

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 618**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2008 PCT/US2008/009765**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2009 WO09025760**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2008 E 08795357 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2175875**

54 Título: **Composiciones de fenilalanina amoniaco-liasa procariótica y métodos de tratamiento del cáncer que usan composiciones de la misma**

30 Prioridad:

17.08.2007 US 66125 P

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

21.02.2017

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.;
WENDT, DANIEL, J.;
MUTHALIF, MUBARACK;
BELL, SEAN, M. y
OKHAMAFE, AUGUSTUS, O.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 618 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 amoniaco-liasa procariótica y métodos de tratamiento del cáncer que usan composiciones de la misma

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a la fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) procariótica y a composiciones de la misma, y a la optimización de dichas composiciones para mejorar la actividad catalítica y/o la estabilidad de la PAL procariótica, mientras se reduce la inmunogenicidad y/o la sensibilidad proteolítica de la PAL procariótica. La invención se refiere además al uso de dichas composiciones óptimas de PAL procariótica para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

- 10 PAL es una enzima no de mamífero 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 pueden producirse de modo recombinante en *Escherichia coli*.

- Una lista representativa de PAL incluye: Q9ATN7 *Agastache rugosa*; O93967 *Amanita muscaria* (agárico de mosca); P35510, P45724, P45725, Q9SS45, Q8RWP4 *Arabidopsis thaliana* (berro oreja de ratón); Q6ST23 *Bambusa oldhamii* (bambú de madera gigante); Q42609 *Bromheadia finlaysoniana* (orquídea); P45726 *Camellia sinensis* (té); Q9MAX1 *Catharanthus roseus* (vinca rósea) (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); O23924 *Digitalis lanata* (dedalera); O23865 *Daucus carota* (zanahoria); P27991 *Glicina max* (soja); O04058 *Helianthus annuus* (girasol común); P14166, Q42858 *Ipomoea batatas* (batata); Q8GZR8, Q8W2E4 *Lactuca sativa* (lechuga); O49835, O49836 *Lithospermum erythrorhizon*; P35511, P26600 *Lycopersicon esculentum* (tomate); P35512 *Malus domestica* (manzana) (*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* (aguacate); Q9AX15 *Pharbitis nil* (violeta) (campanilla japonesa); P52777 *Pinus taeda* (pino taeda); Q01861, Q04593 *Pisum sativum* (guisante de jardín); P24481, P45728, P45729 *Petroselinum crispum* (perejil) (*Petroselinum hortense*); Q84L12 *Phalaenopsis* x *Doritaenopsis* cultivar híbrido; P07218, P19142, P19143 *Phaseolus vulgaris* (habichuela) (alubia); Q7XJC3, Q7XJC4 *Pinus pinaster* (pino marítimo); Q6UD65 *Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* x *Populus deltoides*; P45731, Q43052, O24266 *Populus kitakamiensis* (álamo); Q8H6V5, Q8H6V6 *Populus tremuloides* (álamo temblón); P45730 *Populus trichocarpa* (álamo americano); O64963 *Prunus avium* (cerezo); Q94EN0 *Rehmannia glutinosa*; PI 1544 *Rhodospodium toruloides* (levadura) (*Rhodotorula gracilis*); P10248 *Rhodotorula rubra* (levadura) (*Rhodotorula mucilaginosus*); Q9M568, Q9M567 *Rubus idaeus* (frambuesa); P31425, P31426 *Solanum tuberosum* (patata); 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).

- Numerosos estudios se han centrado en el uso de la enzima fenilalanina amoniaco-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, et al., 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, 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 de EE.UU. n.º 5.753.487).

- El uso de la PAL para tratamiento del cáncer se ha sugerido 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):4646-4650 (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)). Además, la reducción mediada por PAL en la fenilalanina evitó la proliferación de leucemia murina y melanoma metastásico. Sin embargo, la PAL inyectada por vía intravenosa se aclaró rápidamente de la sangre circulante después de la 13ª inyección (Abell, et al., Cancer Res. 33:2529-2532 (1973);

Roberts, et al., (1976), *ibid.*; Shen, et al., (1977), *ibid.*; (Shen, et al., J. Reticuloendothelial Soc. 23:167-175 (1978)).

Algunas células neoplásicas o cancerosas tienen una mayor tasa metabólica y una mayor necesidad que las células normales de aminoácidos esenciales como fenilalanina. En la bibliografía existen evidencias que sugieren que la restricción o reducción de aminoácidos específicos, por ejemplo, fenilalanina, a través del uso de enzimas de degradación de aminoácidos, por ejemplo, PAL, puede reducir el crecimiento de ciertas células tumorales en pacientes humanos de cáncer y en modelos animales. Por ejemplo, algunas células leucémicas carecen de la enzima asparagina sintetasa, que sintetiza el aminoácido no esencial asparagina a partir de glutamina, y así dependen de la asparagina para su supervivencia. Oncaspar (pegaspargasa, Enzon Pharmaceuticals, Inc.), una L-asparaginasa pegilada, se ha usado con éxito para tratar la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Graham, Adv. Drug Del. Rev. 55:1293-1302 (2003)). Otros ejemplos de aminoácidos como dianas potenciales del agotamiento enzimático en la terapia contra el cáncer incluyen la glutamina (glutamina desaminasa, Medical Enzymes AG), la arginina (arginina desaminasa, Phoenix Pharmacologies, Inc.) y la metionina (metioninasa, Anticancer, Inc.) (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.312.939, 6.737.259 y 5.690.929).

Se ha demostrado que la restricción de fenilalanina en la dieta inhibe el crecimiento y la metástasis de melanoma metastásico altamente invasivo y las células de cáncer de próstata independientes de andrógenos en modelos animales, promueve la apoptosis de las células tumorales, pero no las normales, en cultivo, aumenta la supervivencia de los ratones portadores de tumores, sensibiliza las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos y aumenta la citotoxicidad por las toxinas (Fu, et al., Nutr. Cancer 31:1-7 (1998); Fu, et al., Cancer Res. 59:758-765 (1999); Fu, et al., Nutr. Cancer 45:60-73 (2003); Fu, et al., J. Cell. Physiol. 209:522-534 (2006); Meadows, et al., Cancer Res. 42:3056-3063 (1982); Elstad, et al., Anticancer Res. 13:523-528 (1993); Elstad, et al., Nutr. Cancer 25:47-60 (1996); Nunez, et al., Cancer Lett. 236:133-141 (2006)).

El agotamiento enzimático de la fenilalanina con el uso de PAL a partir de la levadura *Rhodospodium toruloides* (también conocida como *Rhodotorula glutinis*) (RtPAL) inhibió el crecimiento de linfocitos leucémicos en cultivo *in vitro* (Abell, et al., Cancer Res. 32:285-290 (1972); Stith, et al., Cancer Res. 33:966-971 (1973)) y en ratones *in vivo* (Abell, et al., Cancer Res. 33:2529-2532 (1973)). Sin embargo, después de inyecciones repetidas en ratones, el aclaramiento de RtPAL a partir de plasma se aceleró enormemente, y la tasa de aclaramiento fue más rápida en ratones portadores de tumores que en los no portadores de tumores (Fritz, et al., J. Biol. Chem. 251:4646-4650 (1976); Shen, et al., Cancer Res. 37:1051-1056 (1977)). La semivida de RtPAL se redujo a aproximadamente 1 hora después de una administración múltiple debido a un aumento en el título de anticuerpos, lo que revela que puede ser necesaria una radiación corporal total para retrasar el aclaramiento y mejorar la semivida (Shen, et al., J. Reticuloendothelial Soc. 23:167-175 (1978)).

