, un vector viral, tal como un vector retroviral, lentiviral, adenoviral, viral adeno-asociado (AAV), viral del herpes o alfavirus. El vector viral puede también ser un astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus, o togavirus.

La distribución de las construcciones de terapia génica de esta invención dentro de las células, no está limitada a los vectores virales anteriormente mencionados.

Otros métodos y medios de distribución pueden ser empleados tales, por ejemplo, vectores de expresión de ácido nucleico, ADN catiónico policondensado ligado o no ligado a adenovirus muerto solo, ADN ligando, complejo de liposoma-ADN, células 5 vehículos de distribución de células eucarióticas, de posición de materiales de hidrogel fotopolimerizados, pistola de partículas de transferencia de genes manual, radiación ionizante, neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. La 10 transferencia de genes mediada por partículas puede ser también empleada. En resumen, la secuencia puede ser insertada dentro de vectores convencionales que contienen secuencia de control convencionales para la expresión de alto nivel, y pueden ser luego incubados 15 con moléculas sintéticas de transferencia de genes tales como cationes poliméricos que se enlazan al ADN, como la polilisina, protamina y albúmina, enlazados a los ligandos de dirección a las células, tales como el asialoorosomucoide, insulina, galactosa, 20 lactosa o transferrina. Puede ser también empleado ADN desnudo. La eficiencia de captación puede ser mejorada utilizando esferas de látex biodegradables. Las esferas de látex recubiertas con ADN son eficientemente transportadas hacia las células después del inicio de la endocitosis por 25 las esferas. El método puede ser mejorado además mediante

tratamiento de las esferas para incrementar la hidrofobicidad y con esto facilitar la desintegración del endosoma y la liberación del ADN dentro del citoplasma.

Otro aspecto más de la invención pertenece a la expresión ya sea de un gen de CAT2 o un gen de ARG1 utilizando un sistema de expresión regulable. Estos sistemas incluyen, pero no están limitados al sistema Tet-on/off, el sistema Ecdysone, el sistema de progesterona y el sistema de rapamicina.

Otro aspecto más de la invención pertenece al uso de células hospederas que son transformadas, transfectadas o transducidas con vectores que codifican o que comprenden ya sea un polipéptido de CAT2 o un polipéptido de ARG1 o porciones de los mismos. Las células hospederas pueden ser células procarióticas o eucarióticas. Estas células hospederas pueden ser empleadas para expresar cualquier polipéptido CAT2 o ARG1 deseado.

Métodos de Detección

Como se discutió al principio, el nivel de expresión del gen de CAT2 o ARG1 puede ser utilizado como un marcador para enfermedades inflamatorias. La detección y medición de la cantidad relativa de un producto de CAT2 o de ARG1 (polinucleótidos o polipéptidos) puede ser cualquier método conocido en la materia. La detección o la medición puede ser cualitativa o cuantitativa.

Las metodologías típicas para la detección de un polinucleótido transcrito incluye la extracción del ARN a partir de una célula o muestra de tejido, seguido por la hibridación de una sonda marcada al ARN extraído y la
5 detección de la sonda marcada (por ejemplo, transferencia de Northern, o arreglo de ácido nucleico).

Las metodologías típicas para la detección de un polinucleótido transcrito incluyen extracción de proteínas a partir de una célula o muestra de tejido,
10 seguido por el enlace de un anticuerpo específico para la proteína objetivo a la muestra de proteínas, y la detección del anticuerpo. Por ejemplo, la detección de un polipéptido CAT2 o ARG1 puede ser lograda utilizando ya sea el anticuerpo policlonal
15 anti-CAT2 o el anticuerpo policlonal anti-ARG1. Los anticuerpos son en general detectados mediante el uso de un anticuerpo secundario marcado. El marcador puede ser un radioisotopo, compuesto fluorescente, una enzima, un co-factor enzimático o ligando. Tales
20 métodos son bien comprendidos en la técnica.

En otra modalidad más, la detección de la expresión de la proteína CAT2 o ARG1 es conducida mediante el uso de moléculas pequeñas que tienen altas afinidades de enlace a los productos proteicos de CAT2 o ARG1. En muchos ejemplos,
25 las moléculas pequeñas son fácilmente detectables. En muchos

otros ejemplos, las moléculas pequeñas pueden ser directa o indirectamente marcadas por otras sustancias detectables. Los ejemplos de estas sustancias detectables incluyen, sin limitación, enzimas, grupos prostéticos, materiales
5 fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, materiales particulados o metales coloidales.

En ciertas modalidades, el gen CAT2 o ARG1 mismo puede servir como un marcador para enfermedades
10 inflamatorias. Por ejemplo, un incremento o una disminución de las copias genómicas del gen de CAT2 o ARG1, tal como mediante duplicación o supresión del gen, puede estar correlacionada con una enfermedad inflamatoria.

La detección de las moléculas polinucleotídicas de
15 CAT2 o ARG1 específicas, puede ser también evaluada mediante electroforesis en gel, cromatografía en columna, o secuenciamiento directo, PCR cuantitativa, RT-PCR, PCR anidada, u otras técnicas conocidas en la materia.

La detección de la presencia de un número de copias
20 de todo o una parte de un gen de CAT2 o de ARG1 puede ser realizada utilizando cualquier método conocido en la técnica. En una modalidad, es empleado el análisis de Southern para evaluar la presencia y/o cantidad de las copias genómicas del gen de CAT2 o ARG1. Otros métodos útiles para la detección
25 y/o cuantificación del ADN incluyen, pero no están limitados

a, secuenciamiento directo, electroforesis en gel, cromatografía en columna, PCR cuantitativa, u otros medios como es apreciado por aquellos expertos en la técnica.

Métodos de Clasificación

5 La invención también proporciona los métodos (también denominados en la presente como "ensayos de clasificación") para identificar los moduladores (por ejemplo, los compuestos o agentes candidatos o de prueba que comprenden porciones terapéuticas (por ejemplo, péptidos, 10 peptidomiméticos, peptoides, polinucleótidos, moléculas pequeñas u otros fármacos) los cuales (a) se enlazan a la proteína CAT2 o ARG1, o (b) tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la proteína CAT2 o ARG1, o más específicamente (c) tienen un efecto modulador sobre las 15 interacciones de la proteína CAT2 o ARG1 con uno o más de sus sustratos naturales (por ejemplo, péptido, proteína, hormona, co-factor o polinucleótido), o (d) tienen un efecto inhibitorio sobre la expresión del gen de CAT2 o ARG1. Tales ensayos comprenden típicamente una reacción entre un gen de 20 CAT2 o ARG1 y uno o más componentes de ensayo. Los otros componentes pueden ser ya sea el compuesto de prueba mismo, o una combinación del compuesto de prueba y un socio de enlace de la proteína CAT2 o ARG1.

 Los compuestos de prueba de la presente invención 25 son en general moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas

pequeñas y biomoléculas. Las biomoléculas incluyen, pero no están limitadas a, aminoácido, ácido nucleico, lípido, azúcar, esteroide, polipéptidos, polinucleótidos, polisacáridos, así como cualesquiera compuestos orgánicos de
5 origen natural o sintético que tengan una bioactividad en mamíferos. En una modalidad, el compuesto de prueba es una molécula orgánica pequeña. En otra modalidad más, el compuesto de prueba es una biomolécula.

Los compuestos de prueba de la presente invención
10 pueden ser obtenidos a partir de cualquier fuente disponible, incluyendo bibliotecas sistemáticas de compuestos naturales y/o sintéticos. Los compuestos de prueba pueden ser también obtenidos mediante cualquiera de los numerosos procedimientos en métodos de biblioteca
15 combinatoria conocidos en la materia incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen la funcionalidad de péptidos, pero con una nueva cadena principal no peptídica que son resistentes a la degradación
20 enzimática, pero que no obstante permanecen bioactivas; ver, por ejemplo, Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37: 2678-85, 1994); las bibliotecas en fase sólida paralelas espacialmente dirigibles o las bibliotecas en fase de solución; los métodos de bibliotecas
25 sintéticas que requieren desconvolución; el método de

biblioteca de "una esfera un compuesto"; y los métodos de biblioteca sintética que utilizan selección de cromatografía de afinidad. Los procedimientos de biblioteca biológica y de biblioteca peptoide están limitados a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro procedimientos son aplicables a bibliotecas de péptidos, de oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas de los compuestos (Lam, *Anticancer Drug Des.* 12: 145, 1997).

Como se utiliza en la presente, el término "socio de enlace" se refiere a un agente bioactivo que sirve ya sea como un sustrato para la proteína CAT2 o ARG1, o alternativamente, como un ligando que tiene afinidad de enlace a la proteína CAT2 o ARG1. Como se mencionó anteriormente, el agente bioactivo puede ser cualquiera de una variedad de compuestos de origen natural o sintético, aminoácidos, polipéptidos, polisacáridos, nucleótidos o polinucleótidos.

Clasificación para Inhibidores de la Proteína CAT2 o ARG1

La invención proporciona los métodos para clasificar los compuestos de prueba para inhibidores de la proteína CAT2 o ARG1, y para seleccionar las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de prueba. El método de selección o clasificación comprende poner en contacto las alícuotas de las muestras de células que expresan CAT2 o ARG1, con uno de una pluralidad de compuestos

de prueba, y comparando la expresión de CAT2 en cada una de las alícuotas para determinar si alguno de los compuestos de prueba proporciona un nivel de expresión o actividad sustancialmente disminuido de CAT2 o ARG1 con relación a las muestras con otros compuestos de prueba, o con relación a una muestra no tratada o muestra control. Además, los métodos de clasificación pueden ser considerados mediante la combinación de un compuesto de prueba con la proteína CAT2 o ARG1 y con esto determinar el efecto del compuesto de prueba sobre la proteína CAT2 o ARG1.

Además, la invención está dirigida también a un método para clasificar o seleccionar los compuestos de prueba capaces de modular el enlace de la proteína CAT2 o ARG1 a un socio de enlace, mediante la combinación del compuesto de prueba, la proteína CAT2 o ARG1, y el socio de enlace entre sí, y determinando si el enlace del socio de enlace y la proteína CAT2 o ARG1 ocurre. El compuesto de prueba puede ser ya sea moléculas pequeñas o una biomolécula. Como se discute más adelante, los compuestos de prueba pueden ser proporcionados a partir de una variedad de bibliotecas bien conocidas en la técnica.

Otros métodos y composiciones para seleccionar los inhibidores proteicos son también conocidos en la técnica. Ver las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,980,281, 5,266,464, 5,688,635 y 5,877,007, que se incorporan por

referencia en la presente.

Los inhibidores de la expresión, actividad o habilidad de enlace de CAT2 o ARG1, son útiles como composiciones terapéuticas de la invención. Uno de los 5 inhibidores para el transporte de arginina mediado por CAT2, es la lisina. Tales inhibidores pueden ser formulados como composiciones farmacéuticas, como se describe más adelante en la presente.

Ensayos de Clasificación de Alto Rendimiento

10 La invención proporciona los métodos para conducir la clasificación de alto rendimiento para los compuestos de prueba capaces de inhibir la actividad o la expresión de CAT2 o ARG1. En una modalidad, el método de clasificación de alto rendimiento involucra la combinación de los compuestos de 15 prueba y la proteína CAT2 o ARG1, y la detección del efecto del compuesto de prueba sobre la proteína CAT2 o ARG1. Los ensayos funcionales tales como el microfisiómetro citosensor, los ensayos de flujo de calcio tales como FLIPR® (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA), o el ensayo de TUNEL, pueden 20 ser empleados para medir la actividad celular, como se discute más adelante.

Una variedad de ensayos funcionales de alto rendimiento bien conocidos en la técnica pueden ser utilizados en combinación para clasificar y/o estudiar la 25 reactividad de diversos tipos de compuestos de prueba de

activación. Ya que el sistema de acoplamiento es frecuentemente difícil de predecir, pueden ser necesarios un número de ensayos para ser configurados para detectar una amplia gama de mecanismos de acoplamiento. Una variedad de técnicas basadas en fluorescencia son bien conocidas en la técnica y son capaces de realizar la clasificación de alto rendimiento y de ultra alto rendimiento para la actividad, incluyendo pero no limitados a BRET[®] o FRET[®] (ambos por Packard Instrument Co., Meriden, CT). El sistema BIACORE[®] puede ser también manipulado para detectar el enlace de los compuestos de prueba con componentes individuales del objetivo terapéutico.

