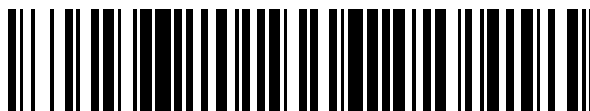


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 315**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2008** **E 08754717 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2152868**

54 Título: **Composiciones de fenilalanina amoníaco-liasa procariótica y métodos de uso de dichas composiciones**

30 Prioridad:

25.05.2007 US 807227

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

18.11.2015

73 Titular/es:

**BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 DIGITAL DRIVE
NOVATO, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**VELLARD, MICHEL, C.;
FITZPATRICK, PAUL, A.;
KAKKIS, EMIL, D. y
WENDT, DANIEL, J.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 551 315 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de fenilalanina amoníaco-liasa procariótica y métodos de uso de dichas composiciones

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

- 5 En la presente se proporcionan variantes de fenilalanina amoníaco-liasa procariótica (PAL) y composiciones de estos y la optimización de tales composiciones para mejorar la actividad catalítica y estabilidad de PAL mientras que reduce la inmunogenicidad y/o la sensibilidad proteolítica de PAL. También se proporciona en la presente el uso de tales composiciones óptimas de PAL para fines terapéuticos e industriales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 PAL es una enzima no mamífera ampliamente distribuida en las plantas (Koukol, et al., J. Biol. Chem. 236:2692-2698 (1961); Hanson, et al., The Enzymes 7:75-166 (1972); Poppe, et al., Curr. Org. Chem. 7:1297-1315 (2003)), algunos hongos (Rao, et al., Can. J. Biochem. 45:12:1863-1872 (1967); Abell, et al., Methods Enzymol. 142:242-253 (1987)) y bacterias (Bezanson, et al., Can. J. Microbiol. 16:147-151. (1970); Xiang, et al., J. Biol. Chem. 277:32505-32509 (2002); Hill, et al., Chem. Commun. 1358-1359 (2003)) y se pueden producir de modo recombinante en *Escherichia coli*.

- 15 Una lista representativa de PAL incluye: Q9ATN7 *Agastache rugosa*; *Muscaria Amanita* O93967 (agárico de mosca); P35510, P45724, P45725, Q9SS45, *Arabidopsis thaliana* Q8RWP4 (berro oreja de ratón); Q6ST23 *Bambusa oldhamii* (gigante de bambú de madera); Q42609 *bromheadia finlaysoniana* (orquídea); P45726 *Camellia sinensis* (té); Q9MAX1 *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*) (vinca de Madagascar); Q9SMK9 *Cicer arietinum* (garbanzo); Q9XFX5, Q9XFX6 *Citrus clementina* x *Citrus reticulata*; Q42667 *Citrus limon* (limón); Q8H6V9, Q8H6W0 *Coffea canephora* (café Robusta); Q852S1 *Daucus carota* (Zanahoria); 023924 *Digitalis lanata* (dedalera); 023865 *Daucus carota* (Zanahoria); P27991 *Glycine max* (soja); 004058 *Helianthus annuus* (girasol común); P14166, *Ipomoea batatas* (batata); Q8GZR8, Q8W2E4 *Lactuca sativa* (lechuga); 049835, Q49836 *Lithospermum erythrorhizon*; P35511, P26600 *Lycopersicon esculentum* (tomate); P35512 *Malus domestica* (Apple) (*Malus sylvestris*); Q94C45, Q94F89 *Manihot esculenta* (yuca) (mandioca); P27990 *Medicago sativa* (alfalfa); P25872, P35513, P45733 *Nicotiana tabacum* (tabaco común); Q6T1C9 *Quercus suber* (alcornoque); P14717, P53443, Q7M1Q5, Q84VE0, Q84VE0 *Oryza sativa* (arroz); P45727 *Persea americana* (palta); Q9AXI5 *Pharbitis nula* (Violeta) (campanilla japonesa); P52777 *Pinus taeda* (Pino taeda); Q01861, Q04593 *Pisum sativum* (arveja de jardín); P24481, P45728, P45729 *Petroselinum crispum* (Perejil) (*Petroselinum hortense*); Q84LI2 *Phalaenopsis* x *Doritaenopsis* cultivar híbrido; P07218, P19142, P19143 *Phaseolus vulgaris* (poroto) (habichuela); Q7XJC3, Q7XJC4 *Pinus pinaster* (pino marítimo); Q6UD65 *Populus subsp balsamifera*. *trichocarpa* x *Populus deltoides*; P45731, Q43052, Q24266 *Populus kitakamiensis* (Aspen); Q8H6V5, Q8H6V6 *Populus tremuloides* (álamo temblón); P45730 *Populus trichocarpa* (álamo americano); 064963 *Prunus avium* (cereza); Q94EN0 *Rehmannia glutinosa*; P11544 *Rhodospiridium toruloides* (levadura) (*Rhodotorula gracilis*); P10248 *Rhodotorula rubra* (levadura) (*Rhodotorula mucilaginosus*); Q9M568, Q9M567 *Rubus idaeus* (frambuesa); P31425, P31426 *Solanum tuberosum* (papa); Q6SPE8 *Stellaria longipes* (pamplina); P45732-*Stylosanthes humilis* (Townsville stylo); P45734 *Trifolium subterraneum* (trébol subterráneo); Q43210, Q43664 *Triticum aestivum* (trigo); Q96V77 *Ustilago maydis* (carbón del maíz); P45735 *Vitis vinifera* (uva); y Q8VXG7 *Zea mays* (maíz).

- 40 Numerosos estudios se han centrado en el uso de la enzima fenilalanina amoníaco-liasa (PAL, EC 4.3.1.5) para el tratamiento de sustitución enzimática de la fenilcetonuria (PKU) (Hoskins, et al., Lancet 1(8165):392-394 (1980); Gilbert, et al., Biochem. J. 199(3):715-723 (1981); Hoskins, J.A., et al., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 35(2):275-282 (1982); Sarkissian, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(5):2339-2344 (1999); Liu, et al., Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 30(4):243-257 (2002); Wieder, K.J., J Biol. Chem. 254(24):12579-12587 (1979); Gamez, et al., Mol. Ther. 11(6):986-989 (2005); Ambrus, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 224(3):598-602 (1983); Ambrus, et al., Science 201(4358):837-839 (1978); Kalghatgi, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 27(3):551-561 (1980); Ambrus, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 37(1):105-111 (1982); Gilbert, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 131(2):557-563 (1985); Pedersen, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 20(3):559-569 (1978); Marconi, et al., Biochimie 62(8-9):575-580 (1980); Larue, et al., Dev. Pharmacol. Ther. 9(2):73-81(1986); Ambrus, C.M., et al., Ann. Intern. Med. 106(4):531-537 (1987); Bourget, et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 10:57-59 (1984); Bourget, et al., FEBS Lett. 180(1):5-8 (1985); Bourget, et al., Biochim. Biophys. Acta 883(3):432-438 (1986); Chang, et al., Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 23(1):1-21 (1995); Chang, et al., Mol Biotechnol. 17(3):249-260 (2001); patente U. S. N.º 5.753.487).

- 55 La PKU es un error congénito del metabolismo de los aminoácidos que proviene de la actividad alterada de la fenilalanina hidroxilasa hepática (PAH), la enzima responsable del metabolismo de la fenilalanina. Los pacientes con mutaciones de PAH que llevan a la PKU e hiperfenilalaninemia (HPA) presentan niveles elevados de fenilalanina, funcionamiento neurofisiológico alterado y desarrollo cognitivo reducido. Para los pacientes con PKU grave, existe el potencial para el retraso mental irreversible a menos que los niveles de fenilalanina se mantengan en niveles bajos utilizando restricciones dietéticas. PAL convierte la fenilalanina en amoníaco y ácido trans-cinámico, un metabolito inocuo, que posteriormente se metaboliza y se excreta en la orina como (Hoskins *et al.*, (1980) *ibid*; Hoskins, et al., Biomed Mass Spectrom 11(6): 296-300 (1984)).

El tratamiento actual para la PKU implica el cumplimiento de por vida a una dieta que sea baja en el aminoácido fenilalanina (Levy, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 96 (5):1811-1813 (1999)). Esta terapia dietaria es difícil de mantener Matalon, et al., Genet. Med. 6(1): 27-32 (2004); Woolf, et al., Arch. Dis. Child. 33(167):31-45 (1958); Kim, Mol Ther. 10(2):220-224 (2004)) y no siempre elimina los efectos neurológicos dañinos que pueden ser causados por los

5 Sarkissian, et al., Mol. Genet. Metab. 69:188-194 (2000)). Un control menor del ideal durante el embarazo puede provocar anomalías congénitas (Levy, (1999) *ibíd.*). Además, es muy difícil para los pacientes con PKU/HPA vivir una vida normal mientras que siguen la dieta restrictiva, y la terapia dietaria puede estar asociada con deficiencias de varios nutrientes, algunos de los cuales son perjudiciales para el desarrollo cerebral (Levy, (1999) *ibíd.*). La mayoría de los productos de la dieta baja en fenilalanina tienen propiedades organolépticas suficientemente poco

10 satisfactorias por lo que el cumplimiento de este tratamiento se ve comprometida (Levy, (1999) *ibíd.*). Por lo tanto, el desarrollo de un tratamiento terapéutico podría sustituir o complementar el tratamiento dietario actual y prevenir los daños neurológicos infligidos a las personas con PKU, en especial para los pacientes con las formas más severas de la enfermedad.

En 1999, Scriver y colaboradores informaron sus estudios iniciales sobre el uso de la enzima PAL de Rhodosporidium toruloides (Sarkissian, et al., (1999) *ibíd.*) para aplicaciones de sustitución enzimática de PKU. Los estudios de modelos de PKU y HPA de ratón demostraron que la administración PAL (por inyección i.p. u oralmente usando PAL en combinación con inhibidor de la proteasa aprotinina o PAL expresado de forma recombinante y presente dentro de las células de *E. coli*) se asoció con menores niveles de fenilalanina en plasma sanguíneo. Además, los estudios preliminares que describen el uso de PAL con los pacientes de PKU han mostrado reducción

15 en los niveles de fenilalanina utilizando PAL administrado en cápsulas de gelatina con recubrimiento entérico (Hoskins, et al., (1980) *ibíd.*) o el uso de una fábrica de enzima extracorpórea Ambrus, et al., Ann. Intern. Med. 106(4):531-537 (1987)). Estos estudios sugieren que si PAL está protegida contra la degradación proteolítica, se pueden obtener reducciones significativas de Phe plasmática después de la administración oral.

También se ha sugerido el uso de PAL para el tratamiento del cáncer sobre la base de su capacidad de limitar el suministro de nutrientes de fenilalanina a las células cancerosas y por lo tanto inhibir el crecimiento neoplásico (Fritz, et al., J Biol Chem: 251(15):726 (1976); Roberts, et al., Cancer Treat Rep. 60(3):261-263 (1976); Shen, et al., Cancer Res. 37(4):1051-1056 (1977); Shen, et al., Cancer Treat Rep. 63(6):1063-1068 (1979); Wieder, et al., J Biol Chem. 254(24):12579-12587 (1979)). Sin embargo, el PAL pegilado inyectado por vía intravenosa se eliminó rápidamente de la sangre circulante después de la 13era inyección. Además, la reducción mediada por PAL en fenilalanina

25 impidió la proliferación de la leucemia murina y el melanoma metastásico (Abell, et al., Cancer Res. 33:2529-2532 (1973); Roberts, et al., (1976) *ibíd.*; Shen, et al., (1977) *ibíd.*).

La PAL bacteriana de la bacteria marina Streptomyces maritimus puede servir como una fuente importante de la enterocina del agente bacteriostático. PAL de *S. maritimus*, EncP, cataliza la etapa inicial en la síntesis de enterocina, que es la conversión de fenilalanina en ácido trans-cinámico (Xiang, et al., J. Biol. Chem. 277:32505-32509 (2002)).

35

PAL se puede utilizar para la síntesis industrial de éster metílico de L-fenilalanina (para la producción de Aspartame) (D'Cunha, et al., Enzyme and Microbial Technology 19(6):421-427 (1996); Hamilton, et al., Trends in Biotechnol. 3(3):64-68 (1985)) y otros derivados de L-fenilalanina sustituidos que se utilizan como precursores farmacéuticos (solicitud de patente US 20020102712).

PAL también puede tener aplicaciones agrícolas, en las que PAL participa en el proceso enzimático inicial, lo que lleva a los fenilpropanoides que producen ligninas, cumarinas, y flavonoides en plantas, hongos, y bacterias. Por lo tanto, la modulación de la actividad PAL puede influir en una serie de fenómenos agrícolas, tales como el oscurecimiento de la fruta. Además, el diseño de fármacos basado en la estructura de los inhibidores de PAL de sitio activo podría llevar a herbicidas eficaces (Poppe, et al., (2003) *ibíd.*).

Aunque PAL potencialmente tiene varias aplicaciones industriales y terapéuticas, el uso de PAL puede estar limitado por la reducción de la actividad específica y la inestabilidad proteolítica. De manera similar a otras proteínas terapéuticas, el uso de PAL como una terapia enzima se acompaña de varias desventajas, tales como la inmunogenicidad y la sensibilidad proteolítica. Además, se requiere un equilibrio delicado entre la afinidad de sustrato y la actividad enzimática para lograr y mantener el control de los niveles de fenilalanina en plasma dentro de

45 un rango normal algo estrecho en trastornos caracterizados por hiperfenilalaninemia. Hasta el momento, no se ha realizado un esfuerzo concertado para mejorar estos parámetros debido a una escasez de conocimiento estructural y bioquímico relacionado con esta proteína.

50

Por lo tanto, aún existe una necesidad de moléculas PAL con características cinéticas óptimas que incluyen una potente actividad catalítica y una mayor vida media biológica, mayor estabilidad bioquímica y/o inmunogenicidad atenuada.

55

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Varias PAL bacterianas han sido ya identificado como parte de la familia HAL/PAL, incluyendo PAL de Streptomyces maritimus (también conocida como EncP, SEQ ID NO: 5, FIGURA 4), PAL/HAL de Nostoc punctiforme (acceso

ZP_00105927 de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, presentado 1 de octubre de 2004, NCBI Microbial Genomes Annotation Project) (SEQ ID NO: 2, FIGURA 4), PAL/HAL de *Anabaena variabilis* (ID 3679622, Ava_3988 fenilalanina/histidina amoníaco-liasas [*Anabaena variabilis* ATCC 29413, 31 de marzo 2006 (SEQ ID NO: 4, FIGURA 4), el *Anacystis nidulans* procariota fotosintético (Löfflehardt, Z. Naturforsch 31 (11-12): 693-9 (1976)), las bacterias gram-negativas de la familia Enterobacteriaceae, *Photobacterium luminescens* TT01 (Williams, et al., Microbiology 151:2543-2550 (2005)), and *Streptomyces verticillatus* (Bezanson, et al., Can. J. Microbiol. 16(3):147-51 (1970)). Además, la actividad de PAL fue evaluada en *Streptomyces maritimus* (Xiang, L., et al., J. Biol. Chem. 277:32505-32509 (2002)). Las cianobacterias, tales como *Anabaena* y *Nostoc* se han estudiado con respecto a su producción de productos naturales bioactivos que se generan a través de las vías de biosíntesis de péptido-policétidos mixtos (Moore, B.S., Natural Products Reports 22(5):580-593 (2005); Becker, et al., Gene 325:35-42 (2004); Hoffman, et al., Gene 311:171-180 (2003)). La invención se basa en el hallazgo de que PAL procariótica o bacteriana puede servir como un tratamiento efectiva para PKU y otros trastornos.

La presente invención proporciona una variante de fenilalanina amoníaco-liasas de *Anabaena variabilis* (AvPAL) donde dicha variante de AvPAL tiene una mayor actividad convertidora de fenilalanina y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con una AvPAL tipo salvaje (SEQ ID NO:4), donde uno o más residuos de cisteína seleccionados del grupo que consiste en residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 que se han sustituido con un residuo de serina. En una forma de realización particular, el residuo de cisteína de la posición 565 de AvPAL se ha sustituido con un residuo de serina (SEQ ID NO:10). En otra forma de realización, los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de AvPAL se han sustituido con un residuo de serina (SEQ ID NO:11). En otra forma de realización, la variante de AvPAL también comprende un polímero soluble en agua, con preferencia un polietilenglicol. En otra forma de realización, la variante de AvPAL se puede obtener por la reacción de la variante de AvPAL con polietilenglicol activado por NHS en una relación de 3 polietilenglicol por residuo de lisina de la variante de AvPAL.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de una enfermedad metabólica de aminoácido que comprende la variante de AvPAL de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona una composición que comprende la variante de AvPAL de la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad causada totalmente o en parte por una deficiencia de fenilalanina hidroxilasa (PAH). En una forma de realización, la enfermedad se caracteriza por niveles de fenilalanina elevados. En otra forma de realización, la composición se prepara para tratar un sujeto que tiene 10% o menos de una actividad de PAH normal. En otra forma de realización, la variante de AvPAL de la invención se usa para tratar un ser humano que sufre de fenilcetonuria (PKU).

La presente invención también proporciona una composición que comprende la variante de AvPAL de la invención para usar en el tratamiento de PKU grave clásica, donde la composición es efectiva para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma de un sujeto en comparación con dicha concentración en ausencia de administración de dicha composición.

En una forma de realización, dicho sujeto ha sido diagnosticado como portador de una PAH mutante. En otra forma de realización, dicha PAH mutante comprende una mutación en el dominio catalítico de PAH, o una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M E390G, A395P, P407S, y Y414C.

La presente invención proporciona además una composición que comprende la variante AvPAL de la invención para usar en el tratamiento de una mujer embarazada que tiene hiperfenilalaninemia (HPA), donde la composición se prepara para administrar en combinación con una dieta restringida en proteínas, donde la administración combinada de la composición y dieta restringida en proteínas es efectiva para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma de dicha mujer en comparación con dicha concentración en ausencia de la administración de dicha combinación.

La presente invención también proporciona una composición que comprende la variante de AvPAL de la invención para usar en el tratamiento de un lactante que tiene PKU, donde la composición se prepara para administrar a un lactante entre 0 y 3 años y que tiene una concentración de fenilalanina plasmática entre 360 μ M a 4800 μ M, y donde la composición se prepara para administrar en una cantidad efectiva para producir una disminución en la concentración de fenilalanina plasmática de dicho lactante.

La presente invención también proporciona una variante de AvPAL donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de AvPAL se han sustituido con residuos de serina (SEQ ID. NO. 11). En una forma de realización, el AvPAL está opcionalmente pegilado. En otra forma de realización, dicha pegilación se puede obtener por la reacción de la variante de AvPAL con polietilenglicol activado por NHS en una relación de al menos 1,6 polietilenglicol por residuo de lisina de la variante de AvPAL. En otra forma de realización, dicha pegilación se puede obtener por la reacción de la variante de AvPAL con polietilenglicol activado por NHS en una relación de al menos 2.4 polietilenglicol por residuo de lisina de variante de AvPAL.

En otra forma de realización, dicha pegilación se puede obtener por la reacción de la variante de AvPAL con polietilenglicol activado por NHS en una relación de 3 polietilenglicol por residuo de lisina de la variante de AvPAL. En otra forma de realización, al menos 28 por ciento de los residuos de lisina en las posiciones 2, 10, 32, 145, 195, 301, 413, 493, y 522 de la variante de AvPAL están pegilados; donde al menos 51 por ciento de los residuos de lisina en las posiciones 2, 10, 195, 413, 493, y 522 de la AvPAL están pegilados. En otra forma de realización, al menos 75 por ciento de los residuos de lisina en las posiciones 2, 10, 195, 493, y 522 de la variante de AvPAL están pegilados.

También se describen en la presente composiciones de PAL bacteriana y fragmentos, mutantes, variantes y análogos de estos biológicamente activos, con propiedades mejoradas, tales como actividad catalítica más potente, mayor estabilidad bioquímica y, para aplicaciones terapéuticas, inmunogenicidad atenuada y mayor vida media biológica. También se describen en la presente los métodos de producción y purificación de PAL bacteriana y fragmentos, mutantes, variantes y análogos de estos biológicamente activos, y métodos de uso de tales composiciones para fines terapéuticos e industriales.

Como se usa en la presente, "PAL bacteriana" y "PAL procariótica" se usan de modo intercambiable para significar (1) PAL de tipo salvaje, PAL de organismos procarióticos de *Streptomyces maritimus* (también conocida como EncP, SEQ ID NO: 5, FIGURA 4), *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO: 2, FIGURA 4), *Anabaena variabilis* (SEQ ID NO: 4, FIGURA 4), *Anacystis nidulans* (Löfflehardt, (1976) *ibid*), *Photobacterium luminescens* TT01 (Williams, et al, (2005) *ibid*), y *Streptomyces verticillatus* (Bezanson, et al, (1970) *ibid*.); (2) fragmentos, mutantes, variantes y análogos de tales enzimas de tipo salvaje que retienen (es decir, al menos 50%) la actividad catalítica similar para la fenilalanina, y que, en algunas realizaciones, presentan un aumento de la actividad catalítica y/o aumento de la vida media y/o disminución de la inmunogenicidad, y (3) versiones modificadas químicamente de tales enzimas de tipo salvaje, fragmentos, mutantes, variantes y análogos de estos que se han ligado a otros restos químicos que proporcionan otros efectos ventajosos, tales como la vida media mejorada. Por ejemplo, todas las referencias a métodos de preparar o usar PAL de procariotas, fragmentos, mutantes, variantes, análogos o versiones modificadas químicamente de estos, y composiciones de tales enzimas, con fines terapéuticos o industriales, están destinados a referirse a métodos de fabricación, uso o formulación de todos tales tipo salvaje, mutantes, fragmentos, variantes, análogos o modificaciones químicas de estos.

En la presente se describe PAL bacteriana y fragmentos, mutantes, variantes o análogos de estos biológicamente activos. Específicamente se describe una PAL bacteriana de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO: 2) o fragmento, mutante, variante o análogo de esta biológicamente activo. Específicamente se describe una PAL bacteriana de *Anabaena variabilis* (SEQ ID NO:4) o fragmento, mutante, variante o análogo de esta biológicamente activo. En algunas formas de realización, las variantes retienen los residuos del sitio activo de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a la tríada Ser 210 Ala-Ser-Gly (211-213) Asp214, Leu 215, Asn270, Val269, Leu266, Leu 134, His 137, Lys468, Glu496, Gln 500 en PAL de *Rhodospiridium toruloides* o sustituciones conservadoras de estos residuos del sitio activo, de los cuales se considera que la tríada Ala-Ser-Gly en 211-213 es el sitio de unión para la fenilalanina.

Las variantes deseables pueden incluir proteínas en las que uno o más residuos de cisteína han sido reemplazados con otro residuo de aminoácido (por ejemplo, serina) para reducir la agregación de proteína que puede asociarse con una disminución de la actividad enzimática, aumento de la inmunogenicidad, y/u otros efectos desventajosos *in vivo*.

Las variantes deseables pueden incluir proteínas de fusión en las que la enzima se ha fusionado a otro polipéptido heterólogo, tal como una región constante nativa o modificada de una inmunoglobulina o un fragmento de esta que retiene el epítipo de salvamento, conocido en la técnica por aumentar la vida media.

La invención contempla además versiones modificadas químicamente de tales polipéptidos, que se han ligado a un resto químico que proporciona otros efectos ventajosos. Por ejemplo, la unión no específica o específica de sitio (por ejemplo, N-terminal) de polímeros solubles en agua a polipéptidos se conoce en la técnica para mejorar la vida media, y la unión de restos químicos también puede reducir la inmunogenicidad y mejorar la resistencia a la proteasa.

Tal PAL bacteriana se aísla y purifica de acuerdo con los métodos descritos en la presente y de este modo presente en cantidades que permiten utilizar la enzima terapéuticamente. En forma específica, se utiliza un ADNc que codifica una PAL bacteriana completa o de tipo salvaje. Sin embargo, se puede usar un ADNc que codifica un fragmento o mutante de esta biológicamente activo. Además, se describen composiciones de PAL bacteriana optimizada obtenida por enfoques de ingeniería molecular basado en la estructura y/o formas de PAL modificadas químicamente (por ejemplo, pegilada). Los ejemplos específicos contemplan composiciones óptimas de PAL con una mejor actividad específica, mejor estabilidad, inmunogenicidad reducida y/o sensibilidad proteolítica apropiada para uso terapéutico. Un ejemplo es una forma pegilada de *Nostoc* PAL *punctiforme* con mejor actividad específica. Otro ejemplo es una forma pegilada de PAL de *Anabaena variabilis* con actividad específica mejorada.

La pegilación de la variante de PAL se describe con referencia a la relación de PAL:PEG o PEG:PAL. Como se usa en la presente, y a menos que se indique de otro modo, la relación de "PAL:PEG" se refiere a la relación de residuos

de lisina sobre la variante de PAL a las moléculas de PEG en la reacción de pegilación. De modo similar, como se usa en la presente, y a menos que se indique de otro modo, la relación de "PEG:PAL" se refiere a la relación de las moléculas de PEG a los residuos de lisina sobre la variante de PAL en la reacción de pegilación.

En la presente se describen variantes de PAL pegiladas con inmunogenicidad reducida. También se describe una forma pegilada de la variante de PAL de *Nostoc punctiforme* (NpPAL) con inmunogenicidad reducida. También se describe una forma pegilada de variante de PAL de *Anabaena variabilis* (AvPAL) con inmunogenicidad reducida. También se describen variantes de NpPAL o AvPAL en las que la pegilación se obtiene por la reacción de la variante de NpPAL o AvPAL con un polímero soluble en agua, *por ejemplo*, polietilenglicol (PEG). En particular la pegilación se obtiene por la reacción de la variante de NpPAL o AvPAL una vez con PEG en una relación de al menos 1:1, al menos 1:1.5, al menos 1:2, al menos 1:3, o al menos 1:4 PAL:PEG. En forma específica, la variante de PAL es una variante de AvPAL, y la pegilación se obtiene usando una relación de PAL:PEG de 1:3.

La invención también contempla la repegilación de las variantes de PAL pegiladas como se describe en la presente con inmunogenicidad reducida. Como se describe en la presente, la pegilación se obtiene por la reacción de la variante de NpPAL o AvPAL dos veces o más, con PEG, cada pegilación en una relación de al menos 1:1, al menos 1:1.5, al menos 1:2, al menos 1:3, o al menos 1:4 PAL:PEG. En forma específica, la pegilación se obtiene por la reacción de la variante de NpPAL o AvPAL dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, o más con PEG, cada pegilación en una relación de al menos 1:1, al menos 1:1.5, al menos 1:2, al menos 1:3, o al menos 1:4 PAL:PEG. En forma específica, la variante de PAL es una variante de AvPAL, y la pegilación se obtiene usando una relación PAL:PEG de 1:3 para las primera y segunda reacciones de pegilación.

Los sitios biológicamente activos de PAL tipo salvaje se pueden modificar según se desee para optimizar las características cinéticas de PAL. En forma específica, una PAL modificada tiene suficiente actividad para reducir pero también mantener los niveles de fenilalanina plasmática dentro del rango óptimo de aproximadamente 120 μ M a aproximadamente 240 μ M. De modo alternativo, la PAL modificada biológicamente activa tiene una k_{cat} de al menos aproximadamente 0,1 s⁻¹ o mayor de aproximadamente 0,5 s⁻¹. En forma más específica, la PAL modificada biológicamente activa tiene una k_{cat} de al menos aproximadamente 0,2 s⁻¹ o mayor de aproximadamente 1,0 s⁻¹. En forma específica, la PAL modificada biológicamente activa tiene una K_m de entre aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 1000 μ M, con preferencia entre aproximadamente 100 μ M a aproximadamente 1000 μ M. En forma específica, la PAL modificada biológicamente activa exhibe actividad enzimática que es de aproximadamente dos veces a aproximadamente 1000 veces mayor que la de tipo salvaje, con preferencia es de aproximadamente 10% a 100% veces mayor que la de tipo salvaje. Tales proteínas de PAL modificada biológicamente activa se pueden formar usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como por mutagénesis dirigida al sitio. También se describe el uso de PAL bacteriana que metaboliza fenilalanina (es decir, convierte la fenilalanina en otra sustancia) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia en la actividad de PAH, en mamíferos, en particular, seres humanos, así como una composición farmacéutica que contiene PAL bacteriana para usar en el tratamiento de una deficiencia en la actividad de PAH. En forma específica, la composición farmacéutica comprende Pal altamente purificada derivada de bacteria, o un fragmento, análogo o mutante de esta biológicamente activo solo o en combinación con un portador farmacéuticamente adecuado. En forma específica, las preparaciones contienen PAL bacteriana con una pureza mayor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, o 99,9%. En forma específica, la actividad específica relativa de la PAL bacteriana de acuerdo con la presente invención es mayor de aproximadamente 110% de la actividad específica de PAL tipo salvaje.

También se describen en la presente nuevos métodos de usar composiciones de PAL para fines terapéuticos e industriales. En consecuencia, se describen métodos de tratar trastornos causados en forma total o parcial por una deficiencia en la actividad de PAH mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende PAL bacteriana a un sujeto que necesita tal tratamiento. La deficiencia en la actividad de PAH se puede observar, *por ejemplo*, como niveles de actividad de 50% o menos, 25% o menos, o 10% o menos o 1% o menos, en comparación los niveles normales de actividad de PAH y se puede manifestar como niveles de fenilalanina elevados, por ejemplo, como en la hiperfenilalaninemia, fenilcetonuria leve o fenilcetonuria grave clásica. En forma específica, la enfermedad es fenilcetonuria (PKU).

Como se describe en la presente, el sujeto es uno que se ha diagnosticado como portador de una mutante de fenilalanina hidroxilasa (PAH). La mutante PAH puede comprender una mutación en el dominio catalítico de PAH. Los ejemplos de tales mutaciones incluyen las mutaciones F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M E390G, A395P, P407S, and Y414C.

También se describe un método de tratar un sujeto que tiene concentración normal anterior de plasma fenilalanina (*por ejemplo*, mayor de 180 μ M o 360 μ M) que comprende la administración al sujeto una composición de PAL bacteriana e una cantidad efectiva para producir una disminución en la concentración de fenilalanina plasmática del sujeto. El sujeto probablemente tendrá una concentración de fenilalanina plasmática mayor de 180 μ M antes de la administración de la PAL bacteriana. Más particularmente, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina plasmática entre 120 μ M y 200 μ M. En forma específica, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina plasmática de entre 200 μ M y 600 μ M con preferencia entre 600 μ M y 1200 μ M. Aun otra clase de sujetos por tratar es la de los que tienen una concentración de fenilalanina plasmática no restringida mayor de 1200 μ M.

Particularmente, el sujeto es un lactante, más particularmente, un lactante que tiene una concentración de fenilalanina plasmática mayor de 1200 μM . Se describen métodos de tratamiento de un lactante que tiene fenilcetonuria, que comprende administrar una composición de PAL bacteriana al sujeto en una cantidad efectiva para producir una disminución en la concentración de fenilalanina plasmática del lactante donde el lactante tiene entre 0 y 3 años y el lactante tiene una concentración de fenilalanina plasmática entre aproximadamente 360 μM a aproximadamente 4800 μM . Antes de administrar la PAL bacteriana, el lactante tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 1200 μM y la administración de PAL bacteriana disminuye la concentración de fenilalanina plasmática a aproximadamente 1000 μM . En forma específica, antes de la administración de PAL bacteriana el lactante tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 800 μM y la administración de PAL disminuye la concentración de fenilalanina plasmática a aproximadamente 600 μM . En forma más específica, antes de la administración de PAL el lactante tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 400 μM y la administración de PAL disminuye la concentración de fenilalanina plasmática a aproximadamente 300 μM . En forma más específica, los métodos terapéuticos contemplados en la presente deberían reducir la concentración de fenilalanina plasmática del lactante a un rango entre aproximadamente 120 μM a aproximadamente 360 μM o un rango entre aproximadamente 120 μM a aproximadamente 240 μM .

También se describe en la presente un método para tratar una mujer embarazada que tiene hiperfenilalaninemia (HPA) que comprende administrar al sujeto PAL bacteriana sola o en combinación con una dieta restringida en proteínas, donde la administración de PAL bacteriana sola o en combinación con la dieta restringida en proteínas es efectiva para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma del sujeto en comparación con la concentración en ausencia de la administración combinada. En consecuencia, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina plasmática no restringida mayor de 180 μM pero menos de 600 μM . En forma específica, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina plasmática no restringida mayor de 500 μM pero menor de 1200 μM . En forma más específica, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina plasmática no restringida mayor de 1200 μM . Las personas embarazadas con una concentración de fenilalanina plasmática mayor de 1200 μM son candidatos particularmente atractivos para este tipo de terapia, ya que son sujetos que son mujeres n edad fértil que están contemplando el embarazo. En estos ejemplos, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina plasmática mayor de 1200 μM , y el método también comprende administrar una dieta restringida en proteínas al sujeto.

En la presente se describen métodos de tratar la fenilcetonuria grave clásica (PKU) en un sujeto que comprende administrar al sujeto una PAL bacteriana o un fragmento, mutante, variante o análogo de esta biológicamente activo donde la administración de PAL bacteriana es efectiva para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma del sujeto en comparación con la concentración en ausencia de la administración de PAL bacteriana. Un sujeto seleccionado para el tratamiento de acuerdo con los métodos descritos en la presente tendrán una concentración de Phe plasmática elevada, tal concentración puede ser mayor de 1800 μM en ausencia del agente terapéutico. Otros contemplan un sujeto que tiene una concentración de fenilalanina plasmática mayor de 1000 μM en ausencia de un régimen terapéutico. Los métodos de la administración combinada de la invención disminuyen la concentración de fenilalanina plasmática del sujeto a menos de 600 μM . Disminuye a menos de 500 μM . La administración combinada disminuye la concentración de fenilalanina plasmática del sujeto en el rango de aproximadamente 120 μM a aproximadamente 360 μM . La concentración de fenilalanina plasmática del sujeto está reducida en el rango de aproximadamente 120 μM a aproximadamente 240 μM .

Ciertos ejemplos incluyen la optimización de la dosis a las necesidades del organismo para tratar, por ejemplo, mamíferos o seres humanos, para mejorar efectivamente los síntomas de la enfermedad. PAL se puede administrar en una sola dosis diaria, dosis múltiples sobre una base diaria, en una dosis única semanal o dosis múltiples en forma semanal. En forma específica, la terapia PAL no es continua, sino más bien PAL se administra sobre una base diaria hasta que la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto se redujo a menos de 360 μM . En forma específica, la concentración de fenilalanina plasmática del sujeto se controla diariamente y la PAL se administra cuando se observa un 10% de aumento en la concentración de fenilalanina plasmática. Las dosis s administran una vez por semana. El método contempla dosis de al menos 0,001 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, y puede variar hasta 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg o mayor por semana. En algunas formas de realización, la dosis es 1 mg/kg/semana, 0,1 mg/kg/semana, o 0,01 mg/kg/semana.

Se contempla una variedad de vías de administración parenterales o no parenterales, que incluyen oral, transdérmica, transmucosa, intrapulmonar (incluyendo aerosol), intramuscular, subcutánea, o intravenosa que administran dosis equivalentes. También se contempla específicamente la administración por inyección de bolo o infusión directamente en las articulaciones o CSF, por ejemplo, intratecal, intracerebral, intraventricular, a través de la punción lumbar, o a través de la cisterna magna. Con preferencia, las dosis se administran por vía subcutánea o por vía oral.

También se contemplan otros medios de aumentar la actividad PAL en los seres humanos también se contemplan, incluyendo la terapia génica. La transferencia de un gen PAL es posible a través de una variedad de medios conocidos en la técnica, que incluyen vectores virales, recombinación homóloga, o inyección directa de ADN. Se mencionan particularmente las secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o una parte de PAL bacteriana o un mutante o análogos de estos biológicamente activo, que pueden administrarse in vivo en las células afectadas con la deficiencia de PAH.

La PAL bacteriana también se puede administrar en combinación con una dieta restringida en proteínas. La dieta restringida en proteínas administradas en los métodos en la presente es una que es una dieta restringida en fenilalanina donde la ingesta de fenilalanina total del sujeto está restringida a menos de 600 mg por día, con preferencia menos de 300 mg por día. En forma específica, la dieta restringida en proteínas es una suplementada con aminoácidos, tales como tirosina, valina, isoleucina y leucina. También se contempla una composición que comprende PAL bacteriana y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además un suplemento de proteínas médico. Alternativamente, la composición PAL es parte de una leche fórmula para lactante. Alternativamente, el suplemento de proteínas está libre de fenilalanina. El suplemento de la proteína puede ser fortificado con L-tirosina, L-glutamina, L-carnitina en una concentración de 20 mg/100 g de suplemento, L-aurina a una concentración de 40 mg /100 g de suplemento y selenio. Puede comprender además las dosis diarias recomendadas de minerales, por ejemplo, calcio, fósforo y magnesio. El suplemento puede comprender además la dosis diaria recomendada de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L-leucina, L-prolina, acetato de L-lisina, L-valina, L-isoleucina, L-arginina, L-alanina, glicina, L-asparagina monohidrato, L-triptófano, L-serina, L-treonina, L-histidina, L-metionina, ácido L-glutámico y ácido L-aspartico. Además, el suplemento puede estar fortificado con la dosis diaria recomendada de vitaminas A, D y E. El suplemento puede comprender un contenido de grasa que proporciona al menos 40% de la energía del suplemento. Tal suplemento se puede proporcionar en la forma de un suplemento de polvo o en forma de una barra de proteína.

También se describe en la presente métodos de tratamiento de diversas formas de crecimiento neoplásico y cáncer, que incluye leucemia linfoblástica, tumores mamarios, y melanomas.

En particular se describen métodos de uso de PAL bacteriana para la producción comercial de fenilalanina a partir de amoníaco y trans-cinamato. La fenilalanina se utiliza en el aspártamo, un edulcorante y otros productos alimenticios, que incluyen bebidas, cereales, pasteles, postres, huevos y quesos frescos, grasas, aceites, pescado y otros mariscos, carne y productos cárnicos, leche y productos lácteos, frutos secos, salsas y condimentos, sopas, azúcares, mermeladas y pastas para untar, y verduras.

También se contempla que la PAL bacteriana se puede usar para la producción de herbicidas y agentes antimicrobianos que incluyen enterocina y eritromicina.

También se describe en la presente un método para producir PAL procariótica o un fragmento, mutante, variante o análogo de esta biológicamente activo en cantidades que permiten el uso terapéutico de la enzima. El método usa PAL producida por bacterias que incluyen *Streptomyces*, *Sorangium*, *Pseudomonas*, y cianobacterias tales como *Nostoc* y *Anabaena*. En forma específica, PAL es producida por las especies bacterianas *Streptomyces maritimus*, *S. verticillatus*, *Sorangium cellulosum*, *Nostoc punctiforme*, *Nostoc tobacum*, *Anabaena variabilis*, y *Pseudomonas putida*. En forma específica, la actividad de la enzima PAL procariótica se genera utilizando ADNc o secuencias de ADN que se derivan de secuencias algunas veces descripta como codificadora de la actividad HAL o presenta un motivo PAL-HAL, pero que poseen residuos clave PAL que difieren de HAL.

En particular, el método comprende la etapa de transformar un ADNc o ADN que codifica para el total o una parte de una PAL procariótica o un fragmento, mutante, variante o análogo de esta biológicamente activo en una célula adecuada para su expresión. En forma específica, un vector de expresión se usa para transferir el ADN en una célula o línea celular adecuada para su expresión. En forma específica, el ADNc se transforma en *E. coli* y la PAL bacteriana recombinada se sobreexpresa como proteína de fusión. En forma específica, el método de producción de PAL procariótica comprende las etapas de: (a) cultivar de las células transformadas con un ADNc que codifica la totalidad o una variante, fragmento o mutante de PAL procariótica biológicamente activa en un medio de crecimiento adecuado a una densidad apropiada para producir un cultivo de siembra, (b) introducir las células transformadas en un biorreactor, (c) suministrar un medio de crecimiento adecuado al biorreactor, y (d) separar las células transfectadas del medio que contiene la enzima.

En forma específica, PAL recombinante se sobreexpresa como una proteína de fusión marcada con octahistidilo N-terminal en un vector tal como *E coli* BL21 (DE3)/pLyseS (Invitrogen) con un promotor inducible tal como con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido). Alternativamente, la PAL recombinante se sobreexpresa en *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS sin una marca N-terminal. Alternativamente, el método de producción de PAL procariota comprende las etapas de: (1) crecimiento de un cultivo de siembra para un biorreactor/fermentador a partir de un patrón de glicerol en matraces de agitación; (2) introducción de tales cultivo de siembra en un biorreactor controlado en el modo de alimentación por lotes; (3) crecimiento de dicho cultivo en medios suplementados con glucosa, pH (7,8), > 20% de oxígeno disuelto, agitación hasta 1200 rpm, 30 ° C hasta alcanzar una densidad celular de OD600 de ~22-25 de 70-100 (hrs) ; (4) inducción de dicho cultivo con IPTG 0,4 mM; (5) crecimiento de dicho cultivo a una temperatura reducida de 22 a 26 ° C hasta que el cambio de actividad sea < 0,1 UI/ml (aproximadamente 40-48 horas y típicamente una DO600 de 200); y (5) recolección de las bacterias por centrifugación continua. En forma específica, el medio de cultivo celular se define típicamente y está compuesta de proteína de extracto de levadura, peptona-triptona, glucosa, glicerol, casamino ácidos, trazas de sales y sales tampón de fosfato.

Además se describe en la presente un método para purificar AL bacteriana o a fragmento, análogo o mutante de esta biológicamente activo.

En forma específica, se cultiva una masa celular transformada y se rompe dejando la enzima recombinante cruda. Los materiales exógenos normalmente se separan de la masa cruda para evitar el ensuciamiento de las columnas. La purificación cromatográfica se lleva a cabo utilizando una o varias resinas cromatográficas. Posteriormente, la proteína purificada se formula en un tampón diseñado para proporcionar una actividad estable durante un período prolongado de tiempo. Alternativamente, el método para purificar la PAL bacteriana comprende las etapas de: (a) lisis de las bacterias que contienen PAL recombinante; (b) tratamiento de lisado con calor para inactivar los virus; (c) clarificación de este lisado utilizando una segunda etapa de centrifugación continua y/o filtración en profundidad; (d) pasaje del lisado clarificado a través de una etapa de filtración de carbón; (e) pasaje de filtrado en (d) a través de una etapa de filtración final (como con un filtro Sartorius Sartopore 0,2 µm); (f) pasaje del filtrado final sobre una resina de cromatografía de interacción hidrofoba, tal como una cromatografía de interacción butil hidrofóbica; (g) pasaje del eluido en (f) a través de una resina de cromatografía aniónica, tal como una columna de intercambio de iones Q; (h) recuperación del producto final mediante intercambio de tampón con la filtración de flujo tangencial; y (i) esterilización del producto final. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que una o más de las etapas de cromatografía se pueden omitir o sustituir, o que el orden de las etapas de cromatografía se puede cambiar dentro del alcance de la presente invención. Por último, las medidas de esterilización adecuadas se pueden realizar como se desee.

En la presente también se describen ensayos de detección para identificar PAL bacteriana que puede evitar, mejorar o tratar mejores niveles de fenilalanina mediante el contacto de una célula que contiene niveles elevados de fenilalanina con la PAL bacteriana y determinar si la PAL bacteriana reduce tales niveles elevados de fenilalanina. Tales ensayos de detección también pueden incluir las etapas de crear variantes que incluyen sustituciones conservadoras o no conservadoras en los sitios activos, *por ejemplo* tríada Gly 142, Thr-Ser-Gly (143-145), Asp 146, Leu 147, Asn 196, Ile 195, Leu 192, Leu 76, Asn 79, Met 400, Thr 428, Gln 432 en EncP de *Streptomyces maritimus* que son equivalentes a los residuos de la tríada Ser 210 Ala-Ser-Gly (211-213) Asp214, Leu 215, Asn270, Val269, Leu266, Leu 134, His 137, Lys468, Gln496, Gln 500 en PAL de *Rhodospiridium toruloides*, en regiones adyacentes a los sitios activos, o a lo largo de la secuencia de polipéptidos, seguido por la prueba de las variantes para la actividad convertidora de fenilalanina *in vitro*. En forma específica, el método es un ensayo de alto rendimiento. En forma específica, los genomas completos de las especies bacterianas se secuencian y analizan para determinar la presencia de homólogos de PAL usando un enfoque de la bioinformática. En forma específica, se confirma la actividad catalítica de PAL del producto de proteína de tales homólogos, tales como mediante pruebas de capacidad de convertir la fenilalanina en trans-cinamato *in vitro*.