La RtPAL se ha pegilado en un intento por reducir la inmunogenicidad y tasa de aclaramiento *in vivo* de la enzima (Wieder, et al., J. Biol. Chem. 254:12579-12587 (1979)). Después de una única inyección intravenosa o después de múltiples inyecciones intravenosas en ratones, la semivida en sangre de la RtPAL pegilada fue más larga que en la RtPAL no pegilada; sin embargo, la RtPAL pegilada se aclaró aún rápidamente de la sangre después de la decimotercera inyección intravenosa.

Aunque la PAL tiene potencialmente diversas aplicaciones terapéuticas, el uso de la PAL puede estar limitado por una actividad específica reducida e inestabilidad proteolítica. De forma similar a otras proteínas terapéuticas, el uso de la PAL como una enzimoterapia se acompaña de varios inconvenientes como la inmunogenicidad y la sensibilidad proteolítica (véase Vellard, Curr. Opin. Biotechnol. 14:1-7 (2003)). Hasta hoy no se ha realizado un esfuerzo concertado para mejorar estos parámetros debido a la escasez del conocimiento estructural y bioquímico en relación con esta proteína.

Así, existe aún la necesidad de moléculas PAL con características cinéticas óptimas, lo que incluye potente actividad catalítica, mayor semivida biológica, mayor estabilidad bioquímica y/o inmunogenicidad atenuada, para uso terapéutico, incluido el tratamiento de cáncer. Los documentos WO-03/018.759, WO-2006/034.373 y WO-2006/099.207 describen varias composiciones farmacéuticas que comprenden enzimas PAL.

Compendio de la invención

La invención se basa en el hallazgo de que la PAL procariótica o bacteriana puede servir como un tratamiento eficaz contra el cáncer. La invención contempla composiciones de PAL procariótica y fragmentos, mutantes, variantes o análogos biológicamente activos de la misma, con propiedades mejoradas, como una actividad catalítica más potente, una mayor estabilidad bioquímica y, para aplicaciones terapéuticas, inmunogenicidad atenuada y/o mayor semivida biológica. La invención proporciona composiciones farmacéuticas y formulaciones que comprenden una variante de fenilalanina amoníaco-liasa (AvPAL) de *Anabaena variabilis* y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde:

(i) la variante AvPAL tiene una secuencia de SEQ ID NO: 10, en donde la posición 565 de la variante AvPAL tiene un residuo de serina; o

(ii) la variante AvPAL tiene una secuencia de SEQ ID NO: 11, en donde las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL tienen un residuo de serina, y

en donde el soporte farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador seleccionado entre el grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico.

En una realización, la AvPAL tiene una secuencia de SEQ ID NO: 10. En otra realización, la AvPAL tiene una secuencia de SEQ ID NO: 11. En todas las realizaciones, el estabilizador puede ser L-fenilalanina, ácido trans-cinámico o ácido benzoico. En todas las realizaciones, la variante AvPAL puede comprender además un polímero soluble en agua. En realizaciones específicas, dicho polímero soluble en agua es un polietilenglicol. En algunas realizaciones, la relación entre dicha variante AvPAL y dicho polietilenglicol puede ser de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3).

La presente invención también proporciona dicha composición para fines terapéuticos, lo que incluye una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica y cáncer. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de pulmón, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer renal, melanoma metastásico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, mieloma y un cáncer pediátrico. En una realización, la proliferación y/o la supervivencia de células obtenidas de dicho cáncer son sensibles a la restricción o el agotamiento de fenilalanina. El método de tratamiento del cáncer puede comprender además la administración de un agente terapéutico contra el cáncer, o un agente terapéutico contra el cáncer dirigido, o una dieta con restricción de proteínas.

La composición farmacéutica de la invención puede servir también para su uso en un método para reducir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma de un paciente. En todas las realizaciones, la composición farmacéutica para su uso puede servir para reducir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del paciente a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a menos de aproximadamente 20 μ M, opcionalmente a menos de aproximadamente 10 μ M.

Como se emplea en esta memoria, "AvPAL" o "variante AvPAL" se usa para indicar una variante de fenilalanina amoníaco-liasa de *Anabaena variabilis* como se describe anteriormente. La presente descripción también proporciona métodos de producción y purificación de PAL procariótica y fragmentos, mutantes, variantes o análogos biológicamente activos de la misma.

Como se emplea en esta memoria, "PAL bacteriana" y "PAL procariótica" se usan de forma intercambiable para indicar (1) PAL de tipo silvestre de un organismo procariótico, que incluye pero no se limita a una PAL a partir de *Streptomyces maritimus* (también conocido 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, Z. Naturforsch. 31(11-12):693-9 (1976)), *Photobacterium luminescens* TT01 (Williams, et al., Microbiology 151:2543-2550 (2005)) y *Streptomyces verticillatus* (Bezanson, et al., Can. J. Microbiol. 16(3):147-51 (1970)); (2) fragmentos, mutantes, variantes o análogos de dichas enzimas PAL de tipo silvestre que conservan una actividad catalítica similar (p. ej., al menos el 50%) por la fenilalanina, y que preferiblemente muestran una actividad catalítica incrementada, mayor estabilidad bioquímica, aumento de la semivida y/o reducción de la inmunogenicidad, y (3) versiones modificadas químicamente de dichas enzimas PAL de tipo silvestre o fragmentos, mutantes, variantes o análogos de las mismas que se enlazarán con otros restos químicos que proporcionan otros efectos ventajosos, como, por ejemplo y sin limitarse a ellos, mejora de la semivida y/o reducción de la inmunogenicidad. Por ejemplo, cualquier referencia a métodos de preparación o uso de PAL procariótica, y fragmentos, mutantes, variantes, análogos o versiones modificadas químicamente de la misma, y composiciones de dicha o dichas enzimas, para fines terapéuticos, se entiende que se refiere a métodos de preparación, uso o formulación de todas las PAL procarióticas de tipo silvestre o fragmentos, mutantes, variantes, análogos o modificaciones químicas de las mismas.

En un primer aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden PAL bacteriana y fragmentos, mutantes, variantes o análogos biológicamente activos de la misma, y un soporte farmacéuticamente aceptable. Se describe una PAL bacteriana de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO: 2) o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma. Otro aspecto preferido es una PAL bacteriana de *Anabaena variabilis* (SEQ ID NO: 4) o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma. Se contemplan variantes de PAL procariótica que tienen mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o inmunogenicidad reducida en comparación con una PAL de tipo silvestre.

Preferiblemente, las variantes PAL procarióticas conservan los residuos del sitio activo de tipo silvestre en las posiciones correspondientes a Ser210, la triada Ala-Ser-Gly (211-213), Asp214, Leu215, Asn270, Val269, Leu266, Leu134, His 137, Lys468, Glu496, Gln500 en PAL de *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL) o sustitución o sustituciones conservadoras de este o estos residuos del sitio activo, entre los que según se cree la triada Ala-Ser-Gly en 211-213 es el punto de enlace para fenilalanina.

Las variantes de PAL procariótica deseables pueden incluir proteínas en las que uno o más residuos de aminoácidos han sido sustituidos por otro residuo de aminoácidos para reducir agregación de proteínas que puede asociarse con una disminución de la actividad enzimática, un aumento de la inmunogenicidad y/u otros efectos desventajosos, como reducción de la biodisponibilidad, *in vivo*. La invención contempla una composición farmacéutica que comprende una variante AvPAL en donde la sustitución aumenta la actividad de conversión de fenilalanina y/o

reduce la inmunogenicidad en comparación con la PAL de tipo silvestre.