Al combinar los compuestos de prueba con la proteína CAT2 o ARG1 y determinar la actividad de enlace entre ellos, el análisis de diagnóstico puede ser realizado para elucidar los sistemas de acoplamiento. Los ensayos genéricos que utilizan un microfisiómetro citosensor pueden ser también utilizados para medir la activación metabólica, mientras que los cambios en la movilización del calcio pueden ser detectados mediante el uso de técnicas basadas en fluorescencia tales como FLIPR[®] (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Además, la presencia de las células apoptóticas puede ser determinada por el ensayo de TUNEL, que utiliza la citometría de flujo, para detectar los extremos libres 3-OH que resultan de la escisión del ADN genómico

durante la apoptosis. Como se mencionó anteriormente, una variedad de ensayos funcionales bien conocidos en la técnica pueden ser utilizados en combinación para clasificar y/o estudiar la reactividad de diferentes tipos de compuestos de prueba de activación. En una modalidad, el ensayo de clasificación de alto rendimiento de la presente invención utiliza la tecnología de resonancia de plasmón libre de marcador, como es proporcionado por los sistemas BIACORE® (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). La resonancia libre de plasmón ocurre cuando las sondas de plasmón superficiales son excitadas a una interfaz metal/líquido. Al reflejar la luz directa a partir de la superficie como resultado del contacto con una muestra, la resonancia de plasmón superficial provoca un cambio en el índice de refracción en la capa superficial. El cambio de índice de refracción para un cambio dado de concentración de masa en la capa superficial, es similar para muchos agentes bioactivos (incluyendo proteínas, péptidos, lípidos y polinucleótidos), y ya que la superficie del sensor BIACORE® puede ser funcionalizada para enlazarse a una variedad de estos agentes bioactivos, puede ser lograda de este modo la detección de una amplia selección de compuestos de prueba.

Por lo tanto, la invención proporciona la clasificación de alto rendimiento de los compuestos de prueba para la habilidad de inhibir una actividad de la proteína de

CAT2 o ARG1, mediante la combinación de los compuestos de prueba y la proteína CAT2 o ARG1 en ensayos de alto rendimiento tales como BIAcore®, o en ensayos basados en fluorescencia tales como BRET®. Además, los ensayos de alto
5 rendimiento pueden ser utilizados para identificar factores específicos que se enlazan a la proteína CAT2 o ARG1, o alternativamente, para identificar los compuestos de prueba que previenen el enlace de la proteína CAT2 o ARG1 al socio de enlace. Además, los ensayos de clasificación de alto
10 rendimiento pueden ser clasificados para determinar si los compuestos de prueba pueden enlazarse o no a la proteína CAT2 o ARG1 o a un socio de enlace de la proteína CAT2 o ARG1.

Ensayos de Diagnóstico

Un método ejemplar para detectar la presencia de
15 CAT2 o ARG1 o el polinucleótido que codifica para CAT2 o ARG1 en una muestra biológica, involucra la obtención de una muestra biológica a partir de un sujeto de prueba y poniendo en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar la proteína o el polinucleótido (por
20 ejemplo, ARNm, ADN genómico) que codifica para CAT2 o ARG1, tal que la presencia del polinucleótido CAT2 o ARG1 es detectada en la muestra biológica. Un agente ejemplar para detectar el ARNm o el ADN genómico correspondiente al gen de CAT2 o ARG1 o la proteína CAT2 o ARG1, es una sonda
25 polinucleotídica marcada capaz de hibridarse a un ARNm de

CAT2 o ARG1 o a un ADN genómico. Las sondas adecuadas para el uso en los ensayos de diagnóstico de la invención son descritas en la presente. Un agente ejemplar para detectar las proteínas CAT2 o ARG1 es un anticuerpo que reconoce
5 específicamente las proteínas CAT2 o ARG1.

Los ensayos de diagnóstico pueden ser también utilizados para cuantificar la cantidad de expresión o actividad de CAT2 o ARG1 en una muestra biológica. Tal cuantificación es útil, por ejemplo, para determinar la
10 progresión o la severidad de una enfermedad inflamatoria tal como el asma, COPD y artritis. Tal cuantificación es también útil, por ejemplo, para determinar la severidad de la enfermedad inflamatoria después del tratamiento.

Los métodos descritos en la presente pueden ser
15 realizados, por ejemplo, mediante la utilización de equipos de diagnóstico preempaquetados que comprenden al menos un polinucleótido sonda o un reactivo de anticuerpo descrito en la presente, que pueden ser convenientemente utilizados, por ejemplo, en escenarios clínicos para diagnosticar a los
20 sujetos que muestran síntomas o historia familiar de una enfermedad inflamatoria tal como asma, COPD y artritis.

Además, cualquier tipo celular o tejido en el cual se exprese CAT2 o ARG1, puede ser utilizado en los ensayos de pronóstico o de diagnóstico descritos en la presente.

Determinación de la Severidad de una Enfermedad Inflamatoria

En el campo de los ensayos de diagnóstico, la invención también proporciona los métodos para determinar la severidad de una enfermedad inflamatoria tal como el asma, COPD y artritis por el aislamiento de una muestra proveniente de un sujeto, la detección de la presencia, la cantidad y/o actividad de CAT2 o ARG1 en la muestra con relación a una segunda muestra proveniente de una muestra normal o muestra control. En una modalidad, los niveles de expresión de CAT2 o ARG1 en las dos muestras son comparados y una disminución incrementada de CAT2 o ARG1 en la muestra de prueba indica una enfermedad inflamatoria tal como el asma, COPD y artritis.

Un agente ejemplar para detectar CAT2 o ARG1 es un anticuerpo capaz de enlazarse a CAT2 o ARG1. En algunos casos, el anticuerpo puede ser acoplado, ya sea directa o indirectamente, a un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o $F(ab')_2$) puede ser utilizado. El término "marcado" con respecto a la sonda o anticuerpo, está destinado a abarcar la marcación directa de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (por ejemplo, enlazando físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como la marcación indirecta de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro agente

que es directamente marcado. Los ejemplos de marcación indirecta incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y la marcación en el extremo de una sonda de ADN con biotina, tal que éste puede ser detectado con estreptavidina fluorescentemente marcada. El término "muestra biológica" está destinado a incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Es decir, el método de detección de la invención puede ser utilizado para detectar el ARNm de CAT2 o ARG1, la proteína o el ADN genómico en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección del ARNm de CAT2 o ARG1 incluyen hibridaciones de Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de CAT2 o ARG1 incluyen los ensayos inmunsorbentes ligados a enzima (ELISAs), transferencias de Western, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección del ADN genómico de CAT2 o ARG1 incluyen hibridaciones de Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de CAT2 o ARG1 incluyen la introducción dentro de un sujeto, de un anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1 marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser marcado con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede ser detectada mediante

técnicas estándares de formación de imagen.

En una modalidad, la muestra biológica contiene moléculas de proteína provenientes del sujeto de prueba. Alternativamente, la muestra biológica puede contener 5 moléculas de ARN provenientes del sujeto de prueba o moléculas de ADN genómico provenientes del sujeto de prueba. En un ejemplo, la muestra biológica es una muestra de tejido aislada por medios convencionales a partir de un sujeto, por ejemplo, una biopsia.

10 *Ensayos de Pronóstico*

El método de diagnóstico descrito en la presente puede además ser utilizado para identificar los sujetos que tienen o que están en riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria, tales como el asma, COPD, y artritis, que está 15 asociado con la expresión o actividad aberrante de CAT2 o ARG1.

Además, los ensayos de pronóstico descritos en la presente pueden ser utilizados para determinar si un sujeto puede ser administrado con un agente (por ejemplo, un 20 agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, polinucleótido, molécula pequeña u otro fármaco candidato), para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria asociada con la expresión o actividad aberrante de CAT2 o ARG1. De este modo, la presente invención proporciona los métodos para 25 determinar si un sujeto puede ser o no efectivamente tratado

con un agente para una enfermedad inflamatoria asociada con la expresión o actividad incrementada de CAT2 o ARG1.

Los ensayos de pronóstico pueden ser considerados para determinar si un sujeto que sufre tratamiento para una enfermedad inflamatoria tiene un pobre pronóstico para la supervivencia a largo plazo o progresión de la enfermedad. En una modalidad, el pronóstico puede ser determinado brevemente después del diagnóstico, por ejemplo dentro de unos pocos días. Al establecer los perfiles de expresión de CAT2 o ARG1 de diferentes etapas de la enfermedad inflamatoria, desde el inicio hasta etapas posteriores, puede surgir un patrón de expresión para correlacionar un perfil de expresión particular a la probabilidad incrementada de un pobre pronóstico. El pronóstico puede ser luego utilizado para considerar un programa de tratamiento más agresivo y aumentar la probabilidad de supervivencia a largo plazo y bienestar a largo plazo.

Detección de Alteraciones Genéticas

Los métodos de la invención pueden ser también utilizados para detectar alteraciones genéticas en el gen CAT2 o ARG1, con lo cual se determina si un sujeto con el gen alterado está en riesgo para daño caracterizado por la regulación aberrante en la actividad de CAT2 o ARG1 o la expresión del polinucleótido. En muchas modalidades, los métodos incluyen la detección, en una muestra de células

provenientes del sujeto, de la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por al menos una alteración que afecta la integridad del gen CAT2 o ARG1, o la expresión aberrante del gen de CAT2 o ARG1. Por ejemplo, tales

5 alteraciones genéticas pueden ser detectadas al averiguar la existencia de al menos uno de los siguientes: 1) supresión de uno o más nucleótidos del gen de CAT2 o ARG1; 2) adición de uno o más nucleótidos al gen de CAT2 o ARG1; 3) sustitución de uno o más nucleótidos del gen de CAT2 o ARG1;

10 4) un arreglo cromosómico del gen de CAT2 o ARG1; 5) alteración en el nivel del transcrito de ARN mensajero del gen de CAT2 o ARG1; 6) modificación aberrante del gen de CAT2 o ARG1, tal como el patrón de metilación del ADN genómico; 7) la presencia del patrón de empalme no de tipo silvestre de un

15 transcrito de ARN mensajero del gen de CAT2 o ARG1; 8) el nivel de tipo no silvestre de CAT2 o ARG1; 9) la pérdida alélica el gen de CAT2 o ARG1; y 10) la modificación post-traducciona l inapropiada de CAT2 o ARG1. Como se describe en la presente, existe un gran número de ensayos conocidos en la

20 técnica, los cuales pueden ser utilizados para detectar las alteraciones en el gen de CAT2 o ARG1. Una muestra biológica ejemplar es una muestra de sangre aislada por medios convencionales de un sujeto.

En ciertas modalidades, la detección de la

25 alteración involucra el uso de una sonda/cebador en una

reacción en cadena de polimerasa (PCR), tal como una PCR de ancla o RACE PCR, o, alternativamente, en una reacción en cadena de ligadura (LCR), la última de las cuales puede ser utilizada para la detección de mutaciones puntuales en el gen de CAT2 o ARG1. Este método puede incluir los pasos de recolectar una muestra de células de un sujeto, aislar un polinucleótido (por ejemplo, genómico, ARN o ambos) a partir de las células de la muestra, poner en contacto la muestra polinucleotídica con uno o más cebadores que se hibridan específicamente al gen de CAT2 o ARG1 bajo condiciones tales que la hibridación y la amplificación del gen de CAT2 o ARG1 (si está presente) ocurre, y detectando la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectando el tamaño del producto de amplificación y comparando la longitud a una muestra control. Se entiende que la PCR y/o la LCR pueden ser deseables para utilizarse como un paso de amplificación preliminar en conjunto con cualquiera de las técnicas utilizadas para la detección de mutaciones descritas en la presente.

Los métodos de amplificación alternativos incluyen: replicación de secuencia auto-sostenida, sistema de amplificación transcripcional, Replicasa Q-Beta, o cualquier otro método de amplificación de polinucleótido, seguido por la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la materia.

Estos esquemas de detección son útiles para la detección de moléculas polinucleotídicas si tales moléculas están presentes en números muy pequeños.

En una modalidad alternativa, las mutaciones en el gen de CAT2 o ARG1 proveniente de una célula muestra, pueden ser identificadas por alteraciones en los patrones de escisión de la enzima de restricción. Por ejemplo, las muestras y el ADN control son aislados, amplificados (opcionalmente), digeridos con una o más endonucleasas de restricción, y los tamaños de la longitud del fragmento son determinados mediante electroforesis en gel, y comparados. Las diferencias en los tamaños de la longitud de los fragmentos entre el ADN muestra y de control indican mutaciones en el ADN de muestra. Además, el uso de ribozimas específicas de la secuencia, puede ser utilizado para calificar la presencia de mutaciones específicas por el desarrollo o pérdida de un sitio de escisión con ribozima.