También se describen en la presente métodos de uso de las composiciones de PAL bacteriana para el diagnóstico de enfermedades, que incluyen trastornos causado en forma total o parcial por una deficiencia en la actividad de PAH. En forma específica, la PAL bacteriana se usa para medir los niveles de fenilalanina en las muestras de sangre. Asimismo se describe un kit diagnóstico que comprende PAL bacteriana para usar en el control de muestra de sangre de sujetos con niveles elevados de fenilalanina.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. FIGURA 1A: Secuencia génica de PAL de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO:1); FIGURA 1B: Secuencia de proteínas de PAL de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO:2).

FIGURA 2. FIGURA 2A: Secuencia génica de PAL de *Anabaena variabilis* (SEQ ID NO:3); FIGURA 2B: Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis* (SEQ ID NO:4).

FIGURA 3. Árbol de relación de aminoácidos aromáticos amoniaco-liasas de procariotas y eucariotas. Las secuencias se recuperaron de GenBank (los números de acceso se dan entre paréntesis) y se alinearon con ClustalX (1,83) utilizando el método de unión del vecino (1.83).

FIGURA 4. Alineamiento de las secuencias de proteínas de cianobacterias de PAL de *N. punctiforme* (SEQ ID NO:2) y PAL de *A. variabilis* (SEQ ID NO:4) con PAL de EncP (SEQ ID. No. 5) y PAL de *P. putida* (SEQ ID NO:6). Los residuos del sitio activo, que corresponden a la actividad PAL o HAL, están resaltadas.

FIGURA 5. Efecto de (A) NpPAL no pegilada (1,0 UI/mL) y (B) NpPAL pegilada 1:3 PAL:PEG (Nippon Oil y Fat, NOF Corporation) (1,0 UI/mL) sobre los niveles de fenilalanina (µM) durante un período de 12 días.

FIGURA 6. Efecto de (A) AvPAL no pegilada (1,0 UI/mL) y (B) AvPAL pegilada 1:3 PAL:PEG (Nippon Oil y Fat, NOF Corporation) (1,0 UI/mL) sobre los niveles de fenilalanina (µM) durante un período de 12 días.

FIGURA 7. Efecto de NpPAL pegilada 1:3 PAL:PEG (Nippon Oil y Fat, NOF Corporation) (1,0 UI/mL) sobre los niveles de fenilalanina (µM) en un estudio de tolerancia crónica de 90 días.

FIGURA 8. FIGURA 8A: Secuencia de proteínas de fenilalanina amoniaco liasa de *Anabaena variabilis* (PAL) con una sustitución de cisteína a serina de la posición 64 (AvPAL_C64S, SEQ ID NO:7); FIGURA 8B: Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis* con una sustitución de cisteína a serina de la posición 318 (AvPAL_C318S,

SEQ ID NO:8); FIGURA 8C: Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis* con una sustitución de cisteína a serina de la posición 503 (AvPAL_C503S, SEQ ID NO:9); FIGURA 8D: Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis* con una sustitución de cisteína a serina de la posición 565 (AvPAL_C565S, SEQ ID NO:10); FIGURA 8A: Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis* con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 503 y 565 (AvPAL_C565SC503S, SEQ ID NO: 11). Las sustituciones de cisteína a serina están subrayadas en negrita.

FIGURA 9. FIGURA 9A: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina de la posición 565 o ambas posiciones 565 y 503 de AvPAL no pegilada sobre la actividad enzimática específica de PAL *in vitro* después de la incubación por varias extensiones de tiempo a 37 °C. FIGURA 9B: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina de la posición 565 o ambas posiciones 565 y 503 de AvPAL pegilada sobre la actividad enzimática específica de PAL *in vitro* después de la incubación por varias extensiones de tiempo a 37 °C.

FIGURA 10. FIGURA 10A: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en AvPAL sobre la formación de agregados de proteína en solución analizado por electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (panel izquierdo) o condiciones nativas (panel derecho). FIGURA 10B: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en AvPAL sobre la formación de agregados de proteína en solución analizado por SEC-HPLC.

FIGURA 11. Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (mutante dbl) en AvPAL sobre la pegilación específica de sitio a varias concentraciones de PEG.

FIGURA 12. Efecto del tratamiento de AvPAL con Tween80 0,05% o EDTA 10 mM sobre la formación de agregados de proteína en solución analizado por SEC-HPLC.

FIGURA 13. FIGURA 13A: Efecto del tratamiento de AvPAL por ditioneitol (DTT) sobre la formación de agregados de proteína en solución analizado por SEC-HPLC. FIGURA 13B: Efecto del tratamiento de AvPAL con DTT y N-etilmaleimida (NEM) sobre la formación de agregados de proteína en solución analizado por SEC-HPLC.

FIGURA 14. Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) en AvPAL pegilada sobre niveles de fenilalanina (Phe) *in vivo* en ratones ENU2 tratados con la enzima 0,25 UI (panel superior), 1,0 UI (panel medio) o 4,0 UI (panel inferior) en comparación con los ratones ENU2 tratados con vehículo o 4,0 UI AvPAL pegilada tipo salvaje.

FIGURA 15. Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) en AvPAL pegilada sobre los pesos corporales de los ratones ENU2 tratados con enzima 0,25 UI, 1,0 UI o 4,0 UI en comparación con ratones ENU2 tratados con vehículo o 4,0 UI AvPAL pegilada tipo salvaje.

FIGURA 16. Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL C503S/565S) en AvPAL pegilada sobre los niveles de fenilalanina (Phe) *in vivo* en los ratones ENU2 tratados con 4 UI de enzima a varias relaciones AvPAL:PEG 1:1.6 (panel superior), 1:2.4 (panel medio) o 1:3 (panel inferior), en comparación con ratones ENU2 tratados con vehículo o 4,0 UI AvPAL pegilada tipo salvaje a una relación AvPAL:PEG de 1:3.

FIGURA 17. Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) en AvPAL pegilada sobre los pesos corporales de ratones ENU2 tratados con 4 UI de enzima a varias relaciones AvPAL:PEG: 1:1.6, 1:2.4 o 1:3, en comparación con ratones ENU2 tratados con vehículo o 4,0 UI de AvPAL pegilada tipo salvaje a una relación AvPAL:PEG de 1:3.

FIGURA 18. Efecto de la repegilación de AvPAL pegilada_C565SC503S sobre la actividad específica de AvPAL *in vitro*. (Superior) Recuperación de actividad específica de rAvPAL-PEG, primero pegilado a una relación PAL:PEG de 1:3 (2 mM residuos de lisina:6 mM PEG, círculos llenos), después de la repegilación en una variedad de relaciones PAL:PEG y concentraciones de residuos de lisina y moléculas de PEG según se indica. (Inferior) Recuperación de actividad específica de rAvPAL-PEG, pegilada primero a una relación PAL:PEG de 1:1 (2 mM residuos de lisina:2 mM PEG, cuadrados llenos), o 1:3 2 mM residuos de lisina:6 mM PEG, círculos llenos), después de la repegilación bajo una variedad de relaciones PAL:PEG y concentraciones de residuos de lisina y moléculas de PEG según se indica.

FIGURA 19. FIGURA 19A: Efecto del aumento de la relación PAL:PEG en la reacción de repegilación sobre la pegilación total de rAvPAL-PEG, pegilada primero a una relación PAL:PEG de 1:3 (2 mM residuos de lisina:6 mM PEG), determinado por análisis de electroforesis capilar en gel (CGE). FIGURA 19B: Efecto del aumento de la relación PAL:PEG en la primera reacción de pegilación sobre la pegilación total de rAvPAL-PEG donde se realiza la reacción de repegilación en una relación fija PAL:PEG de 1:3 (2 mM residuos de lisina:6 mM PEG), determinado por el análisis CGE.

FIGURA 20. Efecto de la repegilación de AvPAL_C565SC503S, pegilada primero a una relación PAL:PEG de 1:3 (2 mM residuos de lisina:6 mM PEG), sobre el porcentaje de pegilación de los residuos de lisina específicos en AvPAL después de la repegilación bajo una variedad de relaciones PAL:PEG y concentraciones de residuos de lisina y moléculas de PEG según se indica. El residuo de lisina de la posición 2 (K2) está 100% en todas las condiciones analizadas (no mostradas).

FIGURA 21. Efecto de la repegilación de AvPAL_C565SC503S, pegilada primero a una relación PAL:PEG de 1:3 (2 mM residuos de lisina:6 mM PEG), y repegilada en la misma relación de PAL:PEG y concentración de residuos de lisina y moléculas de PEG, sobre los niveles de fenilalanina (Phe) plasmática *in vivo* en los ratones ENU2 tratados por vía subcutánea como se indica en la Tabla 14.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque PAL es una enzima de la planta superior ubicua que cataliza la desaminación no oxidativa de fenilalanina en ácido cinámico en la etapa destinada a fenilpropanoides metabolitos (Hahlbrock, et al., Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 40:347-369 (1989)), PAL sólo se ha encontrado en unas pocas bacterias en las que está implicada en la biosíntesis de benzoil-CoA en "*S. maritimus*" (Xiang, et al., J. Biol. Chem. 277:32505-32509 (2002)) y *Sorangium cellulosum* (Hill, et al., Chem. Commun. 1358-1359 (2003)) y en la biosíntesis de cinnamamida en *Streptomyces verticillatus* (Bezanson, et al., Can. J. Microbiol. 16:147-151 (1970)). El agente bacteriostático enterocina es un producto natural de la bacteria marina "*Streptomyces maritimus*" cuya biosíntesis involucra numerosas características inusuales (Hertweck, et al., Chem. Biol. 11:461-468 (2004); Piel, et al., Chem. Biol. 7:943-955 (2000); Piel, et al., J. Am. Chem. Soc. 122:5415-5416 (2000); Xiang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:15609-15614 (2004)). Entre ellas se encuentra la formación de la unidad de inicio policétido sintasa (PKS) rara benzoil-coenzima A (CoA) (Moore, et al., Nat. Prod. Rep. 19:70-99 (2002)). La reacción bioquímica inicial implica la conversión del aminoácido L-fenilalanina a ácido trans-cinámico por la nueva fenilalanina amoníaco-liasa bacteriana (PAL, EC 4.3.1.5) EncP (Xiang, et al., J. Biol. Chem. 277: 32.505-32509 (2002)). La activación del ácido cinámico a su CoA tioéster seguido por una única ronda de beta-oxidación produce benzoil-CoA (Hertweck, et al, Chem Bio Chem. 2: 784-786 (2001); Hertweck, et al, Tetrahedron 56: 9115. -9120 (2000); Xiang, et al, J. Bacteriol 185:. 399-404 (2003)), que ceba la PKS enterocina tipo II para la extensión de la cadena con siete moléculas de malonil-CoA.

Se caracterizó el primer gen que codifica la PAL procarióticaa (encP) (SEQ ID NO: 5) y su inactivación produjo la anulación de la síntesis de novo de ácido cinámico y enterocina en "*S. maritimus*" (Kalaizis, et al, J. Am . Chem. Soc. 125: 9290-9.291 (2003); Xiang, et al, J. Biol Chem 277: 32505-32509 (2002)). La biosíntesis de enterocina se puede restaurar en mutantes inactivadas con encP través de la suplementación con ácidos cinámico o benzoico, así como la complementación con encP transmitida en el plásmido. Además, la expresión heteróloga del gen encP bajo el control del promotor ermE* en *Streptomyces coelicolor* condujo a la producción de ácido cinámico en los cultivos fermentados (Xiang, et al., J. Biol. Chem. 277:32505-32509 (2002)). El gen encP codifica una proteína de 522 aminoácidos que es considerablemente menor que las PAL eucarióticas por cerca de 200 residuos de aminoácidos. Aunque la secuencia homóloga para las PAL de planta tales como de *Petroselinum crispum* (Röther, et al., Eur. J. Biochem. 269:3065-3075 (2002)) (CAA57056, 30% idéntica y 48% similar), más bien comparte homología mayor para histidina amoníaco-liasas bacterianas (HAL, EC 4.3.1.3), tales como de *Pseudomonas putida* (Schwede, et al, Biochemistry 27:. 5.355-5.361 (1.999)) (A35251, 36% idéntica y 54% similar, SEQ ID NO : 6, FIGURA 4) y tirosina amoníaco-liasa (TAL) de *Rhodobacter capsulatus* (Kyndt, et al, FEBS Lett. 512:240-244 (2002)) (FIGURA 3). La homología incluye el residuo de serina del sitio activo conservado en la posición 143 de la familia de fenilalanina/histidina/tirosina de amoníaco-liasas que es el precursor probable del residuo deshidroalanina modificado en el grupo prostético 4-metilidenimidazol-5-ona (MIO) (Langer, et al., Adv. Prot. Chem. 58:175-188 (2001); Poppe, Curr. Opin. Chem. Biol. 5:512-524 (2001); Schwede, et al., Biochemistry 27:5355-5361 (1999)). EncP comparte mayor homología de secuencia con AdmH (AAO39102, 63% idéntica y 76% similar), una fenilalanina aminomutasa putativa involucrada en la biosíntesis andrimid en *Pantoea agglomerans* que se relaciona con la tirosina aminomutasa Sgc4 de *Streptomyces globisporus* (Christenson, et al., J. Am. Chem. Soc. 125:6062-6063 (2003); Christenson, et al., Biochemistry 42:12708-12718 (2003)). Cabe destacar que, debido a encP tiene homología más cercana a una encP de proteína humana (HAL) puede ser potencialmente menos inmunogénica. También debido a que son muy similares podría ser posible mutar encP para parecer HAL humano, una versión humanizada de encP.

Se demostró que HAL y PAL comparten un mecanismo común para la eliminación de químicamente difícil de amoníaco de histidina y fenilalanina, respectivamente. Con ambas enzimas, un grupo prostético superelectrofilico 5 metilen-3,5-dihidroimidazol-4-ona (MIO) activa los átomos de hidrógeno beta no ácidos de sus respectivos sustratos por un ataque tipo Friedel-Crafts en el anillo aromático. El complejo sigma que se genera impide la extracción de protones del anillo mediante la exclusión de cualquiera de las bases de acceso al bolsillo de unión de la enzima. La formación de un doble enlace exocíclico es clave en la eliminación de amoníaco, rearomatización, y fragmentación. El grupo prostético MIO se regenera y se forma el producto urocanato o cinnamato de metilo (Poppe, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 44:3668-3688 (2005)).

Debido a la alta homología entre HAL y PAL, las regiones conservadas de HAL y PAL se denominan como región HAL/PAL conservada. Esta alta homología puede crear algunas ambigüedades en las bases de datos como NCBI sobre la actividad enzimática potencial de una proteína "PAL-HAL" que lleva a un etiquetado incorrecto, tal como con las secuencias de proteínas enumeradas en la base de datos NCBI para *Nostoc* y *Anabaena variabilis punctiforme*. Por lo tanto algunas enzimas PAL pueden ser enzimas HAL mal etiquetadas. Aunque los sitios activos de PALs y HAL son muy similares, se predice que difieren en algunos residuos clave (Calabrese et al., Biochemistry 43(36):11403-11416 (2004); Xiang et al., (2002) *ibid.*; William et al., (2005) *ibid.*). Particularmente en HAL, la metionina 382 y glutamina 414 de *Pseudomonas putida* (SEQ ID NO: 6) están altamente conservadas en todas las HAL pero siempre están sustituidas en todas las PAL (descriptas hasta ahora (eucariota o procariota) con lisina y

glutamina, respectivamente (FIGURA 4). Por lo tanto, se puede decir que todas las proteínas con una región "PAL-HAL" y que tiene los homólogos de lisina 382 y glutamina 414 tienen el motivo distintivo de secuencia de una proteína con actividad PAL. Este motivo distintivo de PAL relativamente recién descrito (Williams et al., (2005) *ibíd.*) permite etiquetar la propiedad algunas enzimas de HAL a PAL y se podría usar para identificar algunas nuevas enzimas PAL a partir de bases de datos de genes y proteínas ya publicadas.

La presente solicitud se refiere a composiciones de tal PAL procariótica y fragmentos, mutantes y variantes de estas biológicamente activos y sus usos para propósitos terapéuticos e industriales.

A. DEFINICIONES

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en esta solicitud, que incluyen la memoria descriptiva y reivindicaciones, tienen las siguientes definiciones. Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en la memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La definición de los términos de química estándar se pueden encontrar en las obras de referencia, incluyendo Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3ª edición, Vols. A y B (Plenum Press, Nueva York 1992). La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química orgánica sintética, espectroscopia de masas, métodos analíticos y preparativos de cromatografía, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Ver, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures y Molecular Properties* (W.H. Freeman y Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 4th Edition, 2004); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1996).

Las siguientes abreviaturas de aminoácidos se usan en todo el texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido Glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

En la presente, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto de unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de presentación natural, tales como ácido desoxirribonucleico ("ADN") y ácido ribonucleico ("ARN"), como también los análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácido nucleico incluyen aquellos que incluyen bases de presentación no natural, nucleótidos que intervienen en enlaces con otros nucleótidos distintos del enlace fosfodiéster de presentación natural o que incluyen bases fijados por medio de enlaces distintos de los enlaces por fosfodiéster. Por lo tanto, los nucleótidos incluyen, por ejemplo fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, quiral-metil fosfonatos, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNAs), y similares. Tales nucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, utilizando un sintetizador automático de ADN. Típicamente, la expresión "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos grandes. El término "oligonucleótido" se refiere a polinucleótidos cortos, por lo general no mayores de aproximadamente 50 nucleótidos. Debe entenderse que cuando se representa una secuencia de nucleótidos mediante una secuencia de ADN (*es decir*, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (*es decir*, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza a "T."

El término "cADN" se refiere a un ADN que es complementario un idéntico con respecto a un mRNA, tanto en forma de cadena simple como de cadena doble.

En la presente se utiliza la notación convencional para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo a mano izquierda de una secuencia de polinucleótidos de una sola cadena es el extremo-5'; la dirección a mano izquierda de una secuencia polinucleotídica de doble cadena se designa como la dirección-5'. La dirección de adición de 5' a 3' de nucleótidos a transcritos de ARN nacientes se designa como la dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un mRNA se designa como la "cadena de codificación"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que un mRNA transcrito desde dicho ADN y que están situadas 5' con respecto al extremo-5' de transcrito de ARN llevan la denominación de "secuencias situadas corriente arriba"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ADN de codificación llevan la denominación de "secuencias corriente abajo".

El término "complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o concordancia recíproca de superficies interactuantes de dos polinucleótidos. Por lo tanto, las dos moléculas pueden describirse como complementarias, y además, las características de las superficies de contacto son complementarias entre sí. Un cebador polinucleótido es complementario con respecto a un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del cebador polinucleótido es idéntica a la secuencia de nucleótidos del compañero de ligación de polinucleótidos del segundo polinucleótido. Por lo tanto, el polinucleótido cuya secuencia 5'-TATAC-3' es complementario con respecto a un polinucleótido cuya secuencia es 5'-GTATA-3'.

Una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente complementaria" con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia si la secuencia complementaria con respecto a la secuencia de nucleótidos objeto es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia.

La expresión "que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tales como un gen, un cADN, o un mRNA, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que o bien tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, rARN, tARN y mRNA) o bien una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de ello. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del mRNA producido con dicho gen produce la proteína en una célula o en otro sistema biológico. Puede decirse que tanto la cadena que codifica, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de mRNA y es usualmente provista en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción, de un gen o cADN, codifica la proteína u otro producto de dicho cADN. A menos que se indique otra cosa, la expresión "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye la totalidad de las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

La expresión "polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están naturalmente unidas entre sí. Un polinucleótido recombinante ampliado o ensamblado puede estar incluido en un vector adecuado, y el vector puede utilizarse para transformar una célula huésped adecuada. Una célula huésped que comprende el polinucleótido recombinante se designa como una "célula huésped recombinante". El gen se expresa entonces en la célula huésped recombinante de manera de producir, *por ejemplo*, un "polipéptido recombinante". Un polinucleótido recombinante puede también desempeñar una función no codificadora (*por ejemplo*, promotor, origen de replicación, sitio de ligación de ribosoma, etc.).

La expresión "secuencia de control de la expresión" se refiere a una secuencia de nucleótidos en un polinucleótido que regula la expresión (transcripción y/o traducción) de una secuencia de nucleótidos operativamente ligado a ella. La expresión "operativamente ligado" se refiere a una relación funcional entre dos partes en la cual la actividad de una parte (*por ejemplo*, la capacidad de regular la transcripción) tiene como resultado una acción sobre la otra parte (*por ejemplo*, la transcripción de la secuencia). Las secuencias de control de la expresión pueden incluir, *por ejemplo* y sin limitación, secuencias de promotores (*por ejemplo*, inducibles o constitutivos), reforzadores, terminadores de transcripción, un codón de inicio (es decir, un ATG), señales de desdoblamiento para intrones, y codones de detención.

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operativamente ligadas a una secuencia de nucleótidos que debe ser expresada. Un vector de expresión comprende suficientes elementos actuantes *cis* para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser provistos por la célula huésped o por el sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen la totalidad de los conocidos en la especialidad, tales como cósmidos, plásmidos (*por ejemplo*, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que llevan incorporados el polinucleótido recombinante.

El término "amplificación" se refiere a cualquier medio mediante el que se copia una secuencia polinucleotídica, y por lo tanto se la expande en un número más grande de moléculas polinucleotídicas, *por ejemplo*, mediante transcripción inversa, reacción en cadena de polimerasa, y reacción en cadena de ligasa.

El término “cebador” se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridar específicamente a una plantilla polinucleótida designada y de proveer un punto de iniciación para la síntesis de un polinucleótido complementario. Dicha síntesis tiene lugar cuando el cebador polinucleótido es colocado bajo condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en la presencia de nucleótidos, un templado polinucleótido complementario, y un agente para la polimerización tal como polimerasa de ADN. Típicamente un cebador es de una sola cadena, pero también puede ser de doble cadena. Los cebadores son típicamente ácidos desoxirribonucleicos, pero para muchas aplicaciones son útiles una amplia variedad de cebadores sintéticos y de presentación natural. Un cebador es complementario con respecto a la plantilla con respecto a la cual ha sido diseñado para hibridarse de manera de servir como un sitio para la iniciación de la síntesis, pero no es necesario que refleje la secuencia exacta de la plantilla. En un caso como éste, la hibridación específica del cebador con la plantilla depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden estar etiquetados por ejemplo con partes cromogénicas, radioactivas o fluorescentes, y se los puede utilizar como partes detectables.

El término “sonda”, cuando se lo utiliza con referencia a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que tiene la capacidad de hibridarse específicamente con una secuencia designada de otro polinucleótido. Una sonda se hibrida específicamente con un polinucleótido complementario diana, pero no es necesario que refleje la secuencia complementaria exacta de la plantilla. En un caso como éste, la hibridación específica de la sonda con la diana depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden estar etiquetadas con, por ejemplo, partes cromogénicas, radioactivas o fluorescentes, y se las puede utilizar como partes detectables.

Una primera secuencia es una “secuencia antisentido” con respecto a una segunda secuencia si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia se hibrida específicamente con un polinucleótido cuya secuencia es la segunda secuencia.

Las expresiones “que se hibrida específicamente a” o “hibridación específica” o “hibridarse específicamente a” se refieren a la ligación, duplexing, o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones rigurosas cuando dicha secuencia se halla presente en una mezcla compleja (por ejemplo, totalmente celular) de ADN o de ARN.

La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones bajo las que una sonda se hibridará preferentemente a la subsecuencia apuntada, y en una menor amplitud, o no en absoluto, a otras secuencias. Las expresiones “hibridación rigurosa” y “condiciones rigurosas de hibridación y lavado” en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como las hibridaciones Southern y Northern dependen de las secuencias, y son diferentes bajo diferentes parámetros del entorno. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos puede hallarse en: Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes* part I chapter 2 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, New York. Por lo general, se seleccionan condiciones de hibridación y de lavado sumamente rigurosas de manera tal que serán aproximadamente 5 °C más bajos que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica de la intensidad iónica definida y del pH. El T_m es la temperatura (bajo condiciones definidas de intensidad iónicas y de pH) bajo las que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente concordante. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan de manera de ser iguales al T_m correspondiente a una sonda en particular.

Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en un filtro en un Southern o Northern blot consiste en 50% de formalina con 1 mg de heparina a 42 °C, llevándose a cabo la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado elevadamente rigurosas es de 0,15 M NaCl a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado 0,2X SSC a 65 °C durante 15 minutos (Véase, Sambrook, *et al.* (1989) *ibíd.* para una descripción del tampón SSC). Frecuentemente, un lavado de elevada rigurosidad es precedido por un lavado de baja rigurosidad a efectos de remover la señal de sonda de segundo plano. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para un dúplex de, *por ejemplo*, más de 100 nucleótidos, es 1x SSC a 45 °C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de baja rigurosidad para un dúplex de, *por ejemplo*, más de 100 nucleótidos, es 4-6x SSC a 40 °C durante 15 minutos. En general, una relación entre señal y ruido de 2x (o superior) que el observado para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación en particular, indica la detección de una hibridación específica.

El término “polipéptido” se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas que se presentan naturalmente, y sus análogos sintéticos de presentación no natural ligados mediante enlaces peptídicos, variantes estructurales relacionadas que se presentan naturalmente, y sus análogos sintéticos de presentación no natural. Los polipéptidos sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante un sintetizador automatizado de polipéptidos. Típicamente, el término “proteínas” se refiere a polipéptidos grandes. Típicamente, el término “péptido” se refiere a polipéptidos cortos.

En la presente se utiliza la notación convencional para referirse a las secuencias polipeptídicas: el extremo a mano izquierdo de una secuencia polipeptídica es el terminal amino; el extremo a mano derecha de una secuencia polipeptídica es el terminal carboxilo.

La expresión "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución efectuada en un polipéptido, de un aminoácido por un aminoácido funcionalmente similar. Cada uno de los siguientes seis grupos 6 contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 5 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).
- 10 También es posible agrupar los aminoácidos como sigue:
 - (1) hidrofóbicos: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 - (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr;
 - (3) ácidos: Asp, Glu;
 - (4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
 - 15 (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
 - (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

La expresión "variante alélica" se refiere a cualquiera de dos o más formas polimórficas de un gen que ocupan el mismo lugar genético. Las variaciones alélicas se presentan naturalmente por mutación, y pueden resultar en polimorfismos fenotípicos dentro de poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (no hay cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión "variantes alélicas" también se refiere a cADNs derivados de transcritos de mRNA de variantes alélicas genéticas, como también de las proteínas codificadas por ellos.

Las expresiones "idéntico/a" o "identidad porcentual", en el contexto de dos o más polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o de residuos de aminoácidos que son los mismos, cuando se los compara y alinea para obtener la máxima correspondencia, medida mediante uno o más de los siguientes algoritmos para la comparación de secuencias o mediante inspección visual.

Las expresiones "sustancialmente homólogo" o "sustancialmente idéntico" en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, por lo general se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de nucleótidos o de aminoácidos de por lo menos un 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, o 98%, cuando se las compara y alinea para establecer una máxima correspondencia, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos para la comparación de secuencias o mediante inspección visual. La identidad sustancial puede existir a lo largo de una región de las secuencias que tiene una longitud de por lo menos aproximadamente 50 residuos, sobre una región de aproximadamente 100 residuos, o sobre por lo menos aproximadamente 150 residuos. Las secuencias pueden ser sustancialmente idénticas a lo largo de la longitud completa de uno o ambos biopolímeros de comparación.

Para la comparación de las secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con respecto a la cual se comparan las secuencias de test. Cuando se utiliza un algoritmo para la comparación de las secuencias, las secuencias de test y de referencia son ingresadas en una computadora, se diseñan coordenadas de subsecuencia, en caso de ser necesario, y se diseñan parámetros para el programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo para la comparación de las secuencias calcula seguidamente la identidad porcentual de las secuencias para la o las secuencias de test con referencia a la secuencia de referencia, sobre la base de los parámetros de programas diseñados.

La alineación óptima de las secuencias para su comparación puede llevarse a cabo por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de la búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual.

Un ejemplo de algoritmo útil es el PILEUP. El PILEUP crea una alineación múltiple de secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas para lo cual utiliza alineaciones apareadas progresivas para mostrar la relación y

la identidad porcentual de las secuencias. También grafica un árbol o dendograma que muestra las relaciones de clústering utilizadas para crear la alineación-. El PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987). El método utilizado es similar al método descrito por Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una con una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple empieza con la alineación de a pares de las dos secuencias más similares entre sí. Este clúster es seguidamente más alineada con respecto a la secuencia, o clúster de secuencias alineadas, más relacionadas. Se alinean dos clústeres de secuencias mediante una simple extensión de la alineación de a pares de dos secuencias individuales. La alineación final se logra mediante una serie de alineaciones apareadas progresivas. El programa se ejecuta diseñando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o de nucleótidos para regiones destinadas a la comparación de secuencias y mediante el diseño de los parámetros del programa. Por ejemplo, es posible comparar una secuencia de referencia con otras secuencias de ensayos utilizando los siguientes parámetros: ponderación de gap por default (3.00), ponderación de longitud de gap por defecto (0.10), y gaps finales ponderados. Otro algoritmo que es útil para la generación de múltiples alineaciones de secuencias es el Clustal W (Thompson, et al., Nucleic Acids Research 22: 4673-4680 (1994)).

Otro ejemplo de algoritmo es adecuado para determinar la identidad porcentual de secuencias y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que ha sido descrito en Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El software para llevar a cabo análisis de BLAST está públicamente disponible por medio del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implique identificar inicialmente pares de secuencias de elevado puntaje (HSPs, high scoring sequence pairs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que o bien concuerda con, o satisfacen algún puntaje umbral de valor positivo T cuando está alineado con una palabra de la misma longitud en la secuencia de base de datos. T se diseña como el umbral de puntaje de palabra de vecindad (Altschul *et al.* (1990), *supra*). Estos aciertos de palabras de vecindad actúan como semillas para iniciar búsquedas a efectos de hallar HSPs más largos que los contengan. Los aciertos de palabras son seguidamente ampliados en ambas direcciones a efectos de encontrar HSPs más largos que los contengan. Los aciertos de palabras son ampliados en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta la extensión en que es posible incrementar el puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativo se calculan por ejemplo, para la secuencia de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos que hacen juego: siempre > 0) y N (puntaje de penalización por residuos que no concuerdan; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineación acumulativa decae en la cantidad X a partir de su máximo valor logrado; el puntaje acumulativo cae a cero o más bajo aún, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o se ha llegado al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para la secuencia de nucleótidos) utiliza como defaults una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa n (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como defaults una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (Véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Además de calcular la identidad porcentual de secuencias, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (Véase, *por ejemplo*, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que provee una indicación de la probabilidad con la que una concordancia entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos podrían suceder por casualidad. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de test con respecto al ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,1, inferior a aproximadamente 0,01 o inferior a aproximadamente 0,001.

Otra indicación que dos secuencias de ácido nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas entre sí, es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico presenta una reacción cruzada inmunológica con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe en lo que sigue. Por lo tanto, típicamente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos polipéptidos difieren solamente en sustituciones conservadoras. Otra indicación que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas, es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe en la presente.

Las expresiones "sustancialmente puro" o "aislado" significan que una especie objeto es la especie predominante presente (*es decir*, en una base molar, más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual presente en la composición), y una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende por lo menos aproximadamente 50% (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Por lo general, una composición sustancialmente pura significa que aproximadamente el 80% a 90% o más de la especie macromolecular presente en la composición es la especie purificada de interés. La especie objeto es purificada hasta su homogeneidad esencial (no es posible detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales) si la composición consiste esencialmente en especies macromoleculares individuales. Para los fines de esta definición, las especies solventes, las moléculas pequeñas (<500 Daltons), los agentes estabilizantes (*por ejemplo*, BSA), y las especies iones elementales no son considerados como especies macromoleculares. En algunas formas de realización, los compuestos o conjugados de

la invención son sustancialmente puros o aislados con respecto a los materiales de partida macromoleculares utilizados en su síntesis. En alguna forma de realización, las composiciones farmacéuticas para ser utilizados de acuerdo con la invención comprenden un conjugado sustancialmente purificado o aislado de un polipéptido PAL y del agente activo mezclado conjuntamente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 La expresión “representación natural”, aplicado a un objeto, se refiere al hecho que el objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que se halla presente en un organismo (lo que incluye los virus) que puede ser aislada a partir de una fuente natural y que no ha sido modificada internacionalmente por el ser humano en el laboratorio, es de presentación natural.

- 10 La expresión “de tipo salvaje” es un término que se refiere a la forma genética natural de un organismo. Se diferenciar un tipo salvaje de una forma mutante (un organismo con una mutación genética).

- Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto., Por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, mutímeros, y similares, se encuentran incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como sus fragmentos están abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones posexpresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, el término “polipéptido” se refiere a una proteína, lo que incluye modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (que por lo general son de una naturaleza conservadora), introducidas en la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tales como mediante mutagénesis dirigido a sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones que surgen con huéspedes que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

- 20 Tal como se los utiliza en la presente, los términos “análogo” o “derivado” se refieren a un compuesto, por ejemplo, un péptido, que tiene una similitud de secuencias superior a aproximadamente el 70%, pero inferior al 100%, con un compuesto dado, por ejemplo, un péptido. Tales análogos o derivados pueden comprender residuos de aminoácidos de presentación no natural, lo que incluye a título de ejemplo, sin limitación, la homoarginina, ornitina, penicilamina y norvalina, como también residuos de aminoácidos de presentación natural. Tales análogos o derivados también pueden estar compuestos de uno, o de una pluralidad de, ácidos D-amino, y puede contener interenlaces no peptídicas entre dos o más residuos de aminoácidos.

- 25 La expresión “cantidad efectiva” se refiere a una dosificación suficiente para producir un efecto deseado sobre una condición de salud, patología, y enfermedad de un sujeto, o para fines de diagnóstico. El resultado deseado puede comprender una mejoría subjetiva u objetiva en el receptor de la dosificación. La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a aquella cantidad de un agente que es efectiva para producir el efecto beneficioso previsto sobre la salud. En cualquier caso, la “cantidad efectiva” adecuada puede ser determinada por una persona con la pericia habitual en la técnica, utilizando una experimentación rutinaria.

- 30 El término “tratamiento” se refiere a un tratamiento profiláctico, un tratamiento terapéutico, o un tratamiento de diagnóstico.

- Un tratamiento “profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o que presenta solamente signos tempranos, a los efectos de disminuir el riesgo de desarrollar una patología. Los compuestos o conjugados pueden ser administrados como un tratamiento profiláctico a efectos de reducir la probabilidad de desarrollar una patología o a los efectos de minimizar la gravedad de la patología si llegara a desarrollarse.

- 40 Un tratamiento “terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos o síntomas de patología, a los efectos de disminuir o eliminar estos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionales, subjetivos u objetivos. Los compuestos o conjugados de la invención pueden administrarse como un tratamiento terapéutico, o para fines de diagnóstico.

- 45 El término “diagnóstico” significa identificar la presencia o naturaleza de una condición patológica. Los métodos de diagnóstico difieren en cuanto a su carácter específico y selectividad. Si bien es posible que un método de diagnóstico particular no provea un diagnóstico definitivo de una condición, es suficiente que el método provea una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

- 50 La expresión “composición farmacéutica” se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un animal sujeto, lo que incluye seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente efectiva de un polipéptido PAL y también comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica comprende una composición que comprende el o los ingredientes activos y el o los ingredientes inertes que constituyen el portador, como también cualquier producto que resulte, de manera directa o indirecta, de la combinación, complejación o agregación de cualquier de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno más de los ingredientes. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención comprenden cualquier composición preparada mediante el mezclado conjunto de un compuesto o conjugado de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere al cualquiera de los portadores, tampones y excipientes, farmacéuticos estándar, tales como una solución salina taponada con fosfato, una solución acuosa de dextrosa al 5%, y las emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes y/o de adyuvantes. Se describen portadores y formulaciones farmacéuticas adecuadas en: Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los portadores farmacéuticos dependen del modo de administración previsto para el agente activo. Los modos de administración típicos incluyen la administración enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, inyecciones subcutáneas, intramusculares, intravenosas o intraperitoneales; o la administración tópica, transdérmica o transmucosa). Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que puede ser formulada de manera de obtener un compuesto o conjugado para uso farmacéutico, lo que incluye por ejemplo, sales de metal (de sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.), y sales de amonio o de aminas orgánicas.

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a un material que no es indeseable desde el punto de vista biológico ni de ninguna otra manera, es decir, el material puede ser administrado a un individuo sin ocasionar ningún efecto biológico indeseable ni interactuar de una manera perjudicial con alguno de los componentes de la composición en la cual se halla contenido.

La expresión "forma de dosis unitaria", tal como se la utilizan en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto o conjugado de la presente dimensión, calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo, farmacéuticamente aceptables. Las especificaciones para la novedosa dosis unitaria dependen del compuesto o conjugado particular utilizados, y del efecto que se desea lograr, y del comportamiento farmacodinámico asociado con cada compuesto o conjugado en el huésped.

Las expresiones "pH fisiológico" o "pH en el intervalo fisiológico" se refieren a un pH en el intervalo de aproximadamente 7,2, a 8,0 inclusive, más típicamente en el intervalo de 7,2 a 7,6 inclusive.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "sujeto" abarca tanto mamíferos como no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen sin limitación cualquier miembro de la familia de los mamíferos: seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés, y otros especies de simios y de monos; animales de granja tales como ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, porcinos; animales domésticos tales como conejos, perros, y gatos; animales de laboratorio lo que incluye roedores tales como ratas, ratones y cobayos, y similares. Los ejemplos de no-mamíferos incluyen sin limitación: aves, peces, y similares. El término no designa una edad ni sexo en particular.

La pegilación de las variantes de PAL puede describirse haciendo referencia a las relaciones PAL:PEG o PEG:PAL. Tal como se utiliza en la presente, y a menos que se indique otra cosa, la relación "PAL:PEG" se refiere a la relación entre los residuos lisina en la variante de PAL y las moléculas de PEG en la reacción de pegilación. De manera similar, y tal como se la utiliza en la presente, la relación "PEG: PAL" se refiere a la relación entre las moléculas de PEG y los residuos lisina sobre la variante de PAL en la reacción de pegilación.

B. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS BASADA EN LA ESTRUCTURA

Se conocen numerosos métodos para la ingeniería de proteínas usando optimización racional basada principalmente en la información estructural de la proteína (Brannigan, et al., Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3(12):964-970 (2002); Marshall, et al., Drug Discov. Today 8(5):212-221 (2003)). El reemplazo sistemático de las características estructurales puede conducir a la mejora de las propiedades de la proteína y/o un rediseño de la especificidad de sustrato. La incorporación de la función de un miembro de una familia de genes en otro miembro homólogo se puede lograr mediante la introducción de un número limitado de sustituciones de aminoácidos en la vecindad de unión al sustrato inmediata. Tales mejoras en la función de las proteínas mediante la generación de mejores variantes de la proteína puede conducir a proteínas útiles para aplicaciones industriales, agrícolas y terapéuticas (Bocanegra, et al., Biochemistry 32(11):2737-2740 (1993); Failla, et al., Fold Des. 1(1):35-42 (1996); Hayes, et al., Proc Natl Acad Sci USA 99(25):15926-15931 (2002); Voigt, et al., Nat. Struct. Biol. 9(7):553-558 (2002); Malashkevich, et al., Nat Struct Biol. 2(7):548-553 (1995); Wells, et al., Proc Natl Acad Sci USA 84(15):5167-5171 (1987); Wilks, et al., Science 242(4885):15.41-1544 (1988)).

C. LA ESTRUCTURA DE PAL

La estructura tridimensional de PAL procariótica tipo salvaje se puede determinar usando cristalografía de rayos x. La proteína PAL es un homotetramero, cada monómero que consiste principalmente de alfa-hélices y subdivisible en cuatro dominios - un dominio central catalítico, un dominio N-terminal, y un dominio C-terminal pequeño, con similitud a la estructura de histidina amoníaco-liasas de *Pseudomonas putida* (HAL, Schwede, et al., Biochemistry 38(17):5355-5361 (1999)) más un dominio adicional insertado en la región C-terminal que sobresale de los extremos de la molécula intacta del tetramero. Los primeros 25 residuos N-terminal no son visibles en la estructura para los cuatro monómeros en el tetramero, y esta región está probablemente desordenada. Las regiones de bucle entre los residuos 109-123 y 350-353 están desordenadas para el monómero B, con las regiones 103-123 y 350-353 desordenado para los monómeros A, C y D en el tetramero PAL. Otras dos estructuras de rayos X de PAL de

Rhodospiridium toruloides se han determinado utilizando trans-cinamato y adición de iones NH_4 durante el proceso de cristalización, con resoluciones de 2,1 Å (grupo espacial P3221) y 2,7 Å (grupo espacial P21; Calabrese, et al., Biochemistry 43(36):11403-11416 (2004)). El pH más bajo usado para la cristalización y la resolución más baja de estas estructuras llevaron a un trastorno más inherente a las estructuras (especialmente en las regiones N-terminales) y a la imposibilidad de asignar de forma inequívoca la densidad electrónica adicional presente en el cofactor MIO a un aducto NH_2 .

Existen numerosas estructuras relacionadas (utilizando DALI, Holm, et al., J. Mol. Biol. 233:123-138 (1993)) en esta familia de enzimas tetraméricas que catalizan la eliminación de diversos grupos de ácidos carboxílicos, incluyendo los de amoníaco-liasas (PAL, HAL, y aspartato amoníaco-liasa (AAL)), fumarasa y arginosuccinato liasa (Schwede, et al., Biochemistry 38(17):5355-5361 (1999)). Además, la proteína el cristalino del ojo aviar δ -cristalino tiene un pliegue similar, pero es una forma no enzimática de esta familia estructural (Schwede, et al., (1999) ibíd.).

Las estructuras tridimensionales de rayos X de HAL de P. putida (Röther, et al., Eur. J. Biochem. 268:6011-6019 (2001); Schwede, et al., Biochemistry 27:5355-5361 (1999), y más recientemente de la PAL de Rhodospiridium toruloides (Calabrese, et al., Biochemistry 43:11.403-11416 (2004).), reveló los residuos del sitio activo de estas enzimas tetraméricas que son importantes para la unión, catálisis y la formación de MIO del sustrato. Todo residuos del sitio activo en HAL están presentes en EncP excepto para H83 y E414, que se sustituyen con residuos de valina y glutamina, respectivamente (Xiang, L., et al., J. Biol. Chem. 277:32505-3250924 (2002)). H83 en HAL se propone para unirse y orientar el resto de imidazol de L-histidina en el sitio activo y estabilizar un intermediario catiónico unido a la enzima, mientras que el grupo carboxilato del E414 puede actuar como una base en la catálisis.

La estructura cristalina de la proteína tridimensional de alta resolución de PAL se puede utilizar en métodos que implican la ingeniería de proteínas para mejorar las propiedades bioquímicas y biofísicas de PAL, y para aumentar la efectividad terapéutica in vivo de PAL. Además, la estructura proporciona información con respecto a cuáles regiones de la estructura son los más flexibles (para eliminar y generar una forma más compacta y estable de PAL), cuáles residuos se ubican cerca del sitio activo (para mutar con el fin de mejorar la actividad y/o minimizar el tamaño de la proteína, así como para proporcionar información para el diseño de inhibidores basados en la estructura), y cuáles lugares superficiales están cercanos a sitios inmunogénicos (por ejemplo, epítopos lineales identificados en estudios de mapeo) y/o sensibles proteolíticos (de los estudios de mapeo de la proteasa), lo que permite la introducción de mutantes específicos de sitio para la ruptura directa de los sitios problema o, alternativamente, para la pegilación superficial u otra derivación química para proteger los sitios sensibles presentes en PAL nativa.

D. USOS DE LAS COORDENADAS ESTRUCTURALES DE PAL

La alta resolución de la estructura cristalina tridimensional de PAL se puede utilizar en métodos computados para la selección de regiones de la proteína de mutación, modificación, o mutación y modificación combinada. Por ejemplo, el programa GETAREA disponible comercialmente calcula la exposición de superficie para los residuos de aminoácidos sobre la base las coordenadas cristalográficas de rayos X.

La estructura cristalina tridimensional de alta resolución también se puede usar en métodos in silico para diseñar ligandos para el sitio activo de la enzima. Por ejemplo, los programas de software disponibles en el comercio para el acoplamiento y el diseño de moléculas pequeñas basadas en la estructura se pueden utilizar para diseñar inhibidores PAL (Billett, et al., Biochim Biophys Acta 524(1):219-230 (1978); Janas, et al., Acta Biochim Pol. 32(2):131-143 (1985); Zon, et al., Phytochemistry 59(1): 9-21 (2002); Alunni, et al., Arch Biochem Biophys. 412(2):170-175 (2003)).