Uno o más residuos de aminoácidos de la variante PAL procariótica pueden haber sido sustituidos por otro residuo de aminoácidos. Uno o más residuos de cisteína de la variante PAL procariótica pueden haber sido sustituidos por un residuo de serina. Según la invención, la variante PAL procariótica es una PAL de *Anabaena variabilis* (AvPAL) en donde uno o dos residuos de cisteína de la variante AvPAL han sido sustituidos por un residuo de serina seleccionado entre el grupo que consiste en residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565. En una realización preferida, el residuo de cisteína en la posición 565 de la variante AvPAL ha sido sustituido por un residuo de serina. En otra realización preferida, los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina.

Las variantes de PAL procariótica deseables pueden incluir proteínas de fusión en las que la enzima PAL se ha fusionado con otro polipéptido heterólogo, como una región constante nativa o modificada de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que conserva el epítipo silvestre, conocida en la técnica porque aumenta la semivida, o es reconocida por proteínas específicas para las formas particulares de cáncer.

La invención contempla además versiones modificadas químicamente de polipéptidos de AvPAL, que se han enlazado con un resto químico que proporciona otros efectos ventajosos. Por ejemplo, en la técnica se conoce que el enlace no específico o específico del sitio (p. ej., extremo N) de polímeros solubles en agua, por ejemplo, polietilenglicol, con polipéptidos mejora la semivida, y el enlace de restos químicos puede reducir también la inmunogenicidad y/o mejorar la resistencia a la proteasa.

En algunas realizaciones, la variante AvPAL comprende un polímero soluble en agua. En realizaciones preferidas, la variante AvPAL comprende polietilenglicol. En una realización más preferida, la relación entre AvPAL y polietilenglicol es de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3). En la realización más preferida, la relación entre la variante AvPAL y polietilenglicol es aproximadamente de 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), y los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina.

Uno o más residuos de aminoácidos de la variante PAL procariótica pueden haber sido sustituidos por un residuo de lisina. La pegilación de uno o varios residuos de lisina adicionales en una variante PAL procariótica puede dar como resultado una enzima que tiene inmunogenicidad reducida, actividad catalítica incrementada y/o estabilidad bioquímica mejorada. Sin estar limitado a ninguna teoría en particular, se establece la hipótesis de que un residuo de tirosina en/cerca del sitio activo de la PAL procariótica (p. ej., posición 78 en AvPAL) puede ser un sitio para pegilación, que reduce la actividad enzimática. Uno o más aminoácidos en/cerca del sitio activo de la variante PAL procariótica que no se requiere para actividad enzimática pueden estar sustituidos por un residuo de lisina. Sin estar limitado a ninguna teoría en particular, se establece la hipótesis de que la pegilación del residuo de lisina sustituido en/cerca del sitio activo impide estéricamente la pegilación de un residuo de tirosina (p. ej., posición 78 en AvPAL).

Dichas variantes de PAL procariótica se aíslan y purifican de acuerdo con los métodos como se describe en la presente memoria y por tanto están presentes en cantidades que permiten el uso de la enzima PAL procariótica terapéuticamente. Puede usarse un ADNc que codifica una PAL procariótica completa o de tipo silvestre. Sin embargo, en otros aspectos puede usarse un ADNc que codifica un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma. Además, la presente descripción proporciona composiciones de PAL procariótica optimizada obtenida por estrategias de ingeniería molecular basadas en la estructura y/o formas de PAL modificadas químicamente (p. ej., pegiladas). Se contemplan composiciones óptimas de PAL procariótica con actividad específica mejorada, estabilidad mejorada, inmunogenicidad reducida y/o sensibilidad proteolítica apropiada para un uso terapéutico. Se describe una forma pegilada de PAL de *Nostoc punctiforme* con actividad específica mejorada, estabilidad mejorada, inmunogenicidad reducida y/o sensibilidad proteolítica. Una realización preferida es una forma pegilada de PAL de *Anabaena variabilis* con actividad específica mejorada, estabilidad mejorada, inmunogenicidad reducida y/o sensibilidad proteolítica.

Los sitios activos biológicamente de AvPAL de tipo silvestre pueden modificarse como se desee para optimizar las características cinéticas de la PAL. Según la invención, una AvPAL modificada tiene suficiente actividad para reducir los niveles plasmáticos de fenilalanina en un sujeto tras el tratamiento a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μM y 60 μM , preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μM , y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μM , usando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica. En otras realizaciones preferidas, la AvPAL modificada biológicamente activa tiene una k_{cat} de al menos aproximadamente 0,1 s^{-1} , preferiblemente más de aproximadamente 0,5 s^{-1} , y más preferiblemente todavía más de aproximadamente 1,0 s^{-1} . En realizaciones más preferidas, la AvPAL modificada biológicamente activa tiene una k_{cat} de al menos aproximadamente 0,4 s^{-1} , preferiblemente más de aproximadamente 2,0 s^{-1} , y más preferiblemente todavía más de aproximadamente 4,0 s^{-1} . En otras realizaciones preferidas, la AvPAL modificada biológicamente activa tiene una K_{m} de entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 2.000 μM . En realizaciones más preferidas, la AvPAL modificada biológicamente activa tiene una K_{m} de entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 1.000 μM . En realizaciones todavía más preferidas, la AvPAL modificada biológicamente activa tiene una K_{m} de entre aproximadamente 10 μM a aproximadamente 500 μM . En otras realizaciones preferidas, la AvPAL modificada biológicamente activa muestra una actividad enzimática de aproximadamente al menos el 50% de aproximadamente 10 veces más de la PAL de tipo silvestre. En otras realizaciones preferidas, la

AvPAL modificada biológicamente activa muestra una actividad enzimática de aproximadamente al menos 50% de aproximadamente el 100% más que la PAL de tipo silvestre. Dichas proteínas AvPAL modificadas biológicamente activas pueden formarse usando métodos bien conocidos en la técnica, como mutagénesis dirigida al sitio.

5 En realizaciones adicionales, la invención contempla el uso de AvPAL que metaboliza fenilalanina (p. ej., convierte fenilalanina en otra sustancia) en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar el cáncer en un sujeto, preferiblemente en un sujeto humano, así como una composición farmacéutica que contiene AvPAL para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer en un sujeto, preferiblemente en un sujeto humano. En algunas realizaciones, el medicamento es para prevenir el cáncer en un sujeto humano. En otras realizaciones, el medicamento es para el tratamiento del cáncer en un sujeto humano. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende AvPAL altamente purificada y un soporte farmacéuticamente aceptable. Las preparaciones preferidas contienen AvPAL con una pureza de más del 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9%. La actividad específica relativa de la AvPAL, según la presente invención es preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, y más preferiblemente más de aproximadamente el 110%, de la actividad específica de tipo silvestre PAL procariótica.

15 En un segundo aspecto, la presente invención consiste en nuevos métodos de uso de composiciones de variantes AvPAL para fines terapéuticos. La invención contempla métodos de tratamiento de varias formas de cáncer.