En otras modalidades, pueden ser identificadas mutaciones genéticas en el gen de CAT2 o ARG1 mediante la hibridación de una muestra y los polinucleótidos de control, por ejemplo, ADN o ARN, a los arreglos de alta densidad que contienen cientos o miles de sondas oligonucleotídicas. Por ejemplo, las mutaciones genéticas en el gen de CAT2 o ARG1 pueden ser identificadas en los arreglos bidimensionales y contienen sondas de ADN generadas por luz. En resumen, un

primer arreglo de hibridación de sondas puede ser utilizado para explorar a través de tramos largos de ADN en una muestra y en el control, para identificar cambios de bases entre las secuencias, mediante la elaboración de arreglos lineales de 5 sondas traslapadas secuenciales. Este paso permite la identificación de las mutaciones puntuales. Este paso es seguido por un segundo arreglo de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas mediante el uso de arreglos de sonda especializados, más pequeños, 10 complementarios a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada arreglo de mutación está compuesto de grupos de sondas paralelas, uno complementario al gen de tipo silvestre y el otro complementario al gen mutante.

En otra modalidad más, cualquiera de una variedad 15 de reacciones de secuenciamiento conocidas en la técnica puede ser utilizada para secuenciar directamente el gen CAT2 o ARG1 y detectar mutaciones al comparar la secuencia del gen de CAT2 o ARG1 de muestra, con la secuencia tipo silvestre correspondiente (control). Se contempla también que 20 cualquiera de una variedad de procedimientos de secuenciamiento automatizados, pueden ser utilizados cuando se llevan a cabo los ensayos de diagnóstico, incluyendo el secuenciamiento mediante espectrometría de masa.

Otros métodos para detectar mutaciones en el gen de 25 CAT2 o ARG1 incluyen los métodos en los cuales la protección

contra los agentes de escisión es utilizada para detectar bases más acopladas en los heterodúplex de ARN/ARN o ARN/ADN (Myers et al., *Science*, 230: 1242, 1985). En general, la técnica de "escisión del mal acoplamiento" comienza mediante la provisión de heterodúplex por hibridación de ARN (marcado) o ADN que contiene la secuencia del gen de CAT2 o ARG1 de tipo silvestre, con el ARN o ADN potencialmente mutantes, obtenidos a partir de una muestra de tejido. Los dúplex de doble hebra son tratados con un agente que rompe las regiones de hebra simple del dúplex que existirán debido a los malos acoplamientos de los pares de bases entre las hebras de control y de muestra. Por ejemplo, los dúplex de ARN/ADN pueden ser tratados con ARNasa e híbridos de ADN/ADN tratados con la nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones mal acopladas. En otras modalidades, los dúplex de ADN/ADN o ARN/ADN pueden ser tratados con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina con el fin de digerir las regiones mal acopladas. Después de la digestión de las regiones mal acopladas, el material resultante es luego separado por tamaño sobre geles de poliacrilamida de desnaturalización para determinar el sitio de la mutación. En una modalidad, el ADN o ARN control puede ser marcado para la detección.

En otra modalidad más, la reacción de escisión de mal acoplamiento emplea una o más proteínas que reconocen los pares de bases mal acoplados en el ADN de doble hebra

(llamadas enzimas de "reparación de mal acoplamiento de ADN") en sistemas definidos para detectar y trazar el mapa de las mutaciones puntuales en los cADNs de CAT2 o ARG1 obtenidos a partir de las muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* rompe A en los malos acoplamientos G/A y la timidina-ADN-glucosilasa proveniente de células HeLa rompe T en los malos acoplamientos G/T. De acuerdo a una modalidad ejemplar, un sonda basada en la secuencia de CAT2 o ARG1, por ejemplo, una secuencia del gen de CAT2 o ARG1 de tipo silvestre, es hibridada al ADNc u otro producto de ADN proveniente de una o varias células de prueba. El dúplex es tratado con una enzima de reparación del mal acoplamiento de ADN, y los productos de escisión, si los hay, pueden ser detectados a partir del protocolo de electroforesis o similares. Ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,459,039.

En otras modalidades, las alteraciones en la movilidad electroforética serán utilizadas para identificar las mutaciones en el gen de CAT2 o ARG1. Por ejemplo, el polimorfismo de la conformación de la hebra simple (SSCP) puede ser utilizado para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre los oligonucleótidos mutantes y de tipo silvestre. Los fragmentos de ADN de hebra simple y los polinucleótidos de CAT2 o ARG1 de muestra y de control, serán desnaturalizados y se dejarán renaturalizar. La estructura

secundaria de los polinucleótidos de una sola hebra varía de acuerdo a la secuencia. La alteración resultante en la movilidad electroforética hace posible la detección incluso de un cambio de base simple. Los fragmentos de ADN pueden
5 ser marcados o detectados con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede ser aumentada mediante el uso de ARN (en vez de ADN) en el cual la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una modalidad, el presente método utiliza el análisis de heterodúplex para
10 separar las moléculas heterodúplex de doble hebra con base en los cambios en la movilidad electroforética (Keen et al., *Trends Genet.* 7: 5-7, 1991).

En otra modalidad más, el movimiento de los fragmentos mutantes o de tipo silvestre en los geles de
15 poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturizador, es evaluado utilizando electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (DGGE por sus siglas en ingles). Cuando se utiliza DGGE como el método de análisis, el ADN será modificado para asegurar que éste no se
20 desnaturalice completamente, por ejemplo, mediante la adición de una pincha de GC de aproximadamente 40 pares de bases de ADN rico en GC, de alto punto de fusión, mediante PCR. En una modalidad adicional, se utiliza un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de desnaturalización
25 para identificar las diferencias en la movilidad del ADN

control y de muestras (Rosenbaum y Reissner, *Biophys. Chem.* 265: 12753, 1987).

Los ejemplos de otras técnicas para detectar las mutaciones puntuales incluyen, pero no están limitados a, hibridación selectiva del oligonucleótido, amplificación selectiva, o extensión selectiva de cebador. Por ejemplo, los cebadores oligonucleotídicos pueden ser preparados, en los cuales es colocada la mutación conocida centralmente, y luego hibridados al ADN objetivo bajo condiciones que permiten la hibridación únicamente si es encontrado un acoplamiento perfecto (Saiki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.*, 86: 6230, 1989). Tales oligonucleótidos específicos de alelo son hibridados al objetivo amplificado por PCR, o un número de diferentes mutaciones cuando los oligonucleótidos son acoplados a la membrana de hibridación e hibridados con el ADN objetivo marcado.

Alternativamente, la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación selectiva por PCR, puede ser utilizada en conjunto con la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación depende de la hibridación diferencial) o en el extremo 3' de un cebador donde, bajo condiciones apropiadas, el mal acoplamiento puede prevenir o reducir la extensión de

polimerasa. Además, puede ser deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear detección basada en la escisión. Se anticipa que en ciertas modalidades la amplificación puede ser también realizada
5 utilizando la ligasa Taq para la amplificación. En tales casos, la ligadura ocurrirá únicamente si existe un acoplamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5', haciendo posible detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico, al buscar la presencia o
10 ausencia de amplificación.

Monitoreo de los Efectos Durante las Pruebas Clínicas

El monitoreo de la influencia de los agentes (por ejemplo, fármacos, moléculas pequeñas, proteínas, nucleótidos) sobre la expresión o actividad de CAT2 o ARG1,
15 puede ser aplicado no solamente en la clasificación básica de fármaco, sino también en pruebas clínicas. Por ejemplo, la efectividad de un agente determinada por un ensayo de clasificación, como se describe en la presente para disminuir la expresión de CAT2 o ARG1, los niveles de proteína, o
20 subregular la actividad de CAT2 o ARG1, puede ser monitorizada en pruebas clínicas de sujetos que muestran expresión incrementada de CAT2 o ARG1, niveles de proteínas incrementados o actividad suprarregulada de CAT2 o ARG1. En tales pruebas clínicas, la expresión o la actividad de CAT2 o
25 ARG1 puede ser utilizada como una "lectura" del fenotipo de

un tejido particular.

Por ejemplo, para estudiar el efecto de los agentes sobre el daño asociado a CAT2 o ARG1 en una prueba clínica, las células pueden ser aisladas y el ARN preparado y
5 analizado para los niveles de expresión de CAT2 o ARG1. Los niveles de expresión de genes pueden ser cuantificados mediante análisis de transferencia de Northern, RT-PCR, análisis GeneChip® o Taqman como se describe en la presente, o alternativamente mediante la medición de la cantidad de
10 proteína producida, mediante uno de los métodos como se describen en la presente, o mediante la medición de los niveles de actividad de CAT2 o ARG1. De esta manera, el nivel de expresión del gen puede servir como una lectura, indicadora de la respuesta fisiológica de las células al
15 agente. En consecuencia, este estado de respuesta puede ser determinado antes del tratamiento y en diversos puntos durante el tratamiento del individuo con el agente.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para monitorizar la efectividad del tratamiento de
20 un sujeto con un agente (por ejemplo, un antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, polinucleótido, molécula pequeña, u otro fármaco candidato identificado por los ensayos de selección descritos en la presente) incluyendo los pasos de (i) obtener una muestra de pre-administración a
25 partir de un sujeto, antes de la administración del agente;

(ii) detectar el nivel de la expresión de la proteína CAT2 o ARG1 o el ARNm en la muestra pre-administración; (iii) obtener una o más muestras post-administración provenientes del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión de la proteína de CAT2 o ARG1 o el ARNm en las muestras post-administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad de la proteína CAT2 o ARG1 o el ARNm de los mismos en la muestra pre-administración, con el nivel de expresión o actividad de la proteína o ARNm de CAT2 o ARG1 de la muestra o muestras post-administración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consecuencia. Por ejemplo, la administración disminuida del agente puede ser deseable para incrementar la expresión o actividad de CAT2 o ARG1 a niveles más altos que aquellos detectados, por ejemplo, para disminuir la efectividad del agente. De acuerdo a tal modalidad, la expresión o actividad de CAT2 o ARG1 puede ser utilizada como un indicador de la efectividad de un agente, incluso en ausencia de una respuesta fenotípica observable.

20 *Métodos de Tratamiento*

La presente invención proporciona los métodos profilácticos y terapéuticos de tratamiento de un sujeto en riesgo de, susceptible a o diagnosticado con una enfermedad inflamatoria, tal como asma, COPD, osteoartritis y artritis reumatoide. Con respecto a los métodos profilácticos y

terapéuticos de tratamiento, tales tratamientos pueden ser específicamente diseñados o modificados, con base en el conocimiento obtenido a partir del campo de la farmacogenómica. "Farmacogenómica", como se utiliza en la presente, incluye la aplicación de las tecnologías genómicas tales como secuenciamiento de genes, genética estadística, y análisis de expresión de genes para los fármacos en desarrollo clínico y en el mercado. Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo los genes de un sujeto determinan su respuesta a un fármaco (por ejemplo, un "fenotipo de respuesta al fármaco" del sujeto o "genotipo de respuesta al fármaco"). De este modo, otro aspecto más de la invención proporciona los métodos para diseñar a la medida un tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo con moduladores de CAT2 o ARG1, de acuerdo a la respuesta del individuo hacia el fármaco. La farmacogenómica permite que un médico o clínico dirija los tratamientos profilácticos o terapéuticos a sujetos quienes se beneficiarán más del tratamiento, y evitarán el tratamiento de los sujetos quienes experimentarán efectos colaterales tóxicos relacionados al fármaco.

Métodos Profilácticos

En un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir los procesos patogénicos relacionados a CAT2 o ARG1, en un sujeto, al administrarle al sujeto un agente que

modula la expresión o la actividad de CAT2 o ARG1.

Los sujetos en riesgo de una enfermedad inflamatoria, tal como asma, que está asociada con expresión o actividad aberrante de CAT2 o ARG1, pueden ser
5 identificados por ejemplo, mediante cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico como se describen en la presente.

La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas
10 característicos de la expresión incrementada de la proteína CAT2 o ARG1, tal que es prevenida la enfermedad o, alternativamente, es retrasada su progresión. Dependiendo del tipo de aberrancia de CAT2 o ARG1 (por ejemplo, típicamente una modulación fuera de la desviación estándar
15 normal), una proteína mutante de CAT2 o ARG1, un agente antagonista de la proteína CAT2 o ARG1, un anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1, o el polinucleótido antisentido CAT2 o ARG1 por ejemplo, puede ser utilizado para tratar al sujeto. El agente apropiado puede ser determinado con base en ensayos de
20 clasificación descritos en la presente.