Ingeniería de PAL basada en la estructura

La dilucidación de una estructura tridimensional confiable o modelo estructural para una macromolécula específica permite que diseño racional sea un método productivo para la optimización de la estructura y/o función específica de dicha macromolécula (Penning; et al., Chem Rev. 101(10): 3027-3046 (2001)). Los enfoques de optimización incluyen, pero sin limitación la reingeniería de la especificidad de la coenzima (Bocanegra, et al., Biochemistry 32(11):2737-2740 (1993)); mejora de las estabilidades de la proteína (Malakauskas, et al., Nat Struct Biol. 5(6): 470-475 (1998); Jiang, et al., Protein Sci. 10(7):1454-1465 (2001); Luo, Protein Sci. 11(5):1218-1226 (2002); Filikov, et al., Protein Sci. 11(6):1452-1461 (2002); O'Fagain, Enz Microb Technol. 33:137-149 (2003); Cammett, et al., J Mol Biol. 327(1):285-297 (2003)), rediseño de las especificidades del sustrato (Hedstrom, et al., Science 255(5049):1249-1253 (1992); Failla, et al., Fold Des. 1(1):35-42 (1996); Malashkevich, et al., Nat Struct Biol. 2(7):548-553 (1995); Wilks, et al., Biochemistry 31(34):7802-7806 (1992); Feil, et al., Protein Eng. 10(3):255-262 (1997); Whittle, et al., J Biol Chem. 276(24):21500-21505 (2001)), alteración de las especificidades de unión del ligando o receptor (Cunningham, et al., Proc Natl Acad Sci USA 88(8):3407-3411 (1991); Reddy, et al., Nat Biotechnol. 14(13):1696-1699 (1996); Doyle, et al., Curr Opin Chem Biol. 4(1):60-63 (2000)), y reingeniería de actividades biológicas (Chen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12): 5618-5622 (1993); Sarkar, et al., Nat Biotechnol. 20:908-913 (2002); Blatt, et al., J Interferon Cytokine Res. 16(7):489-499 (1996)).

Se puede usar ingeniería basada en la estructura para generar variantes de PAL que incluyen mutantes racionales, tales como truncamientos, supresiones, inserciones, variantes de empalme, mutaciones puntuales, sustituciones,

quimeras, mutantes sometidas a reingeniería de bucle, mutantes de barrido del bucle, mutantes de recubrimiento de superficie, así como mutantes derivadas estocásticamente (que incluyen las mutantes derivadas por evolución dirigida, solas o en combinación con los mutantes racionalmente desarrolladas). Además, se pueden obtener variantes PAL que comprenden mutantes PAL donde se han introducido mutaciones para la pegilación específica de sitio y/u otras derivaciones químicas. Los mutantes de PAL para su uso en tales métodos incluye cualquier variante PAL tiene sustancialmente la misma actividad funcional como PAL de tipo salvaje de *R. toruloides*, que incluyen variantes, fragmentos y derivados químicos de la proteína PAL original.

Optimización de proteínas por evolución dirigida

Los métodos de evolución dirigida mutan al azar los genes de interés para explorar más completamente regiones más grande del espacio mutacional de la proteína. Existen numerosos métodos de evolución dirigida, que incluyen PCR propensa a errores y mutagénesis por inserción y supresión aleatoria (RID) para introducir la diversidad a lo largo de una secuencia de ADN, y métodos de generación de diversidad más centrados o "dirigidos" tales como mutagénesis de saturación del sitio y otros métodos de mutagénesis basados en oligonucleótidos (Brannigan, et al., (2002) *ibid.*). Además, los métodos de recombinación de secuencias de ADN se han utilizado para combinar sitios ventajosos de mutación y simultáneamente eliminar mutaciones perjudiciales, lo que produce nuevas secuencias de ADN (por ejemplo, métodos de transposición de ADN, StEP, RACHITT, ITCHY). Por último, las técnicas de evolución dirigida basadas en la estructura se han utilizado para rediseñar proteínas para la ventaja terapéutica (manipulación genética combinatoria basada en la estructura, SCOPE, y métodos de automatización de diseño, de proteínas, PDA). El método SCOPE se basa en un enfoque de ingeniería de proteínas semirracional que utiliza la información de estructura de la proteína junto con las técnicas de manipulación de ADN para diseñar y crear múltiples bibliotecas de variantes de proteínas cruzadas de genes no homólogos (O'Maille, et al., *J Mol Biol.* 321 (4): 677 a 691 (2002)). En PDA, un preanálisis computacional de espacio mutacional permite la inclusión sólo de mutaciones compatibles con un pliegue de proteína específica, de este modo se reduce el número de variantes de secuencia a un tamaño susceptible para el análisis experimental (patente U. S. N.º 6.403.312; Dahiyat, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 94(19):10172-10177 (1997); Dahiyat, et al., *Protein Sci.* 6(6):1333-1337 (1997); Hayes, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99(25):15926-15931 (2002) Orenica, et al., *Nature Struct Biol.* 8:238-242 (2001).

Existe un gran número de ejemplos en el que el uso de evolución dirigida (con acoplamiento a un protocolo de selección o análisis efectivo) ha llevado a la mejora de la función catalítica y propiedades biofísicas (por ejemplo, inmunogenicidad reducida, aumento de la estabilidad), a partir de una especie enzimática inicial y la mutación de las especies para la función alterada y/o mejorada (Vasserot, et al., *Drug Discovery Today* 8 (3):118-126 (2003)). Por ejemplo, se han obtenido mutantes exitosas se han obtenido usando métodos de evolución dirigida y otros métodos de mutagénesis "aleatorios" en un número de diferentes proteínas (isomerasa de triosa-fosfato, Hermes, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 87(2):696-700 (1990); Beta-lactamasa, Stemmer, W.P., *Nature* 370(6488):389-391 (1994), Orenica, M.C., et al., *Nature Struct Biol* 8:238-242 (2001), Voigt, C. A., et al., (2002) *ibid.*; para-nitrobenzil esterasa, Moore, et al., *Nature Biotechnol.* 14:458-467 (1996); Galactosidasa a fucosidasa, Zhang, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 94(9):4504-4509 (1997); aspartato aminotransferasa, Yano, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95(10):5511-5515 (1998); proteína verde fluorescente, Crameri, et al., *Nat Biotechnol* 14(3):315-319 (1996); peroxidasa de rábano, Lin, et al., *Biotechnol Prog* 15: 467-471 (1999); citocromo P450, Joo, et al., *Nature* 399(6737):670-673 (1999); bifenil dioxigenasa, Kumamaru, et al., *Nat Biotechnol* 16(7):663-666 (1998); vía de destoxificación de arsenato, Crameri, et al., *Nat Biotechnol* 15(5):436-438 (1997); cefalosporinasa Crameri, et al., *Nature* 391(6664):288-291 (1998); varias proteínas, Shao, et al., *Curr Opin Struct Biol* 6(4):513-518 (1996), varias proteínas, Skandalis, et al., *Chem Biol* 4:889-898 (1997); Subtilisin, Cunningham, et al., *Protein Eng.* 1(4):319-325 (1987); Nitrilase, DeSantis, et al., *J Am Chem Soc.* 125(38):111476-11477 (2003); alfa-aspartil dipeptidasa, Kong, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 289(1):137-142 (2001); Aspartato-aminotransferasa, Rothman, et al., *Protein Science* 13(3):763-772 (2004); L-aspartasa, Wang, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 276(1):346-349 (2000); y lactato deshidrogenasa, Wilks, et al., *Biochemistry* 31(34):7802-7806 (1992).

Estos estudios han demostrado repetidamente la utilidad de la aplicación de técnicas de mutagénesis "aleatoria" para el desarrollo de mejores variantes de enzimas con una mayor estabilidad, actividad, y la resistencia a las vías de degradación. El análisis estructural de clones proteínas evolucionadas conduce a una visión sobre los cambios moleculares que están involucrados con las mejores propiedades físicas y químicas que se obtienen (Orenica, et al., in *Advances in Protein Chemistry: Evolutionary protein design*, F.H. Arnold, Editor, Academic Press: San Diego, pp. 227-259 (2001)). Las recompensas que se pueden obtener con las técnicas de evolución dirigida son especialmente evidentes a la luz de la aparición repetida de mutaciones beneficiosas que involucran residuos del sitio no activos, con algunos sitios de mutación ubicados en 15-20 Å de las regiones del sitio activo de la enzima que tienen efectos beneficiosos (Oue, et al., *J. Biol. Chem.* 274(4):2344-2349 (1999)). La evolución dirigida y otras técnicas de mutagénesis aleatoria, junto con los procedimientos de selección y análisis se pueden utilizar para desarrollar formas más proteólicamente estables y químicamente robustas de PAL para usar en aplicaciones industriales o, alternativamente, para la terapia de sustitución enzimática, por ejemplo, para PKU.

E. PAL MODIFICADA

Experimentos previos han descripto formas modificadas de PAL, tales como mutantes de PAL (Schuster, et al., *FEBS Lett.* 349(2):252-254 (1994); Schuster, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 92(18):8433-8437 (1995); Langer, et al.,

Biochemistry 36:10867-10871 (1997); El-Batal, et al., Acta Microbiol Pol. 49(1):51-61 (2000); Röther, et al., Eur. J. Biochem. 269:3065-3075 (2002)) y mutantes de HAL (Taylor, et al., J. Biol. Chem. 269(44):27473-27477 (1994); Baedeker, et al., Eur. J. Biochem. 269(6):1790-1797 (2002)).

Optimización de cinética de PAL – mutantes procarióticas con mejor actividad catalítica

- 5 Los sitios biológicamente activos de PAL tipo salvaje se pueden modificar como se desee para optimizar las características cinéticas de PAL. Km, la concentración de sustrato que da la mita de la actividad máxima, está íntimamente relacionada con la eficacia terapéutica de PAL en el mantenimiento de niveles de Phe dentro de un rango aceptable, es decir, 120 μ M a 240 μ M. Km es la afinidad de la enzima por el sustrato. Mediante el control de afinidad, se puede limitar o controlar la eficacia de cualquier enzima frente a diferentes concentraciones de sustrato.
- 10 Por ejemplo, si Km es de μ M (Rhodospiridium toruloides), la actividad de la enzima se reducirá aproximadamente 12,5% en los niveles sanguíneos de Phe de 240 μ M y hasta aproximadamente 3% en los niveles sanguíneos de Phe de 60 μ M. Si Km es 240 μ M, la actividad de la enzima se reducirá aproximadamente 50% en los niveles sanguíneos de Phe de 240 μ M y hasta aproximadamente 12% en los niveles sanguíneos de Phe de 60 μ M. Si la Km es 120 μ M, la actividad de la enzima se reducirá a aproximadamente 70% en los niveles sanguíneos de Phe de 240 μ M y hasta aproximadamente 35% en los niveles sanguíneos de Phe de 60 μ M. De manera óptima, un objetivo terapéutico sería tener una enzima con actividad suficiente para reducir, pero también mantener Phe dentro del rango óptimo de aproximadamente 120 μ M a aproximadamente 240 μ M. Una enzima con un Km alto (es decir, 1,000 μ M) perderá la actividad rápidamente ya que los niveles de fenilalanina caen dentro del rango normal y también requerirán la administración poco práctica de volúmenes de dosis muy concentrados o grandes. Por otro lado, una
- 20 enzima con una Km muy baja puede agotar rápidamente los niveles de Phe, lo que puede ser fatal para hiperfenilalanemias pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer.

- Como se describe en la presente, algo de la PAL modificada biológicamente activa tiene una kcat de al menos aproximadamente 0,1 s⁻¹ o mayor de aproximadamente 0,5 s⁻¹. Alternativamente, la PAL modificada biológicamente activa tiene una kcat de al menos aproximadamente 0,2 s⁻¹ o mayor de aproximadamente 1,0 s⁻¹. Como se describe en la presente, la PAL modificada biológicamente activa tiene una Km de entre aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 1.000 μ M. Alternativamente, la PAL modificada biológicamente activa tiene una Km de entre aproximadamente 100 μ M a aproximadamente 1.000 μ M. Como se describe en la presente, la PAL modificada biológicamente activa presenta actividad enzimática que es desde aproximadamente dos veces a aproximadamente 1000 veces mayor que la de la de tipo salvaje. Como se describe en la presente, la PAL modificada biológicamente activa presenta actividad enzimática que es de aproximadamente 10% a aproximadamente 100% mayor que la de la de tipo salvaje. Tales proteínas PAL modificada biológicamente activa se pueden formar usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante mutagénesis dirigida al sitio.

- Se demostró que todos los residuos del sitio activo en HAL, están presentes en EncP excepto por H83 y E414, que se sustituyen con residuos de valina y glutamina, respectivamente (Xiang, L., et al, J. Biol Chem 277:32505-32.509 (2.002)). Se investigó el papel de H83 en HAL en la unión y orientar el resto de imidazol de L-histidina en el sitio activo y en la estabilización de un intermediario catiónico unido a la enzima (Xiang, et al., J. Bacteriology 187(12):4286-4289 (2005); Xiang, et al., J. Bacteriology 188(14):5331 (2006)). Se propuso que el grupo carboxilato de E414 puede actuar como una base en la catálisis. En el estudio, las mutantes de EncP se generaron por mutagénesis dirigida al sitio para evaluar la contribución de V83 a la formación de ácido cinámico por EncP. El
- 40 reemplazo de valina con histidina generó una mutante, V83H, que se caracteriza por una pérdida en la actividad PAL. El reemplazo de valina por alanina produjo una mutante, V83A, que era más activa que EncP V83A tipo salvaje, presentó una afinidad ligeramente inferior a L-fenilalanina con un Km de 120 μ M versus 23 μ M para la enzima de tipo salvaje. Sin embargo, en comparación con EncP V83A tipo salvaje tenía una kcat más alta y era más activo que la enzima de tipo salvaje.

Variantes de proteína específicas: Variantes que tienen inmunogenicidad reducida

- Actualmente se usan numerosas estrategias para reducir la inmunogenicidad de la proteína. Como se describe en la presente, las modificaciones que se introducen para minimizar la respuesta inmune no destruyen la estructura, la función, o la estabilidad de la macromolécula. Las estrategias eficaces utilizadas incluyen el aumento de contenido secuencia humana (quimeras y/u otras estrategias de 'humanización'), la mejora de las propiedades de la solución, la eliminación de epítopos de anticuerpos, la introducción de derivación química (tal como pegilación), y/o la identificación y eliminación de agretopos MHC. Para un agente terapéutico inyectado, la inmunorreactividad in vivo se puede abordar mediante la realización del mapeo de epítopos seguido por mutagénesis racional para modificar y/o mutar de otra manera estos sitios de inmunogenicidad, solo y en combinación con la pegilación específica de sitio (Hershfield, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7185-7189 (1991); Leong, et al., Cytokine 16(3):106-119 (2001); Lee, et al., Pharm. Res. 20(5):818-825 (2003)) u otros métodos de derivación química para reducir la inmunorreactividad de la proteína a un nivel aceptable. La modificación de las regiones de la proteína de superficie antigénicas reduce la inmunogenicidad (Chirino, et al., Drug Discov. Today 9(2):82-90 (2004)). Un método de mejora implica la construcción de proteínas de menor tamaño que retienen la actividad catalítica (por ejemplo, se utiliza un ensayo de absorbancia para la medición de la actividad). Un segundo método de mejora, ingeniería de proteínas acoplada a la detección ELISA, también se puede utilizar para identificar mutantes con inmunorreactividad reducida.
- 60 Otro método introduce mutaciones puntuales para los sitios de Lys de superficie adicionales para la derivación por

pegilación, un método que demuestra reducir la inmunogenicidad con la prueba de enzima fosforilasa del nucleósido purínico (Hershfield et al. (1991) *ibíd.*). Una vía alternativa utiliza la mutación de residuos localizados en regiones de epítomos de proteínas para eliminar sitios inmunogénicos (Yeung, et al, J Immunol 172 (11):6.658-6.665 (2004)). En un enfoque que es análogo a la humanización de anticuerpos, las regiones y/o los residuos del bucle homólogos de bucle de los anticuerpos humanos se sustituyen en las regiones de bucle correspondientes de una proteína homóloga.

La mejora de las propiedades de la solución de proteínas pueden aumentar la actividad de la enzima específica y/o reducir la inmunogenicidad. Una propiedad de la solución típica de las proteínas recombinantes expresadas en bacterias es la formación de agregados de proteínas, debido, por ejemplo, a la formación de enlace disulfuro intercadena, interacciones hidrofóbicas y/o cationes divalentes (Chi, et al, Pharm Res 20 (9):1325 -1336 (2003)). La agregación de las proteínas expresadas de forma recombinante puede mejorar la respuesta inmune (Hermeling, et al, Pharm Res 21 (6):. 897-903 (2.994); Schillekens, Nephrol Dial Transplant 20 (Suppl 6): vi3-9 (2005)). Un método de mejora implica la sustitución de residuos de cisteína de superficie con otros residuos de aminoácidos (por ejemplo, serina) para minimizar la posibilidad de formación de enlaces disulfuro entre cadenas. Por ejemplo, la sustitución de dos residuos de cisteína de superficie con residuos de serina reduce la agregación de la corismato liasa con efectos menores sobre la actividad de la enzima (Holden, et al, Biochim Biophys Acta 1,594 (1):. 160-167 (2002)).

La eliminación de los sitios de procesamiento proteolítico de la proteína terapéutica también puede proporcionar una reducción de la inmunogenicidad al evitar el procesamiento proteasómico, de este modo se evita el recorte y el procesamiento de los fragmentos de péptidos para la unión de célula presentadora de antígeno. Se ha observado un fenómeno similar en la alteración de las regiones flanqueantes para los determinantes de MHC de clase II, lo que impide la presentación de las células T autorreactivas (Maverakis, et al., Proc Natl Acad Sci, USA 100(9):5342-5347 (2003)).

Mapeo de epítomos

Los epítomos terapéuticos de la proteína se pueden calcular usando un número de algoritmos o determinado experimentalmente con métodos in vitro o in vivo. Los programas de computadora tales como "Compañero péptido" y "Protean" en el conjunto del programa de Lasergene de DNASTar se utilizan comúnmente para estimar las regiones de epítomo superficiales de una proteína basada en la composición química y la conformación de una proteína. Las regiones inmunogénicas de una secuencia de proteína son las regiones de hidrofiliidad calculada más alta, sobre la base de un índice de hidrofiliidad, antigenicidad y, sobre la base de anfipaticidad y otros parámetros conformacionales de las regiones de proteína superficial calculadas. Alternativamente, los agretopos en una secuencia de proteína se pueden ubicar sobre la base de predicciones modeladas por computadora de la unión HLA potencial (Robinson, et al., Nucleic Acids Res. 31(1):311-314 (2003); De Groot, et al., Novartis Found. Symp. 254:57-72 (2003)). Además, los epítomos se pueden identificar usando métodos bioquímicos in vitro (Tangri, et al., Curr. Med. Chem. 9(24):2191-2199 (2002)) y basados en células in vitro (Stickler, et al., J Immunother. 23(6):654-660 (2000); Stickler, et al., J Immunol Methods 281(1-2):95-108 (2003)). Para la ingeniería de proteínas, la reducción relativa de la inmunogenicidad se puede controlar usando ensayos similares en el ensayo basado en células in vitro de Stickler, et al. (Toxicol Sci. 77(2):280-289 (2004)).

El análisis Pepscan (mapeo de epítomos) implica el uso de una biblioteca de péptidos superpuestos que abarcan regiones de la superficie de la secuencia de la enzima y el análisis con anticuerpos policlonales de conejo generados contra los péptidos superpuestos que cubren la secuencia de la proteína de la enzima completa, y de este modo revela los epítomos lineales presentes en la enzima. Sobre la base de la estructura tridimensional de la enzima, los sitios identificados experimentalmente de antigenicidad están mutados ya sea por la mutación aleatoria de los residuos de la región del epítomo para eliminar los sitios de reconocimiento de epítomo o mediante mutación específica de sitio para introducir los residuos de Lys o Cys en la superficie cerca de estos sitios del epítomo proporcionan lugares para pegilación para cubrir y proteger estos sitios de reconocimiento inmunogénica. La detección ELISA de estas mutantes de enzimas potencialmente no inmunogénicas (o formas pegiladas de estos mutantes de enzimas) proporciona la identificación in vitro de subconjuntos de mutantes de enzimas que muestran inmunorreactividad disminuida.

Identificación y mutación de los residuos de superficie

Se pueden identificar los residuos expuestos en la superficie en o cerca de las regiones inmunogénicas de la enzima. Estos lugares serán un subconjunto del número total de lugares superficiales accesibles al solvente presentes en la proteína, que dependen de la proximidad a la superficie así como la proximidad a regiones de inmunogenicidad/antigenicidad. La estructura tridimensional de la proteína, determinada usando cristalografía de rayos X, RMN, o modelado por homología, se puede utilizar en los programas de software disponibles comercialmente para calcular el área de superficie accesible al solvente de la macromolécula. La salida proporcionada usando el programa GETAREA 1.1 (Fraczkiewicz, et al., J. Comp. Chem. 19:319-333 (1998)) proporciona una estimación confiable de la accesibilidad de superficie para PAL R. toruloides. GETAREA y PARAREA y programas similares calculan el área superficie accesible al solvente usando métodos continuos con un enfoque paramétrico basado en el teorema de Gauss-Bonnet. PARAREA encuentra puntos de intersección

potenciales en la trayectoria de Gauss-Bonnet usando todos los pares de átomos en la lista de vecinos de cada átomo, mientras que GETAREA calcula de manera más eficiente los vértices expuestos al solvente usando hemiespacios de intersección medias definidos por los planos de dos intersecciones de esfera.

En la PAL nativa, GETAREA identificó doce residuos de Lys expuestos en la superficie, distribuidos por toda la superficie de la proteína tetramérica PAL, así como un residuo de Cys de superficie parcialmente expuesto (Cys140). Estas posiciones están directamente disponibles para la derivación por pegilación. Además, la estructura tridimensional de PAL se puede usar para identificar los residuos de superficie adicionales disponibles para la mutagénesis dirigida al sitio. Estos sitios adicionales se pueden mutar usando técnicas de ingeniería de proteínas estándares para generar mutantes PAL más favorables con inmunogenicidad reducida, mejor resistencia proteolítica, y/o mejora de la estabilidad/actividad.

Las estrategias para la mutación de la proteína para proporcionar mutantes de proteínas con propiedades mejoradas, tales como inmunogenicidad reducida son conocidas en la técnica. Una ruta popular muta cada residuo no alanina en un epítipo al Ala, y muta cada residuo de alanina en un epítipo a Gly. Otros métodos eliminan los residuos cargados e hidrofóbicos de las regiones de epítopos, ya sea por mutación o supresión. Las estrategias adicionales de mutación introducen mutaciones específicas del sitio, seguido por derivación química específica de sitio.

Los truncamientos también se pueden usar para la producción de mejoras de proteínas. El análisis bioinformático de PAL en relación con histidina amoníaco-liasas (HAL) ha sugerido mutantes de truncamiento (residuos 23-716 y 1-564). Además, el análisis de la estructura 3-D PAL proporciona una región alternativa para truncamiento, sobre la base de la ausencia de una región del dominio C-terminal en la estructura de la proteína HAL altamente homóloga. Las mutantes de supresión del dominio C-terminal, que incluyen las mutantes donde la región del bucle correspondiente del HAL se fusiona en la secuencia de PAL para sustituir por la región que sobresale del dominio C-terminal de la estructura PAL (calculado para tener regiones de epítipo grandes), forma variantes menos inmunogénicas más pequeñas, más robustas y predichas de PAL.

En otro método, la ingeniería de proteínas usando mutagénesis racional en combinación con la evolución dirigida se puede utilizar para obtener formas mutantes de PAL. Por ejemplo, la implementación del diseño racional junto con el diseño experimental y combinatorio ha mejorado la actividad de la compstatina (Morikis, et al., *Biochem. Soc. Trans.* 32(1):28-32 (2004)). También se ha demostrado que la combinación de la mutagénesis racional y evolución dirigida es prometedora (Bornscheuer, et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(2):137-143 (2001); Dwyer, et al., *Science* 304(5679):1967-1971 (2004)).

Las formas mutantes de PAL que muestran menos de actividad enzimática óptima se pueden desarrollar para la actividad usando el método de ingeniería de proteínas de la evolución molecular dirigida, donde una etapa de mutagénesis aleatoria es seguida por un procedimiento de selección de mutantes que están activos, lo que produce una nueva mezcla de mutante de proteína de solo los clones que tienen actividad. Por ejemplo, si una PAL mutante específica (que se ha diseñado para introducir un residuo de lisina superficial cerca de una región que contiene epítipo de la estructura), está inactivo, la realización de evolución dirigida en esta mutante (que muta la mutante inactiva y la selección de los transformantes con actividad) genera una nueva mezcla mutante que contiene esta mutación beneficiosa (el sitio de lisina superficial) más un subconjunto de mutaciones aleatorias adicionales ubicadas a lo largo de la estructura que restauran la actividad de cada clon activo. Además, la técnica de evolución dirigida de mejoramiento molecular que puede cruzar diferentes especies de la misma proteína o secuencias similares de diferentes proteínas (Cramer, et al. *Nature*, 391:288-291 (1998); Minshull, et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(3):284-290 (1999)) puede sustituir la secuencia de histidina amoníaco-liasas humana para reemplazar algunas de las regiones más inmunogénicas de PAL con una secuencia humana que no será reconocida por el sistema inmunitario.

Las formas mutantes de PAL se pueden obtener mediante la preparación de variantes de proteínas híbridas basadas en enfoques semirracionales, de este modo se permite un diseño nivel más dirigido del diseño de proteínas en relación con los métodos basadas en la evolución dirigida pura, así la provisión de un nivel más aleatorio de manipulación mutacional para las regiones de una estructura de proteína identificada usando tales abordajes de manipulación genética de proteína sesgadas. Por ejemplo, el método PDA genera bibliotecas preseleccionadas por computación de variantes de la proteína, lo que permite la optimización más rápida de las propiedades de la proteína respecto de los métodos de manipulación genética de proteínas aleatoria o sesgada puras (Patente N.º 6.403.312; Dahiyat, *Curr Opin Biotechnol* 10 (4):387-390 (1999); Filikov, et al., (2002) *ibíd.*; Hayes, et al., (2002) *ibíd.*; Luo, P., et al., (2002) *ibíd.*). Del mismo modo, el método SCOPE construye variantes de la enzima híbrida basada en subdominios "equivalentes" de la estructura, lo que permite la creación de múltiples bibliotecas de la variante de la proteína cruzada a partir de genes no homólogos (O'Maille, et al., (2002) *ibíd.*). De manera similar, el método desarrollado por Voigt, *et al.*, construye híbridos basados en la aplicación de un algoritmo computacional que identifica fragmentos de proteínas, o "esquemas, que se pueden recombinar sin alterar la integridad de la estructura tridimensional de la proteína (Voigt, et al., (2002) *ibíd.*). El análisis computacional también puede identificar regiones centrales conservadas de posiciones estructural y funcionalmente importantes en un pliegue de proteínas, sobre la base de asignaciones del elemento estructural secundario (Mizuguchi, et al., *Bioinformatics* 16(12):1111-1119

(2000)). Las formas mutantes de PAL se pueden obtener siguiendo los procedimientos de cualquiera de los métodos de la técnica.

HAL como un sustituto de enzima alternativo

La estructura de encP de *Streptomyces maritimus* se ha modelado por homología basado en la estructura de la HAL de *P. putida*. Aunque menor que la PAL, la estructura de *S. maritimus* es más similar a la PAL humana, lo que hace a encP una forma posiblemente menos inmunogénica de un amoníaco-liasa por usar para la manipulación genética de proteínas PAL. Un método alternativo para la obtención de variantes PAL no inmunogénicas implica la mutación de encP de *S. maritimus* u otro PAL procariótica para reemplazar las secuencias inmunogénicas por las secuencias de amoníaco-liasa de histidina humana (HAL, Suchi, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1216 (2) : 293-295 (1993)), utilizando mutación seguido de la selección para encP u otros mutantes procarióticos con actividad PAL, para obtener una encP "humanizada" u otra proteína PAL procariótica que se puede pegilar más siguiendo las etapas de mutación y selección para la actividad.

Variantes de proteína específicas: Variantes que tienen sensibilidad a proteasa reducida

Numerosas estrategias se usan actualmente para reducir la susceptibilidad de la proteína proteasa. En algunos ejemplos, las modificaciones introducidas para minimizar la sensibilidad proteolítica no destruyen la estructura, función, o estabilidad de la macromolécula. Las estrategias efectivas incluyen proporcionar una enzima con una especie que estabiliza el sitio activo tal como un inhibidor competitivo (Gilbert, et al, (1981) *ibid.*; patentes US Nros 6.548.644;.. 6.451.986; 6.433.158; 6.461.849), la modificación química de los grupos amino en sitios de Lys y/o Arg susceptibles para bloquear los sitios de unión de tripsina, mutación de residuos de Tyr, Phe, y/o Trp sensibles a quimiopsina en los aminoácidos neutros más pequeños para abolir la susceptibilidad de escisión, ligar o acoplar PAL a otras macromoléculas de protección (tales como dominios de anticuerpo Fc o los componentes no tóxicos de neurotoxina botulínica), y/o la introducción de sitios de Lys o Cys cerca de los sitios de proteasa susceptibles a proteasa para la derivación química subsiguiente con PEG u otros grupos químicamente protectores o estabilizantes.

F. VARIANTES PAL MODIFICADAS QUÍMICAMENTE

La modificación química de la macromolécula se puede realizar de una manera no específica (que produce mezclas de especies derivadas) o de una manera específica de sitio (basada en la derivación dirigida por reactividad de la macromolécula tipo salvaje y/o modificación selectiva de sitio usando una combinación de mutagénesis dirigida al sitio y modificación química), o de forma alternativa usando procedimientos de ligamiento de proteínas expresadas (Hofmann, et al., *Curr Opin Biotechnol.* 13(4):297-303 (2002)). La modificación química se usa para reducir la inmunogenicidad. La pegilación es un método demostrado para reducir la inmunogenicidad de las proteínas (Bhadra, et al, *Pharmazie* 57 (1): 5-29 (2002)), pero también son posibles la glicosilación y otros procedimientos de derivación química, utilizando la modificación con la fosforilación, amidación, carboxilación, acetilación, metilación, creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres, y derivados de N-acilo (Davis, *Ciencia* 303: 480-482 (2004)).

Proteínas pegiladas

Una serie de diferentes reacciones de pegilación en PAL, usando una variedad de relaciones de reactivo químico PEG a proteína PAL proporcionará derivados de PEG-PAL para cada método de modificación. El grado óptimo de pegilación se puede determinar sobre la base de la actividad residual obtenido para cada especie PAL derivada usando el ensayo de absorbancia en combinación con análisis PAGE y de gel nativo para determinar el grado de derivación del PEG. Después de determinar los rangos iniciales de modificación óptimo, se puede determinar el análisis cinético comparativo (incluyendo determinaciones de Vmax y Km, constantes de unión de sustratos, estabilidad proteolítica, dependencia del pH de la actividad, dependencia de temperatura de la actividad) e inmunorreactividad de las especies PEG-PAL óptimas por ELISA, inmunoprecipitación y transferencia de Western. La manipulación genética de las proteínas también se puede utilizar para generar la mutante PAL más favorable para la pegilación usando las condiciones óptimas de derivación; mediante la minimización del tamaño de la proteína PAL y la modificación solamente de las regiones más antigénicas de la superficie PAL, el costo de la modificación con PEG se reducirá mientras que al mismo tiempo se retiene la máxima cantidad de actividad enzimática y la cantidad mínima de inmunogenicidad. Del mismo modo, se puede usar la pegilación específica de sitio para proporcionar derivados de enzimas.

Otras modificaciones químicas tales como la fosforilación u otra modificación química de los residuos de Lys, Arg, Cys se pueden usar para enmascarar regiones inmunogénicas y/o regiones sensibles proteolíticas. Tales modificaciones químicas incluyen el método de adición de polímero de Bednarsaki y el método de reticulación Altus Corporation para mejorar la estabilidad PAL, reducir la inmunogenicidad, y mejorar la resistencia a la proteasa son ejemplos representativos. Bednarsaki demostró que la adición de polímero mejora la estabilidad de la temperatura de proteína (Wang, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 114(1):378-380 (1992)), y Altus Corporation ha encontrado que la reticulación con glutaraldehído mejora la estabilidad de la enzima.

Para descubrir si la vida media terapéutica in vivo de una proteína tal como PAL se beneficiaría de pegilación, se sintetiza una gran variedad de diferentes conjugados PEG:PAL, caracterizado in vitro y analizado in vivo para la

reducción de L-Phe. Con el fin de optimizar los efectos potenciales de la pegilación e identificar los sitios preferidos de la unión de PEG, se emplea una estrategia de diseño en la que la longitud, conformación, y el grado de unión al PEG del polímero es variada.

Los métodos para la preparación de la PAL pegilado de la presente invención generalmente comprenden las etapas de (a) reacción de PAL con polietilenglicol en condiciones en donde PAL se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener los productos de reacción. Debido a que los sitios específicos de modificación PAL pueden alterar significativamente la actividad intrínseca del conjugado, se exploraron diferentes tipos y cantidades de PEG. La química utilizada para la pegilación de PAL fue la acilación de las aminas primarias de la PAL utilizando el NHS-éster de metoxi-PEG (O-[(N-succinimidiloxycarbonil)metil]-O'-metilpolietilenglicol). La acilación con metoxi-PEG-NHS o metoxi-PEG-SPA produce un enlace amida que elimina la carga de la amina primario original.

Los presentes métodos proporcionan una mezcla sustancialmente homogénea de conjugados de polímero:proteína. "Sustancialmente homogéneo" como se usa en la presente significa que solo se observan moléculas de conjugado de polímero:proteína. El conjugado de polímero:proteína tiene actividad biológica y las presentes preparaciones PAL pegiladas "sustancialmente homogéneas" proporcionados en la presente son las que son lo suficientemente homogéneas para mostrar las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, la facilidad en la aplicación clínica en la previsibilidad de la farmacocinética de lote a lote.

Las moléculas de polímero contempladas para uso en los métodos de pegilación descriptos en la presente se pueden seleccionar entre los polímeros solubles en agua o una mezcla de estos. El polímero soluble en agua se puede seleccionar del grupo que consiste en, por ejemplo, polietilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, dextrano, poli (N-vinilpirrolidona), homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), HPMA, FleximerTM, y alcohol polivinílico, mono-alcoxi (C1-C10)-PEG, ariloxi-PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, bis-succinimidil carbonato de PEG, celulosa, o otros polímeros basados en hidratos de carbono. El polímero seleccionado debe ser soluble en agua de modo que la proteína a la que está unido no precipita en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Para uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

En algunas formas de realización, un polímero soluble en agua para su uso en la presente es polietilenglicol, abreviado PEG. Como se usa en la presente, el polietilenglicol está destinado a abarcar cualquier de las formas de PEG que se han usado para derivar otras proteínas, tales como mono-(C1-C10) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol.

La proporción de moléculas de polietilenglicol a moléculas de proteína variará, como lo harán sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (en términos de eficiencia de la reacción en la que no hay exceso de proteína o polímero sin reaccionar) se determinará por el peso molecular del polietilenglicol seleccionado y del número de grupos reactivos disponibles (típicamente grupos amino varepsilon) presentes. En lo que corresponde al peso molecular, en general, a mayor peso molecular del polímero utilizado, menor número de moléculas de polímero que pueden unirse a la proteína. Del mismo modo, la ramificación del polímero debe tomar en cuenta cuándo optimizar estos parámetros. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular (o cuanto más ramas) mayor será la relación de polímero: proteína. La presente invención contempla varias longitudes del polímero de PEG lineal diferentes que incluyen, pero sin limitación conjugados de polímeros de PEG 5 kDa y 20 kDa, ramificados de dos ramas, que incluyen, pero sin limitación 10 kDa y 40 kDa. En algunas formas de realización, o las reacciones de pegilación contempladas en la presente, el peso molecular promedio es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica +/- 1 kDa). En otras formas de realización, el peso molecular promedio es de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa. La relación de polímero soluble en agua para PAL variará generalmente de 1: 1 para monoPEG, 2: 1 para diPEG, etc.

Los ejemplos 6 a 8 describen los efectos de las formas pegiladas y no pegiladas de la PAL R91K de lisina mutante de *Rhodospiridium toruloides*, PAL producida por la cianobacteria *Nostoc punctiforme* (NpPAL), y PAL producidas por la cianobacteria *Anabaena variabilis* (AvPAL) sobre los niveles de fenilalanina en el ratón ENU2 o BTBR^{enu2} durante un período de 12 días. Este modelo animal es un mutante homocigoto en el locus del gen de la fenilalanina hidroxilasa (PAH), que produce un animal con hiperfenilalaninemia grave. Por lo tanto, los altos niveles de fenilalanina en plasma (Phe) hacen a este animal el modelo adecuado para evaluar la capacidad de fenilalanina amonio liasa (PAL) para reducir la Phe plasmática. Los efectos de las formas pegiladas y no pegiladas de la PAL R91K de lisina mutante y NpPAL sobre los niveles de fenilalanina en este modelo animal PKU también se evaluaron durante un período de 90 días. Los resultados mostraron que las formas pegiladas de NpPAL y AvPAL produjeron mayor reducción de fenilalanina en el modelo animal en comparación con NpPAL y AvPALno pegilado, respectivamente. Además, estos efectos de NpPAL pegilada para reducir los niveles de fenilalanina elevados se mantuvieron durante un período de diez semanas. Estos estudios muestran que la pegilación de PAL de las cianobacterias, *Nostoc punctiforme* y *Anabaena variabilis*, es esencial en la reducción de los niveles de fenilalanina en los ratones afectados de PKU. Los resultados sugieren que una variante pegilada de PAL bacteriana puede servir como un agente terapéutico eficaz en el tratamiento de la PKU.

La invención contempla las variantes PAL pegiladas con inmunogenicidad reducida.

Una forma de realización es una forma pegilada de la variante PAL de *Anabaena variabilis* (AvPAL) con inmunogenicidad reducida. Las formas de realización específicas contemplan variantes de AvPAL en que se obtiene la pegilación por la reacción de la variante de AvPAL con un polímero soluble en agua, *por ejemplo*, polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, se obtiene la pegilación mediante la reacción de la variante AvPAL una vez con PEG en una relación de al menos 1:1, al menos 1:1.5, al menos 1:2, al menos 1:3, o al menos 1:4 PAL:PEG. En una forma de realización; la variante PAL es una variante AvPAL, y la pegilación se obtiene usando una relación de PAL:PEG de 1:3. Los métodos para preparar las variantes de PAL pegiladas de la presente invención se describieron anteriormente.

La invención también contempla volver a pegilar las variantes PAL pegiladas para reducir la inmunogenicidad. En algunas formas de realización, la pegilación se obtiene por la reacción de la variante AvPAL dos veces o más con PEG, cada pegilación en una relación de al menos 1:1, al menos 1:1.5, al menos 1:2, al menos 1:3, o al menos 1:4 PAL:PEG. En algunas formas de realización, la pegilación se obtiene por la reacción de la variante AvPAL dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, o más, con PEG, cada pegilación en una relación de al menos 1:1, al menos 1:1.5, al menos 1:2, al menos 1:3, o al menos 1:4 PAL:PEG. En otra forma de realización, la variante PAL es una variante AvPAL, y la pegilación se obtiene usando una relación de PAL:PEG de 1:3 para las primera y segunda reacciones de pegilación.

Los métodos para preparar las variantes PAL repegiladas de la presente invención generalmente comprenden las etapas de (a) hacer reaccionar una variante PAL con polietilenglicol bajo condiciones en donde la variante PAL se une a uno o más grupos PEG, (b) obtener el producto de reacción, (c) hacer reaccionar la variante PAL pegilada con polietilenglicol bajo condiciones en donde la variante PAL pegilada se une a uno o más grupos de PEG en las posiciones no ocupadas por PEG de la etapa (a), y (d) obtener el producto de reacción. Debido a que los sitios específicos de modificación PAL podrían alterar significativamente la actividad intrínseca del variante PAL, se exploraron diferentes tipos y cantidades de PEG. La química utilizada para la pegilación de PAL fue la acilación de las aminas primarias de la PAL utilizando el NHS-éster de metoxi-PEG (O-[(N-succinimidiloxycarbonil) metil]-O'-metilpolietilenglicol). La acilación con metoxi-PEG-NHS o metoxi-PEG-SPA produce un enlace amida que elimina la carga de la amina primaria original.

G. ENSAYOS DE SELECCIÓN Y DETECCIÓN

Para la producción y detección de variantes PAL o HAL activas, la expresión del clon mutante inicial puede usar cualquiera de los sistemas de expresión de vectores conocidos, tales como el sistema de expresión vector His-tag, lo que facilita una etapa de purificación de quelato metálico de alto rendimiento para el aislamiento de la variante de la proteína. Un sistema de detección de tres niveles se puede utilizar para identificar variantes de la proteína favorables. La identificación del clon positivo inicial puede utilizar la transformación y selección para el cultivo de una cepa de *E. coli* auxotrófica de fenilalanina. Una segunda ronda de detección puede utilizar la medición de la absorbancia OD290 (Hodgins, Biochem Biophys Res Commun., 32:246-253 (1968)) susceptibles de procesamiento de alto rendimiento. Por último, la detección de la resistencia a la proteólisis (utilizando incubación en presencia de cóctel de proteasa) o, alternativamente, se puede usar la reducción de la inmunogenicidad (utilizando mediciones ELISA competitivo), para identificar variantes de la proteína favorables.

H. USOS TERAPÉUTICOS Y ADMINISTRACIÓN DE PROTEÍNAS PAL OPTIMIZADAS

1. VARIAS FORMAS DE HIPERFENILALANINEMIA (HPA)

La presente invención se refiere en general al tratamiento de una variedad de poblaciones de paciente HP A con métodos que comprenden el uso de composiciones PAL, ya sea solas o en combinación con otros regímenes terapéuticos, para el tratamiento de HPA y/o PKU. En particular, se contempla que las composiciones de PAL se pueden usar para tratar una población de pacientes con concentraciones de fenilalanina que son lo suficientemente bajas para la que no se utiliza normalmente la intervención dietética (es decir, los pacientes con HPA leve), pacientes con PKU moderada, los pacientes con PKU clásica o grave y cualquier subpoblación de estas. Tales pacientes que son susceptibles de tratamiento con composiciones PAL para mejorar los efectos de HPA leve incluyen mujeres embarazadas y lactantes con concentraciones séricas menores de 200 μ M. Las diversas poblaciones de pacientes, y sus diferentes necesidades terapéuticas, se discuten con más detalle en la presente sección.

En la presente se describe el tratamiento de la PKU clásica grave mediante la administración al sujeto de una dieta restringida en proteínas en combinación con una composición que comprende PAL o una variante, mutante, o fragmento de esta biológicamente activa, donde la administración combinada de la dieta restringida en proteínas y PAL es efectiva para disminuir la concentración de fenilalanina en el plasma de dicho sujeto en comparación con dicha concentración en ausencia de dicha administración combinada. Además, también se describe en la presente el tratamiento de una mujer embarazada que tiene HPA mediante la administración a la mujer una dieta restringida en proteínas en combinación con PAL o un derivado biológicamente activo de este de tal manera que la administración combinada de la dieta restringida en proteínas y PAL es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma de la mujer embarazada en comparación con una concentración tal en ausencia de dicha administración

combinada. En forma específica, se contempla la terapia para un paciente que manifiesta niveles de Phe superiores a 420 μM .

En la presente se describe la administración de una composición de PAL a cualquier individuo que tiene HPA, que se caracteriza por una concentración de Phe plasmática superior a 180 μM antes de la administración de PAL, en una cantidad efectiva para producir una disminución en tal concentración de Phe plasmática del paciente. Los métodos serán útiles en el tratamiento de un lactante que tiene PKU caracterizada por una elevación de las concentraciones de Phe entre más de 300 μM con composiciones PAL descritas en la presente. Por "lactante" la presente solicitud se refiere a un paciente que se encuentra entre las edades de 0 a aproximadamente 36 meses.

Características de la PKU clásica grave y sus métodos de tratamiento

La PKU grave se manifiesta en una concentración Phe plasmática mayor que 1.200 μM y se puede hallar que es tan alta como 4.800 μM . Los pacientes que tienen este trastorno se deben tratar con una dieta libre de Phe con el fin de llevar a sus concentraciones de Phe en plasma a un nivel que sea clínicamente aceptable (por lo general, menos de 600 μM o menor de 300 μM). Estos pacientes solo son capaces de tolerar un máximo de entre 250 a 350 mg de Phe dietaria por día (Spaapen et al., Mol. Genet Metab. 78:93-99 (2003)). Como tal, estos pacientes se inician en una dieta de leche de fórmula restringida en Phe entre 7-10 días después del nacimiento y se someten a esta restricción en la dieta para el resto de su vida útil. Cualquier alivio de las estrictas restricciones dietéticas a las que estos individuos están sometidos sería beneficioso.