En una realización, la invención contempla una composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento del cáncer que comprende una variante AvPAL y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde la variante AvPAL tiene una mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con una PAL de tipo silvestre y es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma, preferiblemente en plasma, del sujeto a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μM y 60 μM , preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μM , y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μM . Como se describe también en la presente memoria, uno o más residuos de aminoácidos de la variante PAL procariótica pueden estar sustituidos por otro residuo de aminoácidos en donde la sustitución aumenta la actividad de conversión de fenilalanina y/o reduce la inmunogenicidad en comparación con la PAL de tipo silvestre. Como se describe en la presente memoria, uno o más residuos de cisteína de una variante PAL procariótica pueden estar sustituidos por otro residuo de aminoácidos. Como se describe en la presente memoria, uno o más residuos de cisteína de una variante PAL procariótica pueden estar sustituidos por un residuo de serina. Según la invención, uno o dos residuos de cisteína de una variante AvPAL han sido sustituidos por un residuo de serina que se selecciona del grupo que consiste en residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565, por un residuo de serina en la posición 565 o por residuos de serina en las posiciones 503 y 565. En algunas realizaciones, la variante AvPAL comprende un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua es polietilenglicol. En una realización preferida, la relación entre la variante AvPAL y el polietilenglicol es aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3). En una realización más preferida, la relación entre la variante AvPAL y el polietilenglicol es aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), y los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina.

En una realización preferida más en particular, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante AvPAL y un soporte farmacéuticamente aceptable para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, en donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina, la variante AvPAL comprende además un polímero soluble en agua de polietilenglicol, en donde la relación de variante AvPAL y el polietilenglicol es aproximadamente de 1:3, y la variante AvPAL es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma, preferiblemente en plasma, del sujeto a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μM y 60 μM , preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μM , y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μM .

En una realización extensa, el cáncer es un cáncer en donde la proliferación y/o supervivencia de células derivadas del cáncer es sensible a la restricción o agotamiento de fenilalanina. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer renal o melanoma metastásico. En otras realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia (p. ej., leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblastoide aguda) o mieloma. En otras realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer pediátrico o un cáncer resistente (p. ej., un cáncer que ha mostrado ser resistente a los agentes terapéuticos contra el cáncer o los agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos).

La invención describe una variante AvPAL para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en donde la administración de la variante AvPAL es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina (Phe) en sangre, suero o plasma, preferiblemente en plasma, del sujeto en comparación con la concentración en ausencia de administración de la variante AvPAL. Un sujeto seleccionado para tratamiento según los métodos de la invención puede tener cualquier concentración de Phe en plasma, por ejemplo, de aproximadamente 40 μM a aproximadamente 2.000 μM , o un intervalo normal de concentración de Phe en plasma, dicha concentración puede estar en el intervalo de aproximadamente 40 μM a aproximadamente 80 μM , más típicamente en el intervalo de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 70 μM , con el intervalo en la mayoría de las personas entre aproximadamente 55 μM y aproximadamente 65 μM . La concentración de Phe en plasma del sujeto después del tratamiento se reduce al

intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μ M y 60 μ M, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μ M, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μ M, usando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica.

5 La invención contempla también una composición farmacéutica que comprende una variante AvPAL y un soporte farmacéuticamente aceptable, en combinación con una dieta con restricción de proteínas (p. ej., sin fenilalanina) para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento es eficaz para producir una disminución en la concentración de Phe en plasma del sujeto en ausencia de la administración combinada. La concentración de Phe en plasma del sujeto después del tratamiento se reduce al intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μ M y 60 μ M, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μ M, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μ M, usando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica.

10 En otra realización, la AvPAL puede administrarse también en combinación con una dieta con restricción de proteínas. La dieta con restricción de proteínas administrada en los métodos en la presente memoria es una dieta con restricción de fenilalanina en donde la ingesta total de Phe del sujeto se restringe a menos de 600 mg al día. En otras realizaciones, la dieta con restricción de proteínas es una dieta con restricción de fenilalanina en donde la Phe total se restringe a menos de 300 mg al día. En otras realizaciones más, la dieta con restricción de proteínas es una suplementada con uno o más aminoácidos, como, por ejemplo y no como limitación, tirosina, valina, isoleucina y/o leucina.

15 También se contempla una composición farmacéutica que comprende AvPAL y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además un suplemento proteínico médico. En otras realizaciones más, el suplemento proteínico está libre de fenilalanina. El suplemento proteínico preferiblemente está reforzado con L-tirosina, L-glutamina, L-carnitina a una concentración de 20 mg/100 g de suplemento, L-taurina 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 entre el grupo que consiste en L-leucina, L-prolina, acetato de L-lisina, L-valina, L-isoleucina, L-arginina, L-alanina, glicina, L-asparagina monohidratada, L-triptófano, L-serina, L-treonina, L-histidina, L-metionina, ácido L-glutámico y ácido L-aspartico. Además, el suplemento puede estar reforzado con la dosificación diaria recomendada de vitaminas A, D y E. El suplemento comprende preferiblemente un contenido en grasas que proporciona al menos el 40% de la energía del suplemento. Dicho suplemento puede proporcionarse en forma de un suplemento en polvo o en forma de una barra de proteínas.

20 La invención contempla también una composición farmacéutica que comprende una variante AvPAL y un soporte farmacéuticamente aceptable para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, en combinación con un agente terapéutico contra el cáncer o un agente terapéutico contra el cáncer dirigido, en donde el tratamiento es eficaz de producir una disminución en la concentración de Phe en plasma del sujeto después del tratamiento se reduce al intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μ M y 60 μ M, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μ M, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μ M, usando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica.

25 Las realizaciones preferidas incluyen la optimización de la dosificación a las necesidades del organismo para su tratamiento, preferiblemente mamíferos o seres humanos, para prevenir o mejorar de manera eficaz los síntomas de la enfermedad. La AvPAL puede administrarse en una sola dosis diaria, múltiples dosis al día, en una sola dosis semanal, múltiples dosis a la semana, en una sola dosis mensual o múltiples dosis al mes. En algunas realizaciones, la terapia con AvPAL no es continua, sino que la AvPAL se administra en una base diaria hasta que la concentración de Phe en plasma del sujeto disminuye a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μ M y 60 μ M, preferiblemente menos de aproximadamente 20 μ M, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μ M, usando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, cuando la concentración de Phe en plasma del sujeto se supervisa en una base diaria y la AvPAL se administra cuando se observa un aumento del 10%-20% en la concentración de Phe en plasma. En otras realizaciones preferidas más, las dosis se suministran una vez a la semana. La invención contempla dosis de al menos 0,001 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, y puede ser de hasta 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 12 mg/kg o más por semana. Una dosis preferida es 1 mg/kg/semana, una dosis más preferida es 0,1 mg/kg/semana y una dosis más preferida todavía es 0,01 mg/kg/semana.

30 Se contemplan diversas vías de administración parenterales o no parenterales, que incluyen vías oral, transdérmica, transmucosa, intrapulmonar (incluida aerosolizada), intramuscular, subcutánea o intravenosa, que suministran dosificaciones equivalentes. Se contempla también específicamente la administración por inyección de bolo o infusión directamente en las articulaciones o el LCR, como las vías intratecal, intracerebral, intraventricular, por punción lumbar o a través de la cisterna magna. Preferiblemente las dosis se suministran por vía subcutánea u oral.