Métodos Terapéuticos

Otro aspecto más de la invención pertenece a los métodos para modular la expresión o la actividad de la proteína CAT2 o ARG1 para fines terapéuticos. En
25 consecuencia, en una modalidad ejemplar, el método modulador

de la invención involucra poner en contacto una célula con un agente que inhiba la expresión de CAT2 o ARG1 o una o más de las actividades de la proteína CAT2 o ARG1 asociadas con la célula. Un agente que modula la
5 expresión de CAT2 o ARG12 o la actividad de la proteína puede ser un agente como se describe en la presente, tal como un polinucleótido, un polipéptido, o un polisacárido, una molécula diana de origen natural de la proteína CAT2 o ARG1 (por ejemplo, un
10 sustrato receptor de la proteína CAT2 o ARG1), un anticuerpo anti-CAT2 o anti-ARG1, un antagonista de la proteína CAT2 o ARG1, un peptidomimético de un antagonista de la proteína CAT2 o ARG1, u otra molécula orgánica e inorgánica pequeña.

15 Estos métodos moduladores pueden ser realizados in vivo (por ejemplo, mediante la administración del agente a un sujeto). Como tal, la presente invención proporciona los métodos para tratar a un individuo diagnosticado con o en riesgo
20 de la enfermedad inflamatoria caracterizado por expresión o actividad aumentada de CAT2 o ARG1. En una modalidad, el método involucra administrar un agente (por ejemplo, un agente identificado por un ensayo de selección descrito en la presente) o la
25 combinación de agentes que subregula la expresión o actividad

de CAT2 o ARG1. El tratamiento puede ser además localizado hacia los tejidos o células afectadas por la enfermedad inflamatoria.

Farmacogenómica

5 En conjunto con el tratamiento para las enfermedades inflamatorias, tales como el asma, COPD, y artritis, el uso de un modulador de CAT2 o ARG1, la farmacogenómica (por ejemplo, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a
10 un compuesto o fármaco extraño) puede ser considerada. Las diferencias en el metabolismo de los agentes terapéuticos pueden conducir a toxicidad severa o falla terapéutica por la alteración de la relación entre la dosis y la concentración sanguínea del fármaco farmacológicamente activo. De este
15 modo, un médico o clínico puede considerar aplicar el conocimiento obtenido en los estudios farmacogenómicos relevantes para determinar si se administra o no un modulador de CAT2 o ARG1 así como el diseño o la medida del régimen de dosificación y/o régimen terapéutico de tratamiento con el
20 modulador de CAT2 o ARG1.

La farmacogenómica tiene que ver con las variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a los fármacos, debido a la disposición alterada del fármaco y a la acción anormal en personas afectadas. En
25 general, pueden ser diferenciados dos tipos de condiciones

farmacogenéticas. Las condiciones genéticas transmitidas como un solo factor que alteran la manera en que los fármacos actúan sobre el cuerpo (acción alterada del fármaco) o las condiciones genéticas transmitidas como factores
5 simples que alteran la manera en que el cuerpo actúa sobre los fármacos (metabolismo alterado del fármaco). Estas condiciones farmacogenéticas pueden ocurrir ya sea como defectos genéticos raros o como polimorfismos de origen natural. Por ejemplo, la
10 deficiencia en la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía heredada común en la cual la complicación clínica principal es la hemólisis después de la ingestión de fármacos oxidantes (anti-malariales, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos)
15 y el consumo de frijoles fava.

Un procedimiento farmacogenómico para identificar los genes que predicen la respuesta al fármaco, conocida como "asociación de amplio genoma", confía principalmente en un mapa de alta resolución
20 del genoma humano, que consiste de los sitios relacionados al gen, ya conocidos (por ejemplo, un mapa marcador del gen "bi-alélico" que consiste de 60,000 a 100,000 sitios polimórficos o variables sobre el genoma humano, cada uno de los cuales tiene
25 dos variantes). Tal mapa genético de alta resolución

puede ser comparado a un mapa del genoma de cada uno de un número estadísticamente sustancial de sujetos que toman parte en una prueba farmacológica de Fase II/III para identificar los genes asociados con una
5 respuesta al fármaco observada, particular o un efecto colateral. Alternativamente, tal mapa de alta resolución puede ser generado a partir de una combinación de aproximadamente diez millones de polimorfismos de nucleótidos simples conocidos (SNPs)
10 en el genoma humano. Como se utiliza en la presente, un "SNP" es una alteración común que ocurre en una base nucleotídica simple en un tramo de ADN. Por ejemplo, un SNP puede ocurrir una vez cada 1000 bases de ADN. Un SNP puede estar involucrado en un proceso
15 de enfermedad. No obstante, la vasta mayoría de SNPs puede no estar asociada a la enfermedad. Dado un mapa genético basado en la aparición de tales SNPs, los individuos pueden ser agrupados en categorías genéticas dependiendo de un patrón particular de SNPs
20 en su genoma individual. De tal manera, los regímenes de tratamiento pueden ser diseñados a la medida para grupos de individuos genéticamente similares, tomando en cuenta los rasgos que pueden ser comunes entre tales individuos genéticamente
25 similares.

Alternativamente, un método denominado el "procedimiento de gen candidato", puede ser utilizado para identificar los genes que predicen la respuesta al fármaco. De acuerdo a este método, si un gen que codifica para un fármaco objetivo es conocido (por ejemplo, el gen de CAT2 o ARG1), todas las variantes comunes de ese gen pueden ser claramente fácilmente identificadas en la población, y pueden ser determinadas si se tiene una versión del gen versus otro más que está asociado con una respuesta particular al fármaco.

Como una modalidad alternativa, la actividad de las enzimas que metabolizan los fármacos, es un determinante mayor de la intensidad y de la duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de los polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan el fármaco (por ejemplo, N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y las enzimas del citocromo P450, a saber, CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación respecto a porqué algunos sujetos no obtienen los efectos farmacéuticos esperados o muestran respuesta exagerada al fármaco y toxicidad sería después de tomar la dosis estándar y segura de un fármaco. Estos polimorfismos son expresados en dos fenotipos en la población, el metabolizador extenso y el metabolizador pobre. La prevalencia de los fenotipos de metabolizador pobre es diferente entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica para CYP2D6 es

altamente polimórfico y han sido identificadas varias mutaciones de los metabolizadores pobres, que conducen todos a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores pobres de CYP2D6 y CYP2SC19 experimentan muy frecuentemente
5 respuesta exagerada al fármaco y efectos colaterales exagerados, cuando éstos reciben dosis estándares. Si un metabolito es la porción terapéutica activa, los metabolizadores pobres no muestran respuesta terapéutica, como es demostrado para el efecto analgésico de la codeína
10 mediado por su metabolito formado por CYP2D6, la morfina. El otro extremo son los denominados metabolizadores ultra rápidos que no responden a dosis estándares. Recientemente, ha sido identificada la base molecular del metabolismo ultra rápido la cual es debida a la amplificación del gen CYP2D6.

15 Alternativamente, puede ser utilizado un método denominado el "perfilamiento de la expresión del gen" para identificar los genes que permiten la respuesta del fármaco. Por ejemplo, la expresión del gen de un animal dosificado con un fármaco (por ejemplo, la expresión de CAT2 o ARG1 en
20 respuesta a un modulador de CAT2 o ARG1) puede dar una indicación de si las vías génicas relacionadas a la toxicidad han sido o no encendidas.

La información generada a partir de más de uno de los procedimientos farmacogenómicos anteriores, puede ser
25 utilizada para determinar los regímenes apropiados de

dosificación y tratamiento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo. Este conocimiento, cuando es aplicado a la dosificación o a la selección del fármaco, puede evitar reacciones adversas o falla terapéutica, y de este modo aumentar la eficiencia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con el modulador de CAT2 o ARG1.

Composiciones Farmacéuticas

La invención es además dirigida a las composiciones farmacéuticas que comprenden un modulador de CAT2 o ARG1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se utiliza en la presente el enunciado "portador farmacéuticamente aceptable" está destinado a incluir cualesquiera y todos los solventes, solubilizadores, rellenos, estabilizadores, aglutinantes, absorbentes, bases, agentes amortiguadores, lubricantes, vehículos de liberación controlada, diluyentes, agentes emulsificantes, humectantes, lubricantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos o antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas, es bien conocido en la técnica. Excepto en cuanto a que cualquier medio o agente convencional sea compatible con el compuesto activo, el uso del mismo en las composiciones es contemplado. Los agentes suplementarios

pueden ser también incorporados dentro de las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención es formulada para ser compatible con su ruta pretendida de administración. Los ejemplos de rutas de administración

5 incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación, sublingual, bronquial y pulmonar), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas

10 para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea puede incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes

15 sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; amortiguadores tales como

20 acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser encerrada en

25 ampollitas, jeringas desechables o frascos de dosis

múltiples elaborados de vidrio o de plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables, estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL^{MR} (BASF, Parippany, NJ) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición inyectable debe ser estéril y debe ser fluida al grado en que exista el fácil manejo con jeringa. Esta debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio solvente o dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y por el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser

lograda mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, los agentes isotónicos, tales como el
5 cloruro de sodio, azúcares o polialcoholes (por ejemplo, manitol, sorbitol) pueden ser incluidos en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser originada por la inclusión en la composición, de un agente que retrasa
10 la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectadas estériles pueden ser preparadas mediante la incorporación del modulador activo de CAT2 o ARG1 en la cantidad
15 requerida, en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido por la esterilización por filtración. En general, las dispersiones son preparadas mediante la incorporación del compuesto
20 activo dentro de un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de
25 preparación ejemplares son el secado a vacío y la

liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo, previamente esterilizada por filtración.

5 Las composiciones orales incluyen en general un diluyente inerte o un portador comestible. Éstas pueden ser encerradas en cápsulas de gelatina o comprimidas en tabletas. Para los fines de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede ser incorporado con excipientes y
10 utilizado en la forma de tabletas, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales pueden ser preparadas también utilizando un portador fluido para el uso como un lavado bucal, en donde el compuesto en el portador fluido es aplicado oralmente y enjuagado y expectorado o tragado. Los agentes aglutinantes
15 farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal
20 como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente desintegrador tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Stertes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente
25 endulzante tal como sucrosa o sacarina; o un agente

saborizante tal como menta, salicilato de metilo o sabor naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos pueden ser distribuidos en la forma de un rocío de aerosol a partir de un recipiente o surtidor presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, un nebulizador, un inhalador bronquial o una gota nasal. Además, los compuestos pueden estar en la forma de una solución líquida, un gel, o un producto seco.

10 Las formulaciones para inhalación pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, éter polioxietilen-9-laurílico, glicocolato y desoxicolato. Las formulaciones para inhalación pueden también contener excipientes tales como lactosa, si es necesario. Un nebulizador puede ser una

15 suspensión acuosa o solución que incluye portadores o excipientes para ajustar el pH y/o la tonicidad.

En una modalidad, las porciones terapéuticas las cuales pueden contener un compuesto bioactivo, son preparadas con portadores que protegerán al compuesto contra la

20 eliminación rápida desde el cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de distribución microencapsulados. Los polímeros biocompatibles, biodegradables, pueden ser utilizados, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido

25 poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido

poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán aparentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales pueden también ser obtenidos comercialmente a partir de, por ejemplo, Alza Corporation y
 5 Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a las células infectadas con anticuerpos monoclonales para los antígenos virales) pueden ser también utilizadas como portadores farmacéuticamente aceptables. Éstos pueden ser preparados de acuerdo a los
 10 métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,522,811.

En una modalidad, las composiciones orales o parenterales formuladas en forma de dosis unitaria son
 15 empleadas para facilidad de administración o uniformidad de dosificación. La forma de dosis unitaria como se utiliza en la presente, incluye unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que va a ser tratado; cada unidad contiene una unidad predeterminada del compuesto
 20 activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéuticamente aceptable. La especificación de las formas de dosis unitaria de la invención es dictada por y directamente dependiente de las características únicas del compuesto activo y del efecto
 25 terapéutico particular que va a ser logrado, y las

limitaciones inherentes en la técnica de composición, tal como un compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales
5 compuestos pueden ser determinadas mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para la determinación de la LD_{50} (la dosis letal a 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La
10 proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede ser expresada como la proporción LD_{50}/ED_{50} . Los compuestos que muestran índices terapéuticos grandes, pueden ser seleccionados. Mientras que los compuestos que muestran efectos colaterales tóxicos
15 pueden ser utilizados, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija tales compuestos al sitio objetivo afectado, con el fin de reducir al mínimo el daño potencial a las células no infectadas y, con esto, reducir los efectos colaterales.