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico de los individuos con Phe clásica se describen con más detalle a continuación. Estas pruebas han revelado que los pacientes con PKU clásica grave requieren una dieta baja en fenilalanina (Lucke et al, Pediatr Neurol 28:228-230 (2003)). Por lo tanto, se contempla que los métodos descritos en la presente implicarán la determinación de que el paciente está sufriendo de PKU clásica mediante el control de la concentración de Phe plasmática del individuo. El paciente luego se trata, mediante la administración de composiciones PAL procariotas sola o un régimen combinado de una dieta baja en proteínas y PAL de tal manera que se produce al menos una disminución del 25% en las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente. Específicamente, el método producirá una disminución del 30% en la concentración Phe plasmática. Específicamente, el método producirá un 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o mayor disminución en la concentración de Phe plasmática del individuo (por ejemplo, cuando un paciente con PKU clásica grave tiene una concentración de Phe de 4.800 μM una disminución del 90% en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe plasmática de 480 μM , una concentración que es suficientemente baja para requerir poca restricción en la dieta). Obviamente, se debe entender que los métodos de tratamiento (ya sea para el tratamiento de PKU clásica grave o cualquier otra HPA descrita en la presente), deben tratar de reducir las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente a niveles cercanos a un rango de aproximadamente 120 μM a aproximadamente 360 $\mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ como sea posible, o para un rango óptimo de aproximadamente 120 μM a aproximadamente 240 μM .

Como se describe en la presente, las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente con PKU clásica que se está tratando se reduce a partir de cualquier cantidad de la concentración de Phe plasmática sin restricciones que es mayor que 1.000 μM a cualquier nivel de Phe plasmática que es menor de 600 μM . Obviamente, incluso si el tratamiento combinado con PAL y la dieta restringida en proteínas produce una menor disminución en la concentración de Phe plasmática, por ejemplo, a un nivel de entre 800 μM a aproximadamente 1.200 μM , esto se considerará como un resultado clínicamente útil de la terapia ya que los pacientes que tienen una concentración de Phe plasmática en este rango pueden manejar la enfermedad simplemente restringiendo la cantidad de proteína en la dieta en lugar de comer una leche de fórmula restringida en Phe, de este modo se produce una mejora notable en la calidad de vida del individuo, así como lleva a un mayor cumplimiento del paciente con la restricción dietaria.

Cualquier aumento en la cantidad de niveles de Phe dietarios que pueden ser tolerados por el paciente como resultado del tratamiento se considerará que es un resultado terapéuticamente efectivo. Por ejemplo, se contempla que, como resultado de la administración de la terapia de PAL, el paciente será capaz de aumentar su ingesta dietaria de Phe 250 a 350 mg/día 350-400 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia de Phe del paciente está alterado respecto del paciente con PKU clásica a un paciente con PKU moderada). Obviamente, sería deseable que la intervención terapéutica enseñada en la presente pueda permitir al paciente aumentar su ingesta de Phe dietaria de 250-350 mg/día a 400-600 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia Phe del paciente está alterado respecto del de un paciente con PKU clásica a un paciente con PKU leve), o en algunos casos, para permitir que el paciente tenga una ingesta mayor de 600 mgde Phe/día (es decir, la ingesta dietaria normal).

Característica de los pacientes con PKU no receptivos a BH4 y sus métodos de tratamiento

Un segundo grupo de pacientes que pueden ser tratados con los métodos descritos en la presente son los individuos en que los que ha determinado que tienen concentraciones de Phe plasmática elevada, cualquier concentración que es mayor que 200 μM , pero que se han diagnosticado como no receptivos a la terapia con BH4 (tal como se determina por el ensayo de carga BH4 se describe a continuación). Tales pacientes pueden incluir los individuos que tienen PKU leve (es decir, concentraciones plasmáticas de Phe de hasta 600 μM), individuos que tienen PKU moderada (es decir, concentraciones plasmáticas de Phe de entre 600 μM hasta aproximadamente

1.200 μM), así como los pacientes que tienen PKU clásica grave (es decir, concentraciones plasmáticas de Phe que son mayores que 1200 μM).

A los pacientes que no son receptivos a la terapia con BH4 se les administra PAL en combinación con una cantidad reducida de proteína en su dieta con el fin de disminuir los concentraciones plasmáticas de Phe del paciente. Los métodos descritos en la presente son tales que la administración de PAL produce una mayor disminución en las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente en comparación con la disminución que se produce con el mismo protocolo dietario administrado en ausencia de la terapia PAL. Las restricciones en la dieta pueden ser una dieta que restringe la ingesta de Phe al proporcionar una leche de fórmula de proteína médica sintética que tiene una cantidad disminuida de Phe o alternativamente, la restricción dietaria puede ser una que simplemente requiere que el paciente limite su ingesta de proteínas en general, pero sin embargo permite al paciente comer los productos alimenticios normales en cantidades limitadas:

Los resultados terapéuticos para los pacientes con PKU clásica se discuten en la bibliografía. Los resultados terapéuticos para los pacientes con PKU moderada (es decir, pacientes que tiene una concentración de Phe plasmática no restringida de 600 μM a 1200 μM) incluyen al menos 25% de disminución en las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente. El método puede producir una 30% de disminución en la concentración de Phe plasmática. El método puede producir un 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o disminución mayor en la concentración de Phe plasmática del individuo (por ejemplo, cuando un paciente con PKU clásica moderada tiene una concentración de Phe de 1000 μM , un 90% de disminución en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe plasmática de 100 μM , una concentración que es suficientemente baja para requerir poca o ninguna restricción dietaria).

Como se describe en la presente, las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente con PKU moderada que se está tratando se reducen de cualquier cantidad concentración de Phe plasmática no restringida que está entre 600 μM a 1200 μM al cualquier nivel de Phe plasmático que es menor de 300 μM . En forma específica, el tratamiento con PAL (sea solo o en combinación con una restricción dietaria) produce una disminución de la concentración de Phe plasmática, por ejemplo, a un nivel entre 200 μM a aproximadamente 400 μM , que se considerará como un resultado clínicamente útil de la terapia ya que los pacientes que tienen una concentración de Phe plasmática en este rango pueden manejar la enfermedad simplemente restringiendo la cantidad de proteína en la dieta en lugar de comer una leche de fórmula restringida en Phe. En efecto, en muchos estudios, se describe que tales pacientes incluso pueden comer una dieta normal.

Cualquier aumento en la cantidad de niveles de Phe dietarios que pueden ser tolerados por el paciente como resultado del tratamiento se considerará que es un resultado terapéuticamente efectivo. Por ejemplo, se contempla que, como resultado de la administración de la terapia de PAL (sea solo o en combinación con otra intervención terapéutica), el paciente será capaz de aumentar su ingesta dietaria de Phe 350-600 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia de Phe del paciente está alterado respecto del paciente con PKU moderada a un paciente con PKU leve). Obviamente, sería deseable que la intervención terapéutica enseñada en la presente pueda permitir al paciente aumentar su ingesta de Phe dietaria de 350-400 mg/día para tener un ingesta mayor de 600 mg de Phe/día (es decir, la ingesta dietaria normal).

Incluso si el paciente que se está tratando es uno que manifiesta solo PKU leve, es decir, tiene una ingesta dietaria recomendada de 400-600 mg Phe /día) se beneficiará de las terapias basadas en PAL descritas en la presente porque es conveniente producir una concentración de Phe plasmática normalizada que es cercana a 360 $\mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ como posible. Para tales pacientes, un resultado terapéutico ventajoso incluirá al menos un 25% de disminución en las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente. En forma específica, el método producirá un 30% de disminución en la concentración de Phe plasmática. En forma específica, el método producirá un 40%, 50%, 60%, o disminución mayor en la concentración de Phe plasmática del individuo (por ejemplo, cuando un paciente con PKU leve tiene una concentración de Phe de 600 μM , un 60% de disminución en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe plasmática de 360 μM , es decir, una concentración normal aceptable de Phe plasmática).

Como se describe en la presente, las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente con PKU leve que se está tratando se reducen de cualquier cantidad de concentración de Phe plasmática no restringida que está entre 400 μM a 600 μM a cualquier nivel de Phe plasmática que es menor de 100 μM . Obviamente, incluso si el tratamiento con PAL (solo o en combinación con una restricción dietaria) produce una disminución menor en la concentración de Phe plasmática, por ejemplo, a un nivel entre 200 μM a aproximadamente 400 μM , que se considerará como un resultado clínicamente útil de la terapia.

Cualquier aumento en la cantidad de niveles de Phe dietarios que pueden ser tolerados por el paciente como resultado del tratamiento se considerará que es un resultado terapéuticamente efectivo. Por ejemplo, se contempla que, como resultado de la administración de la terapia de PAL (sea solo o en combinación con otra intervención terapéutica), el paciente será capaz de aumentar su ingesta dietaria de Phe 400-600 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia de Phe del paciente está alterado respecto del paciente con PKU leve a un paciente con PKU leve). Obviamente, sería deseable que la intervención terapéutica enseñada en la presente pueda permitir al paciente aumentar su ingesta de Phe dietaria de 350-400 mg/día para tener un ingesta mayor de 600 mg de Phe/día (es decir, la ingesta dietaria normal).

- Además, incluso si el paciente es uno que sólo se manifiesta los síntomas de HPA no PKU, es decir, tiene una concentración elevada de Phe plasmática de hasta 600 μM , pero se le permite de otro modo a comer una dieta normal de proteínas se beneficiarán de la terapia de PAL de la invención porque se ha demostrado que las concentraciones elevadas de Phe tienen efectos significativos en el IQ de tales individuos. Por otra parte, como se discute a continuación, la intervención terapéutica con PAL de sujetos con necesidades especiales, por ejemplo, las mujeres embarazadas y lactantes, es particularmente importante, incluso si los niveles de Phe plasmáticos de ese paciente están dentro del nivel percibido "seguro" menor de 200 μM .

PKU materna y sus métodos de tratamiento

- El control metabólico de los niveles de Phe plasmática en mujeres con PKU que planean la concepción y los que están embarazadas es importante debido a las graves consecuencias para el feto expuesto a niveles de Phe incluso moderadamente elevados en el útero, independientemente del estado de PAH del feto. El control terapéutico de la concentración de Phe plasmática es especialmente importante en el primer trimestre del embarazo, ya que el fracaso para lograr un control adecuado producirá trastornos que incluyen microcefalia, deficiencia mental y enfermedad cardíaca congénita.
- Por ejemplo, la Declaración de Consenso del NIH (vol 17 # 3, octubre de 2000) sobre la fenilcetonuria informó que la exposición del feto a niveles de Phe materna de 3-10 mg/dl produjo una incidencia del 24% de microcefalia, mientras que las personas expuestas a más de 20 mg/dL (es decir, mayor que 1.200 μM) tuvo una incidencia de 73% de microcefalia. Del mismo modo la enfermedad cardíaca congénita se encuentra en más del 10% de los niños expuestos a niveles maternos de Phe que eran superiores a 20 mg/dL. Es importante destacar que se ha observado que los niveles de Phe mayores de 6 mg/dl disminuyen significativamente el IQ del niño. Por lo tanto, es imprescindible garantizar que la concentración de Phe plasmática de las mujeres con todas las formas de la fenilcetonuria, incluso las que se manifiesta la HPA más leve, deberá ser estrictamente controlada para evitar el riesgo de síndrome de PKU materna. Sin embargo, los niveles deseados aceptables para las concentraciones de Phe plasmáticas de mujeres con PKU que se han utilizado en las clínicas estadounidenses han variado entre 10 mg/dL y 15 mg/dL, que son mucho más altos que los niveles de 2-6 mg/dL recomendados para mujeres embarazadas o 1-4 mg/dl que se utilizan en las clínicas británicas y alemanas para disminuir los riesgos de desarrollar el síndrome de PKU materna.
- Otra consideración importante para las mujeres embarazadas es su ingesta de proteínas total. Durante el embarazo, es importante que las mujeres ingieran suficiente proteína porque se ha sugerido que una dieta baja en proteínas durante el embarazo producirá desarrollo renal retardado y la subsiguiente reducción en el número de nefrones y potencialmente lleva a la hipertensión en la edad adulta. (D'Agostino, N. Engl. J. Med. 348 (17) 1723 a 1124, (2003)). La siguiente tabla proporciona lineamientos ejemplificativos para la ingesta de proteínas totales en la dieta recomendada para varias personas.

Tabla 1: Lineamientos de los Estados Unidos para los requerimientos de proteína dietaria

	Edad	Ingesta de proteína total recomendada (g)
Lactante	6 meses o menos	13
	6 meses-1 año	14
	1-3 años	16
Niño	4-6 años	24
	7-10 años	28
Varones	11-14 años	45
	15-18 años	59
	19-24	58
	25-50	63
	51+	63

	Edad	Ingesta de proteína total recomendada (g)
Mujeres	11-14 años	46
	15-18 años	44
	19-24	46
	25-50	50
	51+	50
Embarazada		60
Lactancia		65

Como se puede observar a partir de los ejemplos de lineamientos anteriores, en los Estados Unidos, la ingesta de proteína recomendada para mujeres en edad fértil (*por ejemplo*, menores de 51) es de aproximadamente 44 a 50 g/día, mientras que las mujeres embarazadas requieren una ingesta recomendada de aproximadamente 60 g/día.

- 5 En Canadá, el Reino Unido, la ingesta de proteína recomendada para las mujeres embarazadas está en el orden de aproximadamente 70 g/día y 52 g/día. En consecuencia, la necesidad de asegurar que los niveles de concentración de Phe plasmática de las mujeres embarazadas están estrictamente controlados es aún más complicado por el hecho de que este grupo de pacientes con PKU requiere más proteínas que las mujeres no embarazadas con PKU de edad comparable.
- 10 En vista de lo anterior, se contempla que las terapias con PAL descritas en la presente será particularmente útil en las mujeres embarazadas. Se contempla que una mujer que sufre de cualquier forma de HPA que está embarazada o está contemplado el embarazo se colocará en un curso de terapia con PAL para asegurar que sus niveles de concentración de Phe plasmática se mantienen tan cerca de 180 μ M a aproximadamente 360 μ M como sea posible. Tal curso de la terapia puede permitir que la mujer aumente su nivel de ingesta de proteína normal.
- 15 La discusión de los niveles de concentraciones de Phe plasmáticas y los grados en que estas concentraciones de fenilalanina se deben disminuir discutidos anteriormente en la presente se incorporan en la presente sección para mujeres embarazadas.

Tratamiento de PKU en lactantes y sus métodos de tratamiento

- 20 Como se discute a lo largo de la presente, se ha determinado que una elevación en la concentración de Phe plasmática en los lactantes (edades cero a 3 años) produce una caída significativa en el IQ del niño. Sin embargo, como se ha discutido en otra parte de la memoria descriptiva, los pacientes que tienen concentraciones plasmáticas de Phe elevadas de cualquiera hasta 400 μ M normalmente no reciben ninguna intervención dietaria. Por lo tanto, los lactantes de cero a 3 años sufren de efectos perjudiciales significativos de las presentes terapias. La presente solicitud contempla el tratamiento de cualquier lactante tiene una concentración de Phe plasmática sin restricciones
- 25 que es mayor que 360 μ M $\pm$ 15 μ M con una composición terapéutica que comprende PAL a fin de producir una disminución beneficiosa la concentración de Phe plasmática de ese sujeto.

- 30 Como se describe en la presente, el lactante entre cero y 3 años tiene una concentración de Phe plasmática sin restricciones de aproximadamente 1200 μ M antes de la administración de PAL y dicha administración disminuye la concentración de Phe plasmática. En forma específica, la concentración de Phe plasmática disminuye de más de 1800 a aproximadamente 1500 μ M, aproximadamente 1200 μ M, aproximadamente 1100 μ M, aproximadamente 1000 μ M, aproximadamente 900 μ M, aproximadamente 800 μ M, aproximadamente 700 μ M, aproximadamente 600 μ M, aproximadamente 550 μ M, aproximadamente 500 μ M, aproximadamente 450 μ M, aproximadamente 400 μ M, aproximadamente 350 μ M, aproximadamente 300 μ M, aproximadamente 275 μ M, aproximadamente 250 μ M después de la administración. En forma específica, el lactante tiene entre cero y 3 años y tiene una concentración de
- 35 Phe plasmática no restringida mayor de 1200 μ M y, esta concentración de Phe plasmática disminuye a aproximadamente 800 μ M, a aproximadamente 500 μ M, o a aproximadamente 360 μ M, después de la administración de PAL, sola o en combinación con dieta. Los expertos en la técnica pueden entender que la invención contempla el tratamiento de los lactantes con concentraciones de Phe plasmáticas no restringidas mayores de 360 μ M con PAL para producir las disminuciones de tales concentraciones de Phe plasmáticas. La
- 40 dilución de las reducciones terapéuticas de las concentraciones de Phe plasmáticas anteriores se incorpora en la presente por referencia. Además, cualquier disminución por encima de 10% de la concentración de Phe plasmática sin restricciones iniciales se considerará un resultado terapéutico para los regímenes terapéuticos para los lactantes.

Se debería entender que las terapias con PAL se pueden combinar con las restricciones dietarias para efectuar la disminución terapéutica en las concentraciones de Phe plasmáticas en tales lactantes.

La Tabla 2 enumera una serie de condiciones de la enfermedad en la que sería beneficiosa la administración de cantidades terapéuticamente efectivas de PAL. Las vías de administración parenteral, oral, u otras estándares y la dosificación se pueden determinar usando métodos estándares.

Tabla 2: Ejemplos de condiciones de enfermedad susceptibles para la terapia con proteína PAL

Fenilcetonuria
Hiperfenilalaninemia
Tirosinemia
Cáncer

2. COMPOSICIONES PARA USAR EN EL TRATAMIENTO

La presente invención contempla la intervención terapéutica de PKU/HPA. Tal intervención se basa inicialmente en el uso de PAL, que se puede usar solo o en combinación con restricciones dietarias. Otras PAL y/o restricciones dietarias además se pueden combinar con otras composiciones terapéuticas que están diseñadas, por ejemplo, para combatir otras manifestaciones de PKU, tales como por ejemplo, aminoácidos neutros grandes para evitar la acumulación de Phe en el cerebro (ver Koch, et al., Mol. Genet. Metabol. 79:110-113 (2003)) o la administración de suplementos de tirosina. La presente sección proporciona una discusión de las composiciones que se pueden usar en los tratamientos contemplados en la presente.

Composiciones de PAL

En general, la presente invención contempla composiciones farmacéuticas para uso que comprenden cantidades efectivas de proteína o productos derivados de la invención junto con diluyentes, estabilizantes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimerosol, alcohol bencílico) y sustancias de aumento de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol); ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa) páginas 1435:1712. Una cantidad efectiva de ingrediente activo es una cantidad efectiva para uso terapéutico, profiláctico o diagnóstico, que puede ser determinada fácilmente por una persona experta en la técnica tomando en consideración factores tales como el peso corporal, la edad y objetivo terapéutico.

Las composiciones de PEG: PAL para uso de acuerdo con la presente invención también pueden incluir un agente tampón para mantener el pH de la solución dentro de un rango deseado. Los ejemplos de agentes incluyen acetato de sodio, fosfato de sodio y citrato de sodio. También se pueden usar mezclas de estos agentes buffer. La cantidad de agente tampón útil en la composición depende en gran medida del tampón utilizado en particular y el pH de la solución. Por ejemplo, el acetato es un tampón más eficiente a pH 5 que pH 6 por lo tanto se puede usar menos acetato en una solución a pH 5 que a pH 6. En una forma de realización, el rango de pH para las composiciones de la presente invención es pH 3.0- 7.5.

Las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención pueden incluir además un agente de ajuste de isotonicidad para obtener una solución isotónica y más compatible para la inyección. Un ejemplo es cloruro de sodio dentro de un rango de 0-150 mM de concentración.

Como se usa en la presente y cuando se contempla los conjugados de PEG:PAL, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad, que proporciona una disminución en la L-fenilalanina sérica que proporciona beneficio a un paciente. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de numerosos factores, que incluyen la condición física general del paciente. La cantidad de PAL usada para la terapia proporciona una tasa aceptable de disminución de L-fenilalanina en suero y mantiene este valor en un nivel beneficioso (usualmente al menos aproximadamente 30% y típicamente en un rango de 10% a 50%). Una cantidad terapéuticamente efectiva de las presentes composiciones puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica utilizando materiales y procedimientos disponibles al público.

Los conjugados de PEG: PAL se pueden administrar con menos frecuencia que PAL nativa. La frecuencia de dosificación variará de acuerdo con la afección por tratar, pero en general será de aproximadamente una vez por

semana. Se entiende que las frecuencias de dosificación realmente usadas pueden variar algo de las frecuencias descritas en la presente debido a las variaciones en las respuestas de los distintos individuos a los conjugados de PEG:PAL; el término "aproximadamente" pretende reflejar dichas variaciones.

Los compuestos de la invención por lo tanto se pueden utilizar para reducir los niveles de L-fenilalanina séricos. Por lo general, los niveles de L-fenilalanina séricos aumentan debido a la hiperfenilalaninemia. Entre las afecciones tratables por el compuesto de la invención se incluye la hiperfenilalaninemia asociada con fenilcetonuria. También se pueden tratar las afecciones que pueden llevar al aumento de los niveles de L-tirosina séricos tales como se encuentran en la tirosinemia. Además, numerosas afecciones relacionadas con el cáncer, donde la reducción de los niveles de L-fenilalanina sérica y/o L-tirosina sérica sería beneficioso, también se pueden tratar con los conjugados de PEG: PAL de la invención.

Como se describe en la presente, los conjugados de PEG: PAL preparados de acuerdo con la presente invención se administran por inyección intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. Sin embargo, puede ser evidente para un experto en la técnica que también se podrían utilizar efectivamente otras vías de administración usando las composiciones de la presente invención.

Los métodos descritos en la presente usan composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas descritas anteriormente, junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. Dichos excipientes incluyen líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, ciclodextrinas, ciclodextrinas modificadas (es decir, las sulfobutil éter ciclodextrinas), etc. Los excipientes adecuados para formulaciones no líquidas también son conocidos por los expertos en la técnica.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden usar en las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención e incluyen, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Una discusión completa de excipientes y sales farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990).

Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampón biológicas, agentes tensioactivos, y similares, en dichos vehículos. Un tampón biológico puede ser prácticamente cualquier solución que sea farmacológicamente aceptable y que proporcione la formulación con el pH deseado, es decir, un pH en el rango fisiológicamente aceptable. Los ejemplos de soluciones tampón incluyen solución salina, solución salina regulada con fosfato, solución salina regulada con Tris, solución salina regulada de Hank, y similares.

De acuerdo con el modo de administración pretendido, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de formas de dosificación sólidas, semi-sólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, cremas, ungüentos, lociones o similares, y en forma de dosis unitaria adecuada para la administración única de una dosis precisa. Las composiciones incluirán una cantidad eficaz del fármaco seleccionado en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes farmacéuticos, adyuvantes, diluyentes, tampón, etc.

En general, los compuestos o conjugados de esta invención se pueden administrar como formulaciones farmacéuticas que incluyen las adecuadas para la administración oral (incluyendo bucal y sublingual), rectal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal o parenteral (que incluyen administración intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación. Un ejemplo de forma de administración es por vía intravenosa utilizando un régimen de dosis diaria conveniente, que puede ajustarse de acuerdo con el grado de afección.

Para las composiciones sólidas, los portadores sólidos no tóxicos convencionales incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables, por ejemplo, se pueden preparar mediante la disolución, dispersión, etc., un compuesto o conjugado activo descrito en la presente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un excipiente, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar de este modo una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón de pH, agentes tonificantes, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitano, acetato de sodio trietanolamina, oleato de trietanolamina, etc. Los métodos reales para preparar tales formas de dosis son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente.

Para la administración oral, la composición generalmente tomará la forma de un comprimido, cápsula, cápsula de gelatina blanda o, o puede ser una solución, suspensión o jarabe acuoso o no acuoso. Los comprimidos y las cápsulas son algunas de las formas de administración oral. Los comprimidos y las cápsulas para uso oral incluirán generalmente uno o más portadores comúnmente utilizados tales como lactosa y almidón de maíz. También se

añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio,. Cuando se utilizan suspensiones líquidas, el agente activo se puede combinar con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir también agentes aromatizantes, colorantes y/o edulcorantes. Otros componentes opcionales para su incorporación en una formulación oral en la presente incluyen conservantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, y similares.

Las formulaciones parenterales se pueden preparar en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solubilización o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Específicamente, las suspensiones inyectables estériles se formulan de acuerdo con técnicas conocidas en la materia usando portadores, agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La formulación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en un diluyente o solvente no tóxico para uso parenteral aceptable. Entre los portadores y solventes aceptables que se pueden emplear se hallan agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos, estériles, ésteres grasos o polioles se emplean convencionalmente como solventes o medios de suspensión. Además, la administración parenteral puede implicar el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida de tal manera de mantener un nivel constante de dosis.

Los conjugados PEG:PAL identificados descriptos anteriormente se pueden administrar a un paciente a dosis terapéuticamente efectivas para tratar o mejorar la enfermedad cardiovascular. La toxicidad y eficacia terapéutica de tales conjugados se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales de experimentación, tales como, por ejemplo, mediante la determinación de la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se pueden emplear conjugados que exhiben índices terapéuticos grandes.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para usar en seres humanos. Específicamente, la dosis se encuentra dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o mínima toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango de acuerdo con la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada. La dosis terapéuticamente efectiva se puede determinar a partir de ensayos de cultivo celular, y a partir de modelos animales.

Proteína dietaria

Además de administrar PAL y análogos relacionados a los pacientes con HPA/PKU, se contempla que también se puede restringir o modificar la proteína de la dieta de los pacientes. Los expertos en la técnica conocen diferentes fórmulas de proteína disponibles comercialmente para uso en el tratamiento de PKU. Estas leches de fórmula incluyen MAXIMAID, Phenex 1, Phenex 2 (Ross Laboratories, Liverpool, Reino Unido), LOFENALAC, PHENYL-FREE (Mead-Johnson), y similares.

Los expertos en la técnica pueden usar las leches de fórmula-proteína mencionadas, que están generalmente libres de concentraciones de Phe. Las leches de fórmula de proteína a menudo se complementan con aminoácidos que son deficientes en pacientes con PKU. Tales aminoácidos incluyen, por ejemplo, L-tirosina, y L-glutamina. Se ha sugerido que puede ser deseable suplementar la dieta de los pacientes con PKU con valina, isoleucina y leucina (ver la patente U. S. N.º 4.252.822). En ciertas manifestaciones clínicas, los efectos tóxicos de PKU son causados por el bloqueo de Phe de la captación cerebral de otros aminoácidos tales como tirosina y triptófano. Se ha encontrado que la suplementación de la dieta de un paciente de PKU con exceso de tales aminoácidos neutros grandes bloquea la captación de Phe en el cerebro y reduce los niveles de Phe cerebrales. Por lo tanto, se contempla que para los métodos descriptos en la presente, el régimen dietario además se puede suplementar con composiciones que comprenden uno o más de estos aminoácidos (Koch, et al., Mol. Genet. Metabol. 79:110-113 (2003)).

Además, como se sabe también se deben suministrar L-carnitina y taurina, que se encuentran normalmente en la leche humana y otros productos alimenticios de origen animal, además de la restricción de proteínas. Específicamente, la L-carnitina se puede suministrar como 20 mg/100 g de suplemento de proteínas, y la taurina se puede suministrar como 40 mg/100 g de suplemento de proteínas con el fin de ayudar a suministrar cantidades de estos factores que normalmente se encuentran en la leche humana y los alimentos de origen animal.

Además, los expertos en la técnica, se refieren a 2000 National Academy of Sciences-National Research Council Dietary Reference Intakes para obtener una lista adicional de otros componentes, tales como las vitaminas y minerales esenciales que se deben suministrar al paciente para asegurarse que se suministren otros suplementos a pesar de la restricción de proteínas en la dieta.

Con referencia a la discusión anterior con respecto a las cantidades de proteína total y las concentraciones plasmáticas de Phe deseable, los expertos en la técnica serán capaces de determinar la cantidad de restricción de proteína dietaria que se requiere y por lo tanto ajustar la dieta del paciente en consecuencia. Tomando por ejemplo, un varón de aproximadamente 11-14 años, este individuo debe recibir 45 g de proteína/día. En el caso de que el individuo es uno que tiene PKU clásica grave, su concentración de Phe plasmática sin restricciones probablemente será mayor que 1,200 µM, y la mayoría, si no todos de la fuente de proteína dietaria para ese individuo es probable

que sea de un suplemento de proteína en polvo, lo que puede reducir sus concentraciones de Phe plasmáticas a menos de 600 μM . Mediante la administración de PAL a ese sujeto, un resultado terapéutico sería uno que produce una mayor disminución de las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente o, alternativamente, el resultado terapéutico es uno en el cual las concentraciones plasmáticas de Phe del individuo se redujeron en un grado similar, pero ese individuo es capaz de tolerar la proteína de una dieta normal más que de una leche de fórmula dietaria.

Del mismo modo, para un varón de aproximadamente 11-14 años que tiene PKU moderada, puede ser posible el uso de los métodos descritos en la presente para proporcionarle los 45 g de proteína/día asignados a través de una ingesta de proteína normal en lugar de una fórmula restringida. La determinación de si los métodos descritos en la presente son efectivos implicará la determinación de las concentraciones de Phe plasmáticas del paciente sobre una base regular para asegurar que las concentraciones de Phe plasmáticas permanecen por debajo de al menos 400 μM . Las pruebas para la determinación de tales concentraciones se describen a continuación. Específicamente, se obtienen concentraciones de menos de o aproximadamente 360 μM .

3. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE LAS POBLACIONES DE PACIENTES

Como se discute a lo largo de la presente, será necesario determinar si un determinado paciente es sensible a la terapia PAL, y para determinar las concentraciones de fenilalanina del paciente tanto inicialmente para identificar la clase de paciente con PKU que se está tratando como durante un régimen terapéutico en curso para controlar la eficacia del régimen. Tales ejemplos de métodos se describen en la presente a continuación.

Prueba de carga de BH4

La prueba de carga BH4 permite la discriminación entre los pacientes que tienen HPA debido a un déficit de BH4 o por una deficiencia en PAH.

La prueba de carga BH4 más simple es aquella en la que se administra BH4 exógena y se determinan los efectos de la administración sobre la reducción de las concentraciones de Phe plasmáticas. La carga intravenosa de 2 mg/kg de BH4 fue propuesta inicialmente por Danks, et al., Lancet 1:1236 (1976), ya que BH4 de mayor pureza está disponible y ha hecho posible llevar a cabo la prueba usando una administración oral de BH4 en cantidades de aproximadamente 2,5 mg/kg de peso corporal. Finalmente, un enfoque estandarizado fue propuesto por Niederwieser et al. en el que se administra una dosis oral única de 7,5 mg/kg de BH4 (Niederwieser, et al., Eur. J. Pediatr. 138:441 (1982)), aunque algunos laboratorios todavía utilizan más de 20 mg BH4/kg de peso corporal.

Con el fin de que la prueba de carga de BH4 simple produzca resultados confiables, los niveles de Phe en sangre del paciente deben ser superiores a 400 μM . Por lo tanto, a menudo es habitual que el paciente sea retirado de la dieta PKU durante 2 días antes de realizar la prueba de carga. Un kit de ensayo BH4 está disponible y distribuido por Dr. Schircks Laboratories (Jona, Suiza). Este kit recomienda una dosis de 20 mg BH4/kg de peso corporal aproximadamente 30 minutos después de la ingesta de una comida normal.

Determinación de las concentraciones de Phe

Existen numerosos métodos para determinar la presencia de Phe en sangre ((Shaw et al., Analytical Methods in Phenylketonuria-Clinical Biochemistry, In Bickett et al. Eds., Phenylketonuria and Some Other Inborn Errors of Amino Acid Metabolism, Stuttgart, Georg Thiem Verlag, 47-56 (1971)). Típicamente, las concentraciones de fenilalanina y tirosina se determinan a partir del suero de un paciente utilizando un ensayo fluorométrico. Este ensayo se basa en la formación de sustancia fluorescente cuando fenilalanina se calienta con ninhidrina en presencia de leucilalanina (McCaman, et al., J. Lab. Clin. Med. 59:885-890 (1962)).

El método más popular para determinar las concentraciones de Phe es la prueba de Guthrie en el que los discos se perforan a partir de papel de filtro que ha sido saturado con una muestra de sangre del paciente. Los discos uniformes se incuban en una placa de agar que ha sido sembrada con *Bacillus subtilis* y contiene un inhibidor específico del crecimiento de *Bacillus subtilis*. A medida que la fenilalanina se transfiere desde los discos uniforme sobre el agar, la Phe revierte la inhibición del crecimiento bacteriano, de este modo se produce un área de crecimiento bacteriano que se puede correlacionar con la concentración de fenilalanina en comparación con ensayos similares realizados utilizando discos que contienen cantidades conocidas de Phe.

Otros métodos de cuantificación de la concentración de Phe incluyen HPLC, espectrometría de masas, cromatografía en capa fina, y similares. Tales métodos se pueden usar para determinar la concentración de Phe plasmática de un paciente antes de la terapia y para controlar la concentración de Phe durante el régimen terapéutico para determinar la eficacia de estos.

Se contempla que los niveles de Phe plasmáticos de los pacientes se controlarán en intervalos convenientes (por ejemplo, diariamente, cada dos días o semanales) a lo largo del curso temporal del régimen terapéutico. Mediante el control de los niveles plasmáticos de Phe con tal regularidad, el médico será capaz de evaluar la eficacia del tratamiento y ajustar los requerimientos de proteínas dietéticas y/o PAL en consecuencia.

4. TERAPIA DE COMBINACIÓN

Ciertos métodos descritos en la presente implican el uso combinado de PAL y la restricción de proteínas de la dieta para efectuar un resultado terapéutico en pacientes con diversas formas de HPA. Para lograr el resultado terapéutico apropiado en las terapias de combinación contempladas en la presente, generalmente se puede administrar al sujeto la composición PAL y la restricción dietaria en una cantidad combinada efectiva para producir el resultado terapéutico deseado (es decir, una disminución de la concentración de Phe plasmática y/o la capacidad de tolerar mayores cantidades de Phe ingesta de proteína sin producir un aumento concomitante en las concentraciones de Phe plasmáticas). Este proceso puede implicar la administración de la composición PAL y la composición terapéutica de proteína dietaria al mismo tiempo. Esto se puede conseguir mediante la administración de una sola composición o formulación de proteína farmacológica que incluye todos los requerimientos de proteína dietaria y también incluye la PAL dentro de dicha formulación de proteína. Alternativamente, la proteína dietaria (suplemento o comida normal de proteína) se toma aproximadamente al mismo tiempo como una formulación farmacológica (comprimido, inyección o bebida) de PAL. PAL también se puede formular en una barra de proteína u otro producto alimenticio tal como brownies, tortitas, pasteles, adecuados para la ingestión.

En otras alternativas, el tratamiento PAL puede preceder o seguir la terapia de proteínas dietaria por intervalos que varían de minutos a horas. En los casos en que las composiciones de proteína y PAL se administran por separado, generalmente se puede asegurar que un período de tiempo significativo no expiró entre el tiempo de cada administración, de tal manera que PAL todavía será capaz de ejercer un efecto ventajoso sobre el paciente. En tales casos, se contempla que se podría administrar el PAL dentro de aproximadamente 2-6 horas (antes o después) de la ingesta de proteínas de la dieta, con un tiempo de retraso de solo aproximadamente 1 hora en algunos casos. Específicamente, se contempla que la terapia PAL será una terapia continua, donde se administra una dosis diaria de PAL al paciente indefinidamente. En otras situaciones, por ejemplo, en las mujeres embarazadas que tienen solo las formas más leves de la PKU y HPA, puede ser que la terapia PAL solamente continúa durante el tiempo que la mujer está embarazada y/o amamanta.

Además, además de las terapias basadas solamente en la administración de PAL y regulación de la proteína dietaria, los métodos descritos en la presente también contemplan la terapia de combinación con una tercera composición que se dirige específicamente a uno o más de los síntomas de HPA. Por ejemplo, se sabe que el déficit de tirosina causado por HPA produce una deficiencia en los neurotransmisores dopamina y serotonina. Por lo tanto, se contempla que los métodos basados en PAL y proteína dietaria también se pueden combinar con la administración de L-dopa, carbidopa y neurotransmisores 5-hidroxitriptófano para corregir los defectos que resultan de la disminución de cantidades de tirosina en la dieta.

Como la administración de PAL no puede generar tirosina (a diferencia de la administración de PAH), tal tratamiento aún producirá tirosina que es un aminoácido esencial para tales pacientes. Por lo tanto la suplementación dietaria con tirosina puede ser deseable para pacientes que reciben PAL en combinación con la terapia de BH4.

I. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HOMÓLOGOS DE PAL

Además en la presente se describe un ensayo de detección para la identificación de PAL bacteriana que puede prevenir, mejorar, o reducir niveles mejorados de fenilalanina mediante el contacto de una célula que contiene niveles elevados de fenilalanina con la PAL bacteriana y determinar si la PAL bacteriana reduce tales niveles elevados de fenilalanina. En forma específica, el método es un ensayo de alto rendimiento. Específicamente, los genomas completos de las especies bacterianas se secuencian y se analizan para determinar la presencia de homólogos de PAL usando un enfoque bioinformático. Se pueden identificar los genes con homología a *encP* y el análisis BLAST de la secuencia de la proteína relacionada se lleva a cabo para determinar el porcentaje de identidad. Los alineamientos de secuencia primaria de tales proteínas se evalúan por la presencia de residuos conservados esenciales para la actividad PAL. La posición 83 (HAL de *P. putida*) de todas las enzimas HAL es una histidina que es un aminoácido alifático, por ejemplo, leucina o valina en las enzimas con actividad de PAL. El análisis en la posición 83 dilucidará si las enzimas HAL anotadas pueden estar mal etiquetadas y han demostrado realmente la actividad PAL. Por ejemplo, la posición 413 es una glutamina (Q) en la mayoría de las enzimas HAL y es seguido en la posición 414 por un ácido glutámico (E) en todas las enzimas de HAL. En comparación, la posición 414 es una glutamina (Q) seguido en la posición 415 por un ácido aspártico (D) o una asparagina (N) en la mayoría de las enzimas PAL identificadas hasta el momento. Las enzimas HAL anotadas representativas que se determinan por este método bioinformática que más probablemente estén mal etiquetados como enzimas PAL procarionóticas incluyen enzimas HAL de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (ZP 00005404), de *Rubrobacter xylanophilus* DSM9941 (ZP 00188602), de subsp *Photorhabdus luminescens*. LaumondiiTT01 (NP 930421), de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (AA051415).

En forma específica, se confirma la actividad catalítica de PAL del producto de proteína de dicha homología. Los genomas de homólogos PAL se pueden amplificar por PCR y clonar en un vector pHIS8 o similar. Las proteínas putativas PAL se expresan de forma heteróloga en *E. coli* como proteínas marcada con His, se purifican y se analizan para determinar la actividad PAL. Los ensayos para la actividad PAL pueden incluir la capacidad de convertir la fenilalanina en cinamato in vitro, la incapacidad para convertir la tirosina en p-cumarato in vitro, ensayos para analizar la actividad HAL y los ensayos para caracterizar la cinética de las enzimas.

J. PRODUCCIÓN DE PAL PROCARIÓTICA

En la presente también se describe un método para producir PAL procariota. En forma específica, la PAL recombinante se sobreexpresa como una proteína de fusión marcada con octahistidilo N-terminal en un vector, por ejemplo, BL21 (DE3)/pLysS de *E. coli* (Invitrogen) con un promotor inducible tal como con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido). Alternativamente, PAL recombinante se sobreexpresa en BL21 (DE3)/pLysS de *E. coli* sin una marca N-terminal. El cultivo de siembra para un biorreactor/fermentador se cultiva a partir de un patrón de glicerol en matraces de agitación. Tal cultivo de siembra luego se usa para enriquecer en un biorreactor controlado en el modo de alimentación por lote. Se suplementa glucosa y el pH se controla con base (NH₄OH) y la agitación es de hasta 1.200 rpm. La alimentación O₂ mantiene el oxígeno disuelto a más del 20%. Las células se cultivan a una temperatura de 30 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 70-100 (~ 22-25 hrs) y después se induce con IPTG 0,4 mM. La temperatura se reduce al 22 a 26 °C y se cultiva hasta que el cambio de actividad es < 0,1 UI/ml (aproximadamente 40 a 48 horas y una OD₆₀₀ típicamente de 200). El medio de cultivo celular se define típicamente compuesto de proteína y extracto de levadura, peptona-triptona, glucosa, glicerol, casamino ácidos, trazas de sales y sales tampón de fosfato. El producto PAL recombinante se produce en forma intracelular y no se secreta. Las bacterias se recolectan por centrifugación continua (Alfa-Laval, Carr, Ceba, o equivalente).

K. PURIFICACIÓN DE PAL PROCARIÓTICA

Además se describe en la presente un método para purificar PAL bacteriana o un fragmento, mutante o análogo de este biológicamente activo. Específicamente, se cultiva una masa celular transformada y se rompe dejando la enzima recombinante cruda. Los materiales exógenos normalmente se separan de la masa cruda para evitar el ensuciamiento de las columnas. La purificación cromatográfica se lleva a cabo utilizando una o varias resinas cromatográficas. Posteriormente, la proteína purificada se formula en un tampón diseñado para proporcionar una actividad estable durante un período de tiempo prolongado. Específicamente, el método para purificar la PAL bacteriana comprende: (a) la lisis de las bacterias que contienen PAL recombinante usando un homogeneizador de presión (pero potencialmente por otros medios físicos tales como la lisis de perlas de vidrio); (b) tratamiento térmico; (c) clarificación de este lisado utilizando una segunda etapa de centrifugación continua y/o filtración en profundidad (como con filtros Cuono Zeta Plus o Maximizer, Pall Filtron, o Millipore Millistak u Optica); (d) pasaje a través de una etapa de filtración de carbón vegetal (como con Millipore Millistak 40AC); (e) pasaje a través de una etapa de filtración final (como con un filtro de 0,2 µm Sartorius Sartopore); (f) pasaje sobre una cromatografía de interacción hidrofóbica de butilo (como en Toyopearl Butyl 650M de Tosoh Biosciences); (g) pasaje sobre una columna de intercambio iónico Q (como en una Macroprep High Q de BioRad); y (h) la recuperación del producto final mediante intercambio de tampón con la filtración de flujo tangencial (como con una membrana Hydrosart Sartorius o PES 100 kDa). Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que una o más de las etapas de cromatografía se pueden omitir o sustituir, o que se puede cambiar el orden de las etapas de cromatografía. Finalmente, las etapas de esterilización apropiadas se pueden realizar como se desee.

Habiendo ahora descrito generalmente la invención, la misma se puede entender más fácilmente a través de la siguiente referencia a los siguientes ejemplos. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permitirá algún error y desviación experimental.

EJEMPLO 1

40 Clonación de PAL de *Nostoc punctiforme* y *Anabaena variabilis*

Manipulaciones de ADN

Se adquirió de ADN genómico de *N. punctiforme* de ATCC (29133D) y el gen PAL (ZP_00105927) se amplificó por PCR a partir de cebadores 5'-CACTGTCATATGAATATAACATCTCTACAACAGAACAT-3' (SEQ ID NO: 12) y 5'-GACAGTGGCGGCCGCTCACGTTGACTTTAAGCTCGAAAAAATATG-3' (SEQ ID NO: 13). El producto de PCR resultante se digirió con NdeI y NotI y el fragmento de 1,7 kb se ligó en pET-28a (+) y pET-30a (+) (Novagen) por N-His marcada y sin marcar, respectivamente.

Las células de *A. variabilis* se adquirieron de ATCC (29413). El ADN genómico se extrajo (Qiagen) y el gen PAL (YP_324488) se amplificó por SOE-PCR para eliminar un sitio NheI. El cebador 1 (5'-CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAG-3') (SEQ ID NO:14) y cebador 2 (5'-GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO:15) se usaron para amplificar los nucleótidos 1-1190 y el cebador 3 (5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO:16) y cebador 4 (5'-CACTGTGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO:17) se usaron para amplificar los nucleótidos 1142-1771. Estos dos productos de PCR se combinaron para amplificar el gen de longitud completa con los cebadores 1 y 4. El producto de PCR resultante se digirió con NheI, se cortó con Klenow (NEB), luego digirió con NotI. El fragmento de 1,7 kb se ligó en pET-28a(+) y pET-30a(+) (Novagen).

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las células *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) se transformaron con células pGro7 (Takara) y BL21(DE3)pGro7 competentes se prepararon por el método de Inoue (Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001)). Estas células se transformaron con pET-28-NpPAL y se cultivaron en 25 ml de LB con 50 mg/L de kanamicina y 20 mg/l de cloranfenicol durante la noche a 37 °C. Veinte mililitros de este cultivo se sembraron en 1 L de medio LB con kanamicina, cloranfenicol y 500 mg/L de L-arabinosa y se cultivaron a 37 °C. A una DO₆₀₀ de 0,6, el cultivo se enfrió en hielo. Después de 5 minutos el cultivo se indujo con IPTG 0,3 mM y se cultivó durante 16 horas a 20 °C. Las células se recolectaron por centrifugación.