35 Se contemplan también otros medios para aumentar la actividad de PAL procariótica en los sujetos humanos, incluida terapia génica. La transferencia de un gel de PAL procariótica es posible a través de diversos medios

conocidos en la técnica, que incluyen vectores víricos, recombinación homóloga o inyección de ADN directa. Dentro del alcance existen aspectos que presentan secuencias de ácidos nucleicos que codifican parte o la totalidad de la PAL procariótica o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma, que puede administrarse *in vivo* en células que están afectadas, por ejemplo y no como limitación, por el cáncer, situadas cerca de o adyacentes al cáncer, células hematopoyéticas que circulan en el torrente sanguíneo y/o migran al sitio del cáncer.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas o formulaciones de AvPAL y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde el soporte farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. El estabilizador puede ser L-fenilalanina o un análogo estructural de la misma. El estabilizador puede seleccionarse entre el grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico. El estabilizador puede ser L-fenilalanina. El estabilizador puede ser ácido trans-cinámico. El estabilizador puede ser ácido benzoico. Por tanto, la invención se refiere a métodos de tratamiento del cáncer que usan dichas composiciones farmacéuticas o formulaciones.

En una realización preferida en particular, la composición farmacéutica o formulación comprende una variante PAL procariótica y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde la variante PAL procariótica es una variante AvPAL, la relación entre la variante AvPAL y polietilenglicol es de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), y los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina, y el soporte farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. En algunas realizaciones, el estabilizador es L-fenilalanina o un análogo estructural del mismo. En algunas realizaciones, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico. En algunas realizaciones, el estabilizador es L-fenilalanina. En algunas realizaciones el estabilizador es ácido trans-cinámico. En una realización preferida en particular, la invención proporciona el uso de dichas composiciones farmacéuticas o formulaciones en un métodos de tratamiento del cáncer.

En un cuarto aspecto, la presente descripción consiste en un método para producir PAL procariótica recombinante o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente. La presente descripción contempla PAL obtenida de bacterias que incluyen, pero no se limitan a, *Streptomyces*, *Sorangium*, *Pseudomonas*, y cianobacterias como *Nostoc* y *Anabaena*. La PAL puede obtenerse de las especies bacterianas *Streptomyces maritimus*, *S. verticillatus*, *Sorangium cellulosum*, *Nostoc punctiforme*, *Nostoc tobacum*, *Anabaena variabilis* o *Pseudomonas putida*. La PAL puede obtenerse de las especies cianobacterianas *Nostoc punctiforme* o *Anabaena variabilis*. En una realización preferida en particular, la PAL se obtiene de *Anabaena variabilis*. La actividad enzimática de la PAL procariótica puede generarse usando secuencias de ADNc o ADN que se obtienen de secuencias descritas a veces como codificantes para actividad HAL o que presentan un motivo PAL-HAL, pero poseen residuos PAL clave que difieren de HAL.

El método comprende la etapa de transformación de un ADNc o ADN que codifica parte o la totalidad de una PAL procariótica o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma en una célula adecuada para la expresión de los mismos. Se usa un vector de expresión para transferir el ADN a una célula o línea celular adecuada para la expresión del mismo. El ADNc o ADN se transforma en *E. coli* y la PAL bacteriana recombinante está sobreexpresada, opcionalmente como una proteína de fusión. El método de producción de PAL procariótica comprende las etapas de: (a) cultivo de células transformadas con un ADNc o ADN que codifica la totalidad o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de los mismos de la PAL procariótica en un medio de cultivo adecuado hasta una densidad apropiada para producir un cultivo de siembra, (b) introducción de las células transformadas en un biorreactor, (c) suministro de un medio de cultivo adecuado al biorreactor, y (d) separación de las células transfectadas de los medios que contienen la enzima.

La PAL procariótica recombinante o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma está preferiblemente sobreexpresada, con o sin una marcación en el extremo N (p. ej., marcación de octahistidilo), en un vector, preferiblemente pIBX1 (Su, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2723-2734 (1996)) o pET28a (Invitrogen) con un promotor inducible como con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido), en células de *E. coli* BLR(DE3)/pLysS (Novagen) o *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Invitrogen). El método de producción de PAL procariótica comprende las etapas de: (1) preparación de un cultivo de siembra para un biorreactor/fermentador a partir de una cantidad de glicerol en matraces de agitación; (2) introducción de dicho cultivo de siembra en un biorreactor controlado en modo de lotes de suministro; (3) preparación de dicho cultivo en medio suplementado con glucosa, pH (7,8), > 20% de oxígeno disuelto, agitación hasta 1.200 rpm, 30°C hasta alcanzar una densidad celular de DO₆₀₀ de 70-100 (~22-25 h); (4) inducción de dicho cultivo con IPTG 0,4 mM; (5) preparación 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 h y una DO₆₀₀ típicamente de 200); y (6) recogida de bacterias por centrifugación continua. El medio de cultivo celular se define típicamente y está compuesto por proteína por extracto de levadura, peptona-triptona, glucosa, glicerol, casaminoácidos, sales traza y sales de tampón de fosfato.

En un quinto aspecto, en la presente memoria se describe un método para purificar PAL procariótica o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma. Se cultiva una masa celular transformada y se rompe para dejar una enzima recombinante en bruto. Los materiales exógenos se separan normalmente de la carga en bruto para evitar que ensucien las columnas. La purificación cromatográfica se realiza usando una o varias

resinas cromatográficas. Posteriormente, se formula la proteína purificada en un tampón diseñado para proporcionar la actividad estable durante un periodo de tiempo extendido. El método para purificar la PAL procariótica comprende las etapas de: (a) lisis de las bacterias que contienen PAL recombinante; (b) tratamiento del lisado con calor para inactivar los virus; (c) clarificación de este lisado usando una segunda etapa de centrifugación continua y/o filtración en profundidad; (d) paso del lisado clarificado a través de una etapa de filtración con carbono; (e) paso del filtrado de (d) a través de una etapa de filtración final (por ejemplo con un filtro Sartorius Sartopore de 0,2 µm); (f) paso del filtrado final por una resina de cromatografía de interacción hidrófoba, como cromatografía de interacción hidrófoba con butilo; (g) paso del material eluido de (f) sobre una resina de cromatografía aniónica, como una columna de intercambio iónico Q; (h) recuperación del producto final por intercambio con tampón con filtración de flujo tangencial; e (i) esterilización del producto final. Los expertos en la técnica aprecian fácilmente que es posible omitir o sustituir una o más de las etapas de cromatografía, o que el orden de las etapas de cromatografía puede cambiarse dentro del alcance de la presente invención. Finalmente, pueden realizarse etapas de esterilización apropiadas según se desee.

En un sexto aspecto, en la presente memoria se describen ensayos de cribado para identificar PAL procariótica o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma que puede prevenir, mejorar o tratar el cáncer por puesta en contacto de una célula tumoral en cultivo con la PAL procariótica y determinar si la PAL procariótica reduce la proliferación y/o supervivencia de las células tumorales. Dichos ensayos de cribado pueden incluir también las etapas de creación de variantes que incluyen sustituciones conservadoras o no conservadoras en los sitios activos, p. ej. Gly142, la triada Thr-Ser-Gly (143-145), Asp146, Leu147, Asn196, Ile195, Leu192, Leu76, Asn79, Met400, Thr428, Gln432 en EncP de *Streptomyces maritimus*, o sus equivalentes en otra PAL procariótica, como *Nostoc punctiforme* o *Anabaena variabilis*, que son equivalentes a los residuos Ser210, triada Ala-Ser-Gly (211-213), Asp214, Leu215, Asn270, Val269, Leu266, Leu134, His137, Lys468, Glu496, Gln500 en PAL de *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL), en regiones adyacentes a los sitios activos, o en toda la secuencia de polipéptidos, seguido por prueba de las variantes en cuanto a actividad de conversión de fenilalanina *in vitro* fenilalanina. El método puede ser un ensayo de alta productividad. Los genomas completos de las especies bacterianas son secuenciados y cribados en busca de la presencia de homólogos de PAL procariótica que usan una estrategia bioinformática. La actividad catalítica de PAL del producto de proteínas de dichos homólogos se confirma, por ejemplo, mediante ensayo de la capacidad de conversión de la fenilalanina en trans-cinamato *in vitro*.