20 Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios animales, pueden ser utilizados en la formulación de una gama de dosis para el uso en humanos. En muchos casos, la dosis de tales compuestos cae dentro de un intervalo de concentraciones de circulación que incluye la
25 ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar

dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosis empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática en circulación que incluya la IC50 (por ejemplo, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media máxima de los síntomas) como es determinado en el cultivo celular. Tal información puede ser utilizada para determinar de manera más precisa las dosis útiles en los humanos. Los niveles en plasma pueden ser medidos, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

El régimen de dosificación para la administración de una composición farmacéutica de la presente invención puede ser determinado por el médico que atiende con base en diversos factores tal como el tipo de enfermedad, el sitio de la patología, la severidad de la enfermedad, la edad del paciente, el sexo y la dieta, la severidad de la inflamación, el tiempo de administración y otros factores clínicos. En una modalidad, la administración inhalativa, sistémica o inyectable puede ser iniciada a una dosis que es mínimamente efectiva, y la dosis será incrementada en un periodo de tiempo pre-seleccionado hasta que se observe un efecto

positivo. Subsecuentemente, incrementos cada vez mayores en las dosis serán realizados limitándose a los niveles que produzcan un incremento correspondiente en el efecto, al tiempo que se tome en cuenta cualesquiera efectos adversos
5 que puedan aparecer. La adición de otros factores conocidos a una composición final puede también afecta la dosificación. El progreso puede ser monitorizado por evaluación periódica de la progresión utilizando métodos estándares.

Una composición farmacéutica de la presente
10 invención puede ser administrada en una dosis o dosis múltiples. Las dosis pueden ser administradas a cualesquiera intervalos deseables. En una modalidad, cada dosis incluye aproximadamente 0.1 µg-100 mg, 1 µg-10 mg, 10 µg-1 mg, o 100 µg-500 µg de un agente terapéutico activo. La dosis por
15 debajo de 0.1 µg o mayores de 100 mg pueden ser también utilizadas. El volumen de cada dosis puede estar en el intervalo de, por ejemplo, entre 0.1 ml y 5 ml, entre 0.1 ml y 1 ml, o entre 0.2 ml y 0.5 ml.

Las composiciones farmacéuticas de la presente
20 invención pueden ser incluidas en un recipiente, paquete o surtidor junto con las instrucciones para la administración.

Equipos

La invención también abarca los equipos para detectar la presencia de un producto del gen de CAT2 o ARG1
25 en una muestra biológica. El equipo puede comprender

reactivos para evaluar la expresión de CAT2 o ARG1 a nivel de nucleótido o de proteína. En una modalidad, los reactivos pueden ser un anticuerpo o fragmento del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se enlaza específicamente a CAT2 o ARG1. Por ejemplo, los anticuerpos de interés pueden ser preparados mediante los métodos conocidos en la técnica. Opcionalmente, los equipos pueden comprender una sonda polinucleotídica en donde la sonda se enlaza específica a un polinucleótido transcrito correspondiente al gen de CAT2 o ARG1. El equipo puede contener medios para determinar la cantidad de proteína CAT2 o ARG1 o el ARNm del mismo en la muestra, y los medios para comparar la cantidad de la proteína CAT2 o ARG1 o el ARNm en la muestra, con un control estándar. El compuesto o agente puede ser empaquetado en un recipiente adecuado. El equipo puede comprender además las instrucciones para utilizar el equipo para detectar la proteína o polipéptido CAT2 o ARG1.

La invención proporciona además los equipos para evaluar la adecuación de cada uno de la pluralidad de compuestos para inhibir una enfermedad inflamatoria en un sujeto. Tales equipos incluyen una pluralidad de compuestos que van a ser probados,

y un reactivo (por ejemplo, anticuerpo específico para las proteínas correspondientes o una sonda o cebador específico para polinucleótidos correspondiente) para evaluar la expresión de CAT2 o ARG1.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Cambios en la expresión de genes en pulmón de ratón, asociado con la reacción alérgica

Se obtuvieron ratones Balb/c (de 6 a 8 semanas de edad) de Jackson Laboratories. Todos los animales
10 utilizados en este estudio fueron alojados en una instalación ambientalmente controlada, libre de patógenos bajo campanas de flujo laminar. Todos los experimentos se conformaron a los principios para la investigación con animales de laboratorio como se
15 describe en el Acta de Bienestar Animal y el Departamento de Salud, lineamientos de Educación y Bienestar (NIH) (Animal Welfare Act and the Department of Health, Education and Welfare guidelines) para el uso experimental de animales.

20 Ratones Balb/c fueron inmunizados mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de 10 µg de OVA (Sigma, Saint Louis, MO) en 200 µl de PBS en el día 0. En los días 14 y 25 los ratones fueron anestesiados con una mezcla de quetamina y xilazina
25 (45 y 8 mg/kg, respectivamente) y retados

intratraquealmente con 50 μ l de una solución al 1.5% de OVA o un volumen equivalente de PBS. Los ratones fueron inyectados i.p. ya sea con 100 μ l de PBS, hIgG (400 μ g/ml) o sIL-13 α 2-Fc (400 μ g/ml) en los días 24, 5 25, y 27. La purificación de hIgG fue llevada de acuerdo a Urban et al., *Immunity* 8(2): 255-645, 1998. Los pulmones fueron recolectados y congelados para el aislamiento del ARN en el día 28.

Para identificar los cambios en la 10 concentración del ARNm dependiente de la transducción de la señal mediada por IL-13, dos de los ratones retados con OVA fueron tratados con tres inyecciones intraperitoneales de la proteína de fusión del receptor de IL-13 soluble, sIL-13 α 2-Fc, antes de y 15 durante el curso del reto alérgico. Como el control para la porción Fc de la proteína de fusión del receptor, dos de los ratones retados con OVA fueron similarmente tratados con la administración intraperitoneal de hIgG. Un segundo grupo de ratones 20 control fueron similarmente sensibilizados a OVA sin reto subsecuente y tratados en un curso de tiempo idéntico con la administración intratraqueal de amortiguador de PBS, ya sea solo (n=2) o con inyección intraperitoneal de hIgG (n=2) o sIL-13 α 2-Fc (n=2). El tejido pulmonar para los ratones

control retados con OVA y con amortiguador solo fue cosechado a las 78 horas después del segundo reto con antígeno pulmonar (día 28).

La IL-13 murina recombinante (mIL-13; 5 µg en un volumen final de 50 µl) se administró diariamente por tres días mediante instilación intratraqueal a ratones Balb/c intactos o ratones deficientes en Stat 6 que habían sido anestesiados con una mezcla de quetamina y xilazina (45 y 8 mg/kg, respectivamente). Los pulmones fueron recolectados y congelados en hielo seco a las 72 horas después de la administración inicial de IL-13.

El tejido pulmonar de ratón, congelado, fue pulverizado utilizando mortero y mano de mortero con nitrógeno líquido enfriado, suspendido en 6 ml de isotiocianato de guanidinio/0.7% de β-mercaptoetanol (GTC/ME) y sonificado con pulso por 2 minutos. La suspensión del tejido fue extraída dos veces con fenol equilibrado con ácido (equipo de ARN Total Promega) y el ácido nucleico precipitado con un volumen igual de isopropanol. El botón celular fue resuspendido en 0.8 ml de GTC/ME, reextraído dos veces con un volumen igual de fenol ácido y una vez con cloroformo. El ARN fue precipitado con etanol, suspendido en agua tratada con I DEPC y cuantificado por la OD₂₈₀.

El ADNc fue sintetizado a partir de 10 µg del ARN

total utilizando el equipo Superscript (BRL) con la modificación descrita con detalle previamente (Byrne et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (New York), 2000). La síntesis de la primera hebra se
5 llevó a cabo a 50°C para prevenir la mala cebadura a partir del ARN ribosomal y utilizó un promotor de ARN-polimerasa T7 que contenía el cebador poli-T (T7T24) para la amplificación subsecuente del ARN antisentido (ARNc) *in vitro* y marcación con biotina. El ADNc fue purificado utilizando esferas
10 terminadas con grupo carboxilo BioMag (Polysciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se eluyó en 48 µl de acetato de sodio 10 mM, pH 7.8.

Las reacciones de transcripción impulsadas por polimerasa T7 *in vitro* para la síntesis y marcación con
15 biotina del ARNc antisentido, la purificación de columna giratoria Qiagen Rneasy y la fragmentación del ARNc se llevaron a cabo como se describe anteriormente (*supra*). Las mezclas de hibridación GeneChip contenían 10 µg de ARNc fragmentado, 0.5 mg/ml de BSA acetilado, 0.1 mg/ml de ADN de
20 esperma de arenque, en amortiguador MES 1x en un volumen total de 200 µl siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mezclas de reacción fueron hibridadas por 18 horas a 45°C a arreglos de oligonucleótidos Affymetrix MullKsubA y MullKsubB. Las mezclas de hibridación fueron removidas y los
25 arreglos fueron lavados y teñidos con Estreptavidina-R-

ficoeritrina (Molecular Probes) utilizando GeneChip Fluidity Station 400 (Affymetrix) y exploradas con un Explorador (escáner) Hewlett Packard GeneArray siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos de fluorescencia
5 fueron recolectados y convertidos a promedios de diferencia específica de genes utilizando el software MicroArray Suite 4.0.

Una curva estándar de once miembros, comprendida de fragmentos de genes derivados de las secuencias bacterianas y
10 de bacteriófagos, clonadas, fueron introducidos dentro de cada mezcla de hibridación a concentraciones en el intervalo de 0.5 pM a 150 pM, representando frecuencias de ARN de aproximadamente 3.3 a 1000 partes por millón (ppm), asumiendo un tamaño promedio del transcrito de 2 kb. Los fragmentos
15 biotinilados de la curva estándar fueron sintetizados mediante la reacción IVTA impulsada por la polimerasa T7 a partir de plantillas basadas en plásmido (*supra*). Los fragmentos de ARN biotinilados, clavados sirven como un estándar interno para evaluar la sensibilidad del chip y como
20 una curva estándar para convertir los promedios de diferencia de fluorescencia medidos, provenientes de los genes individuales, a frecuencias de ARN en ppm. La diferencia promedio en la fluorescencia entre el acoplamiento perfecto y los grupos de sonda de mal acoplamiento simple que contienen
25 oligonucleótidos específicos del gen, se utilizaron para

determinar los valores de frecuencia con respecto a la curva estándar puntiaguda. Además, un segundo grupo de algoritmos basados principalmente en la fracción de pares de sondas respondedoras positivas o negativas, individuales, se utiliza para evaluar la presencia o ausencia absoluta del producto génico (Lockhart et al., *Nat. Biotechnol.* 14: 1850-1856, 1996). La sensibilidad del chip de microarreglo individual es ajustada a un medio de la concentración mínima a la cual 2 de cualesquiera 3 plantillas clavadas en la curva estándar adyacentes, son llamadas presentes. La regresión lineal de la curva estándar es forzada hasta cero y la frecuencia mínima del gen reportado es ajustada a la sensibilidad del GeneChip® individual.

Múltiples réplicas independientes para cada una de las condiciones experimentales de tratamiento o de control se midieron, y los datos de expresión sujetos a análisis estadístico rutinario en un esfuerzo para eliminar los falsos positivos. Los valores de frecuencia determinados a partir de las mediciones individuales para un grupo experimental dado fueron inicialmente comparados utilizando el software Excel. Los valores promedio para el tratamiento y los animales control fueron comparados para obtener el cambio porcentual promedio (AFC). Las pruebas T de Student de dos colas fueron calculadas utilizando ya sea la co-varianza desigual con valores de frecuencia brutos o co-varianza igual

con valores de frecuencia transformados por logaritmo. En este trabajo, únicamente son reportados aquellos genes que varían en AFC más de 2 veces acoplados a una prueba T de Student $P < 0.05$ en al menos una de las condiciones experimentales. Los grupos de genes establecidos por los criterios de AFC doble > 2 veces y la Prueba t $P < 0.05$, fueron subsecuentemente editados para remover los genes llamados ausentes en la mayoría de los archivos de prueba y para eliminar la redundancia debida a los genes enlosados múltiples veces sobre los arreglos de oligonucleótidos MullKsubA y subB. Finalmente, fueron eliminados los genes para los cuales la frecuencia de expresión promedio de los animales tratados fue menor de 2 veces más alta que el promedio de los controles solos con amortiguador, interexperimentales.