Las células BL21(DE3)pLysS (Stratagene) se transformaron con AvPAL y se cultivaron de forma idéntica a NpPAL sin la inducción de arabinosa.

EJEMPLO 2**Purificación de NpPAL y AvPAL**

Los cultivos se centrifugaron en una centrífuga de mesada a 5000 g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Los sedimentos celulares se congelaron típicamente a -70 °C antes de su procesamiento posterior. Después del descongelamiento, los sedimentos celulares se suspendieron a aproximadamente 80 unidades de densidad óptica (600 nm) en TBS (25 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,8). Las células se lisaron mediante dos pases a través de un homogeneizador de presión APV en 12-14.000 psi. El lisado crudo luego se trató con calor a 55 °C durante 2 horas. El lisado se centrifuga a 10.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se retuvo y se filtró con un filtro de vacío de 0,2 µm (Coming).

El PAL se purificó a partir del lisado clarificado por el pasaje secuencial sobre una columna 650M butilo (Tosoh Biosciences) y una columna MacroPrep High Q (BioRad). El producto eluido mostró un alto nivel de pureza por SDS PAGE y HPLC de fase inversa.

EJEMPLO 3**Generación de variantes de PAL pegiladas****Pegilación de proteína**

La pegilación usa modificaciones de los métodos de la bibliografía Hershfield, *et al.*, (1991) *ibíd.*; Patente U.S. N.º 6.057.292; Lu, *et al.*, Biochemistry 40(44):13288-13301 (2001); Nektar Therapeutics, catálogo 2003). Los PEG activados incluyen tanto los succinimidil succinatos de PEG lineales (mPEG-SPA, MW 5 kDa o MW 20 kDa) como los hidroxisuccinimidas PEG ramificados (mPEG2-NHS éster, MW 10 kDa o MW 40 kDa), que terminan en un extremo con un grupo metoxi y están disponibles en Nektar Therapeutics; normalmente se requiere la determinación experimental de proteínas pegiladas óptimas (Veronese, F.M., *et al.*, J. Bioactive Compatible Polymers 12:196-207 (1997)). Las condiciones óptimas de pegilación se determinan usando diferentes relaciones de PAL: PEG (que toman en cuenta la relación molar de la proteína junto con el número de lisinas por monómero de proteína), diferentes pHs, diferentes tampón, diferentes temperaturas y tiempos de incubación. Las relaciones de derivación de proteína PAL: PEG altas son necesarias ya que el PAL nativo tiene un gran número de lisinas (29 y 18 por monómero de *Rhodospiridium toruloides* (RT) y *Anabaena variabilis* (Av), respectivamente) y porque PAL sin modificar muestra la inmunorreactividad después de la inyección repetida en ratones y debido a que la PAL desnuda (de tipo salvaje) se inactiva rápidamente después de la exposición a las proteasas. Las reacciones de pegilación se detienen por congelación a -20 °C, y las muestras se analizarán por SDS-PAGE, espectroscopia de masas MALDI-TOF, evaluación de la actividad, sensibilidad proteolítica, e inmunorreactividad.

Antes de la actividad, la proteólisis, y la evaluación inmunológica, y con el fin de eliminar el exceso de PEG sin reaccionar, las reacciones se dializan frente a tampón fosfato de potasio 0,05 M pH 8,5, durante una noche a 4 °C con agitación usando dializadores Tube-O (GenoTechnology). Después de determinar la concentración de proteína usando el kit de ensayo de proteínas NI (Geno Technology), las mediciones de la actividad PAL se realizarán en muestras de PAL no derivadas y derivadas con PEG usando condiciones de reacción estándares, como se describió anteriormente. Después de la caracterización *in vitro*, se llevarán a cabo ensayos *in vivo* con los candidatos terapéuticos pegilados más prometedores utilizando el modelo de ratón de PKU.

Caracterización

La concentración de proteína se determina usando el coeficiente de extinción PAL (0,5 y 0,83 mg mL⁻¹cm⁻¹ para RtpAL y AvPAL, respectivamente) a 280 nm para las muestras de proteínas no modificadas y para las muestras de proteína pegiladas la concentración se calcula usando el ensayo de proteína NI (GenoTechnology) que incluye procesamiento de la muestra para eliminar los contaminantes no proteicos que podrían interferir en la determinación de la concentración de proteína exacta.

Los productos PEG-PAL se caracterizan con MALDI-TOF MS para determinar el número de moléculas de PEG unidas a cada monómero PAL, así como se caracterizan usando la evaluación de la actividad y SDS-PAGE y análisis del gel nativo, para asegurar la retención de la actividad, la derivación completa, y la ausencia de pérdida de la formación de PAL tetramérica, respectivamente. Para las muestras de PAL y PEG-PAL, el análisis espectroscópico de masas MALDI-TOF requiere el uso de urea 0,5 M o guanidina-HCl 0,025 M para mejorar la disociación de la subunidad y la reproducibilidad de la detección de especies.

Ensayo de actividad PAL

El ensayo de actividad de PAL se lleva a cabo usando un espectrofotómetro Cary UV (Cary 50) en el modo de cinética. La actividad de PAL con el sustrato de L-fenilalanina se ensaya a temperatura ambiente (25 °C) mediante la medición de la producción de trans-cinamato controlado por el aumento de la absorbancia a 290 nm (Hodgins, (1968) *ibíd.*). El coeficiente de extinción molar de ácido trans-cinámico a 290 nm es 10,2381 litro M⁻¹cm⁻¹. Las mezclas de reacción contienen fenilalanina 22,5 mM en 100 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,5. Para las mediciones estándar de la concentración de enzima final es 0,0035 mg mL, pero para los estudios cinéticos la concentración de enzima en el ensayo se ajusta de manera que la pendiente en 290 nm por minuto esté en el rango de 0,005 a 0,02. Los datos de la actividad se expresan como actividad específica (pmol×mih⁻¹m⁻¹). Una unidad de PAL se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de ácido trans-cinámico por minuto a temperatura ambiente.

EJEMPLO 4

Prueba de vida media in vitro e inmunogenicidad

Después de la caracterización bioquímica, los candidatos PEG-PAL más prometedores se analizan para detectar la inmunorreactividad contra los anticuerpos generados por los ratones PKU inyectados con PAL nativo (no pegilado) usando tres técnicas diferentes y complementarias (transferencia Western, ELISA, e inmunoprecipitación (IP)).

Para el análisis de transferencia Western, el anti-suero PAL (de ratones inyectados con PAL nativo) se utiliza en una dilución 1: 10.000. Como control negativo también se usa el suero de los ratones tratados con tampón en la misma dilución. El anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Promega), se diluye a 1: 5000 y el color se desarrolla usando el sustrato AP Western Blue (Promega). La prueba de ELISA se lleva a cabo utilizando placas Nunc/Immuno Maxisorp (Nalge Nunc International) siguiendo los procedimientos estándares que usan 1 mg/ml de PAL en PBS y se bloquea con PBS, Tween-20 0,05%, BSA 2%. Los antisueros de ratón (de ratones expuestos a PAL nativo) se diluyen 1: 10.000 en solución de bloqueo EB (PBS, Tween-20 0,05%, BSA 2%), y un anti-IgG de ratón de cabra HRP se utiliza como anticuerpo secundario con TMB utilizado para la detección a 450 nm.

La inmunoprecipitación se utiliza para analizar la unión de anticuerpos PAL. Las muestras de proteína (PAL o PAL pegilada) se incuban en tampón TTBS (solución salina tampón Tris con Tween 0,1%) y la actividad PAL se mide antes de añadir la muestra de anticuerpo. Cada muestra se incuba con un exceso de 8 veces de control positivo de suero anti-PAL y una reacción de control negativo por duplicado utilizando suero de ratón no inmune. Después de la incubación, la proteína G Sepharose 4 (50%, v/v) se añade en exceso, teniendo en cuenta la capacidad de unión a IgG de ratón de las perlas, y las muestras se incuban de nuevo a 4 °C durante la noche con rotación. Los sobrenadantes se recuperan por centrifugación y la actividad PAL de cada muestra se analiza en los sobrenadantes. Los sedimentos de las perlas no se descartan, por lo que se puede realizar el análisis adicional por transferencia Western. Para confirmar que se ha producido la unión de anticuerpos-perla, se usa la transferencia Western para detectar el antígeno PAL sobre las perlas. Las perlas que se han recuperado por centrifugación después de la etapa de unión PAL se lavan varias veces con TTBS y tampón TBS. Después de estos enjuagues, se añade tampón de carga SDS-PAGE a las perlas y las muestras se calientan a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras luego se analizan mediante transferencia de Western usando suero anti-PAL. Las variantes de enzima que muestran mala unión del anticuerpo tienen correspondiente poco PAL en las fracciones de perlas sedimentadas según se detecta por transferencia Western y muestran restantes mayores en el sobrenadante en comparación con el PAL no modificada nativa que muestra alta unión del anticuerpo.

EJEMPLO 5

Prueba de sensibilidad de proteasa

Los estudios de mapeo de la proteasa en PAL nativa de *R. toruloides* han indicado los sitios principales de la sensibilidad proteolítica. La eliminación de tales sitios puede reducir o eliminar la sensibilidad proteolítica y contribuir al desarrollo de un sustituto de la enzima PKU efectivo. Sin embargo, la eliminación de tales sitios para la sensibilidad proteolítica puede producir la reducción o pérdida de la actividad enzimática.

Después de que la ingeniería de proteínas ha creado mejores mutantes de PAL (y PEG-PAL) que retienen la actividad, la detección de resistencia a la proteasa usando incubación con un cóctel de tripsina/quimiotripsina proteasa, seguido por el control para la retención de la actividad (a través de la medición OD₂₉₀) y la reducción de escisión de la proteína (por medio del análisis en gel PAGE) permite la identificación de mutantes con propiedades in vitro apropiadas para usar en las pruebas in vivo.

La estabilidad proteolítica se evaluará usando incubación con un cóctel de proteasas que se aproxima el medio ambiente intestinal y contiene tripsina 2,3 mM, quimiotripsina 3,5 mM, carboxipeptidasa A 3,05 mM, y carboxipeptidasa B 3,65 mM. La prueba de proteólisis implicará incubaciones enzimáticas, adición de proteasas a las soluciones PAL, para determinar el grado de sensibilidad de la proteasa para las diferentes variantes de la proteína que se está examinando (proteína nativa o mutante con o sin pegilación u otra modificación química), incluidos los cursos de tiempo de retención de la actividad y la retención de la estabilidad después de la exposición a la proteasa. Los experimentos de mapeo por SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF se utilizarán para determinar la ubicación de sitios sensibles de la proteasa (Kriwacki, R.W., et al., J. Biomol. Tech. 9(3):5-15 (1980)). Estos resultados del mapeo serán importantes para determinar los sitios principales de sensibilidad de la proteasa (tal como los dos sitios primarios ya identificados), por lo que todos los principales sitios de sensibilidad se pueden eliminar usando la protección por pegilación y/o mutación para eliminar y/o proteger zonas sensibles de la arquitectura PAL.

EJEMPLO 6

Generación de NpPAL y AvPAL PEGilado

En general, la PEGilación para NpPAL y AvPAL implica mezclar la proteína con PEG activado con NHS SUNBRIGHT ME-200HS 20 kDa (NOF).

Protocolo para la PEGilación, método estándar "HC" usando PEG lineal de 20 kDa activado por NHS:

1) La proteína se evaluó por la presencia de endotoxina.

Una solución de proteína (0,1 ml) se diluyó en 0,9 ml de agua MQ fresca y se analizó probó con un aparato Charles River manual (EndoPTS) para la endotoxina en el nivel de sensibilidad de 0,5 EU/ml. Si la endotoxina fue mayor que 0,5 EU/ml, luego la endotoxina se redujo inicialmente por filtración Mustang E, seguido por la resina Etox Sterogene, y opcionalmente por purificación cromatográfica adicional. La reducción fue limitada, pero suficientemente útil mediante el pasaje sobre DEAE FF (Amersham) a pH 7,8.

2) Concentración e intercambio de tampón de la proteína:

La proteína se concentró hasta más de 25 mg/ml, pero menos o igual a 75 mg/ml y se intercambió el tampón a KPO₄ 50 mM, pH 8,5. Si se usó un filtro giratorio para preparar esta concentración, el filtro se analizó para determinar endotoxina mediante la centrifugación a velocidad y tiempo reducidos (3000 rpm, 3 minutos) con tampón solo, luego se analiza el tampón retenido por endotoxina en la misma forma que la proteína en la etapa 1. El registro/receta del lote del tampón para KPO₄ 50 mM, pH 8,5 consistía en agua (QS a 1 L), fosfato dibásico de potasio (8,4913 g/L de 48,75 mM), y fosfato monobásico de potasio (0,17011 g/L de 1,25 mM). La solución se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó a temperatura ambiente. El producto concentrado se filtró lentamente (1-2 ml/min) a través de un filtro Acrodisc Mustang E. Una muestra diluida y sellada con TBS estéril, pH 7,5 se midió a A280 para determinar la concentración de proteínas. El coeficiente de extinción fue de 0,83 para NpPAL y 0,75 para AvPAL.

3) PEGilación de NpPAL y AvPAL:

PEG normalmente almacenado a -80 °C se calentó a temperatura ambiente. Se añadió tampón de KPO₄ al PEG para resuspender por agitación en vórtex a velocidad máxima, y agitación manual fuerte del tubo para asegurar que todos los trozos grandes se suspendieron. La proteína se añadió a la solución de PEG bien suspendida dentro de un minuto de haber humedecido primero el PEG y se mezcló por inversión muy suave. Los tubos envueltos en papel de aluminio se colocaron en el eje de un balancín y se sacudieron muy suavemente a temperatura ambiente durante 3 horas. Los tubos se llenaron con TBS (pH 7,5) y se filtraron en forma estéril. Las suspensiones se formularon inmediatamente o se almacenaron a 4 °C hasta que estén listas para la formulación.

4) Formulación

La receta /registro del lote del tampón de formulación consistía en agua (QS a 1 L), Tris-Base (3,2 mM), Tris-HCl (16,8 mM), y cloruro de sodio; la solución tampón se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó a temperatura ambiente. La solución tampón se sometió a filtración de flujo tangencial usando un Vivalow 50 (lotes más pequeños) o 200 (Vivalow lotes más grandes) con una membrana de celulosa MWCO 100, regenerada. La solución se lavó con agua MQ, NaOH 0,1 N y agua 200 ml de nuevo. La solución se equilibró con TBS, pH 7,5 a 50 ml/min de flujo transversal. El pH del permeado se determinó para asegurar un pH de 7,5.

La solución se intercambió con el tampón mediante la dilución primera con TBS aproximadamente 3 veces y el retorno al volumen original al menos cuatro veces. El flujo cruzado era típicamente de 180-200 ml/min para Vivaflow 50 y 200.

El producto final se filtró a través Mustang E. La presencia de endotoxina se evaluó después de la dilución de 0,1 ml con 1,9 ml de agua fresca estéril. Si la endotoxina era mayor que 1 UE/mL, se llevó a cabo la reducción con

Sterogene Etox gel. NpPAL o AvPAL PEGilados formulados y estériles se sellaron en viales y se colocaron a -70 °C hasta que estén listos para los estudios in vivo.

EJEMPLO 7 (solo para referencia)

Efecto del PAL de *Nostoc punctiforme* (NpPAL) y su forma PEGilada en ratones afectados con PKU

- 5 El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de fenilalanina en plasma (Phe) después de las administraciones subcutáneas de NpPAL o NpPAL pegilada.

10 Los efectos de (1) una R91K PAL con lisina mutante de *Rhodospiridium toruloides* y su forma pegilada (1: 3 PA :: PEG) (PEG de Nippon Oil and Fat, NOF) a una dosis de 3,0 UI/ml; (2) NpPAL y su forma pegilada (1: 3 PAL: PEG NOF) a dosis que varían de 0,6 UI/ml y 3,0 UI/ml; y (3) vehículo se analizaron en ratones homocigotas ENU2 (también conocidos como ratones BTBR^{enu2}). Se demostró previamente que R91K PAL que tienen una mejor actividad relativa a PAL de *R. toruloides* tipo salvaje. R91K se encuentra en la hélice que abarca Asp86 a Leu101, cerca de la superficie de la proteína. Todas las soluciones tenían menos de 1,0 UE/ml de endotoxina y se almacenaron a -75- 80 °C. El ratón ENU2 o BTBR^{enu2} es mutante homocigota en el locus del gen fenilalanina hidroxilasa (PAH), lo que produce un animal con hiperfenilalaninemia grave. Los niveles de fenilalanina plasmática altos (Phe) hacen que este animal sea el modelo adecuado para evaluar la capacidad de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) para reducir el plasma.

Diseño experimental

Tabla 3: Designaciones del grupo y niveles de dosis

Grupo N.º	N	Administrado	Nivel de dosis (UI/ratón)	Actividad del artículo de ensayo (IU/mL)	Volumen de dosis (mL)
1	2	R91K	1.0	3.0	0.33
2	2	R91K	1.0	3.0	0.33
		1:3 PAL:PEG			
		NOF			
3	5	npPAL	0.2	0.6	0.33
4	5	npPAL	0.4	1.2	0.33
5	5	NpPAL	0.6	1.8	0.33
6	5	npPAL	1.0	3.0	0.33
7	5	npPAL	0.2	0.46	0.43
		1:3 PAL:PEG			
		NOF			
8	5	npPAL	0.4	0.92	0.43
		1:3 PAL:PEG			
		NOF			
9	5	npPAL	0.6	1.38	0.43
		1:3 PAL:PEG			

Grupo N.º	N	Administrado	Nivel de dosis (UI/ratón)	Actividad del artículo de ensayo (IU/mL)	Volumen de dosis (mL)
		NOF			
10	5	npPAL	1.0	2.30	0.43
		1:3 PAL:PEG			
		NOF			
11	2	Vehículo	0.0	0.0	0.43

Las soluciones se administraron a través de bolo subcutáneo entre las escápulas en el día 1, en el abdomen derecho en el día 4, y en el abdomen izquierdo en día 8. Las soluciones se administraron usando una aguja de calibre 25 y jeringa de 1 ó 3 cc o en el espacio subcutáneo. Cada animal recibió 0,2, 0,4, 0,6 o 1,0 UI de artículo de prueba en los volúmenes de dosis descritos en la tabla anterior. Los animales se anestesiaron ligeramente por inhalación de halotano (1-3% mg/kg) y también se sujetaron a mano. La administración de la dosis se realizó en aproximadamente el mismo tiempo en cada día de administración de la dosis.

Los animales se observaron diariamente por morbilidad, mortalidad y la salud general. En particular, se observó el sitio de inyección para detectar signos de enrojecimiento o edema. Los pesos corporales se midieron y registraron en los días -3, 8 y 12, y se utilizan como parámetro clínico, pero no se utilizaron para determinar el volumen de la dosis. Las recolecciones de sangre (P-plasma, S-suero) se realizaron en el día -3 (P, S), Día 2 (P), Día 4 antes de la dosis (P), Día 5 (P), Día 8 antes de la dosis (P, S), Día 9 (P, S), Día 12 (P), y Día 23 (S). Se recolectaron aproximadamente 50-100 µL de sangre entera en cada punto de tiempo (para el 25-50 µL de plasma o suero). Se recogió sangre de la vena de la cola. Se recogió plasma o suero como se indica en el esquema anterior. Se punzó la vena de la cola y se recolectaron gotas de sangre usando tubos de recolección de sangre capilar RAM Green-Top Scientific (# 07 7250). Para la recolección de suero, las gotas de sangre se recolectaron en un tubo sin aditivos. Se recolectó plasma/suero y se transfirió a un tubo de almacenamiento para almacenar a -20 °C (plasma) o -80 °C (suero).

Resultados

Los resultados para los estudios de dosificación a corto plazo de NpPAL demuestran la eficacia de las enzimas PEGiladas en la reducción de los niveles de fenilalanina excesivos. Cabe destacar que NpPAL no pegilado no redujo los niveles de fenilalanina después de cualquier inyección, incluso antes de que pueda haber una respuesta inmunogénica. Por lo tanto, la PEGilación es un requerimiento absoluto para que NpPAL sea un tratamiento potencial para la PKU (FIGURA 5).

EJEMPLO 8 (solo para referencia)

Efecto de PAL de *Anabaena variabilis* (AvPAL) y su forma PEGilada en ratones afectados con PKU

El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de fenilalanina en plasma (Phe) después de las administraciones subcutáneas de AvPAL o AvPAL pegilada.

Los efectos de (1) una R91K PAL con lisina mutante de *Rhodospiridium toruloides* y su forma pegilada (1: 3 PA :: PEG) (PEG de Nippon Oil and Fat, NOF) a una dosis de 3,0 UI/ml; (2) AvPAL y su forma pegilada (1: 3 PAL: PEG NOF) a dosis que varían de 0,6 UI/ml y 3,0 UI/ml; y (3) vehículo se analizaron en ratones homocigotas ENU2 (también conocidos como ratones BTBR^{enu2}). Se demostró previamente que R91K PAL que tienen una mejor actividad relativa a PAL de *R. toruloides* tipo salvaje. R91K se encuentra en la hélice que abarca Asp86 a Leu101, cerca de la superficie de la proteína. Todas las soluciones tenían menos de 1,0 UE/ml de endotoxina y se almacenaron a -75-80 °C. El ratón ENU2 o BTBR^{enu2} es mutante homocigota en el locus del gen fenilalanina hidroxilasa (PAH), lo que produce un animal con hiperfenilalaninemia grave. Los niveles de fenilalanina plasmática altos (Phe) hacen que este animal sea el modelo adecuado para evaluar la capacidad de la fenilalanina amonio-liasas (PAL) para reducir el plasma.

Diseño experimental**Tabla 4: Designaciones del grupo y niveles de dosis**

Grupo N.º	N	Administrado	Nivel de dosis (UI/ratón)	Actividad del artículo de ensayo (UI/mL)	Volumen de dosis (mL)	Ruta	Frecuencia de la dosis
1	3	Vehículo	0	0	0.33	SC	Días 1, 4, 8
2	5	avPAL	0.2	0.6	0.33		
3	5	avPAL	1.0	3.0	0.33		
4	5	avPAL PEG	0.2	0.6	0.33		
5	6	avPAL PEG	1.0	3.0	0.33		
6	5	R91K PEG	1.0	3.0	0.33		

5 Las soluciones se administraron a través de bolo subcutáneo entre la parte trasera del animal en el día 1, 4 y 8. Las soluciones se administraron usando una aguja de calibre 25 y jeringa de 1 ó 3 cc o en el espacio subcutáneo. Cada animal recibió 0,2, 0,4, 0,6 o 1,0 UI de artículo de prueba en los volúmenes de dosis descriptos en la tabla anterior. Los animales se anestesiaron ligeramente por inhalación de halotano (1-3% mg/kg) y también se sujetaron a mano. La administración de la dosis se realizó en aproximadamente el mismo tiempo en cada día de administración de la dosis.

10 Los animales se observaron diariamente por morbilidad, mortalidad y la salud general. En particular, se observó el sitio de inyección para detectar signos de enrojecimiento o edema. Los pesos corporales se midieron y registraron en los días -3, 8 y 12, y se usaron como parámetro clínico, pero no se utilizaron para determinar el volumen de la dosis. Las recolecciones de sangre (P-plasma, S-suero) se realizaron en el día -3 (P, S), Día 2 (P), Día 4 antes de la dosis (P), Día 5 (P), Día 8 antes de la dosis (P, S), Día 9 (P, S), Día 12 (P), y el Día 22 (S). Se recolectaron aproximadamente 50-100 µL de sangre entera en cada punto de tiempo (para el 25-50 µL de plasma o suero). Se recogió sangre de la vena de la cola. Se recogió plasma o suero como se indica en el esquema anterior. Se punzó la vena de la cola y se recolectaron gotas de sangre usando tubos de recolección de sangre capilar RAM Green-Top Scientific (# 07 7250). Para la recolección de suero, las gotas de sangre se recolectaron en un tubo sin aditivos. Se recolectó plasma/suero y se transfirió a un tubo de almacenamiento para almacenar a -20 °C (plasma) o -80 °C (suero).

Resultados

25 Los resultados para los estudios de dosificación a corto plazo de AvPAL demuestran la eficacia de las enzimas PEGiladas en la reducción de los niveles de fenilalanina excesivos. Cabe destacar que AvPAL no pegilado no redujo los niveles de fenilalanina después de cualquier inyección, incluso antes de que pueda haber una respuesta inmunogénica. Por lo tanto, se demostró que la PEGilación es un requerimiento absoluto para que NpPAL sea un tratamiento potencial para la PKU (FIGURA 6).

EJEMPLO 9 (solo para referencia)**Estudio de tolerancia crónica (90 días) de R91K PAL no PEGilada y PEGilada y NpPAL PEGilada en ratones afectados con PKU**

30 El objetivo de este estudio fue evaluar los parámetros farmacodinámicos y efectos de inmunogenicidad de la dosificación crónica (90 días) con PAL R91K pegilada y no pegilada y NpPAL pegilada en ratones ENU/2, un modelo de la enfermedad de la fenilcetonuria.

35 Se produjeron dos lotes de cada artículo de prueba (R91 K y su forma pegilada R91KPAL:PEG de 1:3, npPAL y su forma pegilada npPAL: PEG de 1:3 NOF, y el vehículo de Tris-HCl), uno se usó para la primera mitad del estudio y el segundo para la segunda mitad del estudio. Las soluciones de ensayo se almacenaron a -70 °C a -80 °C. Se usó un total de 55 ratones ENU2 homocigotas (n = 3-7 por grupo de dosis) (aka BTBRenu2), y en ningún caso se usaron animales no-naïve (ratones inyectados previamente con PAL).

Diseño experimental**Tabla 5: Designaciones del grupo y niveles de dosis**

Número de grupo	Descriptores del grupo	Administrado	Número de dosis	N
1	Control vehículo, s.i.d.	Tris NaCl	90	3
2	b.i.w. ^a	R91K	26	3
3	b.i.w. pos-semana 3 ^b	R91K	22	3
4	Dosis de escalamiento, s.i.d.	R91K	90	7
5	Dosis decreciente, s.i.d	R91K	90	7
6	b.i.w. ^a	R91K 1:3 NOF	26	6
7	b.i.w. pos-semana 3 ^b	R91K 1:3 NOF	22	6
8	Dosis de escalamiento, s.i.d.	R91K 1:3 NOF	90	7
9	Dosis decreciente, s.i.d	R91K 1:3 NOF	90	7
10	PAL bacteriana, s.i.w. ^c	npPAL 1:3 NOF	13	6

b.i.w.: dos veces por semana s.i.d.: una vez por día s.i.w.: una vez por semana

^aDosis del día 1 y 4 en un esquema de 7 días (ejemplo, cada lunes y jueves)

^b Los Grupos 3 y 7 se administrarán en el día 1 y 8, y a partir del día 22 seguirá el mismo esquema de 7 días como los grupos 2 y 6.

^cDosis del día 1 en un esquema de 7 días (ejemplo, cada lunes)

Tabla 6: Niveles de dosis

		Días de dosis				
		1 - 14	15 - 28	29 - 42	43 - 56	57 - 90
Números del grupo	Descriptores del grupo	Nivel de dosis en UI/ratón/día				
1	Control vehículo	0	0	0	0	0
2, 3, 6 y 7	Dosis estática b.i.w.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4 y 8	Dosis de escalamiento, s.i.d.	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
5 y 9	Dosis decreciente, s.i.d.	3,0	2,0	1,0	0,8	0,6
10	PAI bacteriana, s.i.w.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

5

La administración de dosis se realizó una vez al día para los grupos 1, 4, 5, 8 y 9. Los Grupos 2 y 6 (b.i.w) se administraron dos veces por semana en los días 1 y 4, por ejemplo, todos los lunes y jueves. Los Grupos 3 y 7 (b.i.

w pos semana 31) se administraron los días 1 y 8 y luego de nuevo el día 22, después de lo cual el esquema coincidió con el de los grupos 2 y 6 (todos los lunes y jueves). El Grupo 10 se administró una vez por semana. Las soluciones de ensayo se administraron por inyección subcutánea (bolo) utilizando una aguja de calibre 25 o 26 y una jeringa de 1 cc en el espacio subcutáneo entre las escápulas. Cada animal recibió un volumen de dosis predeterminado calculado usando la actividad de la solución de prueba (UI/ml) y el nivel de dosis (IU/ratón). La administración de la dosis se realizó en aproximadamente el mismo tiempo en cada día de administración de la dosis.

Se observaron diariamente los animales para la morbilidad, la mortalidad y la salud general. En particular, se observó el sitio de inyección para detectar signos de enrojecimiento o edema. Los pesos corporales se midieron y registraron una vez por semana, (día -3, 5, 12, ..., por ejemplo, cada viernes) y en la terminación del estudio. Si hubo una muerte o terminación no programada debido al estado moribundo, el peso corporal se registró en ese momento. Se recolectaron aproximadamente 100 µL de sangre entera en cada punto de tiempo (para 25 µL de plasma y 25 µL de suero). La sangre se recogió por punción de la vena de la cola de los animales conscientes. Las gotas de sangre para el plasma se recolectaron mediante tubos de recolección de sangre capilar RAM Scientific Green-Top (# 07 7250). Para la recolección de suero, se recogió sangre en un tubo sin aditivos. Las muestras de sangre se almacenaron en hielo húmedo durante no más de 2 horas antes de la separación por centrifugación en plasma/suero y se almacenaron a -70 a -80 °C hasta su evaluación en los ensayos. La sangre se recolectó para plasma y suero para la determinación tanto de fenilalanina como de los títulos de anticuerpos en los siguientes días: -3 (inicio pre-estudio), 9, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 59, 66, 73, 80, 87 y 91. En el día 89, la sangre y el plasma también se recolectaron en los animales del Grupo 1, 5, 9 y 10. Los puntos de tiempo individuales cada semana no pueden proporcionar una visión exacta de la respuesta de Phe sanguínea de la dosificación. Los puntos de tiempo adicionales mostraron si los niveles de fenilalanina son o no diferentes entre las dosis. La muestra del día 9 fue de vital importancia para estudiar la integridad ya que marca el momento en que el efecto PD se perdió en todos los regímenes de dosificación intentados hasta la fecha. Se recogió una muestra de sangre de 100 µL final.

Resultados

El estudio de dosificación a largo plazo mostrado en la Figura 7 muestra eficacia continua después de numerosas inyecciones semanales durante un período de diez semanas (con NpPAL-PEG).

EJEMPLO 10

Generación de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

Las sustituciones de aminoácidos se realizaron en el polipéptido AvPAL para reducir la agregación que se produce en proteínas recombinantes expresadas en bacterias. La agregación de proteínas puede reducir la actividad de la enzima y/o aumentar la inmunogenicidad in vivo. Una de estas formas de agregación se produce como resultado de la formación de enlaces disulfuro entre cadenas. Para minimizar esta posibilidad, diversos residuos de cisteína AvPAL, solos o en combinación, se reemplazaron con residuos de serina.

El polipéptido AvPAL tiene 6 restos de cisteína, en las posiciones 64, 235, 318, 424 503 y 565 (SEQ ID NO: 4). Se generaron las siguientes mutantes de cisteína únicas AvPAL: AvPAL_C64S (SEQ ID NO: 7), AvPAL_C318S (SEQ ID NO: 8), AvPAL_C503S (SEQ ID NO: 9), y AvPAL_C565S (SEQ ID NO: 10). También se generó una mutante de cisteína doble AvPAL, AvPAL_S565SC503S (SEQ ID NO: 11). La Figura 8 muestra las secuencias de aminoácidos de estos mutantes de cisteína AvPAL.

Clonación

El gen AvPAL se amplificó a partir de ADN genómico de *Anabaena variabilis* (ATCC 29413-U, Kit Qiagen DNeasy) con cebador delantero AvarPALfor (5'-CACTGTCATATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO:18) y cebador inverso AvarPALrev (5'-CACTGTCTCGAGATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO:19). El producto de PCR resultante se trató con Taq y luego se ligó en pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó 1p40.

Se añadió un sitio 5' NheI y se eliminó un sitio NheI interno por SOE-PCR. El fragmento de AvPAL corriente arriba se amplificó a partir de 1p40 con cebador directo N-Nhe-AvPAL (5'-CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO:20) y cebador inverso Nhe-AvPALrev (5'-GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO:21), y el fragmento AvPAL corriente abajo se amplificó a partir de 1p40 con el cebador directo Nhe-AvPALfor (5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO:22) y cebador inverso AvPALr6v-r (5'-ACAGTGGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO:23). En una sola reacción de PCR, los dos productos de PCR se hibridaron y se extendieron con ADN polimerasa para producir el gen AvPAL de longitud completa, y luego se amplificaron con los cebadores N-Nhe-AvPAL y AvPALrev-r. El producto de PCR resultante se digirió con NheI, se cortó con Klenow, se digirió con NotI, y se ligó en el vector pET28a + (preparado por digestión con NdeI, corte con Klenow y digestión con NotI). El plásmido resultante se denominó 3p86-23.

Se añadieron nuevos sitios de restricción por PCR. AvPAL se amplificó a partir del plásmido p86-23 con cebador directo AvEcoRIfor (5'-CACTGTGAATTCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO:24) y cebador inverso AvSmaIrev (5'-CACTGTCCCGGGTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCT-3') (SEQ ID NO:25). El producto de PCR resultante se digirió con EcoRI y SmaI y se ligó en el vector pIBX7 digeridos con EcoRI y SmaI. El plásmido resultante se denominó 7p56 Av3.

Mutantes de cisteína

Dos codones de cisteína en el gen AvPAL, correspondientes a las posiciones 503 y 565 del polipéptido AvPAL, se sustituyeron con codones de serina mediante mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange XL II, Stratagene). El codón de cisteína en la posición 503 se cambió a un codón de serina en el plásmido 7p56 Av3 por PCR con Av_C503S cebador directo (5'-GTCATTACGATGCACGCGCCTCTCTATCACCTGCAACTGAG-3') (SEQ ID NO: 26) y cebador inverso Av_C503Srev (5'-CTCAGTTGCAGGTGATAGAGAGGCGCGTGCATCGTAATGAC-3') (SEQ ID NO:27). El codón de serina está subrayado y la mutación G a C en la cadena codificadora (mutación de C a G la cadena no codificadora) se indica en negrita. El plásmido resultante se denominó j282. El codón de cisteína en la posición 565 se cambió a un codón de serina en el plásmido j282 con cebador directo Av_C565S (5'-CAGTTCAAGATATCTTACCCTCCTTGCATTAAACCGGGCTGC-3') (SEQ ID NO:28) y cebador inverso Av_C565Srev (5'-GCAGCCCGGGTTAATGCAAGGAGGGTAAGATATCTTGAAGTGC-3') (SEQ ID NO:29). El codón de serina está subrayado y la mutación G a C en la cadena codificadora (mutación de C a G la cadena no codificadora) se indica en negrita. El plásmido resultante se denominó j298a.

Los codones de cisteína en el gen AvPAL en las posiciones 64, 318 y 565 del polipéptido AvPAL se sustituyeron de modo similar con codones de serina usando los siguientes pares de cebador: C64S, cebador directo Av_C64S (5'-GCAGGGTATTCAGGCATCTTCTGATTACATTAATAATGCTGTTG-3') (SEQ ID NO:30) y cebador inverso Av_C64Srev (5'-CAACAGCATTATTAATGTAATCAGAAGATGCCTGAATAGCCTGC-3') (SEQ ID NO:31); C318S, cebador directo Av_C318S (5'-CAAGATCGTTACTCACTCCGATCCCTTCCCCAGTATTTGGGGC-3') (SEQ ID NO:32) y cebador inverso Av_C318Srev (5'-GCCCCAAATACTGGGGAAGGGATCGGAGTGAGTAACGATCTTG-3') (SEQ ID NO:33); y C565S, cebador directo Av_C565S (SEQ ID NO:28) y cebador inverso Av_C565Srev (SEQ ID NO:29). Los codones de serina están subrayados y las mutaciones G a C en las cadenas codificadoras y las mutaciones de C a G en la cadena no codificadora se indican en negrita.

EJEMPLO 11

Actividad de la enzima *in vitro* de las variantes de AvPAL (Mutantes de cisteína)

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la sustitución de la serina de los diversos residuos de cisteína en el polipéptido en AvPAL sobre la actividad enzimática de fenilalanina amoniliasa (PAL).

Las variantes de AvPAL (es decir, mutantes de cisteína) se clonaron como se describe en el EJEMPLO 10. Los plásmidos de expresión de mutantes de cisteína AvPAL se transformaron bacterias *intro* y los polipéptidos mutantes de cisteína AvPAL se expresaron como se describe en el EJEMPLO 1 y se purificó como se describe en el EJEMPLO 2.

Las mutantes de cisteína AvPAL y AvPAL de tipo salvaje (WT) y se analizaron para determinar *in vitro* la actividad enzimática PAL como se describe en el EJEMPLO 3. La Tabla 7 muestra que en comparación con AvPAL WT no pegilado, la actividad específica de PAL *in vitro*, las proteínas mutantes de cisteína AvPAL no pegilada purificada se redujo mediante la sustitución de serina del residuo cisteína en la posición 64 (AvPAL_C64S), pero no se afectó negativamente por la sustitución de serina de los residuos de cisteína en cualquiera de las posiciones 503 y 565, o en ambas posiciones 503 y 565 (AvPAL_C503S, AvPAL_C565S, y AvPAL_C565SC503S, respectivamente).

Tabla 7: Actividad específica de AvPAL (Mutantes de cisteína)

Proteína AvPAL	PEGvlación	Actividad específica (U/mg)
WT AvPAL	-	1.7
AvPAL_C503S	-	1.9
AvPAL_C64S	-	1.3
AvPAL_C565S E1	-	2.0
AvPAL_C565S E2	-	2.1

Proteína AvPAL	PEGvlación	Actividad específica (U/mg)
AvPAL_C565SC503S	-	2.2
WT AvPAL	+	1.1
AvPAL_C565SC503S	+	1.1

Para determinar si la introducción de los residuos de serina tenía algún efecto sobre la actividad enzimática de las proteínas AvPAL pegiladas, el AvPAL WT y doble mutante de cisteína, AvPAL_C565SC503S, se pegilaron como se describió en el EJEMPLO 6. La Tabla 7 muestra que la actividad específica PAL in vitro de la proteína AvPAL pegilada no fue afectada adversamente por la sustitución de serina de los residuos de cisteína en ambas posiciones 503 y 565.

EJEMPLO 12

Caracterización bioquímica *in vitro* de las variantes de AvPAL (Mutantes de cisteína)

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la sustitución de la serina de los diversos residuos de cisteína en el polipéptido AvPAL en: (1) estabilidad acelerada; (2) formación de agregados; y (3) pegilación específica de sitio.

Estabilidad acelerada

El efecto de la sustitución de serina de los residuos de cisteína en AvPAL en la estabilidad in vitro se determinó mediante el almacenamiento de los mutantes de cisteína AvPAL purificadas, ya sea pegiladas como no pegiladas, para varios períodos de tiempo a 37 °C, y luego la medición de la actividad específica PAL in vitro de estas proteínas como se describe en el EJEMPLO 3.

Las mutantes de cisteína AvPAL y AvPAL tipo salvaje, ya sea no pegiladas como pegiladas, se prepararon como se describe en el EJEMPLO 11.

Como se muestra en la FIGURE 9A, las actividades específicas de las proteínas AvPAL no pegiladas eran estables durante al menos 5 días a 37 °C, y no fueron afectadas adversamente por la sustitución de serina de los residuos de cisteína en la posición 565, o en ambas posiciones 503 y 565. De modo similar, como se muestra en la FIGURA 9B, las actividades específicas de las proteínas AvPAL pegiladas eran estables durante al menos 6 días a 37 °C. La mutante de AvPAL de cisteína única, AvPAL_C565S, mostró alguna estabilidad reducida en comparación con la AvPAL tipo salvaje y la mutante de AvPAL doble cisteína, AvPAL_C565SC503S, después de 6 días a 37 °C.

Formación de agregados

El efecto de la sustitución de serina de los residuos de cisteína en AvPAL sobre la formación de agregados de proteína en solución se determinó por separación de la AvPAL tipo salvaje no peguilada, purificada y mutantes de cisteína AvPAL por desnaturalización y electroforesis de gel nativo o por SEC-HPLC.

Las preparaciones purificadas AvPAL se separaron por electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (4-12% NuPAGE Bis-Tris) o condiciones nativas (8% Tris-Gly, pH 8,3). Las proteínas separadas AvPAL se tiñeron con azul de Coomassie.

Las preparaciones purificadas AvPAL se separaron mediante SEC-HPLC. Las proteínas AvPAL se cargaron en una columna de gel TSK (G3000SWXL, 7,8 mm x 30 cm, 5 µm (Tosoh Bioscience, LLC)) en Na-fosfato 20 mM, NaCl 300 mM, pH 6,9, y se eluyeron a un caudal de flujo de 0,5 ml/min. Las proteínas AvPAL separadas se analizaron en un espectrómetro Agilent serie 1100.

Los agregados estaban presentes en la preparación AvPAL de tipo salvaje y en las preparaciones AvPAL_C503S y AvPAL_C64S, pero no en las preparaciones AvPAL_C565S y AvPAL_C565SC503S, según se juzga por electroforesis en gel (Figura 10A) o SEC-HPLC (Figura 10B).

Pegilación específica de sitio

El efecto de la sustitución de serina de los residuos de cisteína en AvPAL sobre la pegilación específica de sitio se determinó por pegilación del AvPAL tipo salvaje y mutante doble cisteína AvPAL_G503SC565S como se describe en el EJEMPLO 6, y luego se compara la pegilación relativa en los residuos de lisina AvPAL: K2, K10, K32, K115, K145, K195, K301, K335, K413, K419, K493, K494 y K522.

Se desnaturalizaron aproximadamente 100 µg (10 µL a 10 µg/µL) de proteínas AvPAL no pegiladas o pegiladas en urea 8 M. Las proteínas desnaturalizadas luego se digirieron en un volumen de reacción de 100 µL con tripsina a pH 8,2 durante la noche (~20 horas) a 37 °C. Las proteínas digeridas con tripsina se redujeron mediante tratamiento con 1 µL de DTT 1 M durante 1 hora a 37 °C, seguido de inactivación con 3 µL de TFA 15%. Las proteínas digeridas se separaron en una columna de fase inversa C18. El porcentaje de pegilación de cada uno de los péptidos pegilados AvPAL se calculó mediante mapeo de péptidos sustractiva del correspondiente péptido no pegilado.

Como se muestra en la FIGURA 11, en una relación de proteína AvPAL: PEG de 1: 3, no hubo ninguna diferencia notable en el porcentaje de pegilación de cualquiera de los residuos de lisina (K) con la posible excepción de K419, en que el porcentaje de pegilación de la mutante doble cisteína C565SC503S fue menor en comparación con la AvPAL tipo salvaje. Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando la mutante doble cisteína en relaciones crecientes de proteína AvPAL: PEG, en la que no se observó relación dosis-respuesta, tomados juntos con el porcentaje de pegilación relativamente pequeño, indica que las diferencias observadas en K1419 probablemente no son significativas. Por lo tanto, la sustitución de serina de residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 no parece afectar a la pegilación específica de sitio de AvPAL.

EJEMPLO 13

Mecanismo de agregación de las proteínas de AvPAL

Se llevaron a cabo estudios para investigar el mecanismo de agregación de las proteínas AvPAL expresadas en bacterias.

La concentración de las preparaciones de AvPAL purificadas, e incubación de las soluciones de proteínas concentradas durante 2 horas a 37 °C, aceleró la agregación de las proteínas purificadas AvPAL en solución. La agregación se detectó mediante la separación de las proteínas AvPAL por SEC-HPLC. Para determinar si la reticulación del disulfuro fue responsable de la agregación, se añadió ditioneitol 50 mM (DTT) a la solución de proteína concentrada, seguido de incubación durante 2 horas a 37 °C.

Las proteínas AvPAL expresadas en bacterias se purificaron como se describe en el EJEMPLO 2, y se concentraron utilizando un filtro giratorio (Millipore Biomax -10K NMWL). Las proteínas se centrifugaron a aproximadamente 15.000 g durante unos pocos minutos en una centrifuga Eppendorf 5415C. Para las mutantes de cisteína que tienden a agregarse (por ejemplo, AvPAL_C503S y AvPAL_C64S), las proteínas se concentraron a aproximadamente 20 mg/ml y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Para las mutantes de cisteína que son resistentes a la agregación (por ejemplo, AvPAL_C565S y AvPAL_C565SC503S), las proteínas se concentraron a aproximadamente 40 mg/ml y se incubaron durante 2 horas a 37 °C.