En un séptimo aspecto, en la presente memoria se describen métodos que usan composiciones de PAL procariótica para el diagnóstico de enfermedades, que incluye pero no se limita a cáncer. La PAL procariótica se usa para medir los niveles de Phe en muestras de sangre, plasma o suero. En la presente memoria se describe un equipo de diagnóstico que comprende la PAL procariótica para su uso en el seguimiento de muestras de sangre, plasma o suero de sujetos para niveles de Phe.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se ofrecen solo a modo de ilustración, dado que para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada serán evidentes diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención.

Descripción detallada de las figuras

FIGURA 1. FIGURA 1A: Secuencia génica de *Nostoc punctiforme* PAL (SEQ ID NO: 1); FIGURA 1B: Secuencia de proteínas de *Nostoc punctiforme* PAL (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 relaciones de amoniaco-liasas de aminoácidos aromáticas de procariotas y eucariotas. Las secuencias se recuperaron a partir de GenBank (los números de entrada se indican entre paréntesis) y se alinearon con ClustalX (1.83) usando el Método de unión del vecino.

FIGURA 4. Alineación de secuencias de proteínas cianobacterianas de PAL de *N. punctiforme* (SEQ ID NO: 2) y PAL de *A. variabilis* (SEQ ID NO: 4) PAL con EncP (SEQ ID. NO: 5) y HAL de *P. putida* (SEQ ID NO: 6). Los residuos de sitios activos, que corresponden a actividad PAL o HAL, están resaltados.

FIGURA 5. FIGURA 5 A: Secuencia de proteínas de fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) de *Anabaena variabilis* con una sustitución de cisteína a serina en la posición 64 (AvPAL_C64S, SEQ ID NO: 7); FIGURA 5B: Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis* con una sustitución de cisteína a serina en la posición 318 (AvPAL_C318S, SEQ ID NO: 8); FIGURA 5C: Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis* con una sustitución de cisteína a serina en la posición 503 (AvPAL_C503S, SEQ ID NO: 9); FIGURA 5D: Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis* con una sustitución de cisteína a serina en la posición 565 (AvPAL_C565S, SEQ ID NO: 10); FIGURA 5E: 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 y en negrita.

FIGURA 6. FIGURA 6A: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en la posición 565 o en las posiciones 565 y

503 de AvPAL no pegilada en actividad enzimática específica de PAL *in vitro* después de incubación durante varios intervalos de tiempo a 37°C. FIGURA 6B: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en la posición 565 o en las posiciones 565 y 503 de AvPAL pegilada en actividad enzimática específica de PAL *in vitro* después de incubación durante varios intervalos de tiempo a 37°C.

5 FIGURA 7. FIGURA 7A: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en AvPAL en la formación de agregados de proteínas en solución analizado por electroforesis en gel en condiciones de desnaturalización (panel izquierdo) o condiciones nativas (panel derecho). FIGURA 7B: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en AvPAL en la formación de agregados de proteínas en solución analizado por SEC-HPLC.

10 FIGURA 8. Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (dbl mutante) en AvPAL en pegilación específica del sitio a varias concentraciones de PEG.

FIGURA 9. Efecto del tratamiento de AvPAL con Tween 80 al 0,05% o EDTA 10 mM en la formación de agregados de proteínas en solución analizado por SEC-HPLC.

15 FIGURA 10. FIGURA 10A: Efecto del tratamiento de AvPAL por ditioneitol (DTT) en la formación de agregados de proteínas en solución analizado por SEC-HPLC. FIGURA 10B: Efecto del tratamiento de AvPAL por DTT y N-etilmaleimida (NEM) en la formación de agregados de proteínas en solución analizado por SEC-HPLC.

FIGURA 11. Efecto de la fenilalanina (Phe) y el ácido trans-cinámico (t-CA) como se indica en la actividad enzimática de una AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) (rAV-PAL-PEG) almacenado durante varios tiempos (días) a 4°C (panel superior), a 25°C (panel medio) y a 37°C (panel inferior).

20 FIGURA 12. Efecto de tirosina (Tyr) a 1 y 5 mM como se indica en la actividad enzimática de una AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) (rAV-PAL-PEG) almacenado durante varios tiempos (días) a 4°C (panel superior), a 25°C (panel medio) y a 37°C (panel inferior).

25 FIGURA 13. FIGURA 13 A: Efecto de fenilalanina (Phe), ácido benzoico y piridoxamina, en solitario o en combinación como se indica, en la actividad enzimática de una AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AVPAL-C565SC503S) (rAV-PAL-PEG) almacenado durante varios tiempos (semanas) a 4°C (panel superior) y a 37°C (panel inferior). FIGURA 13B: Se representan las estructuras químicas de ácido benzoico (izquierda), fenilalanina (centro) y ácido trans-cinámico (derecha).

30 FIGURA 14. FIGURA 14A: Efecto de una única inyección subcutánea de una AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) a 4 mg/kg (rombos) y a 12 mg/kg (cuadrados) en monos *Cynomolgus* en los niveles en plasma de AvPAL_C565SC503S con el tiempo (horas). FIGURA 14B: Efecto de una única inyección subcutánea de AvPAL_C565SC503S a 4 mg/kg en monos *Cynomolgus* en los niveles en plasma de AvPAL_C565SC503S (rombos) y fenilalanina (cuadrados) con el tiempo (horas).

35 FIGURA 15. FIGURA 15 A: Efecto de una única inyección intravenosa de una AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) a 1 mg/kg (rombos), a 5 mg/kg (cuadrados) y a 25 mg/kg (triángulos) en ratas en los niveles en plasma de AvPAL_C565SC503S con el tiempo (horas). FIGURA 15A: Efecto de una única inyección subcutánea de AvPAL_C565SC503S a 10 mg/kg (rombos), a 25 mg/kg (cuadrados) y a 250 mg/kg (triángulos) en ratas en los niveles en plasma de AvPAL_C565SC503S con el tiempo (horas)

40 FIGURA 16. FIGURA 16A: Efecto de una AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) a 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml como se indica en la proliferación (medido por tinción con yoduro de propidio) de células NOMO1 de leucemia mieloide aguda (LMA) *in vitro*. FIGURA 16B: Efecto de AvPAL_C565SC503S a 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml como se indica en la proliferación de células de mieloma IM9 *in vitro*.

45 FIGURA 17. FIGURA 17 A: Efecto de una AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) a 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml como se indica en la proliferación (medido por tinción con yoduro de propidio) de células tumorales del encéfalo/SNC SF268 (arriba) y 498L (abajo) *in vitro*. FIGURA 17B: Efecto de AvPAL_C565SC503S a 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml como se indica en la proliferación de células tumorales de colon HT29 (arriba) y HCT116 (abajo) *in vitro*. FIGURA 17C: Efecto de AvPAL_C565SC503S a 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml como se indica en la proliferación de células tumorales de pulmón H460 (arriba), 529L (centro) y 629L (abajo) *in vitro*. FIGURA 17D: Efecto de AvPAL_C565SC503S a 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml como se indica en la proliferación de células tumorales de próstata LNCaP (arriba), PC3M (centro) y DU145 (abajo) *in vitro*.