El GeneChip® 11K subA y subB murino permitió la interrogación de más de 13,000 genes murinos, ESTs y secuencias control. Los arreglos de oligonucleótidos respondieron con una sensibilidad promedio de 13 ppm y 12 ppm para los arreglos de oligonucleótidos MullKsubA y subB respectivamente. La calidad del ARN purificado y el producto de ADNc derivado fue monitorizada mediante comparación de la proporción de frecuencias calculadas para la actina y

los tres grupos de tratamiento utilizados para identificar la expresión del gen inducida por el reto con alérgeno (como se muestra en la Tabla 3) fue bien balanceada con respecto a la integridad del ARNm, el número de genes llamados presentes y la frecuencia del ARNm total computada a través de los diversos archivos de control y de tratamiento.

Tabla 3. Resumen del Balance de ARN

10

	Balb/C 72 hr (IL-13)		STAT6 72 hr (IL-13)		Balb/C 72 hr (OVA)		
	Control N=5	IL-13 N=6	Control N=4	IL-13 N=5	Control N=6	OVA N=4	OVA+ α Fc13Ra2 N=2
Proporción promedio 5'/3' de ARN	0.90	0.77	0.88	0.80	0.76	0.78	0.80
# de Genes Presentes	5396 $\pm$ 813	4984 $\pm$ 568	5553 $\pm$ 475	5422 $\pm$ 5143	5143 $\pm$ 285	5352 $\pm$ 568	5210 $\pm$ 394
Frecuencia Total ¹	450 $\pm$ 101	581 $\pm$ 131	482 $\pm$ 80	539 $\pm$ 174	447 $\pm$ 83	414 $\pm$ 52	480 $\pm$ 89

¹ Frecuencia total promedio de todos los genes llamados Presentes en al menos 1 archivo ($\times 10^{-3}$).

El perfil de expresión de gen. medido para los ratones control tratados con PBS. no fue significativamente alterado por la co-administración intraperitoneal de IgG humana o sIL-13R α 2-Fc, y de este modo los valores de frecuencia a partir de seis ratones control fueron combinados como un grupo simple en el cálculo de los valores de expresión de línea base no tratados, promedio. Similarmente, los cuatro ratones retados con OVA tratados ya sea con la co-administración intraperitoneal de amortiguador o hIgG, fueron combinados como un grupo simple en el cálculo de los valores

de frecuencia promedio para la frecuencia de ARNm pulmonar retado con el alérgeno. La comparación de las frecuencias de ARNm pulmonar promedio entre los seis ratones control tratados con PBS y cuatro 5 ratones retados con OVA, identificaron 246 secuencias enlosadas en las cuales el AFC fue doble o mayor. De este grupo de genes, 132 cumplieron los segundos criterios de selección de $P < 0.05$ y se muestran en la Tabla 4 siguiente.

10 Tabla 4. Resumen de los Cambios de Expresión de Genes

	Balb/C 72 hr IL-13 v. PBS	STAT6 72 hr IL-13 v. PBS	Balb/C 72 hr OVA v. PBS	PBS STAT 6 v. Balb/C
# de Genes Presentes*	5306 ± 615	5480 ± 536	5224 ± 386	5472 ± 622
Frecuencia Total†	522 ± 130	514 ± 136	441 ± 72	466 ± 86
<2X AFC‡	279	28	246	43
P<0.05§	288	5	344	54
2X AFC + P<0.05	136	0	132	1

15

* Número total de transcritos de ARNm llamados presentes en las 13,179 secuencias enlosadas.

† Frecuencia total promedio de todos los genes llamados Presentes en al menos 1 archivo ($\times 10^{-3}$).

20 ‡ Número de genes que cumplen los criterios de 2 veces o mayor Cambio Porcentual Promedio

§ Número de genes que cumplen los criterios de la prueba t de Student de $P < 0.05$.

25 || Número de genes que cumplen los criterios dobles de AFC doble y la prueba t de Student $P < 0.05$.

veces en los ratones nulos Stat-/- (P=0.03). Con la excepción simple de la proteína de enlace a la caja D de albúmina, estos datos demostraron que en ausencia de estimulación inmune, existió diferencia muy limitada en la expresión total del gen en el pulmón de ratón, resultante del alelo nulo Stat-/-. Además de la comparación de los ratones tratados con mIL-13 Stat-/- y tratados con amortiguador control, estos resultados sugirieron además que el AFC doble y los criterios estadísticos utilizados para filtrar los datos, es efectivo en eliminar las llamadas falsas positivas.

Ejemplo 2: Cambios de expresión de genes en pulmón de ratón inducidos por instilación pulmonar de IL-13

Para identificar los cambios mediados por IL-13 en la expresión del gen pulmonar, seis ratones Balb/c (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) fueron tratados con múltiples dosis de 5 µg (0 hr, 24 hr, y 48 hr) de instilación pulmonar de IL-13 recombinante de ratón (mIL-13). Un segundo grupo de ratones control Balb/C (n=4) fueron instilados con amortiguador únicamente a una escala idéntica. Adicionalmente, un grupo de ratones nulos Stat6-/ fueron tratados idénticamente con mIL-13 a dosis múltiples (n=4) o amortiguador de PBS (n=5) con

instilación pulmonar antes de la cosecha de todos los pulmones a las 78 hr para perfilamiento de la expresión. La comparación de los datos del perfil de expresión de genes de ratones Balb/c tratados por
5 instilación intratraqueal de mL-13 a los controles solos con amortiguador, identificaron 279 genes con una diferencia porcentual promedio mayor de dos veces dentro del promedio de 5306 genes llamados presentes en los archivos individuales. De estos 279 genes, 136 cumplieron
10 los segundos criterios de la prueba T de Student $P < 0.05$ (Tabla 4 anterior).

Existe un traslape dramático en la expresión de genes mediada por el reto con alérgeno y la instilación directa de IL-13. La observación de los genes supra-
15 regulados por IL-13 no identificados en el modelo inducido por OVA, refleja más probablemente una diferencia en la fuerza de la señal proporcionada por la instilación directa de la citocina. La administración intratraqueal de IL-13 o bien la sobreexpresión transgénica específica de pulmón de
20 IL-13, dan como resultado todas las respuestas patofisiológicas observadas en el modelo de ratón del asma alérgico, los genes modulados por IL-13 más probablemente reflejan un grupo extendido de genes relacionados a la enfermedad. La Figura 1 muestra que los gen de CAT2 o ARG1
25 son supra-regulados en los ratones Balb/C que reciben el

tratamiento con OVA o IL-13. La Figura 2 muestra la frecuencia del ARNm de ARG1 en ratones Balb/c tratados con OVA o con IL-13.

Ejemplo 3: Inducción del gen ARG1 por OVA o expresión de IL-13 mediada por adenovirus en ratones Balb/c

En resumen, los ratones Balb/c fueron inoculados intranasalmente con 5×10^{10} partículas de una IL-13 murina de expresión en adenovirus recombinante (Ad-IL13) o fosfatasa alcalina secretada murina (Ad-SEAP). Los ratones control fueron tratados con PBS, OVA o IL-13 como se describe en el Ejemplo 1. Los animales fueron sacrificados 72 horas después de la inoculación y los pulmones fueron cosechados para la extracción del ARN. El ARN fue preparado a partir de tejido pulmonar utilizando el equipo RN-easy Mini (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La expresión de ARG1 fue determinada utilizando los arreglos de oligonucleótidos Affymetrix Mu U74Av2. Los resultados son mostrados en la Figura 3. La frecuencia del ARNm es expresada como partes por millón.

Ejemplo 4: Inducción del gen de ARG1 por expresión mediada por adenovirus de IL-13 en ratones C57bl/6

En resumen, los ratones Balb/c fueron inoculados intranasalmente con 5×10^{10} partículas de Ad-IL13 o Ad-SEAP. Los ratones control fueron tratados con PBS como se describe en el Ejemplo 1. Los animales fueron sacrificados 72 horas

después de la inoculación. El ARN pulmonar total fue aislado y analizado para la expresión de ARG1 como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados son mostrados en la Figura 4. La frecuencia del ARNm es expresada como partes por millón.

5 *Ejemplo 5: Expresión de CAT2 o ARG1 en la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 tratada con LPS e IL-13*

Células RAW264.7 confluentes fueron divididas 1:5 en 20 ml de medio de Eagle modificado de Dulbecco completo (cDME) suplementado con L-glutamina 4 mM (CTS), 10% de suero fetal bovino (JRH Biosciences), aminoácidos no esenciales (Gibco) y HEPES 10 mM (Gibco). Las células subconfluentes fueron luego estimuladas 24 horas después con 100 ng/ml de IL13 de ratón, recombinante (R&D Systems) y/o 1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS) proveniente de *Pseudomonas aeruginosa* Serotipo 10 (Sigma). Después de 24 horas de estimulación, las células fueron raspadas de los matraces, lavadas 1 vez con PBS frío, y el botón celular lisado en 600 µl de amortiguador RLT (equipo 15 RN-easy Mini, Qiagen) que contenía 10 µl/ml de β-mercaptoetanol. Los lisados fueron almacenados a -80°C.

El ARN fue preparado a partir de las células RAW264.7 tratadas utilizando el equipo RN-easy Mini 25 (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del

fabricante. El ARN fue cuantificado por absorbancia a 260 nm, y se preparó una curva estándar 1:6 a partir de la muestra tratada con LPS/IL-13 comenzando a 150 ng/reacción. Todas las muestras remanentes fueron evaluadas a 50 ng/reacción para Arg1, CAT1, CAT2A, CAT2B, CAT3 y CAT4, utilizando el equipo TaqMan EZ RT-PCR (Applied Biosystems) y la expresión del ARNm de GAPDH para normalizar. Los cebadores fueron diseñados utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems). La entrada para Arg1, CAT1, CAT3 y CAT4 fue la secuencia de codificación de ARNm completa proveniente de GenBank, mientras que únicamente los exones específicos de CAT2A y CAT2B fueron utilizados en el caso de CAT2. Las bases de datos públicas fueron BLAST buscadas con secuencias cebadoras para asegurar la especificidad. Los oligonucleótidos del cebador y de la sonda marcada con FAM/apagada con TAMRA en las siguientes secuencias (5'->3') fueron sintetizadas en Wyeth:

Tabla 5. Cebadores

Gen	Cebador 5'	Sonda FAM	Cebador 3'
CAT1	SEQ ID NO: 1,518	SEQ ID NO: 1,519	SEQ ID NO: 1,520
CAT2A	SEQ ID NO: 1,521	SEQ ID NO: 1,522	SEQ ID NO: 1,523
CAT2B	SEQ ID NO: 1,524	SEQ ID NO: 1,525	SEQ ID NO: 1,526
CAT3	SEQ ID NO: 1,527	SEQ ID NO: 1,528	SEQ ID NO: 1,529
CAT4	SEQ ID NO: 1,530	SEQ ID NO: 1,531	SEQ ID NO: 1,532
ARG1	SEQ ID NO: 1,533	SEQ ID NO: 1,534	SEQ ID NO: 1,535

La amplificación por PCR fue realizada en un Detector de Secuencias ABI 7700 (Applied Biosystems) utilizando los parámetros estándares de 40 ciclos recomendados en el equipo de EZ RT-PCR. Los números
5 de ciclo de umbral fueron utilizados para generar una indicación de la expresión utilizando el método de Fink et al. (Fink et al., Nat. Medicine, 4: 1329-1333, 1998). La RT-PCR cuantitativa en tiempo real después de la recolección de células ayudada por
10 láser.

La Figura 5 muestra que la expresión de CAT2A, CAT2B y ARG1 es marginalmente inducida por LPS solo, pero es significativamente inducida por la combinación de LPS e IL-13.