Como se muestra en la Tabla 8, los preparativos mutantes de cisteína AvPAL purificadas AvPAL_C64S y AvPAL_C503S formaron agregados después de la incubación durante 2 horas a 37 °C. Como era de esperar, esta agregación se exacerbó cuando las proteínas AvPAL se concentraron antes de la incubación durante 2 horas a 37 °C. La agregación puede ser bloqueada por la exposición de las proteínas concentradas a DTT, lo que indica que la agregación se debe a la reticulación del disulfuro. En contraste, las preparaciones mutantes de cisteína AvPAL purificadas AvPAL_C565S y AvPAL_C565SC503S no formaron agregados después de la incubación durante 2 horas a 37 °C, lo que indica que el residuo de cisteína en la posición 565 está implicado en la agregación de AvPAL a través de la reticulación del disulfuro.

Tabla 8: Agregación relacionada con la reticulación del disulfuro de las mutantes de cisteína AvPAL

Proteína AvPAL	Tratamiento	Formación de agregado
AvPAL_C503S	37 °C/2 h	+
AvPAL_C64S	37 °C/2 h	+
AvPAL_C565S E1	37 °C/2 h	-
AvPAL_C565S E2	37 °C/2 h	-
AvPAL_C565SC503S	37 °C/2 h	-
AvPAL_C503S	Concentrado + 37 °C/2 h	++
AvPAL_C64S	Concentrado + 37 °C/2 h	++

Proteína AvPAL	Tratamiento	Formación de agregado
AvPAL_C565S E1	Concentrado + 37 °C/2 h	-
AvPAL_C565S E2	Concentrado + 37 °C/2 h	-
AvPAL_C565SC503S	Concentrado + 37 °C/2 h	-
AvPAL_C503S	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-
AvPAL_C64S	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-
AvPAL_C565S E1	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-
AvPAL_C565S E2	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-
AvPAL_C565SC503S	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-

Para determinar cuáles residuos de cisteína existen como sulfhidrilos libres, una preparación purificada AvPAL se desnaturizó en presencia de urea 8 M, se alquiló con yodoacetamida, se digirió con tripsina, y se analizó por LC/MS. Todos los residuos de cisteína AvPAL se marcaron con yodoacetamida, lo que indica que todos los residuos de cisteína de AvPAL expresados en bacterias existen como sulfhidrilos libres.

Para determinar qué residuos de cisteína están presentes en la superficie de la proteína nativa, una preparación de AvPAL purificada se trató primero con N-etil-maleimida (NEM), luego se desnaturizó en presencia de urea 8 M, alquiló con yodoacetamida, se digirió con tripsina, y se analizó por LC/MS. Los residuos de cisteína en las posiciones 235 y 424 no fueron alquilados por NEM, y el residuo de cisteína en la posición 318 fue solo parcialmente alquilado por NEM, lo que indica que los residuos de cisteína en las posiciones 64, 503 y 565 están en la superficie de AvPAL nativa y el residuo de cisteína en la posición 318 está parcialmente expuesto en la superficie de AvPAL nativa.

Para determinar qué residuos de cisteína están implicados en la reticulación de disulfuro intercatenario, 67 µL de una solución 0,7 mg/ml de, una preparación de AvPAL tipo salvaje no pegilada, purificada se desnaturizó en urea 8 M durante 1 hora a 37 °C, y luego digirió en un volumen de reacción de 100 µL con tripsina a pH 8,2 durante la noche (~17,5 horas) a 25 °C. Las proteínas digeridas con tripsina se separaron y se analizaron por espectrometría de masas, en el que se identificaron los péptidos correspondientes a los pares de disulfuro predichos y se cuantificaron como cuentas de iones totales (TIC).

La Tabla 9 muestra que se detectaron pares disulfuro para C503-C503, C503-C565, C565-C318 y C565-C565. Los residuos de cisteína en la posición 565, y en menor medida en la posición 503, se encontraron en pares disulfuro en la preparación de AvPAL purificada.

Tabla 9: Pares de disulfuro agregados

Par de disulfuro	Resultados (TIC/1000)
C64-C318	n.d. [#]
C64-C64	n.d.
C64-C503	n.d.
C64-C565	n.d.
C503-C318	n.d.
C503-C503	11

Par de disulfuro	Resultados (TIC/1000)
C503-C565	112
C565-C318	13
C565-C565	37
C318-C318	n.d.
# no detectado	

Se realizaron estudios para determinar si los mecanismos adicionales además de la reticulación de disulfuro pueden estar implicados en la agregación de proteínas AvPAL.

5 Las preparaciones de AvPAL purificadas se incubaron con de Tween 0,05% o EDTA 10 mM, y luego se separaron por SEC-HPLC como se describe en el EJEMPLO 12. Tween reduce la agregación de proteínas debido a las interacciones hidrofóbicas, y EDTA reduce la agregación de proteínas debido a la presencia de cationes divalentes. Como se muestra en la FIGURA 12, la exposición a Tween 0,05% o EDTA 10 mM no tuvo efecto sobre la agregación de proteínas AvPAL. El pico adicional a 10 minutos en la AvPAL tratada con EDTA 10 mM se debe a la absorbancia de EDTA a 210 nm.

10 Para investigar adicionalmente el papel de la reticulación de disulfuro en la agregación de proteínas AvPAL, la AvPAL purificada se redujo mediante el tratamiento con DTT y luego se desalinizó antes de la separación por SEC-HPLC. Como se muestra en la Figura 13, la agregación de proteínas AvPAL se redujo al mínimo mediante tratamiento con DTT, y los agregados se volvieron a formar después de la incubación durante 18 horas a 37 °C. En contraste, como se muestra en la FIGURA 13B, los agregados no se volvieron a formar una vez que se modificaron las cisteínas de la superficie AvPAL (es decir, alquilaron) por tratamiento con N-metilmaleimida (NEM) después de la exposición a DDT, pero antes de la desalinización e incubación durante 18 horas a 37 °C.

15 Sobre la base de lo anterior, la agregación de AvPAL expresada en bacterias parece deberse únicamente a la formación de enlaces disulfuro entre cadenas, y no debido a los efectos hidrofóbicos o presencia de cationes divalentes. Los residuos de cisteína en las posiciones 565 y 503 están involucrados en la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en las preparaciones de AvPAL.

EJEMPLO 14

Efectos de las variantes de AvPAL (Mutantes de cisteína) y sus formas PEGiladas en los ratones

25 El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la sustitución de la serina de los diversos residuos de cisteína de las posiciones 503 y 565 en el polipéptido en AvPAL sobre los niveles de fenilalanina *in vivo* (Phe) en los ratones.

30 Las formas pegiladas de las mutantes de cisteína doble AvPAL AvPAL_C565SC503S se analizaron para determinar la actividad *in vivo* en ratones ENU2 homocigotas (también conocidos como BTBR^{enu2}) básicamente como se describe en el EJEMPLO 8. El ratón ENU2 es mutante homocigoto en el locus PAH que produce un animal con HPA grave. Los niveles de fenilalanina plasmáticos elevados hacen que este animal sea el modelo adecuado para evaluar la capacidad del PAL para reducir la Phe plasmática.

35 En el primer estudio, la mutante de cisteína doble AvPAL AvPAL_C565SC503S se analizó en varias dosis. Los ratones ENU2 (machos y hembras) se dividieron en 5 grupos de dosis: 4 grupos de prueba (n=4) y un grupo de vehículo (n=2). A cada ratón se administraron 8 dosis de vehículo s.c. en forma semanal, mutante de cisteína doble AvPAL pegilada de dosis baja (0,25 UI), mutante de cisteína doble AvPAL pegilada de dosis media (1,0 UI), mutante de cisteína doble AvPAL pegilada de dosis alta (4,0 UI), o AvPAL tipo salvaje pegilada (4,0 UI). El plasma se recolectó antes de la dosis y a 48 horas posdosis (hasta el día 57) y se analizó para determinar los niveles de Phe. También se recolectó suero predosis y a 48 horas posdosis (hasta el día 57) para el análisis de los niveles de anticuerpo anti-AvPAL. Los ratones también se pesaron una vez por semana comenzando 2 días antes de la primera dosis (hasta el día 40).

40 Dos ratones murieron durante el estudio, un ratón tratado con vehículo y una mutante de cisteína doble AvPAL pegilada de dosis baja tratado con AvPAL. Como se muestra en la FIGURA 14, se observó una reducción dependiente de la dosis en los niveles de Phe en el plasma 48 horas después de cada inyección s.c. de mutante de cisteína doble AvPAL pegilada. A dosis equivalentes, no hubo diferencia en los niveles plasmáticos de Phe entre los

ratones tratados con AvPAL tipo salvaje pegilada o doble mutante de cisteína AvPAL pegilada. Como se muestra en la FIGURA 15, tampoco hubo diferencias significativas en el peso corporal entre los ratones tratados con vehículo, AvPAL tipo salvaje pegilada o doble mutante de cisteína AvPAL pegilada. Es probable que no se observen diferencias significativas en el peso corporal debido a que se usaron ratones machos y hembras en el estudio.

- 5 Los títulos de anticuerpos anti-AvPAL en estos ratones se analizaron con un ensayo ELISA indirecto. En este ensayo, las placas de microtitulación se recubrieron con AvPAL, se bloquearon, y luego se expusieron a sueros diluidos apropiadamente de cada sangrado de ratón. La AvPAL, que se unió a la superficie de placas de microtitulación, fue reconocida y unida por los anticuerpos específicos de AvPAL presentes en las muestras de suero. Los anticuerpos IgG antirratón de cabra marcados de manera detectable detectaron los anticuerpos anti-AvPAL unidos. Las muestras de suero se diluyeron 1:50 inicialmente, y se analizaron en comparación con el "punto de corte", que provino del suero de ratón diluido 1:50 mezclado. Las muestras con la señal más baja que el punto de corte se informaron como <50, o "negativo". El resto de las muestras, consideradas "positivas", se diluyeron adicionalmente en titulación en serie 1: 3 a una dilución en la que la señal cayó por debajo del punto de corte. El factor de dilución más alto que dio una señal positiva (es decir, más alto que el punto de corte) se informó como el título de esa muestra. Durante esta serie de título, un cambio de 3 veces del título no puede reflejar una diferencia significativa del anticuerpo detectado porque la diferencia podría ser el resultado de un cambio mínimo de la señal en el nivel de punto de corte..

- 20 Como se muestra en la Tabla 10, los títulos de anticuerpos anti-AvPAL fueron más bajos en los ratones tratados con la mutante de cisteína doble AvPAL pegilada en comparación con los ratones tratados con una dosis equivalente (4,0 UI) de AvPAL tipo salvaje pegilada. Aunque no se observó respuesta clara a la dosis, los ratones tratados con la dosis alta (4,0 UI) de mutante de cisteína doble AvPAL pegilada tenían mayores títulos de anticuerpos anti-AvPAL que los ratones tratados con la dosis baja (0,25 UI) de mutante de cisteína doble AvPAL pegilada.

Tabla 10: Títulos de IgG anti-AvPALs

Proteína AvPAL pegilada	Muestra	Pre	D8	D15	D 22	D29
AvPAL_C565SC503S (0.25 UI)	S203	<50	50	<50	50	50
	S204	<50	50	50	50	450
	S205	<50	<50	<50	<50	<50
	S206	<50	<50	50	50	50
AvPAL C565SC503S (1.0 UI)	S307	<50	<50	<50	<50	<50
	S308	<50	<50	<50	<50	<50
	S309	<50	<50	<50	<50	50
	S310	<50	<50	<50	<50	<50
AvPAL C565SC503S (4.0 UI)	S411	<50	<50	<50	50	50
	S412	<50	<50	50	50	50
	S413	50	50	50	450	150
	S414	<50	<50	<50	<50	<50
WT AvPAL (4.0 UI)	S515	<50	<50	150	150	450
	S516	<50	50	150	150	450
	S517	<50	<50	150	4050	12150

ES 2 551 315 T3

Proteína AvPAL pegilada	Muestra	Pre	D8	D15	D 22	D29
	S518	<50	50	150	450	150
Proteína AvPAL pegilada	Muestra	Pre	D 36	D 43	D 50	D 57
AvPAL_C565SC503S (0.25 UI)	S203	<50	<50	150	150	<50
	S204	<50	>1350	>1350	>1350	4050
	S205	<50	N/A*	N/A	N/A	N/A
	S206	<50	<50	50	50	<50
AvPAL_C565SC503S (1.0 UI)	S3307	<50	50	150	>1350	150
	S308	<50	<50	<50	<50	<50
	S309	<50	450	>1350	>1350	450
	S310	<500	<50	50	50	<50
AvPAL_C565SC503S (4.0 UI)	S411	<50	50	150	50	50
	S412	<50	150	150	150	50
	S413	50	450	450	450	150
	S414	<50	150	150	150	150
WT AvPAL (4.0 UI)	S515	<50	450	1350	1350	150
	S516	<50	150	450	450	150
	S517	<50	4050	4050	4050	450
	S518	<50	50	50	50	<50
*Ninguna muestra/datos no disponibles						

Los títulos de IgG anti-AvPAL reducidos en ratones tratados con 4,0 UI de mutante de cisteína doble AvPAL pegilada en comparación con 4,0 UI de AvPAL tipo salvaje pegilada se mantuvieron durante todo el estudio.

- 5 En el segundo estudio, la mutante de cisteína doble AvPAL AvPAL_C565SC503S se analizó en diferentes relaciones de pegilación. Los ratones ENU2 macho se dividieron en 5 grupos de dosis: 4 grupos de prueba (n=4) y un grupo de vehículo (n=2). A cada ratón se administraron 8 veces por semana dosis s.c. de vehículo, mutante de cisteína doble AvPAL pegilada de dosis baja (4 UI y 1:1.6 de relación AvPAL:PEG), mutante de cisteína doble AvPAL pegilada de dosis media (4 UI y relación 1:2.4 de AvPAL:PEG), mutante de cisteína doble AvPAL pegilada de dosis alta (4 UI y relación 1:3 de AvPAL:PEG), o AvPAL pegilada tipo salvaje (4 UI y 1:3 de relación AvPAL:PEG).
- 10 Se recolectó plasma predosis y a 4 días posdosis (al día 61) y se analizaron para determinar los niveles de Phe. También se recolectó predosis a 4 días posdosis (hasta el día 57) para el análisis de los niveles del anticuerpo anti-AvPAL. Los ratones también se pesaron una vez por semana comenzando 2 días antes de la primera dosis (al día 40).

Un ratón tratado con vehículo murió durante el estudio. Como se muestra en la FIGURA 16, se observó una reducción dependiente de la relación de PEG en los niveles de Phe en plasma 4 días después de cada inyección s.c. de la mutante de cisteína doble AvPAL pegilada. A relaciones de PEG equivalentes, no hubo diferencia en los niveles de Phe plasmáticos entre los ratones tratados con AvPAL tipo salvaje pegilada o mutante de cisteína doble AvPAL pegilada. Como se muestra en la FIGURA 17, los pesos corporales de los ratones tratados con AvPAL tipo salvaje pegilada o mutante de cisteína doble AvPAL pegilada fueron significativamente más altos que los ratones tratados con vehículo.

Los títulos de anticuerpo anti-AvPAL en estos ratones se analizaron con el ensayo ELISA indirecto descrito anterior.

Como se muestra en la Tabla 11, los títulos de anticuerpo anti-AvPAL fueron más bajos en los ratones tratados con la mutante de cisteína doble AvPAL pegilada en comparación con los ratones tratados con una dosis equivalente de AvPAL tipo salvaje pegilada que tiene la misma relación (1:3) de AvPAL a PEG. Se observó una respuesta de dosis inversa entre los títulos de anticuerpo anti-AvPAL y la relación de AvPAL a PEG, compatible con la expectativa de que la pegilación de proteínas, tales como AvPAL, se asocia con inmunogenicidad reducida *in vivo*.

Tabla 11: Títulos de IgG anti-AvPAL

Proteína AvPAL pegilada	Muestra	Pre	D 15	D 28	D 43	D 64
WT AvPAL (PEG 1:3 NOF)	S101	<50	450	12150	4050	>1350
	S106	<50	450	450	450	4050
	S110	<50	50	50	150	450
	S117	<50	150	450	450	1350
AvPAL C565SC503S (PEG 1:1.6)	S202	50	450	12150	1350	1350
	S207	<50	1350	12150	12150	36450
	S211	<50	450	1350	12150	12150
	S218	50	150	36450	26.57M	>36450
AvPAL_C565SC503S (PEG 1:2.4)	S303	<50	50	150	450	4050
	S308	<50	50	50	50	450
	S312	<50	50	150	450	4050
	S313	<50	50	450	1350	4050
AvPAL_C565SC503S (PEG 1:3)	S404	<50	50	50	450	450
	S409	50	50	50	150	450
	S414	<50	<50	50	450	1350
	S416	<50	<50	150	50	450
Vehículo	S505	<50	<50	<50	<50	N/A*
	S515	<50	<50	<50	<50	<50
*N/A: ninguna muestra de suero para este punto temporal						

Los resultados anteriores muestran que la mutante de cisteína doble AvPAL pegilada AvPAL_C565SG503S tiene actividad enzimática de PAL *in vivo* que es comparable con la AvPAL tipo salvaje pegilada. Debido a que AvPAL tipo salvaje no pegilada no presentó actividad enzimática PAL detectable *in vivo* (ver EJEMPLO 8), se concluye que las variantes de AvPAL, que incluyen la mutante de cisteína doble AvPAL pegilada; AvPAL_C565SC503S, y la AvPAL tipo salvaje pegilada tienen mayor actividad convertidora de fenilalanina que la AvPAL tipo salvaje.

Los resultados anteriores muestran también que la variante de AvPAL pegilada, que tiene agregación de proteínas reducida *in vitro* debido a a sustituciones de cisteína a serina en ambas posiciones 503 y 565, tiene inmunogenicidad reducida en comparación con la vPAL tipo salvaje pegilada. Debido a la pegilación misma se asocia con inmunogenicidad reducida, se concluye que las variantes AvPAL tienen inmunogenicidad reducida *in vivo* en comparación con la AvPAL tipo salvaje.

EJEMPLO 15

Generación de formas repegiladas de variantes de AvPAL

Los estudios se realizaron para determinar si las formas pegiladas de las variantes AvPAL se podrían someter a repegilación para aumentar la cantidad de pegilación, es decir, el porcentaje de moléculas de PEG en los residuos de lisina AvPAL, y, si es así, si las formas repegiladas de variantes de AvPAL retienen actividad enzimática *in vitro* y tienen alguna propiedad mejorada *in vivo*, a saber, la reducción de la inmunogenicidad.

Pegilación de variantes de AvPAL

La mutante de cisteína doble AvPAL, AvPAL_C565SC503S, se pegiló básicamente como se describe en el EJEMPLO 6 a unas relaciones diferentes de PAL:PEG (es decir, AvPAL_C565SC503S:SUNBRIGHT ME-200HS 20 kDa PEG activada con NHS (NOF)).

Brevemente, la mezcla de reacción estándar contenía: 7 mg/ml (correspondiente a residuos de lisina 2 mM) AvPAL_C565SC503S y 2,3,4 o 6 mM mPEG20K-NHS (éster de hidroxisuccinimida-metoxipoli(etilenglicol)-carboximetil-N, 20 kDa, SUNBRIGHT ME-200HS, NOF) en tampón de fosfato de potasio 50 mM pH 8,5, correspondiente a la relación molar 1: 1, 1: 1,5, 1: 3, respectivamente, del total de los residuos de lisina AvPAL a moléculas de PEG (ver la Tabla 12): 2 ó 1. Después de una incubación de 3 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se intercambiaba tampón en fosfato de potasio 200 mM, pH 8,5, y se concentró a más de 20 mg/ml usando filtración de flujo tangencial (Vivaflow 50 ó 200, membrana de polietersulfona o celulosa regenerada, 100 kDa MWCO, Sartorius) en la preparación para la etapa de repegilación subsiguiente..

Tabla 12: Condición de pegilación y repegilación para AvPAL

PEGilación			RePEGilación		
AvPAL (mg/ml)	Residuos totales de lisina (mM)	mPEG20K-NHS (mM)	rAvPAL-PEG (mg/ml)	Residuos totales de lisina (mM)	mPEG20K-NHS (mM)
7	2	6	-	-	-
7	2	6	7	2	6
7	2	6	3.5	1	3
7	2	6	7	2	2
7	2	6	7	2	4
7	2	6	7	2	6
7	2	6	10.5	3	6
7	2	2	-	-	-
7	2	2	7	2	2

PEGilación			RePEGilación		
AvPAL (mg/ml)	Residuos totales de lisina (mM)	mPEG20K-NHS (mM)	rAvPAL-PEG (mg/ml)	Residuos totales de lisina (mM)	mPEG20K-NHS (mM)
7	2	2	7	2	6
7	2	2	10.5	3	6
7	2	2	14	4	6
7	2	3	7	2	6
7	2	4	7	2	6

Repegilación de variantes de AvPAL pegiladas

AvPAL_C565SC503S, pegilado en diferentes relaciones PAL:PEG, se repegilaron básicamente como se describe en el EJEMPLO 6 usando diversas concentraciones de enzima pegilado, y diferentes cantidades y diferentes relaciones de residuos de lisina en la enzima AvPAL y moléculas de SUNBRIGHT ME-200HS PEG activada con NHS 20 kDa (NOF).

Para cada reacción de repegilación, el material de partida era una AvPAL_C565SC503S pegilada (rAvPAL-PEG) que se concentró a más de 20 mg/ml en fosfato de potasio 200 mM, pH 8,5. mPEG20K-NHS se pesó por separado para cada reacción de repegilación, y se resuspendió en un volumen mínimo de agua. rAvPAL-PEG, diluido en el tampón según sea necesario, se añadió directamente a la solución mPEG20K-NHS resuspendida para alcanzar la concentración final indicada en la Tabla 12. Las reacciones de repegilación se dejó proceder durante 3 horas a temperatura ambiente, y luego se inactivó mediante la dilución dos veces con Tris HCl 25 mM, pH 7,3. El método de filtración de flujo tangencial (Vivaflow 50 o 200, membrana de polietersulfona o celulosa regenerada, 100 kDa MWCO, Sartorius) se usó para intercambio de tampón y concentrar las muestras de rAvPAL-PEG repegiladas en HCl-Tris 10 mM, NaCl 135 mM, L-Phe 1 mM pH 7,3. Las muestras de rAvPAL-PEG repegiladas finales también se concentraron, según sea necesario, utilizando la concentración centrífuga.

Métodos de caracterización in vitro

Ensayo de proteína total: Las concentraciones de muestras de rAvPAL-PEG pegiladas y repegiladas se determinaron mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA), utilizando un kit de ensayo disponible en el comercio de Pierce (cat # 23227) con una albúmina sérica bovina como estándar. Brevemente, 25 μ L de las muestras y los estándares se incubaron con 200 μ L de reactivo BCA a 37 °C durante 30 min. La absorbancia a 562 nm se leyó en el espectrofotómetro de microplaca SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices Corporation).

Ensayo de actividad rAvPAL: Las actividades específicas de las muestras de rAvPAL-PEG pegiladas y repegiladas se determinaron en base al protocolo de ensayo de actividad PAL establecido como se describe en el EJEMPLO 3. En breves palabras, después de añadir muestras de proteínas (25-50 μ L L) a la reacción de ensayo de 1 ml, el aumento en OD₂₉₀ se controla con L-Phe que se convierte en ácido trans-cinámico. Cuando sea necesario, las muestras se diluyeron en el tampón de dilución de ensayo (Tris HCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 7,3) antes del ensayo. Cada punto de datos representa un valor promedio de tres mediciones independientes.

Electroforesis del gel capilar (CGE): Se realizaron los análisis CGE utilizando el kit de análisis ProteomeLab SDS-MW de Beckman Coulter-(cat # 390953). Las muestras de rAvPAL-PEG y rAvPAL-PEG-RP1 pegiladas y repegiladas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos en presencia de SDS y β -mercaptoetanol, y luego se cargaron en capilares (PA800 CE, 23 cm sílice fundida) en el sistema de electroforesis capilar de ACE MDQ Beckman-Coulter. Los perfiles de CGE muestran la cantidad de absorbancia UV a 214 nm. Cada muestra CGE contenía un marcador de migración de 10 kDa como una referencia para los análisis. Los capilares se reacondicionaron entre muestras rAvPAL-PEG.

Ensayo TNBS: Un ensayo de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) se utilizó para proporcionar una estimación de los grupos amino libres presentes en las muestras rAvPAL-PEG pegiladas y repegiladas.

Mapeo de péptidos: El mapeo de péptidos tripticos de las muestras de rAvPAL-PEG y rAvPAL-PEG se realizó como se describe en el EJEMPLO 10 para determinar el porcentaje de pegilación en los residuos de lisina sobre las variantes de proteína AvPAL. Se determinó la cantidad de pegilación, es decir, el porcentaje de moléculas de PEG en los residuos de lisina AvPAL, K10, K32, K115, K145, K195, K301, K335, K413, K493/K494 y K522, de las AvPAL_C565SC503S repegiladas.

Caracterización in vitro de variantes pegiladas y repegiladas

Actividad enzimática de rAvPAL: Como se muestra en la FIGURA 18 (arriba), la pegilación o repegilación causaron una disminución temporal de la actividad de la enzima rAvPAL in vitro. Esto parece ser debido a la pegilación reversible en los residuos de tirosina específicos cerca del sitio activo catalítico. En comparación con la pegilación única, la repegilación pareció mejorar el efecto de las reacciones de pegilación sobre la actividad enzimática rAvPAL, es decir, para reducir temporalmente su actividad específica, que se recuperó gradualmente con el tiempo. Una mayor concentración de PEG en la reacción de pegilación correlacionado con una mayor reducción temporal de la actividad específica. Sin embargo, después de unas semanas a 4 °C, la actividad específica de la rAvPAL-PEG repegilada primero generada usando una variedad de relaciones de PAL: PEG y concentraciones de enzimas y moléculas de PEG (se indican las concentraciones mM de residuos de lisina en AvPAL y PEG), alcanzó al menos aproximadamente el 80% de la AvPAL-PEG pegilada individualmente generada usando una relación de PAL: PEG de 1: 3 (residuos de lisina 2 mM: PEG 6 mM, círculos rellenos). Además, las enzimas AvPAL-PEG pegiladas y repegiladas sometieron a tasas comparables de recuperación de la actividad después de pegilación.

Como se muestra en la Figura 18 (parte inferior), se observó una tendencia similar cuando la rAvPAL pegilada-PEG se generó primero usando una relación de PAL:PEG de 1: 1 (residuos de lisina 2 mM: PEG 2 mM, cuadrados rellenos). En general, aunque la repegilación afectó temporalmente la actividad AvPAL, las actividades específicas resultantes de la rAvPAL-PEG repegilada estaban dentro de rangos aceptables en comparación con la AvPAL-PEG pegilada individualmente generada en una relación de PAL:PEG de 1:3.

Análisis de CGE de rAvPAL pegilada y repegilada: Los análisis CGE indicaron que la repegilación aumentó el alcance general de pegilación, en relación con la pegilación única. Como se muestra en la FIGURA 19A, la repegilación produjo la disminución de la movilidad electroforética de rAvPAL-PEG, lo que implica un aumento del tamaño molecular debido a la unión de moléculas de PEG adicionales. Además, el grado de Pegilación correlaciona bien con la concentración de PEG usada durante la etapa de repegilación. Como se muestra en la FIGURA 19B, con independencia de las condiciones de reacción durante la primera etapa de pegilación, una concentración 6 mM o mayor de mPEG20K-NHS fue igualmente efectiva en el aumento de pegilación de la rAvPAL-PEG. En resumen, en comparación con la rAvPAL pegilada individualmente, rAvPAL-PEG repegilada demostraron claramente una reducción de la movilidad CGE y, por tanto, el aumento de la masa molecular.

Aminas libres en rAvPAL-PEG después de la repegilación: El ensayo TNBS se realizó para estimar la cantidad de grupos amino libres presentes en rAvPAL-PEG repegilada, con respecto a la rAvPAL-PEG repegilada única. Como se muestra en la Tabla 13, la repegilación en presencia de concentraciones de PEG más altas, tales como 6 mM, disminuyó más significativamente la cantidad de aminas libres presentes en la proteína rAvPAL, lo que indica un aumento global de la pegilación. En las condiciones utilizadas en la presente, la mayoría de las aminas libres en rAvPAL no pegilada que están disponibles para modificación química se pegilan efectivamente después de la repegilación.

Tabla 13: Aminas libres presentes en rAvPAL-PEG repegiladas

	[AvPAL] μM	[Aminas libres] μM	Aminas rAvPAL libres/monómero	moles PEG/mol rAvPAL
rAvPAL	13,9	204,0	14,6	-
2 mM Lys: 6 mM PEG	23,5	66,8	2,8	11,8
2:6 y 1:3	22,9	42,3	1,8	12,8
2:6 y 2:2	33,1	118,1	3,6	11,0
2:6 y 2:4	32,9	96,3	2,9	11,7
2:6 y 2:6	26,3	16,8	0,6	14,0
2:6 y 3:6	30,5	37,2	1,2	13,4

Porcentaje de pegilación de residuos de lisina después de la repegilación: Como se muestra en la FIGURA 20, el mapeo de péptidos tripticos indicó que la repegilación mejoró el porcentaje de pegilación de los residuos de lisina en rAvPAL-PEG. Excepto por el residuo de lisina en la posición 10 de AvPAL, que ya estaba 100% pegilado durante la

etapa de pegilación única, el resto de los residuos de lisina no conjugados se dirigieron a la pegilación después de la repegilación. En particular, la pegilación en el residuo de lisina en la posición 301 de AvPAL aumentó hasta en un 500% después de la repegilación. Las condiciones de repegilación en la presencia de concentraciones más altas de mPEG20K-NHS activadas, tales como 6 mM, parecía ser más eficaz en el aumento del grado de pegilación en rAvPAL-PEG que las concentraciones más bajas de PEG, tales como 2 mM..

EJEMPLO 16

Efecto de la repegilación de una variante de AvPAL-PEG en ratones

La AvPAL_C565SC503S repegilada (rAvPAL-PEG-RP1), generada usando una relación de PAL: PEG de 1:3 en las primera y segunda reacciones de pegilación descritas en el EJEMPLO 15, se comparó con la AvPAL_C565SC503S pegilada individualmente (rAvPAL-PEG), generada usando una relación de PAL:PEG de 1: 3 como se describe en los EJEMPLOS 6 y 15, con respecto a su capacidad para reducir los niveles de Phe plasmáticos en un modelo de ratón de PKU y para inducir una respuesta de anticuerpos in vivo.

La actividad específica de las dos variantes de de enzimas AvPAL pegiladas y repegiladas se midió como se describe en el EJEMPLO 3. Se encontró que rAvPAL-PEG-RP1 tenía una actividad específica (1,17 U/mg), que era aproximadamente 20% más baja que la actividad específica de rAvPAL-PEG (1,47 U/mg).

Las formas pegiladas y repegiladas de AvPAL_C565SC503S, rAvPAL-PEG y rAvPAL-PEG-RP1, respectivamente, se analizaron para determinar la actividad in vivo en ratones ENU2 homocigotas (también conocido como BTBR^{enu2}) básicamente como se describe en el EJEMPLO 8. El diseño del estudio se muestra continuación en la Tabla 14.

Tabla 14: Diseño del estudio *in vivo* para comparar las formas PEGiladas y rePEGiladas de una variante AvPAL

Grupo N.º	N	Artículo de prueba	Período de dosificación (semana)	Dosis (mg/kg)	Actividad nominal del artículo de prueba (IU/mL)	Volumen de dosis (mL/kg)	Número total de dosis y frecuencia de dosis
1	4	rAvPAL-PEG	Semanas 1 - 8	80	12	10	14 administración una vez por semana (día 1 de semana 7)
			Semanas 9 - 14	20	3		
2	4	rAvPAL-PEG-RP1	Semanas 1 - 8	80	12		
			Semanas 9 - 14	20	3		
3	4	rAvPAL-PEG	Semanas 1 - 8	80	12		
		rAvPAL-PEG-RP1	Semanas 9 - 14	20	3		

A dos grupos de ratones, grupos 1 y 2, se les administró por vía subcutánea una dosis alta (80 mg/kg) semanal de rAvPAL-PEG o rAvPAL-PEG-RP1, respectivamente, durante 8 semanas, seguido por una dosis baja (20 mg/kg) semanal de rAvPAL-PEG o rAvPAL-PEG-RP1, respectivamente, durante 6 semanas. A un grupo de ratones, grupo 3, se administró la dosis alta de rAvPAL-PEG seguido por la dosis baja de rAvPAL-PEG-RP1. Se recogió plasma antes de la dosis y varios días después de la dosis, y se analizaron los niveles de Phe. Se midieron los niveles de plasma de Phe como se describe en el EJEMPLO 8, y los datos obtenidos se muestran en la FIGURA 21. El suero también se recogió antes de la dosis y varios días después de la dosis para el análisis de los niveles de anticuerpos anti-AvPAL. Se midieron los títulos de IgG anti-rAvPAL en suero como se describe en el EJEMPLO 14, y los datos obtenidos se muestran en la Tabla 15.

Como se muestra en la FIGURA 21, para los 3 grupos, 7-8 semanas de dosificación subcutánea semanal de 80 mg/kg de rAvPAL-PEG (DP, círculos rellenos o triángulos invertidos rellenos) o rAvPAL-PEG-RP1 (2xPEG, círculos abiertos) produjeron la estabilización de los niveles de Phe plasmáticos a <200 µM. Después de la estabilización, una disminución de la dosificación subcutánea a 20 mg/kg semanal con rAvPAL-PEG produjo 4 días de los niveles

de Phe plasmáticos a $<200 \mu\text{M}$. Los niveles de Phe plasmáticos en ratones ENU2 tratados con 20 mg/kg de rAvPAL-PEG (DP, círculos rellenos) fueron más bajos que los ratones tratados con 20 mg/kg de rAvPAL-PEG-RP1 (2xPEG, círculos abiertos o triángulos invertidos rellenos), posiblemente debido a la mayor actividad específica del rAvPAL-PEG pegilado individualmente en comparación con la de la rAvPAL-PEG-RP1 doblemente pegilada.

- 5 Como se muestra en la Tabla 15, los títulos de IgG anti-AvPAL fueron más bajos en los ratones inyectados con rAvPAL ENU2-PEG-RP1 (grupo 2) que los inyectados con rAvPAL-PEG (grupos 1 y 3). Esto indicó que la repegilación de la variante AvPAL para tener una mayor cantidad de pegilación, en particular con moléculas de PEG lineal de 20 kDa, se asoció con una disminución de la inmunogenicidad in vivo.

Tabla 15: Títulos de IgG anti-AvPAL

Proteína AvPAL pegilada	Muestra	D -2	D 14	D 26	D 42	D 68
rAvPAL-PEG	1-1	<50	50	150	150	150
	1-2	<50	50	1350	450	150
	1-3	150	450	4050	1350	1350
	1-4	150	1350	450	450	1350
rAvPAL-PEG-RP1	2-1	<50	<50	50	150	50
	2-2	150	50	<50	50	<50
	2-3	<50	<50	<50	50	<50
	2-4	<50	<50	<50	<50	<50
rAvPAL-PEG semanas 1-8, luego	3-1	50	450	1350	1350	450
rAvPAL-PEG-RP1 semanas 9-14	3-2	50	1350	1350	1350	1350
	3-3	<50	450	4050	1350	1350
	3-4	<50	50	450	150	450

10

En resumen, la repegilación de la variante AvPAL-PEG con moléculas de PEG lineal de 20 kDa para aumentar el porcentaje de pegilación en diversos residuos de lisina en AvPAL se asoció con una actividad de la enzima ligeramente disminuida in vitro, pero, sobre todo, con inmunogenicidad reducida in vivo.

EJEMPLO 17**Evaluación clínica con composiciones de PAL procarióticas**

El siguiente ejemplo proporciona orientación sobre los parámetros que se utilizarán para la evaluación clínica de las composiciones que comprenden PAL procariótica o variantes, mutantes, y fragmentos de estas biológicamente activas ("PAL") en los métodos terapéuticos de la presente invención. Como se discute a lo largo de la presente, PAL se utilizará en el tratamiento de HPA incluyendo HPA, fenilketonuria leve (PKU) y PKU clásica. Se llevarán a cabo ensayos clínicos que proporcionarán una evaluación de dosis orales o subcutáneas de PAL para la seguridad, farmacocinética, y la respuesta inicial de los criterios de valoración clínicos sustitutos y definidos. El ensayo se llevará a cabo durante un mínimo, pero no necesariamente limitado a, las 24 semanas para recolectar información de seguridad suficiente para 100 pacientes evaluables. La dosis inicial para los ensayos variará de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg/kg/semana. En el caso de que esta dosis no produzca una reducción en los niveles de fenilalanina plasmáticos (Phe) en exceso en un paciente, ni produzca un beneficio clínico directo significativo medido como la capacidad de aumentar la ingesta de Phe oral diaria sin un aumento en los niveles Phe plasmáticos, la dosis se debe aumentar según sea necesario, y se mantuvo durante un período mínimo adicional de, pero necesariamente limitado a, 24 semanas para establecer la seguridad y para evaluar adicionalmente la eficacia.

Las mediciones de seguridad incluirán eventos adversos, reacciones alérgicas, panel completo de química clínica (función renal y hepática), análisis de orina y de CBC con recuento diferencial. Además, se controlarán también otros parámetros que incluyen la reducción de los niveles sanguíneos de Phe, pruebas neuropsicológicas y cognitivas, y las evaluaciones globales. El presente ejemplo también contempla la determinación de los parámetros farmacocinéticos del fármaco en la circulación, y la distribución general y media de vida de PAL en la sangre. Se prevé que estas medidas ayudarán a relacionar dosis y la respuesta clínica.

Métodos

Los pacientes que tienen niveles elevados de Phe plasmática se someterán a un examen de historia clínica y físico inicial, pruebas neuropsicológicas y cognitivas, un conjunto estándar de pruebas clínicas de laboratorio (hemograma, Panel 20, CH50, UA), los niveles de iones urinarios, niveles de dihidropteridina reductasa (DHPR), y un panel de sangre en ayunas (plasma) de aminoácidos de suero. El paciente será seguido detenidamente con visitas semanales a la clínica. Los pacientes volverán a la clínica para una evaluación completa de una semana después de completar el período de tratamiento. En caso de ser necesaria el escalamiento de la dosis, los pacientes seguirán el mismo esquema indicado anteriormente. La seguridad se controlará durante todo el ensayo.

Diagnóstico y criterios de inclusión/exclusión

El paciente puede ser hombre o mujer, con un diagnóstico documentado de HPA o PKU leve confirmada por las pruebas genéticas y evidencia de niveles de Phe elevados en sangre. El estudio incluirá pacientes HPA o PKU que no sigan con precisión el control de la dieta. Las pacientes mujeres en edad fértil deben tener una prueba de embarazo negativa (β -hCG orina) justo antes de cada dosis y se les debe aconsejar usar un método anticonceptivo médicamente aceptada durante todo el estudio. Un paciente será excluido de este estudio si la paciente está embarazada o en período de lactancia; ha recibido un fármaco en investigación en los 30 días previos al enrolamiento del estudio; o tiene una afección médica, enfermedades intercurrentes graves, u otra circunstancia atenuantes que puede disminuir significativamente el cumplimiento del estudio.

Intervención dietaria

Después de la aleatorización inicial y el del período de tratamiento de dos semanas, todos los participantes del estudio se someterán a asesoramiento dietético y seguirán una dieta estándar y/o una dieta estándar restringido en Phe complementado con alimentos médicos específicos de Phe para un total de cuatro a seis semanas. Las dietas se manejarán en el hogar y la ingesta dietaria se registrará en los registros diarios. Los análisis de las ingestas de nutrientes y alimentos médicos y el porcentaje de ingesta diaria recomendado (RDI) se compararon entre los grupos de tratamiento.

Seguridad PAL

Se determinará que la terapia PAL es segura si no se producen reacciones farmacológicas agudas o crónicas significativas durante el curso del estudio. Se determinará que la administración a largo plazo del fármaco es segura si no se observan anomalías significativas en los exámenes clínicos, laboratorios clínicos u otros estudios apropiados.

EJEMPLO 18**Evaluación clínica de una variante AvPAL PEGilada**

5 La mutante de cisteína doble AvPAL pegilada_C565SC503S se evaluará clínicamente en los seres humanos. El objetivo de la evaluación clínica es determinar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética (PK), y eficacia en pacientes con PKU. Los niveles de fenilalanina sanguíneos (Phe) servirán como criterio de valoración clínica.

Fase 1

10 La Fase 1 es un estudio abierto, de escalamiento de dosis única en 35 pacientes con PKU de edades entre 16 y 50 años. El objetivo primario es evaluar la seguridad y tolerabilidad de la mutante de cisteína doble AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S, y los objetivos secundarios son evaluar PK de la enzima pegilada y reducción de Phe. A siete cohortes de 5 sujetos se administran secuencialmente con dosis crecientes de 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 y 1 mg/kg AvPAL_C565SC503S pegilada. Los sujetos en cada cohorte reciben una dosis única y, a continuación, son seguidos por un total de 6 semanas. Los criterios de inclusión son que el nivel de fenilalanina en la sangre en la selección y el nivel promedio de Phe en sangre durante los últimos 3 años es ≥ 600 M.

Fase 2

15 El estudio de Fase 2 se divide en dos partes sin interrupción:

- Parte 1 – administración de 16 semanas – 8 semanas, luego optimización de la dosis
- Parte 2 - 40 semana - extensión

20 La Fase 2 es un estudio abierto, de dos partes de la optimización de dosis en 35 pacientes con PKU. La Parte 1 llevada a cabo durante un período de 16 semanas de duración implica la administración de dosis de AvPAL_C565SC503S pegilada una vez por semana durante 8 semanas, seguido por un período de optimización de la dosis. Cada dosis del sujeto se ajusta para alcanzar concentraciones de Phe en sangre por debajo de 600 μ M. El objetivo primario es evaluar la seguridad y tolerabilidad de la administración múltiple de los AvPAL_C565SC503S pegilado, y los objetivos secundarios son evaluar los efectos de la enzima pegilada en las concentraciones de Phe sanguíneas, respuesta inmune, por ejemplo, los títulos de anticuerpos anti-AvPAL y PK estado estacionario. En la

25 parte 2, a los sujetos se administra AvPAL_C565SC503S pegilada durante 40 semanas, con dosis optimizada individualizada y frecuencia de administración.