50 FIGURA 18. Efecto de AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) en el tamaño del tumor en un modelo de xenoinjerto de línea celular de melanoma B16. La enzima se administró profilácticamente (arriba) o terapéuticamente (abajo) por inyección subcutánea a 40, 80 o 100 mg/kg como se indica.

55

FIGURA 19: Efecto de AvPAL pegilada con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL_C565SC503S) en el tamaño del tumor en modelos de xenoinjerto de la línea celular tumoral de hepatoma SNU398 (arriba) y HepG2 (abajo). La enzima se administró profilácticamente por inyección subcutánea a 60 mg/kg como se indica.

5 Descripción detallada de la invención

Varias PAL bacteriana se han identificado ya como parte de la familia HAL/PAL, que incluye pero no se limita a PAL de *Streptomyces maritimus* (también conocida como EncP, SEQ ID NO: 5, FIGURA 4), PAL/HAL de *Nostoc punctiforme* (entrada ZP_00105927 de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, expuesta el 1 de octubre de, 2004, NCBI Microbial Genomes Annotation Project) (SEQ ID NO: 2, FIGURA 4), PAL/HAL de *Anabaena variabilis* (Gene ID 3679622, fenilalanina/histidina amoniaco-liasa Ava_3988, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, 31 de marzo de 2006) (SEQ ID NO: 4, FIGURA 4), la procarionota fotosintética *Anacystis nidulans* (Lofflehardt, Z. Naturforsch. 31(11-12):693-9 (1976)), las bacterias gramnegativas de la familia Enterobacteriaceae, *Photobacterium luminescens* TT01 (Williams, et al., *Microbiology* 151:2543-2550 (2005)) y *Streptomyces verticillatus* (Bezanson, et al., *Can. J. Microbiol.* 16(3): 147-51 (1970)). Además, la actividad PAL se ha evaluado en *Streptomyces maritimus* (Xiang, et al., *J. Biol. Chem.* 277:32505-32509 (2002)). Se han contemplado las cianobacterias, como *Anabaena* y *Nostoc* en relación con su producción de productos naturales bioactivos que se generan a través de vías biosintéticas de policétido-péptido mixtas (Moore, *Nat. Prod. Rep.* 22(5):580-593 (2005); Becker, et al., *Gene* 325:35-42 (2004); Hoffman, et al., *Gene* 311:171-180 (2003)).

Aunque la PAL es una enzima de plantas superiores ubicua que cataliza la desaminación no oxidativa de fenilalanina a ácido cinámico en la etapa comprometida con metabolitos fenilpropanoides (Hahlbrock, et al., *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 40:347-369 (1989)), la PAL se ha encontrado solo en algunas 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 cinamamida 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 implica una serie de características infrecuentes (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 rara unidad iniciadora de la policétido sintasa (PKS) 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 en ácido trans-cinámico mediante la nueva fenilalanina amoniaco-liasa (PAL, EC 4.3.1.5) bacteriana EncP (Xiang, et al., *J. Biol. Chem.* 277:32505-32509 (2002)). La activación de ácido cinámico en su tioéster CoA seguida de por una única tanda 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 enterocina tipo II PKS para extensión de cadena con siete moléculas de malonil-CoA.

Se caracterizó el primer gen que codifica PAL procarionota (encP) (SEQ ID NO: 5) y se identificó su función en la síntesis *de novo* de ácido cinámico y enterocina en "*S. maritimus*" (Kalaitzis, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125:9290-9291 (2003); 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 en casi 200 residuos de aminoácidos. Aunque la secuencia homóloga a la PAL de plantas, por ejemplo, de *Petroselinum crispum* (Röther, et al., *Eur. J. Biochem.* 269:3065-3075 (2002)) (CAA57056, 30% idéntica y 48% similar), comparte bastante más homología con las histidina amoniaco-liasas (HAL, EC 4.3.1.3) bacterianas como las de *Pseudomonas putida* (Schwede, et al., *Biochemistry* 27:5355-5361 (1999)) (A35251, 36% idéntica y 54% similar, SEQ ID NO: 6, FIGURA 4) y con tirosina amoniaco-liasa (TAL) de *Rhodobacter capsulatus* (Kyndt, et al., *FEBS Lett.* 512:240-244 (2002)) (FIGURA 3). La homología incluye el residuo del sitio activo de serina conservado en la posición 143 de la familia de fenilalanina/histidina/tirosina de amoniaco-liasas que es el probable precursor del residuo de deshidroalanina modificado en el grupo protésico 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 la máxima homología de secuencias con AdmH (AAO39102, 63% idéntica y 76% similar), una posible fenilalanina aminomutasa implicada en la biosíntesis de andrimida en *Pantoea agglomerans* que está relacionada 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)).

Se mostró que HAL y PAL compartían en común un mecanismo para la eliminación químicamente difícil de amoniaco de la histidina y la fenilalanina, respectivamente. Con las dos enzimas, un grupo protésico superelectrófilo grupo 5 metilen-3,5-dihidroimidazol-4-ona (MIO) activa los átomos de hidrógeno beta no ácidos de sus sustratos respectivos mediante un ataque de tipo Friedel-Crafts en el anillo aromático. El complejo sigma que se genera evita la extracción de protones del anillo por exclusión del acceso de cualquier base a la bolsa de enlace de la enzima. La formación de un doble enlace exocíclico es clave en la eliminación de amoniaco, la rearomatización y la fragmentación. Se regenera el grupo MIO protésico y se forma el producto urocanato o cinamato (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 refieren como la región

conservada HAL/PAL. Esta alta homología puede crear algunas ambigüedades en bases de datos como NCBI en la actividad enzimática potencial de una proteína "PAL-HAL" lo que conduce a un error de marcado, por ejemplo con las secuencias de proteínas enumeradas en la base de datos NCBI para *Nostoc punctiforme* y *Anabaena variabilis*. Por lo tanto algunas enzimas PAL pueden ser enzimas HAL marcadas incorrectamente. Aunque los sitios activos de PAL y HAL son muy similares, se ha predicho que difieren en algunos residuos clave (Calabrese, et al., *Biochemistry* 43(36):11403-11416 (2004); Xiang et al., (2002), *ibid.*; Williams et al., (2005), *ibid.*). En particular en HAL, la metionina 382 y la glutamina 414 de *Pseudomonas putida* (SEQ ID NO: 6) están muy conservadas en todos los HAL pero siempre están sustituidas en todos los PAL descritos hasta ahora (eucarióticos y procarióticos) por lisina y glutamina, respectivamente (FIGURA 4). Así puede decirse que todas las proteínas con una región "PAL-HAL" y que tiene los homólogos de lisina 382 y glutamina 414 tienen la signatura de secuencia de una proteína con actividad PAL. Esta signatura PAL descrita de forma relativamente nueva (Williams, et al., (2005), *ibid.*) permite etiquetar adecuadamente algunas enzimas de HAL a PAL y podría usarse para identificar algunas enzimas PAL nuevas de una base de datos de genes y proteínas ya publicada.

La presente invención se refiere a composiciones de dicha AvPAL y fragmentos, mutantes, variantes o análogos biológicamente activos de la misma y a su uso para fines terapéuticos, incluido el tratamiento contra el cáncer.