15 *Ejemplo 6: Captación de arginina en células RAW264.7 tratadas con LPS e IL-13*

Las células RAW264.7a a 1×10^6 , fueron sembradas en placa sobre placas de cultivo de tejido de 24 pozos en 0.5 ml de cDME. Después de la
20 adherencia por 2 horas, 0.5 ml del medio que contenía LPS (Sigma) y/o rhIL13 (R&D Systems) se agregó para concentraciones finales de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 ng/ml , respectivamente. Después de 20 horas de incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire, las
25 células fueron lavadas 3 veces con Amortiguador de

Lavado de Arg #1 (cloruro de colina 140 mM, cloruro de potasio 5 mM, cloruro de calcio 0.9 mM, sulfato de magnesio 1 mM, glucosa 5.6 mM, y HEPES 25 mM, pH 7.4), luego 4 veces adicionales con Amortiguador de

5 Transporte de Arg (cloruro de colina 137 mM, cloruro de potasio 5.4 mM, cloruro de calcio 1.8 mM, sulfato de magnesio 1.2 mM, HEPES 10 mM, ajustado a pH 7.4). Se agregaron 0.5 ml de amortiguador de transporte con L-leucina 5 mM (Sigma) y L-[2,3,4,5-³H]Arginina 38 nM

10 (Amersham) mezclado con L-arginina (Sigma) a una concentración final ya sea de L-arginina 400 µM o L-arginina 100 µM y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. El enlace no saturable fue cuantificado mediante incubación de un pozo réplica

15 de cada tratamiento con el amortiguador de transporte que contenía L-arginina 5 mM. El bloqueo de CAT2 fue realizado en réplicas adicionales por la adición de L-lisina 20 mM (Sigma) al amortiguador de transporte. El transporte fue detenido por lavado 4 veces con

20 Amortiguador de Lavado de Arg #2 enfriado con hielo (cloruro de sodio 137 mM, Tris 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4). Las células fueron lisadas con 500 µl de SDS al 1.0% en HEPES 10 mM, pH 7.4. La cuantificación de la proteína fue realizada utilizando un equipo micro-

BCA (Pierce) y 400 μ l de lisado suspendido en 10 ml de fluido de cintilación, se cargó dentro de frascos de cintilación de vidrio, y las emisiones fueron contadas por 1 minuto. La captación específica de arginina fue calculada como el enlace saturable (CPM/mg de Arg 400 μ M de proteína) - enlace no saturable (CPM/mg de Arg 5 mM de proteína).

Como se muestra en la Figura 6, la captación de arginina es óptimamente inducida por el tratamiento de las células RAW264.7 con una combinación de LPS e IL-13. La captación incrementada de arginina, no obstante, es inhibida por la lisina (Figura 7), un inhibidor competitivo de CAT2 para el transporte de arginina.

Ejemplo 7: Producción de urea en células RAW264.7 tratadas con LPS e IL-13

Los macrófagos RAW264.7 fueron estimulados en placas de 24 pozos para los estudios de transporte de arginina (anteriores). Después de 20 horas de estimulación, las células fueron lavadas tres veces con Amortiguador de Lavado de Arg #1 y luego cuatro veces adicionales con Amortiguador de Transporte de Arg. Las células fueron incubadas a 37°C por 24 horas en una muestra de 5% de CO₂ y 95% de aire en el Amortiguador de Transporte de Arg que contenía L-

leucina 5 mM, L-arginina 400 μ M, L-lisina $\pm$ 20 mM. Los sobrenadantes fueron clarificados mediante centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos y 100 μ l evaluados para la urea por triplicado utilizando un método del equipo de absorbancia de UV (R-Biopharma) siguiendo las instrucciones del fabricante, con la excepción de que éste se realizó a una escala de 1/10 en una placa de ensayo de 96 pozos con un volumen total de 300 μ l/pozo. Las células fueron lisadas con 500 μ l de SDS al 1.0% en HEPES 10 mM, pH 7.4 y la proteína cuantificada utilizando el equipo Micro-BCA (Pierce). La producción de urea fue expresada como μ g de urea/mg de lisado de proteína.

La Figura 8 muestra que el tratamiento con LPS/IL-13 incrementa la producción de urea en las células RAW264.7. En concordancia con los datos de captación de arginina mostrados en las Figuras 6 y 7, la producción incrementada de urea es inhibida por la lisina, el inhibidor competitivo de CAT2 para el transporte de arginina.

Ejemplo 8: La inducción de la expresión de ARG1 requiere el receptor de IL-4

Ratones suprimidos en el gen del receptor de IL-4 (IL4R^{-/-}) y ratones suprimidos en el gen de IL-4 (IL4^{-/-}) fueron sensibilizados a OVA, o tratados con PBS o IL-13 como se describe en la Figura 1. El ARN pulmonar total fue

aislado y analizado para la expresión de ARG1 como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados son mostrados en la Figura 10. La frecuencia del ARNm es expresada como partes por millón.

5 *Ejemplo 9: Efecto de la lisina sobre la contracción traqueal inducida por carbacol*

Ratas entre 8 y 10 semanas de edad fueron utilizadas para este experimento. Las traqueas fueron rápidamente extirpadas y limpiadas de tejido conectivo
10 adherente. Cada traquea fue seccionada en 3 a 4 mm de longitud y luego cultivada en una mezcla de RPMI-1640 y DMEM (v/v) con vehículo, leucina (25 mM), lisina (100 mM) o ambos de ellos por 15 a 20 horas. La composición farmacéutica (mM) del medio incluyó
15 aminoácidos no esenciales 0.1, FBS al 4%, glutamina 2.0, β -mercaptoetanol 0.05, 100 μ /ml de penicilina/100 μ g/ml de estreptomycin.

Las traqueas fueron soportadas longitudinalmente por una varilla con una espiga de
20 acero inoxidable en la base de un baño de órganos, de vidrio, de doble forro, relleno con 15 ml de solución de Krebs-Henseleit (K-H) a 37°C, de la siguiente composición (mM): cloruro de sodio 118; cloruro de potasio 4.7; fosfato diácido de potasio 1.2; dextrosa
25 11.1; sulfato de magnesio 1.2; cloruro de calcio 2.8

y carbonato ácido de sodio 25. La solución fue continuamente gasificada con una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de oxígeno por toda la duración de cada experimento. El soporte superior fue acoplado por un rizo de hilo de seda a un transductor de fuerza TSD125. Los cambios en la tensión de los anillos traqueales fueron sincrónicamente registrados con un sistema MP150 (BIOPAC Systems, Inc.) y mostrados visualmente en una computadora PC.

10 Las traqueas tratadas con los fármacos fueron lavadas con la solución K-H a intervalos de 10 minutos por 3 veces. Fueron construidas curvas de respuesta al carbacol (10^{-6} a 10^{-5} M). Las concentraciones de los agentes fueron incrementadas únicamente cuando las respuestas contráctiles a
15 las concentraciones previas habían sido estabilizadas.

Al final de cada experimento, todas las traqueas fueron transferidas sobre una almohadilla de gasa y pesadas. Las tensiones fueron calculadas como miligramo de tensiones por miligramo de peso (mg/mg) y expresadas como un porcentaje
20 individual (%) de la fuerza evocada por el carbacol 10^{-5} de las traqueas en ausencia de los fármacos. Todos los valores fueron expresados como la Media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó la prueba T de Student apareada en este efecto. Un valor de p menor de 0.05 fue considerado significativo.

25 Como se muestra en la Figura 9, la contracción

traqueal de rata inducida por carbacol es inhibida por la lisina.

Ejemplo 10: La contracción traqueal inducida por carbacol es reducida por la supresión del gen de CAT2

5 Ratones suprimidos en el gen de CAT2 (CAT2 -/-) fueron tratados como se describe en el Ejemplo 9. Como se muestra en la Figura 11, la contracción traqueal inducida por carbacol es también inhibida por la supresión del gen de CAT2, sugiriendo además el involucramiento de CAT2 en la
10 patofisiología de las enfermedades inflamatorias.

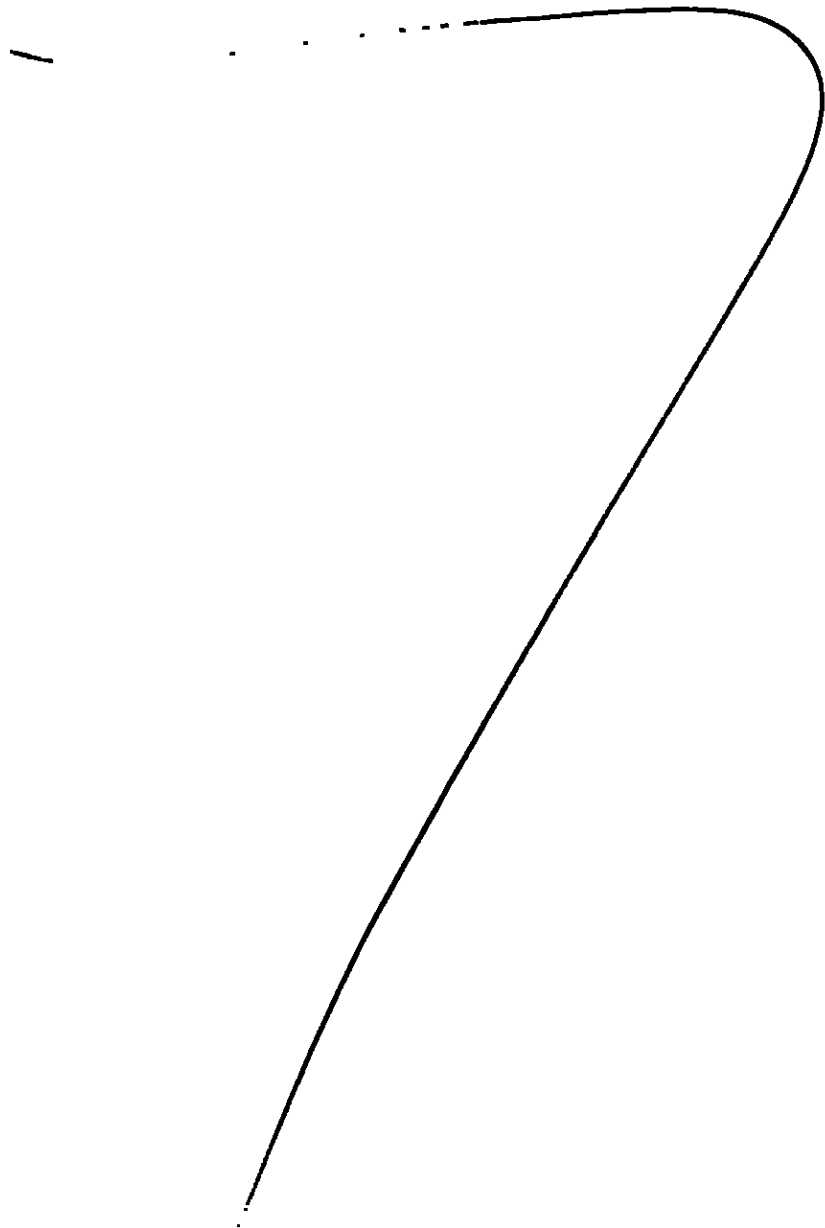
Ejemplo 11: Asociación de la Inhibición de la Expresión de ARNm de ARG1 con el bloqueo de señalización de IL-13

 Ratones Balb/C tratados y no tratados fueron sensibilizados a OVA, tratados con PBS, rIL-13 o sIL13Ra2.Fc
15 como se describe en la Figura 1. El ARN pulmonar total fue aislado y analizado para la expresión de ARG1 como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados son mostrados en la Figura 12. La frecuencia del ARNm es expresada como partes por millón.

20 Mientras que la invención ha sido ilustrada y descrita con detalle en los dibujos y en la descripción anterior, la misma tiene que ser considerada como ilustrativa y no restrictiva en carácter, y debe entenderse que únicamente la modalidad preferida ha sido mostrada y
25 descrita, y que se desea que todos los cambios y

modificaciones que entren dentro del alcance de la invención sean protegidos.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la
5 práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.



REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un agente capaz de inhibir una actividad o expresión de un componente que no es NOS de una vía metabólica de la arginina.
2. Una composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende el uso en un método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un mamífero que tiene una enfermedad alérgica o inflamatoria.
3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la enfermedad es una enfermedad respiratoria.
4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la enfermedad respiratoria es asma, remodelación crónica de las vías respiratorias o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. (COPD).
5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el agente es capaz de enlazarse al

componente o a un polinucleótido que codifica para el componente.

6. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el componente es una arginasa.

7. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el componente es un transportador de aminoácido catiónico.

8. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el componente está corriente abajo de una arginasa en la vía.

9. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el agente inhibe la expresión del componente por la interferencia del ARN o un mecanismo antisentido.

10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el agente codifica o comprende un siARN capaz de inhibir la expresión de ARG1 en el tejido por interferencia del ARN.

11. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el agente codifica o comprende un siARN capaz de inhibir la expresión de CAT2 en el tejido por interferencia del ARN.

12. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el agente es α -difluorometilornitina.

13. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el agente es lisina o un polipéptido catiónico.

14. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el mamífero es un humano.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque dicho humano tiene asma o COPD, y el componente es una arginasa o un transportador aminoácido catiónico, y en donde el agente es capaz de enlazarse al componente o a un polinucleótido que codifica para el componente.