Fase 3

30 Una vez que los estudios de fase 1 y 2 están completos, los estudios adicionales potencialmente pueden incluir un estudio doble ciego de seis meses de fase 3 en un mayor número de sujetos, con estudios adicionales en poblaciones especiales, tales como, por ejemplo y no de limitación, pacientes con hiperfenilalaninemia no PKU (HPA), pacientes PKU receptivos a BH4 y pacientes PHU no receptivos a BH4.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BioMarin Pharmaceutical Inc. Vellard, Michel C Fitzpatrick, Paul A Kakkis, Emil D Wendt, Dan

5 <120> Composiciones de fenilalanina amoníaco-liasa procariótica y métodos de uso de dichas composiciones

<130> 0165 PC10

<150> US 11/451.999

10 <151> 2006-06-12

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1
<211> 1710

<212> ADN

<213> Nostoc punctiforme

20 <400> 1

```

atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc tttcactaat      60
agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga ggttgtaaatt      120
gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcgggggtgtt      180
caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacgggggtg      240
acatctggct ttggcgggat ggcagatgtt gtcacatctc gcgaacaagc agcgggaactt      300
cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgaggaa acaaattatc gttagcagac      360
gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggtgcgtc tggatatacga      420
ctcgaactta ttcagcggat tgaaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat      480
gagtttggct ctatcgggtc tagcggcgat ttggtgccat taccctacat tactggggca      540
ctaatcggtc tagatcctag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccgtt      600
acagccttgt ctggtttggg ttgccaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca      660
atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa      720
gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaagggtt atacggaacg      780
aatcaatctt tccacccgtt tattcatcag tgcaagccac atcccgttca actatggaca      840
gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcaccttttag ttcgtgaaga gttggatggt      900
aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcggt attctctccg ctgtctggca      960
cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaatt cgaggtagaa     1020

```

ES 2 551 315 T3

```

atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc 1080
ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg 1140
ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac 1200
ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt 1260
ttgcaaatac gtggaaactc gattatgcca ctgttgagct tctatggaaa ttccctagcc 1320
gatcgctttc ctaccacgc cgagcaattt aatcaaaaata ttaacagcca aggctatatt 1380
tccgcaaatt tgacacgtcg ttccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg 1440
atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaaaggcca ttatgatgca 1500
cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga 1560
aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag 1620
catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtgggtggt taattgtgca agcagttgag 1680
catatttttt cgagcttaaa gtcaacgtaa 1710

```

<210> 2

<211> 569

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 2

```

Met Asn Ile Thr Ser Leu Gln Gln Asn Ile Thr Arg Ser Trp Gln Ile
1           5           10           15

Pro Phe Thr Asn Ser Ser Asp Ser Ile Val Thr Val Gly Asp Arg Asn
20           25           30

Leu Thr Ile Asp Glu Val Val Asn Val Ala Arg His Gly Thr Gln Val
35           40           45

Arg Leu Thr Asp Asn Ala Asp Val Ile Arg Gly Val Gln Ala Ser Cys
50           55           60

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

Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asp Val Val Ile Ser Arg Glu Gln
85           90           95

Ala Ala Glu Leu Gln Thr Asn Leu Ile Trp Phe Leu Lys Ser Gly Ala
100          105          110

Gly Asn Lys Leu Ser Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg

```

ES 2 551 315 T3

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

ES 2 551 315 T3

Gly Val Thr Met Asp Arg Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Ile Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Val Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Val Gly Asn Ser Asp Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Ser Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Ser Phe Tyr Gly Asn Ser Leu Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Ile Ser Ala Asn Leu
450 455 460

Thr Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Met Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Met Lys Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Thr Cys Leu Ser Pro Asn Thr Val Gln Leu Tyr
500 505 510

Thr Ala Val Cys Glu Val Val Gly Lys Pro Leu Thr Ser Val Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Cys Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Gly Gly Gly Leu Ile Val Gln Ala Val Glu
545 550 555 560

His Ile Phe Ser Ser Leu Lys Ser Thr
565

<210> 3

<211> 1704

5 <212> ADN

<213> Anabaena variabilis

<400> 3

10 atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga 60

ES 2 551 315 T3

```

aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg 120
gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggtatt 180
caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg 240
acatctgggtt ttggcggtat ggccaatggt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc 300
caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc cttggcggat 360
gtgcgcgcag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcatc tggcatcaga 420
ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgat 480
gagtttggtt caattgggtc aagtgggtgat ttagtgccac taccctacat tactggttca 540
ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gttaaagaaat ggatgcgcca 600
acagctctac gtcaactgaa tttgtcacc cttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg 660
atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgtcta cgataactca 720
attttaactg cgatcgctat gggcggtcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc 780
aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctgggtca attatgggca 840
gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gtttagatgg 900
aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcggt actcactccg atgccttccc 960
cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaaat tgaaatcgaa 1020
atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga 1080
ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg 1140
ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat 1200
ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaaggt 1260
ctgcaaatat gcggtaaact aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc 1320
gatcgctttc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact 1380
tcagcgactc tagcccgccg ttctgtggat atcttcaga attatgtggc gatcgctctg 1440
atgtttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactgggtca ttacgatgca 1500
cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga 1560
caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag 1620
catattgccc ggatttctgc tgatatcgct gctgggtggg tgattgtgca agcagttcaa 1680
gatatcttac cctgcttgca ttaa 1704

```

<210> 4

<211> 567

5 <212> PRT

<213> *Anabaena variabilis*

<400> 4

ES 2 551 315 T3

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

ES 2 551 315 T3

225		230		235		240
Ile Leu Thr Ala	Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala					
	245			250		255
Leu Asn Gly Thr	Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys					
	260		265			270
Pro His Pro Gly	Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu					
	275		280			285
Ala Asn Ser Gln	Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr					
	290		295			300
Arg Asp His Glu	Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro					
305		310		315		320
Gln Tyr Leu Gly	Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln					
	325			330		335
Ile Glu Ile Glu	Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val					
	340		345			350
Asp Asn Gln Ala	Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val					
	355		360			365
Gly Met Gly Met	Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys					
	370		375			380
His Leu Asp Val	Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn					
385		390		395		400
Gly Leu Pro Pro	Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met					
	405		410			415
Gly Leu Lys Gly	Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu					
	420		425			430
Thr Phe Tyr Gly	Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu					
	435		440			445
Gln Phe Asn Gln	Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu					
	450		455			460
Ala Arg Arg Ser	Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu					
465		470		475		480

ES 2 551 315 T3

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 5

<211> 523

<212> PRT

<213> Streptomyces maritimus

<400> 5

Met Thr Phe Val Ile Glu Leu Asp Met Asn Val Thr Leu Asp Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asp Ala Ala Arg Gln Arg Thr Pro Val Glu Leu Ser Ala Pro Val
20 25 30

Arg Ser Arg Val Arg Ala Ser Arg Asp Val Leu Val Lys Phe Val Gln
35 40 45

Asp Glu Arg Val Ile Tyr Gly Val Asn Thr Ser Met Gly Gly Phe Val
50 55 60

Asp His Leu Val Pro Val Ser Gln Ala Arg Gln Leu Gln Glu Asn Leu
65 70 75 80

Ile Asn Ala Val Ala Thr Asn Val Gly Ala Tyr Leu Asp Asp Thr Thr
85 90 95

Ala Arg Thr Ile Met Leu Ser Arg Ile Val Ser Leu Ala Arg Gly Asn
100 105 110

ES 2 551 315 T3

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

ES 2 551 315 T3

355 360 365
 Asn Arg Arg Val Asp Arg Phe Leu Asp Lys Ser Asn Ser Asn Gly Leu
 370 375 380
 Pro Ala Phe Leu Cys Arg Glu Asp Pro Gly Leu Arg Leu Gly Leu Met
 385 390 395 400
 Gly Gly Gln Phe Met Thr Ala Ser Ile Thr Ala Glu Thr Arg Thr Leu
 405 410 415
 Thr Ile Pro Met Ser Val Gln Ser Leu Thr Ser Thr Ala Asp Phe Gln
 420 425 430
 Asp Ile Val Ser Phe Gly Phe Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Glu Val
 435 440 445
 Leu Thr Asn Ala Ala Tyr Val Val Ala Phe Glu Leu Leu Cys Ala Cys
 450 455 460
 Gln Ala Val Asp Ile Arg Gly Ala Asp Lys Leu Ser Ser Phe Thr Arg
 465 470 475 480
 Pro Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Lys Ile Val Pro Phe Phe Asp Arg Asp
 485 490 495
 Glu Thr Ile Thr Asp Tyr Val Glu Lys Leu Ala Ala Asp Leu Ile Ala
 500 505 510
 Gly Glu Pro Val Asp Ala Ala Val Ala Ala His
 515 520
 <210> 6
 <211> 510
 5 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida
 <400> 6
 Met Thr Glu Leu Thr Leu Lys Pro Gly Thr Leu Thr Leu Ala Gln Leu
 1 5 10 15
 Arg Ala Ile His Ala Ala Pro Val Arg Leu Gln Leu Asp Ala Ser Ala
 20 25 30
 10 Ala Pro Ala Ile Asp Ala Ser Val Ala Cys Val Glu Gln Ile Ile Ala
 35 40 45

ES 2 551 315 T3

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

ES 2 551 315 T3

Val Met Gly Ala Cys Leu Thr Gln Leu Arg Gln Ala Ala Glu Val Leu
290 295 300

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

Glu Gly Asp Val Ile Ser Gly Gly Asn Phe His Ala Glu Pro Val Ala
325 330 335

Met Ala Ala Asp Asn Leu Ala Leu Ala Ile Ala Glu Ile Gly Ser Leu
340 345 350

Ser Glu Arg Arg Ile Ser Leu Met Met Asp Lys His Met Ser Gln Leu
355 360 365

Pro Pro Phe Leu Val Glu Asn Gly Gly Val Asn Ser Gly Phe Met Ile
370 375 380

Ala Gln Val Thr Ala Ala Ala Leu Ala Ser Glu Asn Lys Ala Leu Ser
385 390 395 400

His Pro His Ser Val Asp Ser Leu Pro Thr Ser Ala Asn Gln Glu Asp
405 410 415

His Val Ser Met Ala Pro Ala Ala Gly Lys Arg Leu Trp Glu Met Ala
420 425 430

Glu Asn Thr Arg Gly Val Pro Ala Ile Glu Trp Leu Gly Ala Cys Gln
435 440 445

Gly Leu Asp Leu Arg Lys Gly Leu Lys Thr Ser Ala Lys Leu Glu Lys
450 455 460

Ala Arg Gln Ala Leu Arg Ser Glu Val Ala His Tyr Asp Arg Asp Arg
465 470 475 480

Phe Phe Ala Pro Asp Ile Glu Lys Ala Val Glu Leu Leu Ala Lys Gly
485 490 495

Ser Leu Thr Gly Leu Leu Pro Ala Gly Val Leu Pro Ser Leu
500 505 510

<210> 7

<211> 567

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Sustitución de cisteína por serina en la posición 64 en Anabaena variabilis PAL

<400> 7

ES 2 551 315 T3

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

ES 2 551 315 T3

Thr	Ser	Val	Met	Thr	Gly	Ile	Ala	Ala	Asn	Cys	Val	Tyr	Asp	Thr	Gln
225					230					235					240
Ile	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Val	His	Ala	Leu	Asp	Ile	Gln	Ala
				245					250					255	
Leu	Asn	Gly	Thr	Asn	Gln	Ser	Phe	His	Pro	Phe	Ile	His	Asn	Ser	Lys
			260					265					270		
Pro	His	Pro	Gly	Gln	Leu	Trp	Ala	Ala	Asp	Gln	Met	Ile	Ser	Leu	Leu
		275					280					285			
Ala	Asn	Ser	Gln	Leu	Val	Arg	Asp	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	His	Asp	Tyr
	290					295					300				
Arg	Asp	His	Glu	Leu	Ile	Gln	Asp	Arg	Tyr	Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Pro
305					310					315					320
Gln	Tyr	Leu	Gly	Pro	Ile	Val	Asp	Gly	Ile	Ser	Gln	Ile	Ala	Lys	Gln
				325					330					335	
Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Asp	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Val
			340					345					350		
Asp	Asn	Gln	Ala	Ser	Tyr	His	Gly	Gly	Asn	Phe	Leu	Gly	Gln	Tyr	Val
		355					360					365			
Gly	Met	Gly	Met	Asp	His	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
	370					375					380				
His	Leu	Asp	Val	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Glu	Phe	Ser	Asn
385					390					395					400
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Leu	Gly	Asn	Arg	Glu	Arg	Lys	Val	Asn	Met
				405					410					415	
Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Gln	Ile	Cys	Gly	Asn	Ser	Ile	Met	Pro	Leu	Leu
			420					425					430		
Thr	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ser	Ile	Ala	Asp	Arg	Phe	Pro	Thr	His	Ala	Glu
		435					440					445			
Gln	Phe	Asn	Gln	Asn	Ile	Asn	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu
	450					455					460				

ES 2 551 315 T3

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 8

<211> 567

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sustitución de cisteína por serina en la posición 318 en Anabaena variabilis PAL

<400> 8

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20 25 30

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
35 40 45

Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
50 55 60

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
65 70 75 80

Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
85 90 95

ES 2 551 315 T3

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

ES 2 551 315 T3

Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350

Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 9

<211> 567

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sustitución de cisteína por serina en la posición 503 en Anabaena variabilis PAL

10

<400> 9

ES 2 551 315 T3

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

ES 2 551 315 T3

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
 210 215 220
 Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
 225 230 235 240
 Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
 245 250 255
 Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
 260 265 270
 Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
 275 280 285
 Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
 290 295 300
 Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
 305 310 315 320
 Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
 325 330 335
 Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
 340 345 350
 Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
 355 360 365
 Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
 370 375 380
 His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
 405 410 415
 Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
 420 425 430
 Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
 435 440 445

ES 2 551 315 T3

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Ser Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 10

<211> 567

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Sustitución de cisteína por serina en la posición 565 en Anabaena variabilis PAL

<400> 10

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20 25 30

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
35 40 45

Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
50 55 60

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val

ES 2 551 315 T3

65	70	75	80
Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln	85	90	95
Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala	100	105	110
Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg	115	120	125
Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile	130	135	140
Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr	145	150	155
Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr	165	170	175
Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe	180	185	190
Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu	195	200	205
Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly	210	215	220
Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln	225	230	235
Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala	245	250	255
Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys	260	265	270
Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu	275	280	285
Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr	290	295	300
Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro	305	310	315
			320

ES 2 551 315 T3

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

Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350

Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
565

5 <210> 11
<211> 567
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sustituciones de cisteína por serina en las posiciones 565 y 503 en Anabaena variabilis PAL

<400> 11

ES 2 551 315 T3

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

ES 2 551 315 T3

[illegible]

ES 2 551 315 T3

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
 435 440 445
 Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
 450 455 460
 Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
 465 470 475 480
 Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
 485 490 495
 His Tyr Asp Ala Arg Ala Ser Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
 500 505 510
 Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
 515 520 525
 Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
 530 535 540
 Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
 545 550 555 560
 Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
 565

<210> 12
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Nostoc punctiforme PAL cebador 1 (directo)
 <400> 12

cactgtcata tgaatataac atctctacaa cagaacat 38

<210> 13
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Nostoc punctiforme PAL cebador 2 (inverso)
 <400> 13

gacagtggcg gccgctcacg ttgactttaa gctcgaaaaa atatg 45

<210> 14
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Anabaena variabilis PAL cebador 1 (directo, fragmento N-terminal)

<400> 14

cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaaag 38

<210> 15
<211> 49
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador 2 (inverso, fragmento N-terminal)

10 <400> 15

ggaaattcc tccatgatag ctggcttgg tatcaacatc aattagtgg 49

15 <210> 16
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador 3 (directo, fragmento C-terminal)

<400> 16

25 ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc 49

<210> 17
<211> 41
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador 4 (inverso, fragmento C-terminal)

35 <400> 17

cactgtgcgg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g 41

<210> 18
40 <211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
45 <223> Anabaena variabilis PAL cebador directo

<400> 18

cactgtcata tgaagacact atctcaagca caaag 35

50 <210> 19
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador inverso

<400> 19

60 cactgtctcg agatgcaagc agggttaagat atcttg 36

<210> 20
65 <211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 551 315 T3

<220>
 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sitio 5' NheI y suprimir sitio NheI interno (directo, N-terminal)

5 <400> 20
 cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38

10 <210> 21
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sitio 5' NheI y suprimir sitio NheI interno (inverso, N-terminal)

<400> 21
 ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggg tatcaacatc aattagtg 49

20 <210> 22
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sitio 5' NheI y suprimir sitio NheI interno (directo, fragmento C-terminal)

30 <400> 22
 ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc 49

35 <210> 23
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sitio 5' NheI y suprimir sitio NheI interno (inverso, fragmento C-terminal)

<400> 23

45 acagtggcgg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g 41

50 <210> 24
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sitio 5' NheI y sitio 3' SmaI (directo)

55 <400> 24
 cactgtgaat tcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38

60 <210> 25
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sitio 5' NheI y sitio 3' SmaI (inverso)

ES 2 551 315 T3

<400> 25

cactgtcccg ggtaaatgca agcagggtaa gatatct 37

5 <210> 26
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sustitución de cisteína por serina en la posición 503 (directo)

<400> 26

15 gtcattacga tgcacgcgcc tctctatcac ctgcaactga g 41

<210> 27
<211> 41
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sustitución de cisteína por serina en la posición 503 (inverso)

25 <400> 27

ctcagttgca ggtgatagag aggcgcgtgc atcgtaatga c 41

<210> 28
30 <211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sustitución de cisteína por serina en la posición 565 (directo)

<400> 28

cagttcaaga tatcttacct tccttgcat aacccgggct gc 42

40 <210> 29
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sustitución de cisteína por serina en la posición 565 (inverso)

<400> 29

50 gcagcccgagg ttaatgcaag gagggtaaga tatcttgaac tg 42

<210> 30
<211> 44
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sustitución de cisteína por serina en la posición 64 (directo)

60 <400> 30

gcagggtatt caggcatctt ctgattacat taataatgct gttg 44

65 <210> 31
<211> 44

ES 2 551 315 T3

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sustitución de cisteína por serina en la posición 64 (inverso)

<400> 31

10 caacagcatt attaatgtaa tcagaagatg cctgaatacc ctgc 44

<210> 32
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sustitución de cisteína por serina en la posición 318 (directo)

<400> 32

20 caagatcgtt actcactccg atccctccc cagtatttgg ggc 43

<210> 33
<211> 43
25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
30 <223> Anabaena variabilis PAL cebador para crear sustitución de cisteína por serina en la posición 318 (inverso)

<400> 33

35 gccccaaata ctggggaagg gatcggagtg agtaacgatc ttg 43

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante de fenilalanina amoníaco liasa (AvPAL) de *Anabaena variabilis* donde dicha variante de AvPAL tiene una actividad convertidora de fenilalanina mayor y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con una AvPAL tipo salvaje (SEQ ID NO:4), donde uno o más residuos de cisteína seleccionados del grupo que consiste en residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 se han sustituido con un residuo de serina.
2. La variante de AvPAL de la reivindicación 1, donde el residuo de cisteína de la posición 565 de AvPAL se ha sustituido con un residuo de serina (SEQ ID NO:10).
3. La variante de AvPAL de la reivindicación 1, donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de AvPAL se han sustituido con un residuo de serina (SEQ ID NO:11).
- 10 4. La variante de AvPAL de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende un polímero soluble en agua.
5. La variante de AvPAL de la reivindicación 4, donde el polímero soluble en agua es un polietilenglicol.
- 15 6. La variante de AvPAL de la reivindicación 5, donde la variante de AvPAL se puede obtener por la reacción de la variante de AvPAL con polietilenglicol activado por NHS en una relación de 3 polietilenglicol por residuo de lisina de la variante de AvPAL.
7. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de una enfermedad del metabolismo de aminoácidos que comprende la variante de AvPAL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. Una composición que comprende la variante de AvPAL de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en el tratamiento de una enfermedad causada en forma total o parcial por una deficiencia en fenilalanina hidroxilasa (PAH).
9. La composición para usar de la reivindicación 8, donde la enfermedad está **caracterizada por** niveles de fenilalanina elevados; o donde la composición se prepara para tratar un sujeto que tiene 10% o menos de una actividad de PAH normal.
- 25 10. La variante de AvPAL de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en el tratamiento de un ser humano que sufre de fenilcetonuria (PKU).
11. Una composición que comprende la variante de AvPAL de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en el tratamiento de PKU grave clásica, donde la composición es efectiva para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma de un sujeto en comparación con dicha concentración en la ausencia de administración de dicha composición.
- 30 12. La composición para usar de la reivindicación 11, donde dicho sujeto ha sido diagnosticado como portador de una PAH mutante.
13. La composición para usar de la reivindicación 12, donde dicha PAH mutante comprende una mutación en el dominio catalítico de PAH, o una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M E390G, A395P, P407S, y Y414C.
- 35 14. Una composición que comprende la variante de AvPAL de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en el tratamiento de una mujer embarazada que tiene hiperfenilalaninamia (HPA), donde la composición se prepara para administrar en combinación con una dieta restringida en proteínas, donde la administración combinada de la composición y dieta restringida en proteínas es efectiva para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma de dicha mujer en comparación con dicha concentración en ausencia de administración de dicha combinación.
- 40 15. Una composición que comprende la variante de AvPAL de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en el tratamiento de un lactante que tiene PKU, donde la composición se prepara para administrar a un lactante entre 0 y 3 años y que tiene una concentración de fenilalanina plasmática entre 360 µM a 4800 µM, y donde la composición se prepara para administrar en una cantidad efectiva para producir una disminución en la concentración de fenilalanina plasmática de dicho lactante.
- 45 16. Una variante de AvPAL donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de AvPAL se han sustituido con los residuos de serina (SEQ ID. NO. 11).
17. La variante de AvPAL de la reivindicación 16, que está pegilada.
- 50 18. La variante de AvPAL de la reivindicación 17, donde dicha pegilación se puede obtener por la reacción de la variante de AvPAL con polietilenglicol activado por NHS en una relación de al menos 1.6 polietilenglicol por residuo

de lisina de variante de AvPAL; por la reacción de la variante de AvPAL con polietilenglicol activado por NHS en una relación de al menos 2,4 polietilenglicol por residuo de lisina de la variante de AvPAL; o por la reacción de la variante de AvPAL con polietilenglicol activado por NHS en una relación de 3 polietilenglicol por residuo de lisina de la variante de AvPAL.

- 5 **19.** La variante de AvPAL de la reivindicación 17, donde al menos 28 por ciento de los residuos de lisina en las posiciones 2, 10, 32, 145, 195, 301, 413, 493, y 522 de la variante de AvPAL están pegilados; donde al menos 51 por ciento de los residuos de lisina en las posiciones 2, 10, 195, 413, 493, y 522 de la variante de AvPAL están pegilados; o donde al menos 75 por ciento de los residuos de lisina en las posiciones 2, 10, 195, 493, y 522 de la variante de AvPAL están pegilados.

FIGURA 1A

Secuencia génica de PAL de *Nostoc punctiforme*

```

1   atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc tttcactaat
61  agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga gggtgtaaat
121 gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcgggggtgt
181 caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacgggggtg
241 acatctggct ttggcggtat ggcagatgtt gtcattctct gcgaacaagc agcggaactt
301 cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgcaggaa acaaattatc gttagcagac
361 gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggtgcgtc tggatatacga
421 ctggaactta ttcagcggat tgaaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat
481 gagtttggtt ctatcggtgc tagcggcgat ttggtgccat tatctacat tactggggca
541 ctaatcggtc tagatcctag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccgtt
601 acagccttgt ctcgtttggg ttggccaaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca
661 atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa
721 gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaagggtt atacggaacg
781 aatcaatctt tccaccggtt tattcatcag tgcaagccac atcccgggtca actatggaca
841 gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcatctttag ttctggaaga gttggatggt
901 aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca
961 cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa
1021 atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc
1081 ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg
1141 ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac
1201 ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt
1261 ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctgttgagct tctatggaaa ttccctagcc
1321 gatcgctttc ctaccacgcg cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt
1381 tccgcaaatt tgacacgtcg ttccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg
1441 atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaaagggtc ttatgatgca
1501 cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga
1561 aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag
1621 catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtggtggtt taattgtgca agcagttgag
1681 catatttttt cgagcttaaa gtcaacgtaa

```

FIGURA 1B

Secuencia de proteínas de PAL de *Nostoc punctiforme*

MNITSLQQNITRSWQIPFTNSSDSIVTVGDRNLTIDEVVNVARH
 GTQVRLTDNADVIRGVQASCDYINNAVETAQPIYGVTSFGFGMADVVISREQAAELQT
 NLIWFLKSGAGNKLSLADVRAAMLLRANSHLYGASGIRLELIQRIETFLNAGVTPHVV
 EFGSIGASGDLVPLSYITGALIGLDPSFTVDFDGKEMDAVTALSRLGLPKLQLQPKEG
 LAMMNGTSVMTGIAANCVDKAVLLALTMGVHALAIQGLYGTNQS FHPFIHQCKPHPG
 QLWTADQMFSLLKDSSLVREELDGKHEYRGKDLIQDRYSLRCLAQFIGPIVDGVSEIT
 KQIEVEMNSVTDNPLIDVENQVSYHGGNFLGQYVGVTMDRLRYIIGLLAKHIDVQIAL
 LVSPPEFSNGLPPSLVGNSDRKVMGLKGLQISGNSIMPLLSFYGNLADRFPTHAEQF
 NQNINSQGYISANLTRRSVDIFQNYMAIALMFGVQAVDLRTYKMKGHYDARTCLSPNT
 VQLYTAVCEVVGKPLTSVRPYIWNENEQCLDEHIARISADIAGGGLIVQAVEHIFSSL
 KST

FIGURA 2A

Secuencia génica de PAL de *Anabaena variabilis*

```

1   atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttctactgga
61  aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg
121 gtagcgcgta atggcaccct agtgtcttta accaalaaca ctgatatttt gcagggtatt
181 caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg
241 acatctgggt tggcggtat ggccaatgtt gccatalccc gtgaacaagc atctgaactc
301 caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc ctggcggtat
361 gtgcgcgcag ctatgcictt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcac tggtcatcaga
421 ttgaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgtat
481 gagtttggtt caattgggtc aagtgggtat ttatggccac taccctacat tactgggtca
541 ctgatagget tagatcccag tttaagggtt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcca
601 acagctctac gtcaactgaa ttgtcaccc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg
661 atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt atgcagcaa actgcgtcta cgatactcaa
721 attttaactg cgtatgctat gggcggtcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc
781 aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atccgtgtca attatgggca
841 gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttctgtatga gttataggtt
901 aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcactccg atgccttccc
961 cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaat tgaaatcgaa
1021 atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga
1081 ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg
1141 ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat
1201 ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaaggt
1261 ctgcaaatat gcggttaact aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc
1321 gatcgcttc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact
1381 tcagcgactc tagcccgcgc ttctgtggat atcttcaga attatgtggc gatcgctctg
1441 atgtttggag tccaagctgt tgaccicgcg acatataaaa agactgggtc ttacgatgca
1501 cgcgctgtgc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga
1561 caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag
1621 catattgccc ggatttctgc tgatategct gctgggtgtg tgattgtgca agcagttcaa
1681 gatattctac cctgcttgca ttaa

```

FIGURA 2B

Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis*

```

1      mktlsqaqsk tssqqfsftg nssanviign qkltindvar varngtlvs1 tnntdilggi
61     gascdyinna vesgepiygv tsqfggmanv aisreqasel qtnlvwflkt gagnklplad
121    vraamllran shmrgasgir lelikrmeif lnagvtpyvy efgsigasgd lvplsyitgs
181    ligldpsfkv dfngkemdap talrqlnlsp ltllpkegla mmngtsvmgt iaancvydtg
241    iltaiamgvh aldiqalngt nqsfhpfihn skphpgqlwa adqmisllan sqlvrdeidg
301    khdyrdheli qdryslrclp qylgpivdgi sqiakqieie insvtdnpli dvdnqasyhg
361    gnflgqyvqm gmdhlryyig llakhldvqi allaspefsn glppsllgnr erkvnmgikg
421    lqicgnsimp lltfygnsia drfpthaeqf nqninsqgyt satlarrsvd ifqnyvaial
481    mfgvqavdlr tykktghyda raclspater lysavrhvvg qkptsdrpyi wndneqglde
541    hiarisadia aggvivqavq dilpclh

```

FIGURA 3

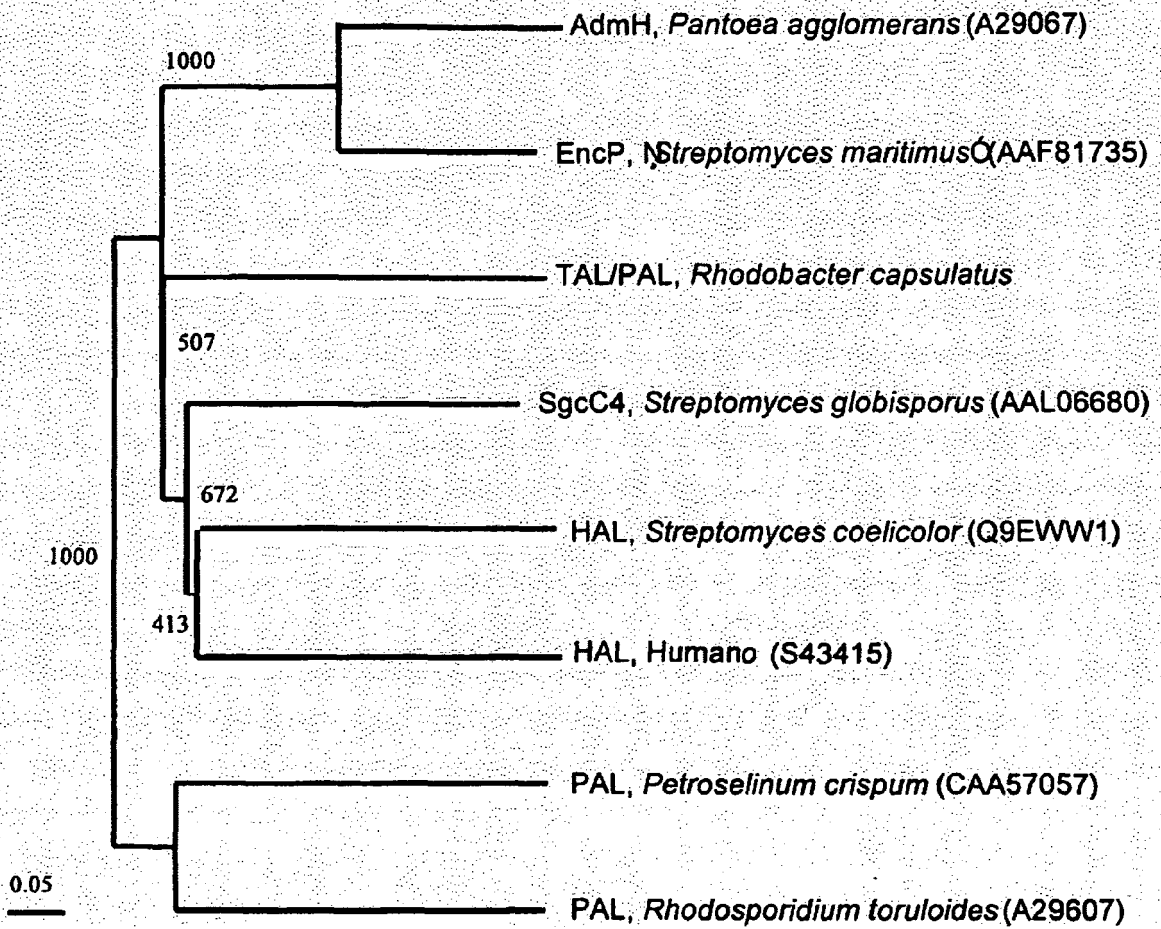


FIGURA 4

Alineación de secuencias de proteínas cianobacterianas de PAL N. punctiforme (SEQ ID NO:4) y A. variabilis (SEQ ID NO:2) con EncP PAL (SEQ ID NO:5) y P. putida HAL (SEQ ID NO:6). Los residuos del sitio activo que corresponden a la actividad de PAL o HAL están destacados.

Avar03005300	MKTLQAQSK TSSQQFSFTG NSSANVIIGN QKLTINDVAR VARNGTLVSL
Npun02008223	MNITSLOONI TRSWQIPFTN SSDSIVTVGD RNLTIDEVVN VARHGTQVRL
EncP	 MTFVIELD MNVTLDQLED AARQRTPVEL
PputidaHAL	 MTELTLPK GTLTLAQLRA IHAAPVRLQL
Avar03005300	TNNTDILQGI QASCDYINNA VESGEPIYGV TSGFGGMANV AISREQASEL
Npun02008223	TDNADVIRGV QASCDYINNA VETAQPIYGV TSGFGGMADV VISREQAAEL
EncP	S..APVRSRV RASRDVLVKF VQDERVIYGV NTSMGGFVDH LVPVSQARQL
PputidaHAL	D..ASAAPAI DASVACVEQI IAEDRTAYGI NTGFGLLAST RIASHDLENL
Avar03005300	QTNLVWFLKT GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHMRGASGIR LELIKRMEIF
Npun02008223	QTNLIWFLKS GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHLYGASGIR LELIQRIETP
EncP	QENLINAVAT NVGAYLDDTT ARTIMLSRIV SLARGNSAIT PANLDKLVAV
PputidaHAL	QRSLVLSHAA GIGAPLDDDL VRLIMVLKIN SLRSGFSGIR RKVIDALIAL
Avar03005300	LNAGVTPYVY EFGSIGASGD LVPLSYITGS LIGLDPSFKV DFNGKEMDAP
Npun02008223	LNAGVTPHYV EFGSIGASGD LVPLSYITGA LIGLDPSFTV DFDGKEMDAV
EncP	LNAGIVPCIP EKGS LGTSGD LGPLAAIALV CAGQW...KA RYNGQIMPGR
PputidaHAL	VNAEVYPHIP LKGSV GASGD LAPLATMSLV LLGEG...KA RYKGQWLSAT
Avar03005300	TALRQLNLSP LTLLPKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDTQ ILTAIAMGVH
Npun02008223	TALSRLGLPK LQLQPKKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDAK VLLALTMGVH
EncP	QALSEAGVEP MELS YKDG LA LINGTSGMVG LGTMVLQAAR RLVD RYLQVS
PputidaHAL	EALAVAGLEP LTLAAKEGLA LLNGTQASTA YALRGLFYAE DLYAAAIACG
Avar03005300	ALDIQALNGT NQSFHPFIHN SKPHPGQLWA ADQMISLLAN SQLVRDELDG
Npun02008223	ALAIQGLYGT NQSFHPFIHQ CKPHPGQLWT ADQMFSLLKD SSLVREELDG
EncP	ALSVEGLAGM TKPFDPRVHG VKPHRGQRQV ASRLWEGLAD SHLAVNELDT
PputidaHAL	GLSVEAVLGS RSPFDARIHE ARGQRGQIDT AACFRDLLGD SSEVS.....

FIGURA 4 (CONTINUACIÓN)

Avar03005300	K HDYRDHELIQ DRYSLRCLPQ YLGPIVDGIS QIAKQIEIEI
Npun02008223	K HEYRGKDLIQ DRYSLRCLAQ FIGPIVDGVS EITKQIEVEM
EncP	EQTLAGEMGT VAKAGSLAIE DAYSIRCTPQ ILGPVVDVLD RIGATLQDEL
PputidaHAL	 LSHKNCDKVQ DPYSLRCQPQ VMGACLTQLR QAAEVLGIEA
Avar03005300	NSVTDNPLID VDNQASYHGG NFLGQYVGMG MDHLRYIIGL LAKHLDVQIA
Npun02008223	NSVTDNPLID VENQVSYHGG NFLGQYVGVT MDRLRYIIGL LAKHIDVQIA
EncP	NSSNDNPIVL PEEAEVFHNG HFHGQYVAMA MDHLNMALAT VTNLNRRVD
PputidaHAL	NAVSDNPLVF AAEGDVISGG NFHAEPVAMA ADNLALATAE IGSLSERRIS
Avar03005300	LLASPEFSNG LPPSLLGNG RKVNMGLKGL QICGNSIMPL LTFYGNISAD
Npun02008223	LLVSPEFSNG LPPSLVGNSD RKVNMGLKGL QISGNSIMPL LSFYGNISAD
EncP	RFLDKSNSNG LPAFLCREDP .GLRLGLMGG QFMTASITAE TRTLTIPMSV
PputidaHAL	LMMDKHMS.Q LPPFLVENG. .GVNSGFMIA QVTAAALASE NKALSHPHSV
Avar03005300	RFPTHAEQFN QNINSQGYTS ATLARRSVDI FQNYVAIALM FGVQAVDLRT
Npun02008223	RFPTHAEQFN QNINSQGYIS ANLTRRSVDI FQNYMAIALM FGVQAVDLRT
EncP	QSLTSTADF. QDIVSFGFVA ARRAREVLTN AAYVVAPELL CACQAVDIRG
PputidaHAL	DSLPTSANQ. EDHVSMAPIA GKRLWEMAEN TRGVPAIEWL GACQGLDLRK
Avar03005300	YKKTGHYDAR ACLSPATERL YSAVRHVVGQ KPTSDRPYIW NDNEQGLDEH
Npun02008223	YKMKGHYDAR TCLSPNTVQL YTAVCEVVGK PLTSVRPYIW NDNEQCLDEH
EncP	ADKL..... ..SSPTRPL YERTRKIVP.F FDRDETITDY
PputidaHAL	GLKT..... ..SAKLEKA RQALRSEVA.H YDRDRFPAPD
Avar03005300	IARISADIAA GGVIVQAVQD ILPCLH..
Npun02008223	IARISADIAG GGLIVQAVEH IFSSLKST
EncP	VEKLAADLIA GEPVDAAVAA H.....
PputidaHAL	IEKAVELLAK GSLTGLLPAG VLPSL...

FIGURA 5A

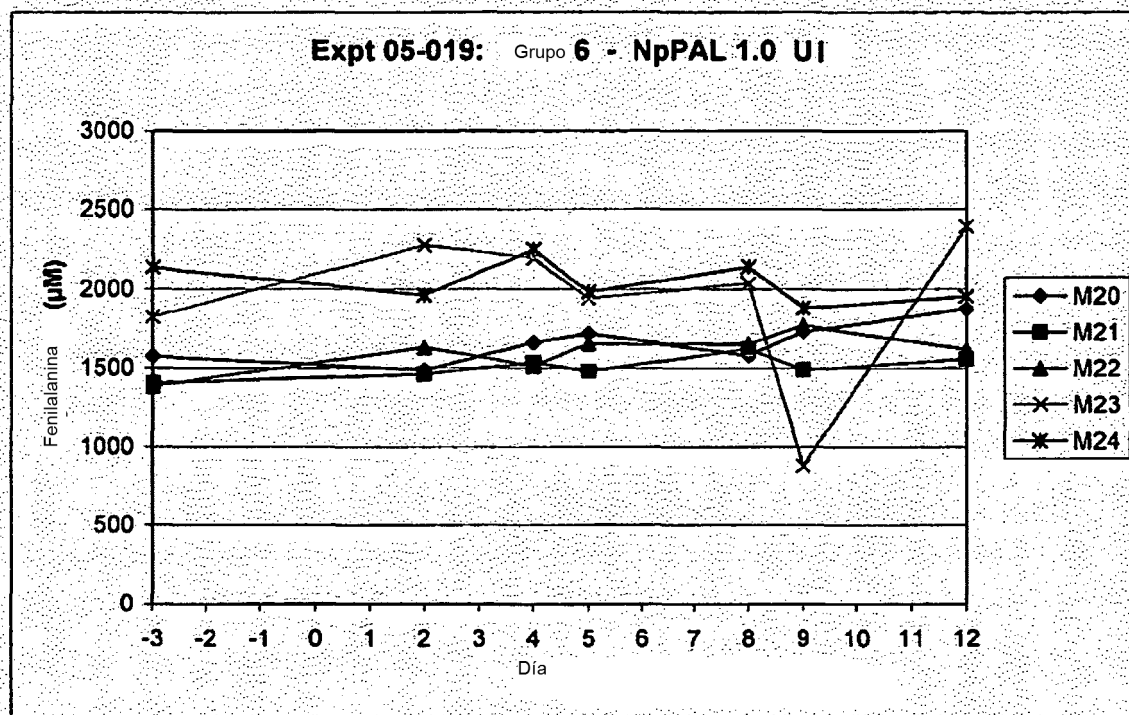


FIGURA 5B

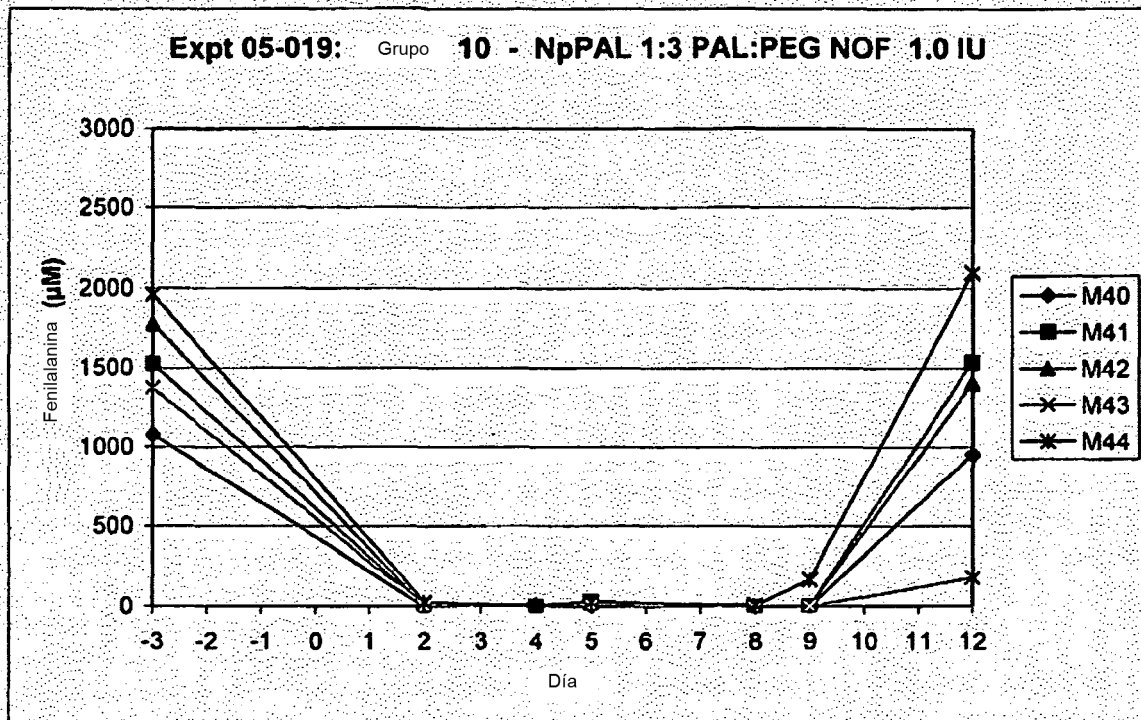


FIGURA 6A

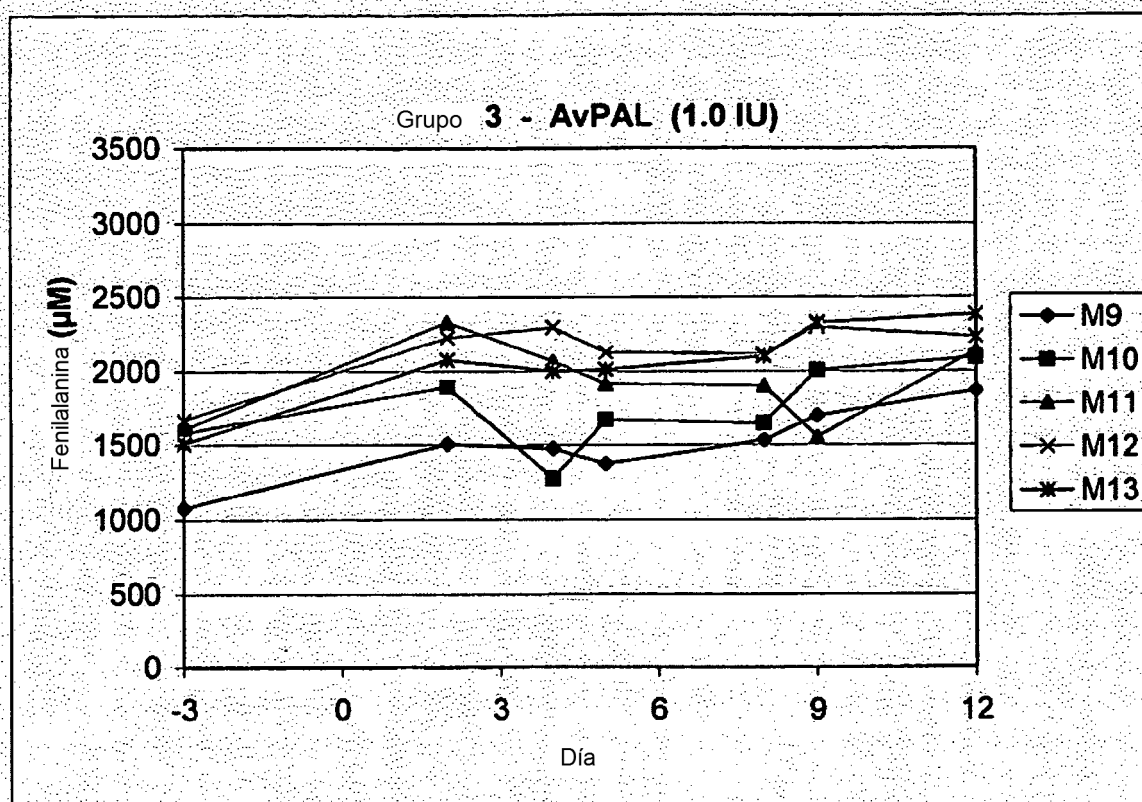


FIGURA 6B

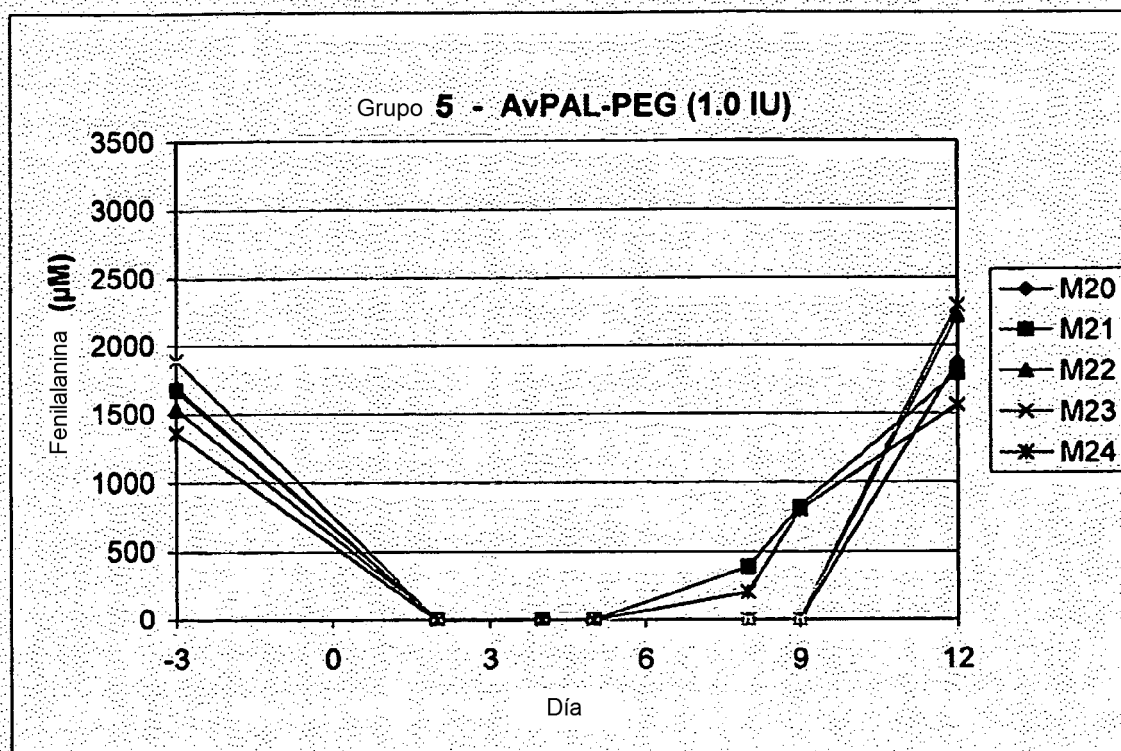


FIGURA 7

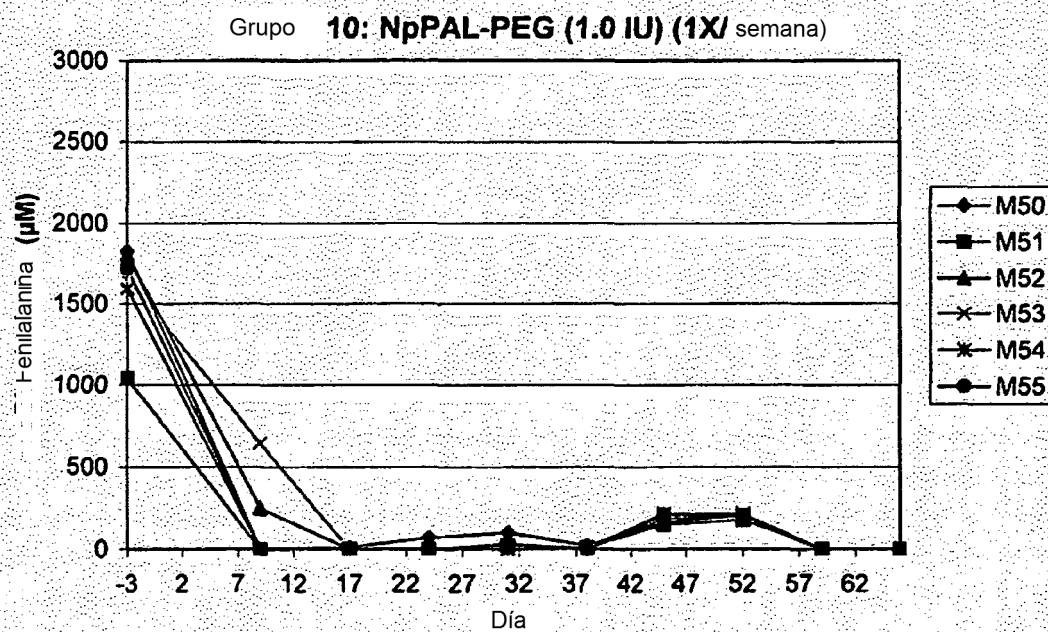


FIGURA 8A-8E

Secuencia de proteínas de variantes de AvPAL (mutantes de cisteína)