16. Un método para identificar un agente para tratar una enfermedad alérgica o inflamatoria, caracterizado porque comprende:

poner en contacto una molécula con un tejido afectado por asma u otra enfermedad alérgica o inflamatoria, en donde la molécula es capaz de enlazarse a un componente no NOS de una vía metabólica de la arginina o a un polinucleótido que codifica para el componente; y

determinar si la molécula es capaz de mejorar o eliminar un síndrome o fenotipo asociado con el asma o la enfermedad.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la molécula es seleccionada o producida con base en un diseño de fármaco racional basado en la estructura, o basado en la selección de una biblioteca de compuestos.

18. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el componente es una arginasa o un transportador de aminoácido catiónico.

19. Un método caracterizado porque comprende:

la detección de un perfil de expresión de al menos un gen en una muestra biológica de un mamífero; y

la comparación del perfil de expresión a un perfil de expresión de referencia de al menos un gen, para determinar si el mamífero tiene o está en riesgo de una enfermedad alérgica o inflamatoria,

en donde un gen codifica para un componente no NOS de una vía metabólica de la arginina.

20. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la enfermedad es asma.

Figura 1

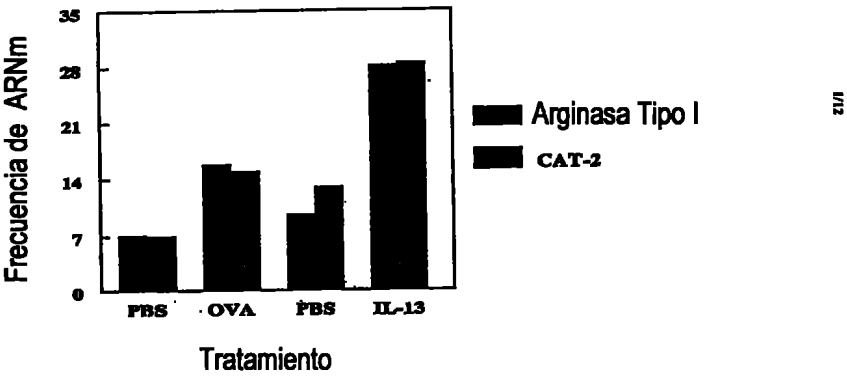
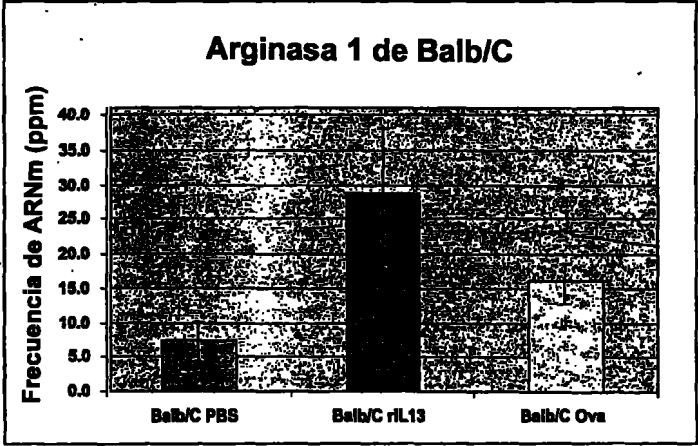


Figura 2



2/12

Figura 4

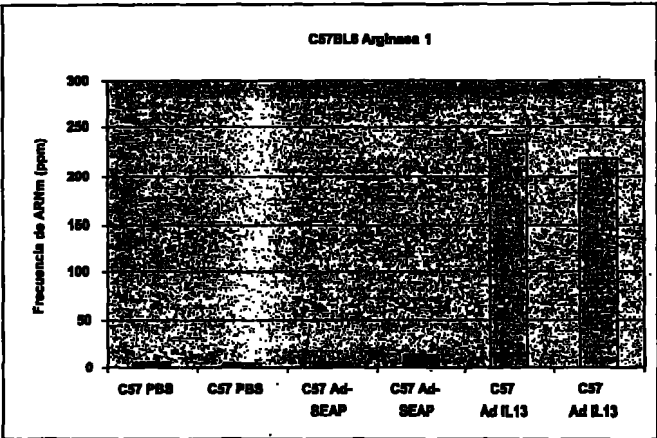


Figura 5

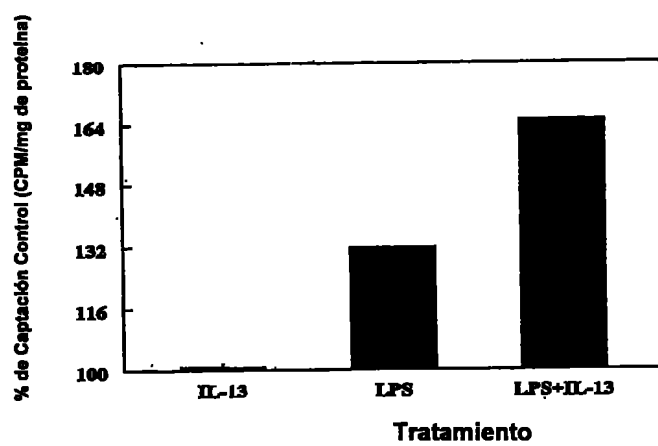
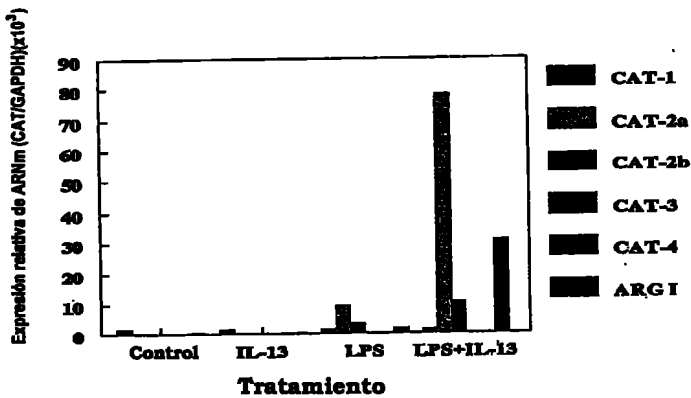
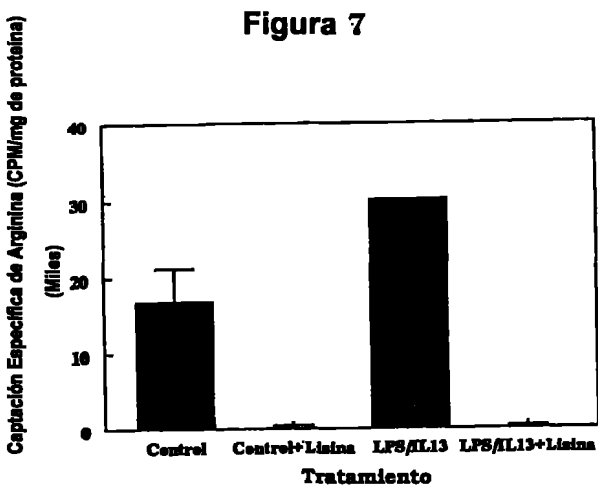


Figura 6



21/9

Figura 7



7/12

Figura 8

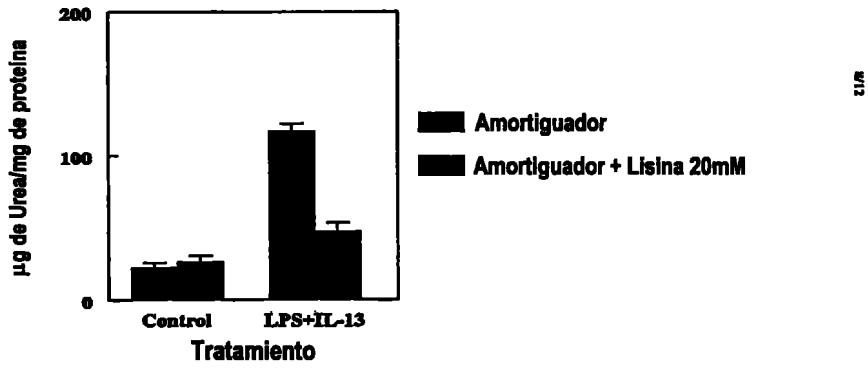
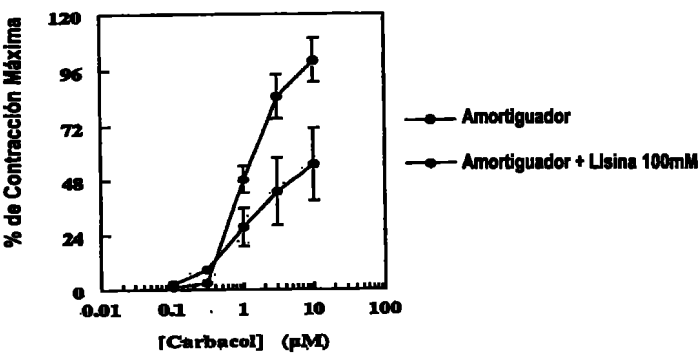
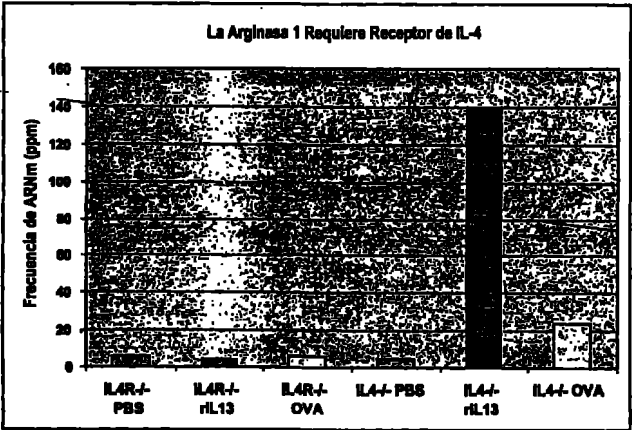


Figura 9



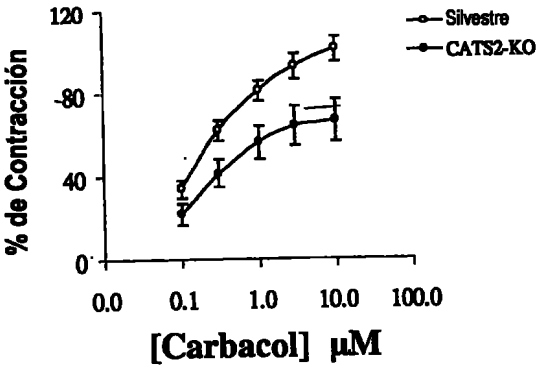
9/12

Figura 10



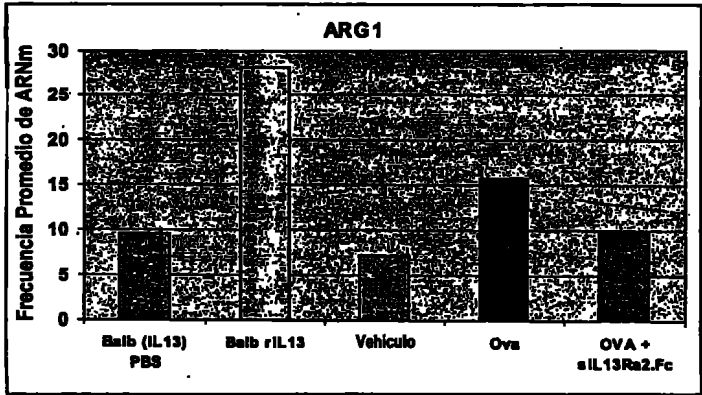
10/12

Figura 11



11/12

Figura 12



12/12

243
241

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 050993389 00000000
Fecha (MM): 2005-09-28 17:11:23
Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2026 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 242



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 70
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 231
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

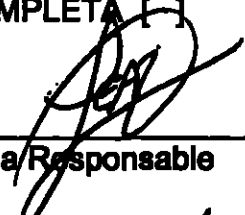
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha sept 30 de 2005

Camera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

242

gfh

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

• Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH

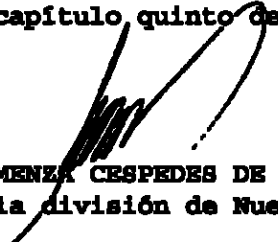
REFERENCIA	Radicación No.	05 99389
	Solicitud internacional	US2004/006470
	Fecha inicio fase nacional	04/10/2005
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	11097

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 25 NOV. 2020
adpal