A. AvPAL_C64S (SEQ ID NO:7)

MKTL**SQAQ**SKTSSQ**QFS**FTGNSSANV**IIGNQ**KL**TIND**VARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS**SDY**INNA
VESGEPIYGVTS**SGFG**GMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIK**RMEI**FLNAGVTPYVYEF**SG**ISASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGV**HALDIQALNGTNQSFH**PF**IHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ**LVR**DEL**DGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGN**FLGQY**VGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPTHAEQFNQ**IN**INSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLS**PATER**LYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQ**GLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

B. AvPAL_C318S (SEQ ID NO:8)

MKTL**SQAQ**SKTSSQ**QFS**FTGNSSANV**IIGNQ**KL**TIND**VARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS**CDY**INNA
VESGEPIYGVTS**SGFG**GMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIK**RMEI**FLNAGVTPYVYEF**SG**ISASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGV**HALDIQALNGTNQSFH**PF**IHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ**LVR**DEL**DGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGN**FLGQY**VGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPTHAEQFNQ**IN**INSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLS**PATER**LYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQ**GLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

C. AvPAL_C503S (SEQ ID NO:9)

MKTL**SQAQ**SKTSSQ**QFS**FTGNSSANV**IIGNQ**KL**TIND**VARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS**CDY**INNA
VESGEPIYGVTS**SGFG**GMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIK**RMEI**FLNAGVTPYVYEF**SG**ISASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGV**HALDIQALNGTNQSFH**PF**IHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ**LVR**DEL**DGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGN**FLGQY**VGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPTHAEQFNQ**IN**INSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARAS**LS**PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQ**GLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

D. AvPAL_C565S (SEQ ID NO:10)

MKTL**SQAQ**SKTSSQ**QFS**FTGNSSANV**IIGNQ**KL**TIND**VARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS**CDY**INNA
VESGEPIYGVTS**SGFG**GMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIK**RMEI**FLNAGVTPYVYEF**SG**ISASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGV**HALDIQALNGTNQSFH**PF**IHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ**LVR**DEL**DGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGN**FLGQY**VGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPTHAEQFNQ**IN**INSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLS**PATER**LYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQ**GLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

E. AvPAL_C565SC503S (SEQ ID NO:11)

MKTL**SQAQ**SKTSSQ**QFS**FTGNSSANV**IIGNQ**KL**TIND**VARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS**CDY**INNA
VESGEPIYGVTS**SGFG**GMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIK**RMEI**FLNAGVTPYVYEF**SG**ISASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGV**HALDIQALNGTNQSFH**PF**IHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ**LVR**DEL**DGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGN**FLGQY**VGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPTHAEQFNQ**IN**INSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARAS**LS**PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQ**GLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

FIGURA 9A

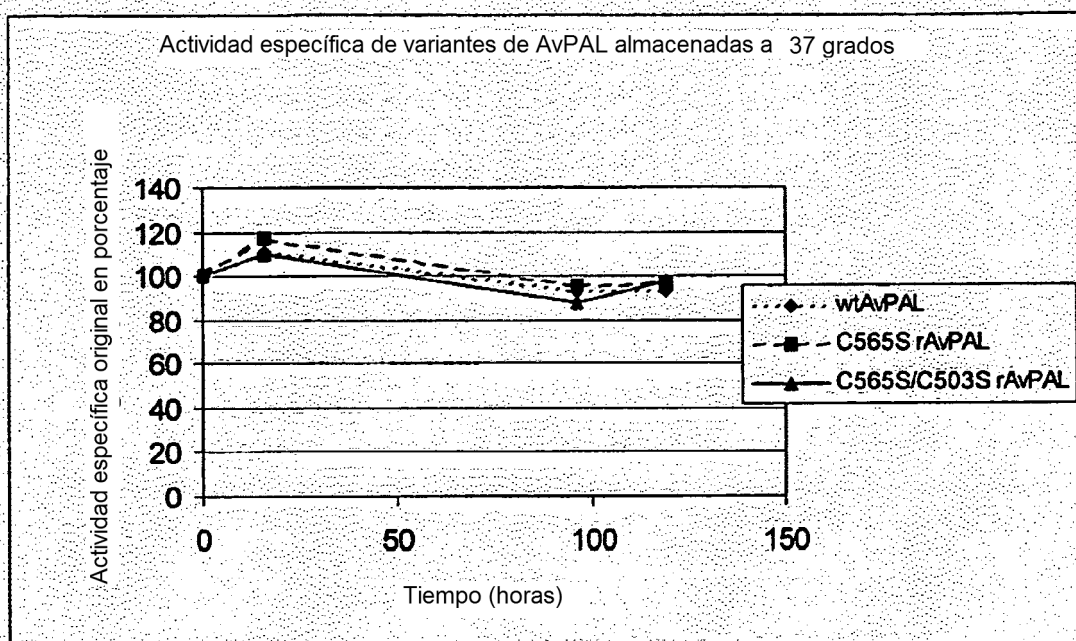


FIGURA 9B

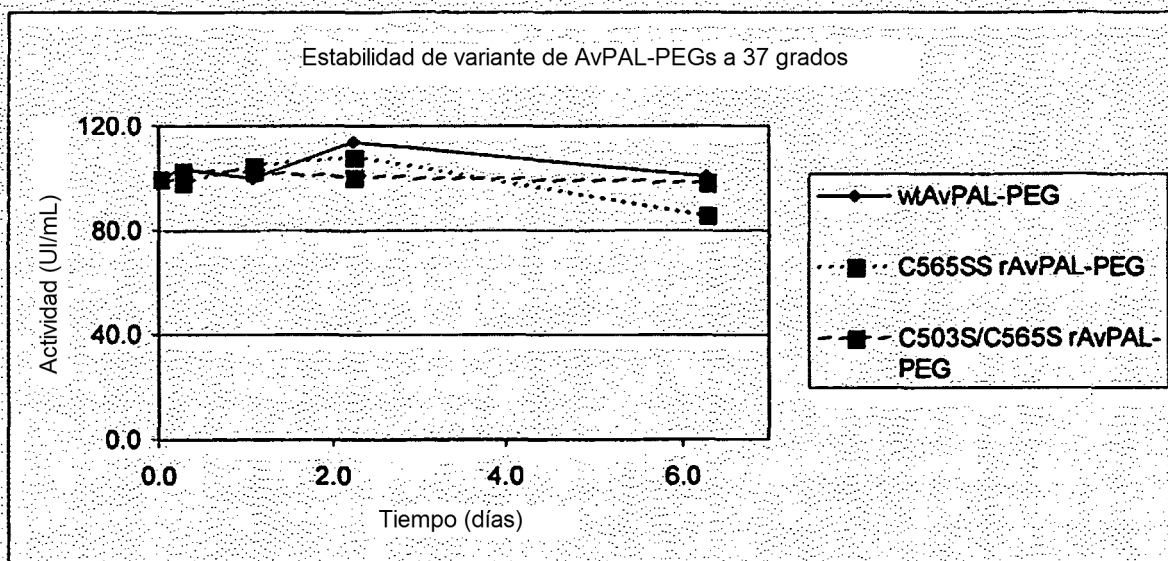


FIGURA 10A

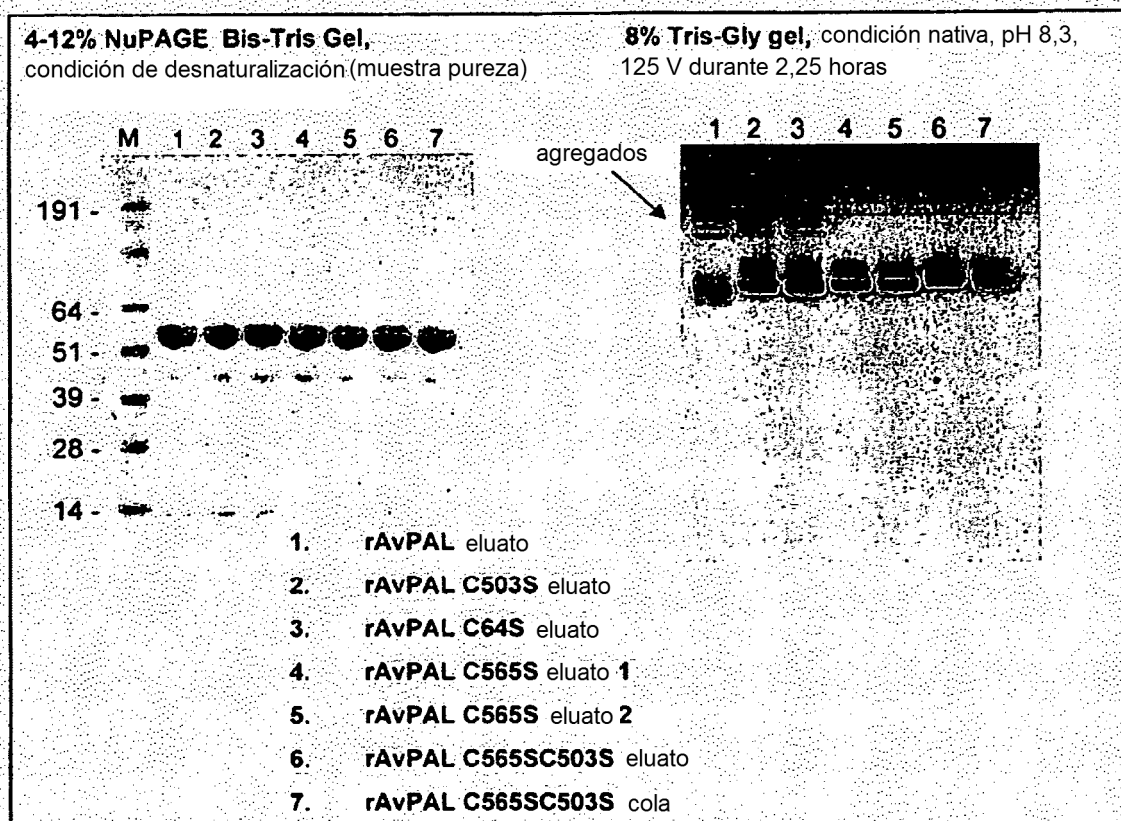


FIGURA 10B

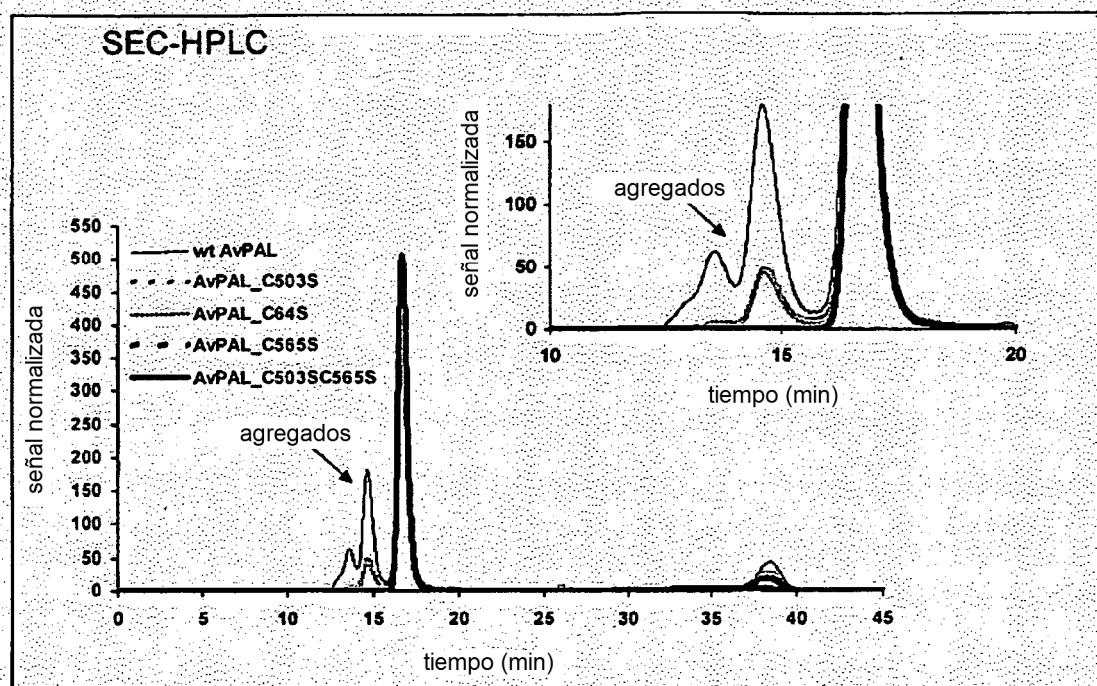


FIGURA 11

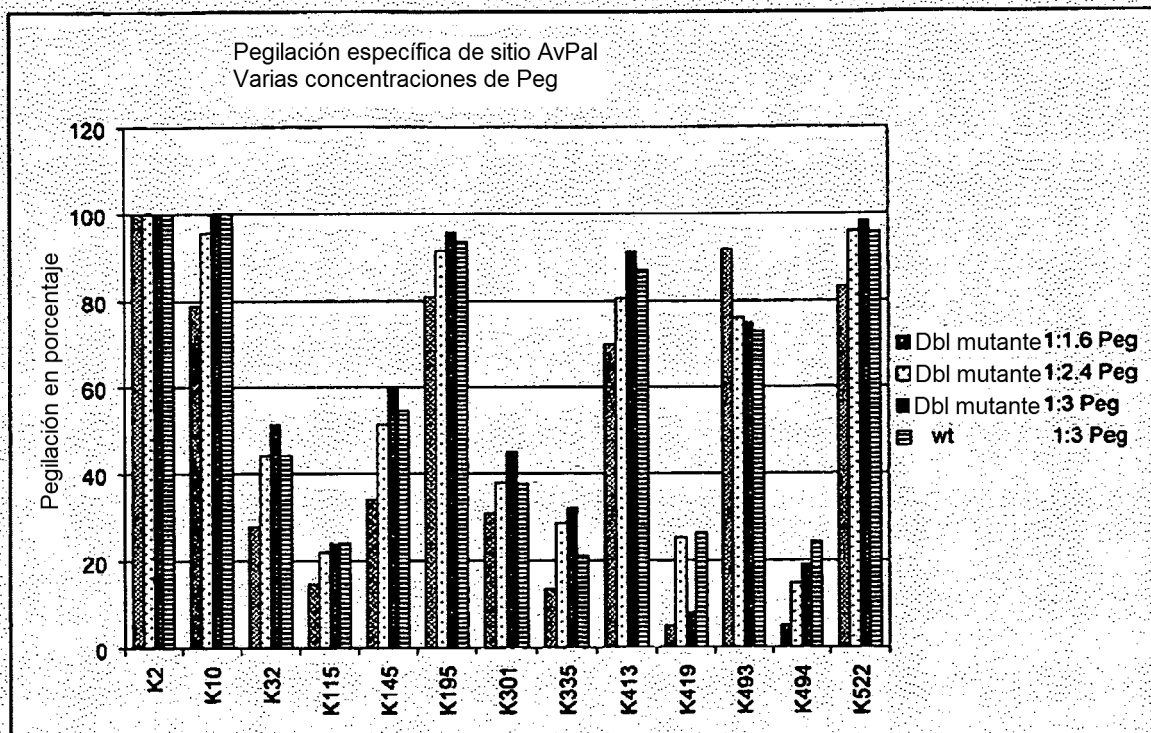


FIGURA 12

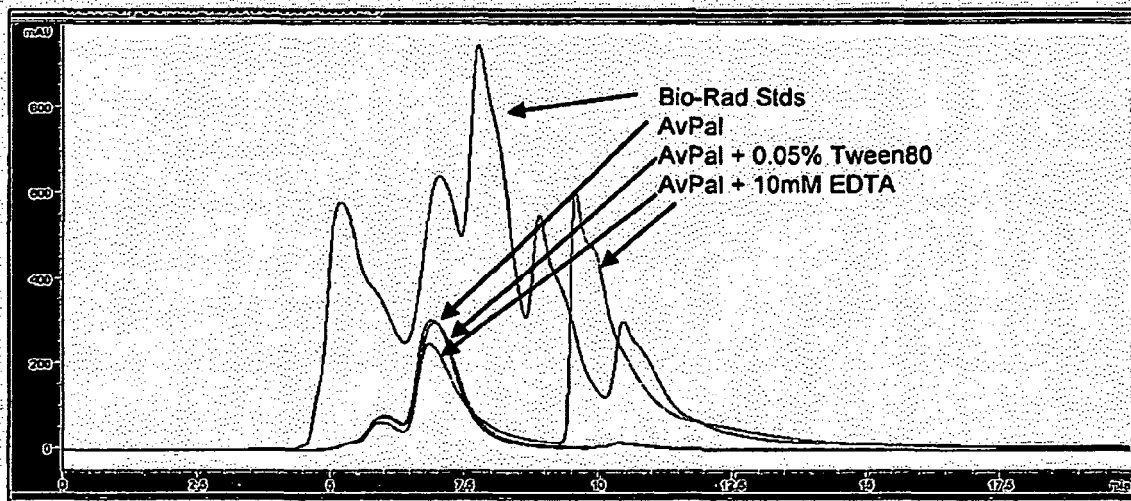


FIGURA 13A

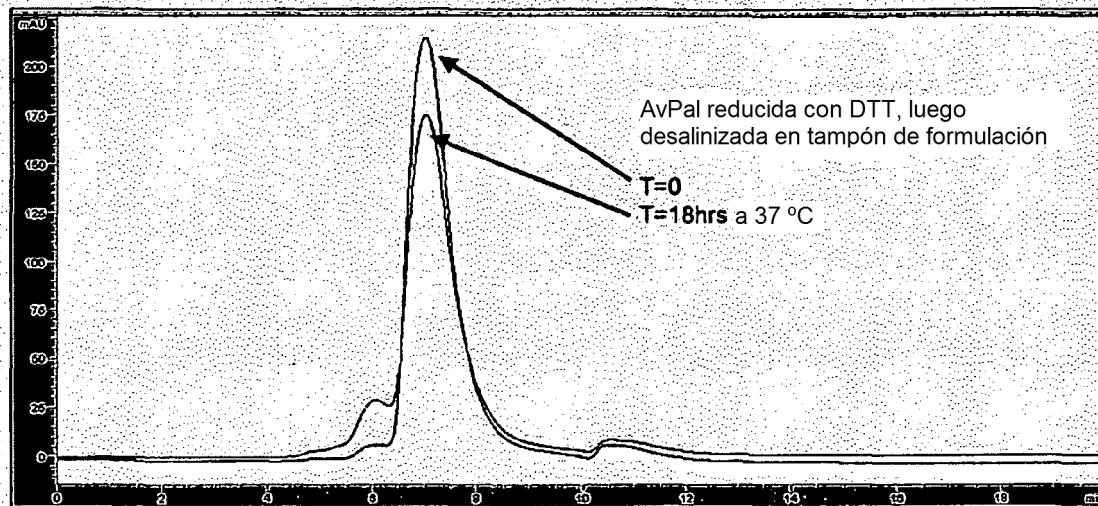


FIGURA 13B

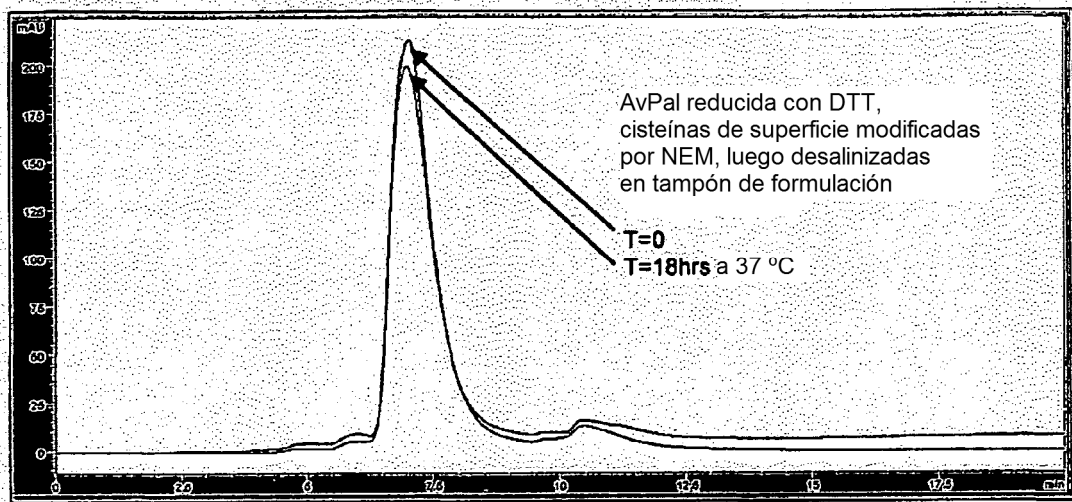


FIGURA 14

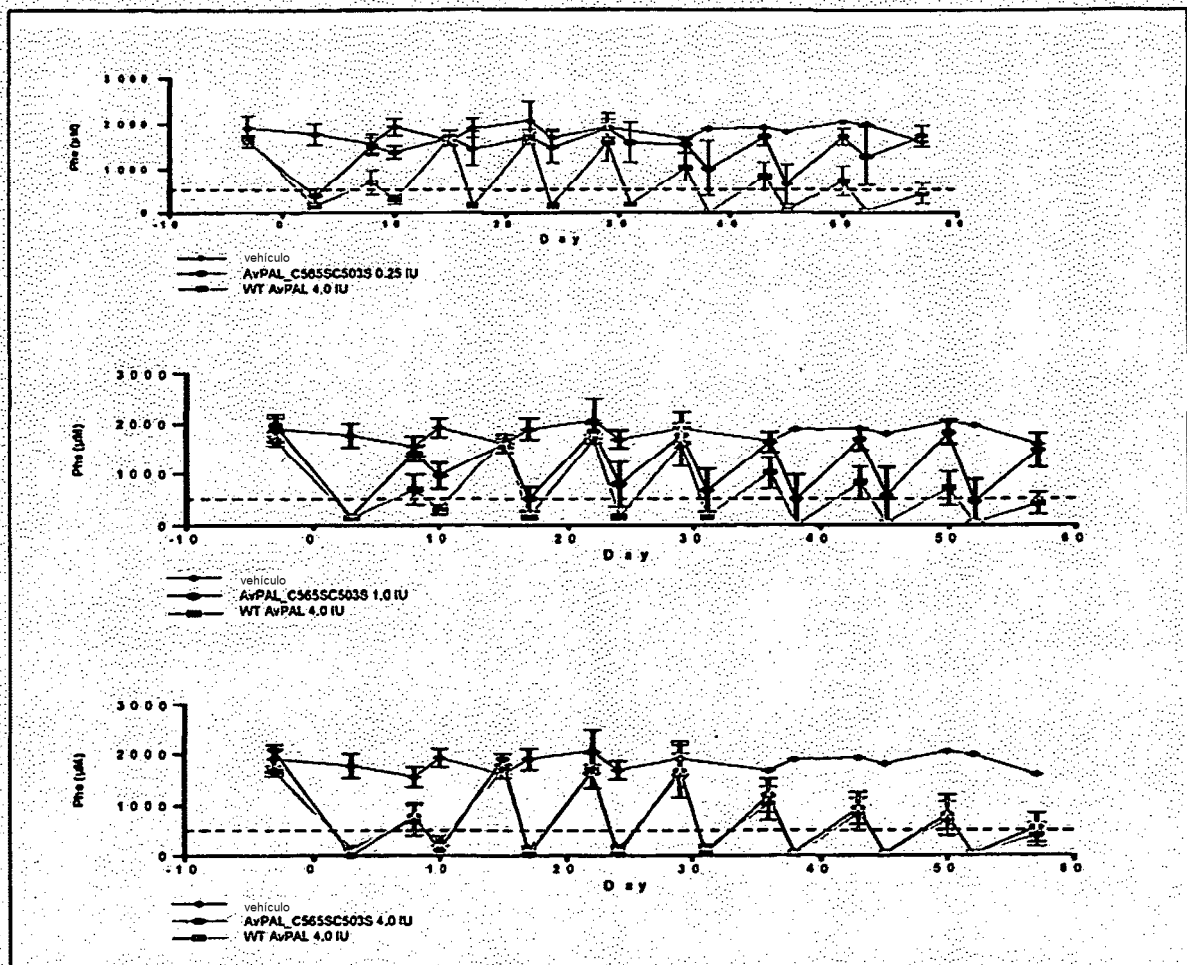


FIGURA 15

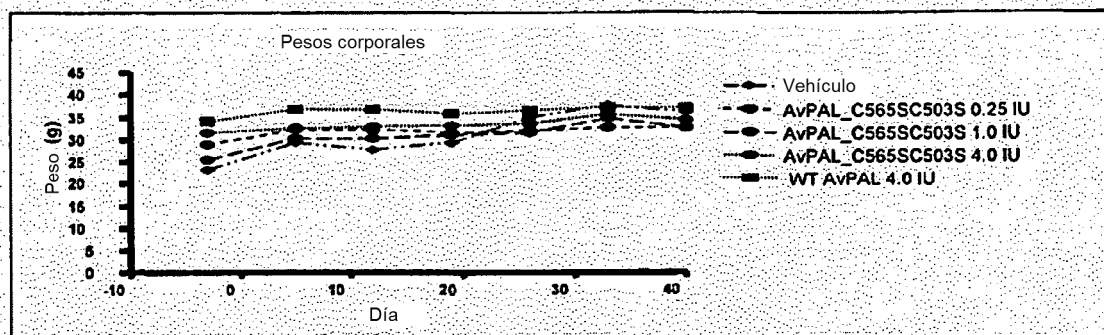


FIGURA 16

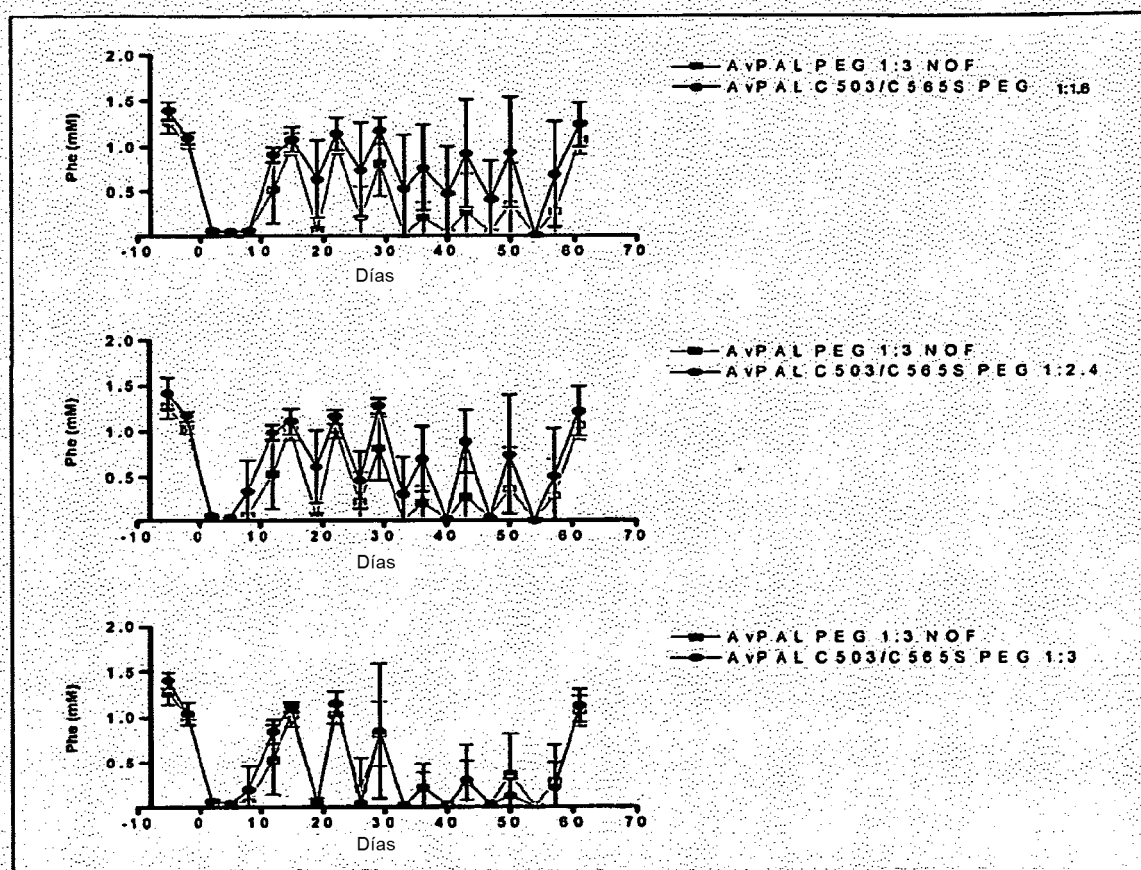


FIGURA 17

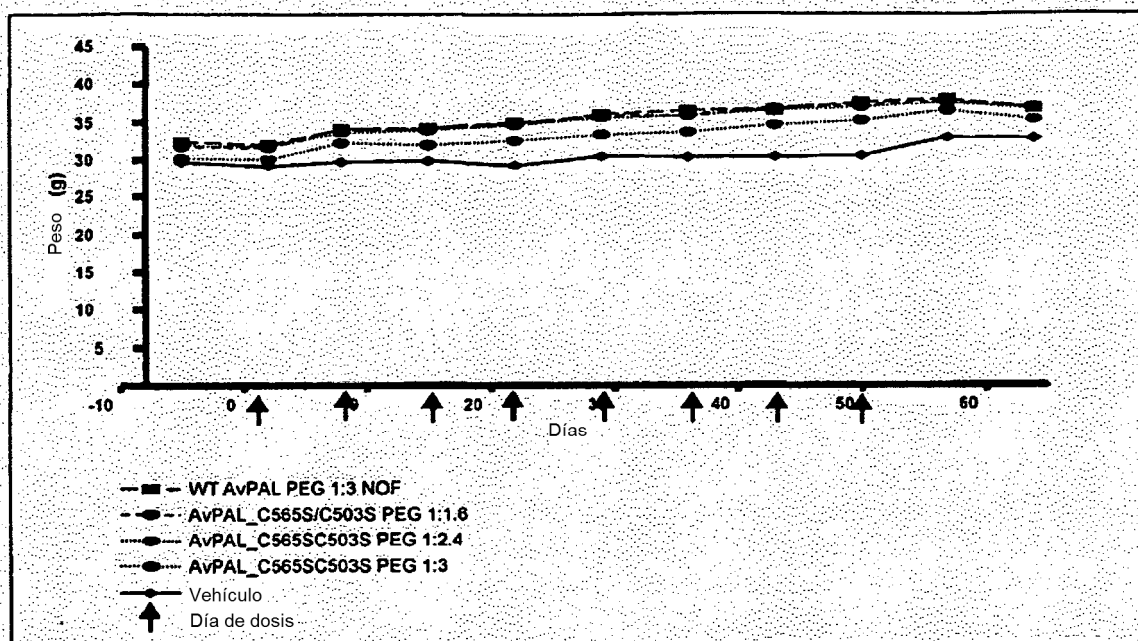
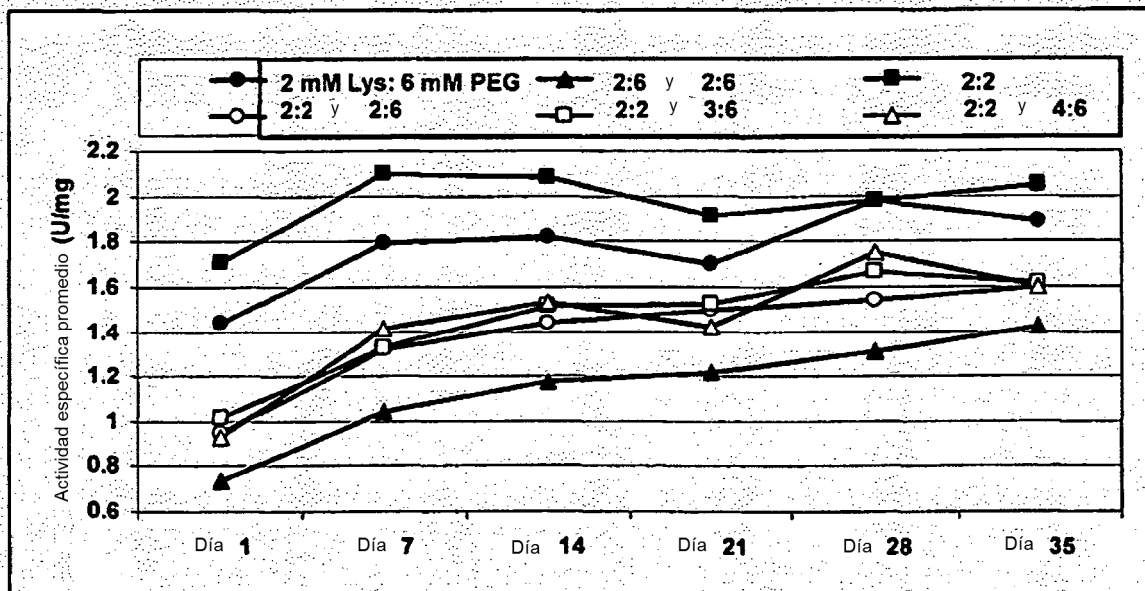
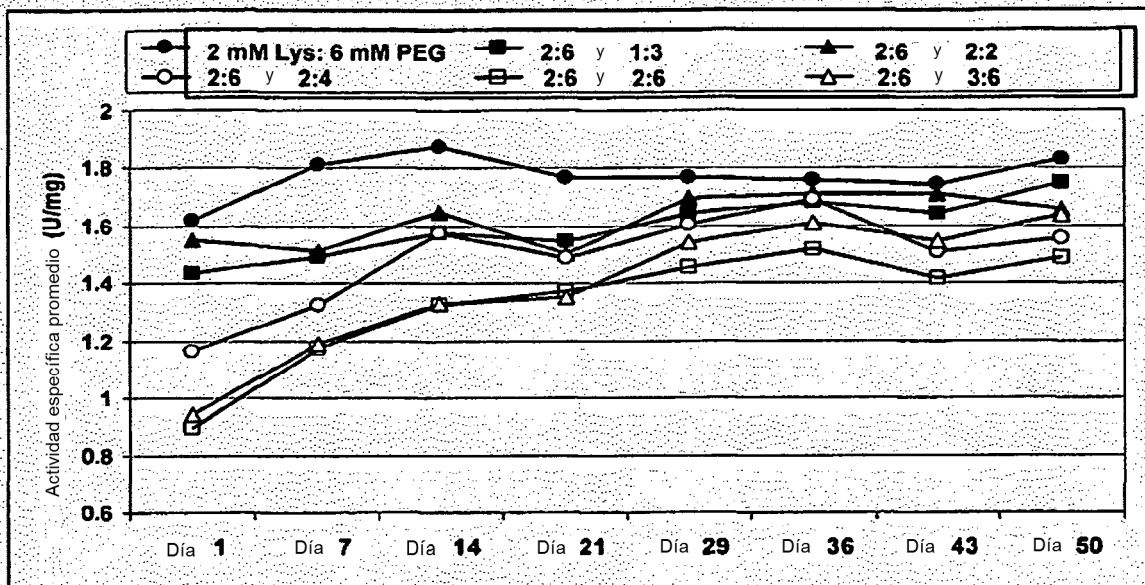


FIGURA 18



FIGURAS 19A y 19B

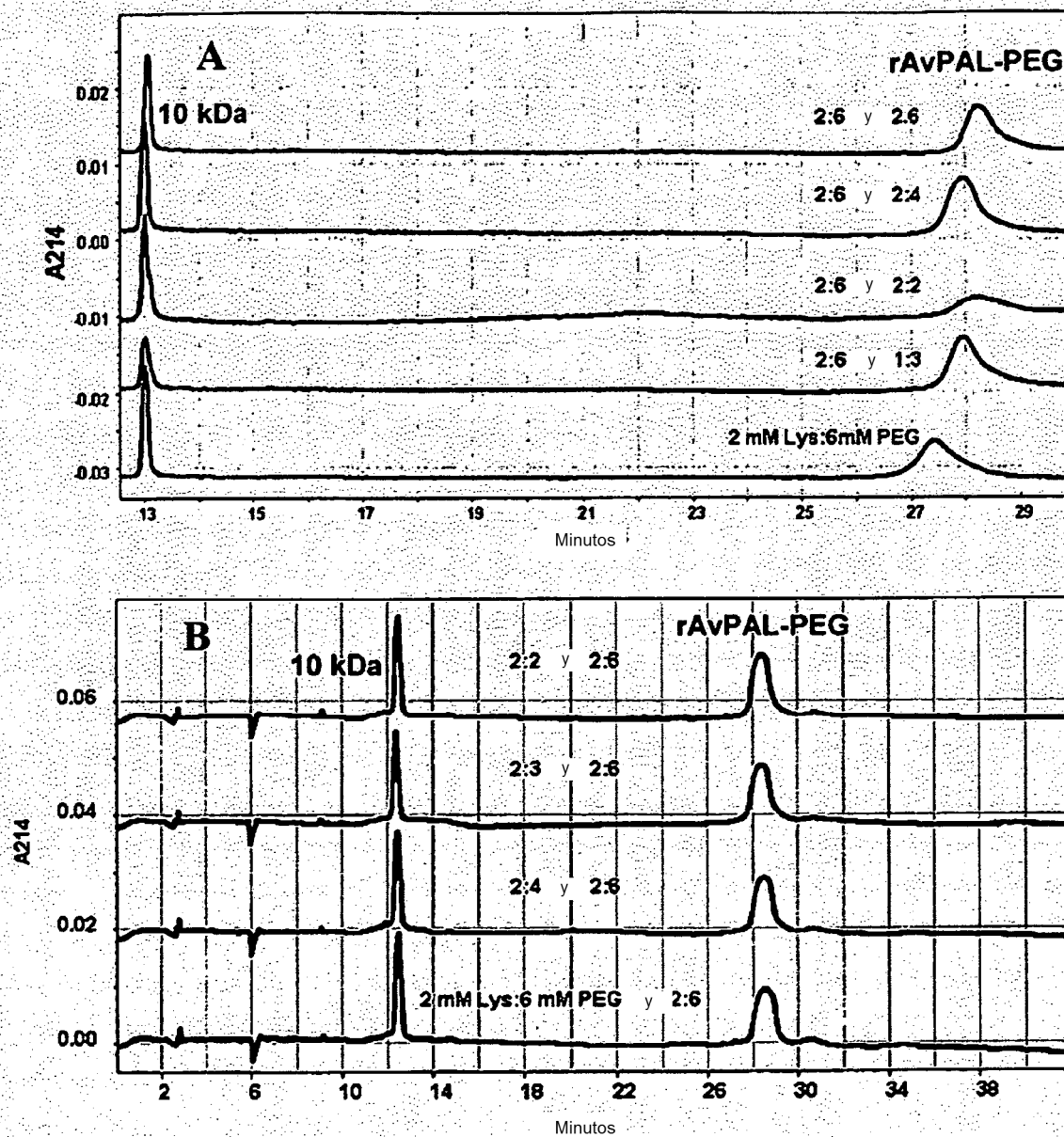


FIGURA 20

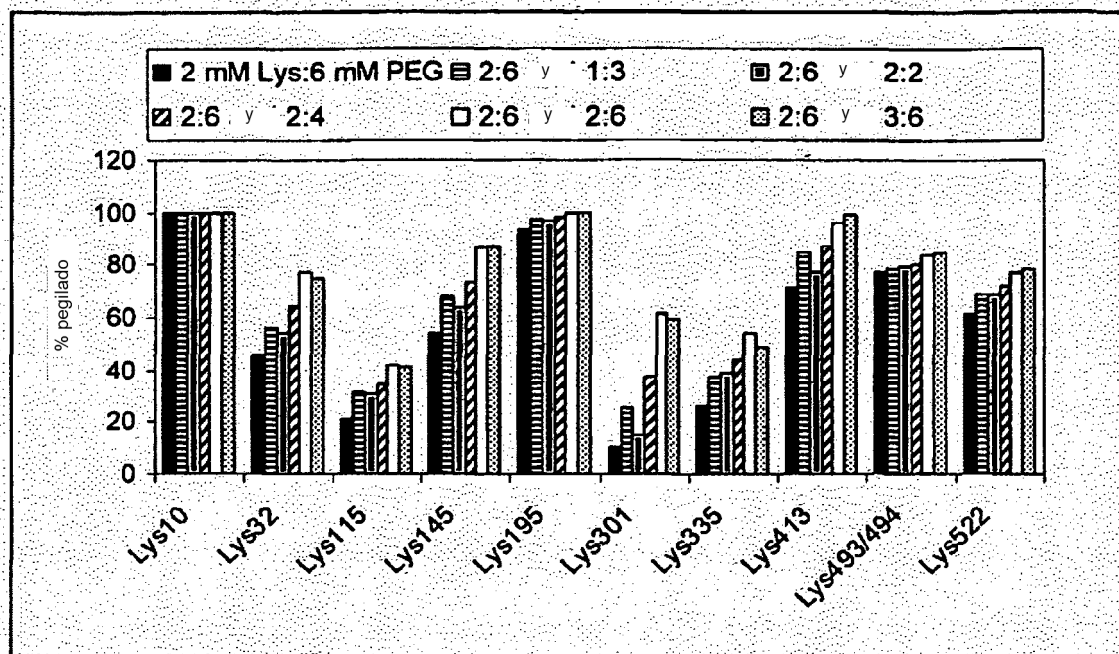


FIGURA 21