A. Definiciones

Salvo que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en esta solicitud, que incluye la memoria descriptiva y las reivindicaciones, tienen las definiciones que se ofrecen a continuación. Debe observarse que, según se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. La definición de los términos químicos estándar puede encontrarse en obras de referencias, que incluyen Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3ª edición, Vols. A y B (Plenum Press, Nueva York 1992). La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, métodos convencionales de química orgánica sintética, espectroscopia de masas, métodos de cromatografía preparatorios y analíticos, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman y Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 4ª edición, 2004); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan ed., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

A lo largo del texto se usan las siguientes abreviaturas de aminoácido:

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)

El término "polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto por unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de origen natural, como ácido desoxirribonucleico ("ADN") y ácido ribonucleico ("ARN") así como análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos que incluyen bases de origen no natural, nucleótidos que se acoplan en enlaces con otros nucleótidos distintos del enlace de fosfodiéster de origen natural o que incluyen bases unidas a través de enlaces distintos de enlaces de fosfodiéster. Así, los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y similares. Dichos polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado. La expresión "ácido nucleico" se refiere típicamente a grandes polinucleótidos. El término "oligonucleótido" se refiere típicamente a polinucleótidos cortos, en general de no más aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (p. ej., A, T, G, C), esto incluye también una secuencia de ARN (p. ej., A, U, G, C) en la que "U" sustituye a "T".

El término "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, ya sea en forma

monocatenaria o bicatenaria.

En la presente memoria se usa la notación convencional para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polinucleótidos monocatenarios es el extremo 5'; la dirección izquierda de una secuencia de polinucleótido bicatenarios se refiere como dirección 5'. La dirección de adición de nucleótidos de 5' a 3' de transcritos de ARN naciente se refiere como la dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se refiere como "cadena codificante"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que un ARNm transcrito a partir de ese ADN y que están situadas en 5' en el extremo 5' del transcrito de ARN se refieren como "secuencias en la dirección 5'"; secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 3' en el extremo 3' del transcrito de ARN codificante se refieren como "secuencias en la dirección 3'".

El término "complementario" se refiere a la compatibilidad o armonización topológica de superficies en interacción de dos polinucleótidos. Así, las dos moléculas pueden describirse como complementarias, y además, las características de la superficie de contacto son complementarias entre sí. Un primer polinucleótido es complementario con un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del primer polinucleótido es idéntica a la secuencia de nucleótidos de la pareja de enlace de polinucleótidos del segundo polinucleótido. Así, el polinucleótido cuya secuencia 5'-TATAC-3' es complementaria a un polinucleótido cuya secuencia es 5'-GTATA-3'.

Una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente complementaria" a una secuencia de nucleótidos de referencia si la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos del sujeto es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia.

El término "que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, como un gen, un ADNc o un ARNm, para que sirva como moldes para síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (p. ej., ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de ello. Así, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción de ARNm producida por ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante como la secuencia de nucleótidos de que es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en listados de secuencias, como la cadena no codificante, usada como molde para transcripción, de un gen o ADNc pueden referirse como proteína codificante u otro producto de ese gen o ADNc. Salvo que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas 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 se unen entre sí de forma natural. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado puede estar incluido en un vector adecuado, y el vector puede usarse para transformar una célula huésped adecuada. Una célula huésped que comprende el polinucleótido recombinante se refiere como una "célula huésped recombinante". El gen se expresa entonces en la célula huésped recombinante para producir, por ejemplo, un "polipéptido recombinante". Un polinucleótido recombinante puede desempeñar también una función no codificante (p. ej., promotor, origen de replicación, sitio de unión 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 ligada operativamente a ella. La expresión "ligado operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos partes en la que la actividad de una parte (p. ej., la capacidad de regular la transcripción) da como resultado una acción en la otra parte (p. ej., transcripción de la secuencia). Las secuencias de control de la expresión pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, secuencias de promotores (p. ej., inducible o constitutivos), reforzadores, terminadores de transcripción, un codón de inicio (p. ej., ATG), señales de empalme 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 ligadas operativamente 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 suministrados por la célula huésped o un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, como cósmidos, plásmidos (p. ej., desnudos o contenidos en liposomas) y virus que llevan incorporado el polinucleótido recombinante.

El término "amplificación" se refiere a cualquier medio por el cual se copia una secuencia de polinucleótidos y así se expande a un número mayor de moléculas de polinucleótidos, por ejemplo, por transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa y reacción en cadena de la ligasa.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridarse específicamente con un molde de polinucleótidos designado y de proporcionar un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario. Dicha síntesis tiene lugar cuando el cebador de polinucleótido se coloca en condiciones en que se induce la síntesis, por ejemplo, en presencia de nucleótidos, un molde de polinucleótidos complementario y un agente para

polimerización como polimerasa de ADN. Un cebador es típicamente monocatenario, aunque puede ser bicatenario. Los cebadores son típicamente ácidos desoxirribonucleicos, aunque para numerosas aplicaciones es útil una amplia variedad de cebadores sintéticos y de origen natural. Un cebador es complementario al molde a partir del cual ha sido diseñado para hibridarse y actuar como un sitio para el inicio de la síntesis, pero no es necesario que refleje la secuencia exacta del molde. En tal caso, la hibridación específica del cebador con el molde depende de la severidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden ser marcados, por ejemplo, con restos cromógenos, radioactivos o fluorescentes y pueden usarse como restos detectables.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácidos, variantes estructurales de origen natural relacionadas y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos ligados por medio de enlaces peptídicos, variantes estructurales de origen natural relacionadas y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos. Los polipéptidos sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado. El término "proteína" típicamente se refiere a polipéptidos grandes. El término "péptido" se refiere típicamente a polipéptidos cortos.

En la presente memoria se usa la notación convencional para representar las secuencias de polipéptidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polipéptidos es el extremo amino; el extremo derecho de una secuencia de polipéptidos es el extremo carboxilo.

La expresión "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución en un polipéptido de un aminoácido con un aminoácido similar funcionalmente. Los seis grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 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).

Los aminoácidos pueden agruparse también del modo siguiente:

- (1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófobos neutros: Cys, Ser, Thr;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Los términos "idéntico" o "identidad" porcentual, en el contexto de dos o más secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos de nucleótidos o de aminoácidos que es el mismo, cuando se comparan y se alinean para obtener la máxima correspondencia, medida mediante un algoritmo de comparación de secuencias descrito en la solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente, n.º 11/230.374 presentada el 19 de septiembre de 2005.

Las expresiones "sustancialmente homólogo" o "sustancialmente idéntico" en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere en general a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos el 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y se alinean para obtener una máxima correspondencia, medida mediante uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Preferiblemente, la identidad sustancial puede existir a lo largo de una región de las secuencias que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 residuos, más preferiblemente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y lo más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas en al menos aproximadamente 150 residuos. Lo más preferiblemente, las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de la longitud completa de uno o los dos biopolímeros de comparación.

Las expresiones "sustancialmente puro" o "aislado" significan que una especie objeto es la especie predominante presente (p. ej., 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 al menos aproximadamente el 50% (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura significa que aproximadamente el 80% al 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 por métodos de detección convencionales) si la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. Para los fines de esta definición, las especies solventes, las moléculas pequeñas (<500 Daltons), los estabilizadores (p. ej., BSA) y las especies iónicas elementales no se consideran especies macromoleculares. En algunos aspectos, las composiciones de variantes PAL procarióticas son sustancialmente puras o aisladas. Las composiciones de variantes PAL procarióticas son sustancialmente puras o aisladas con respecto a los materiales de partida macromoleculares usados en su síntesis. Las composiciones farmacéuticas comprenden una variante PAL procariótica sustancialmente purificada o aislada mezclada con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La expresión "origen natural" aplicada a un objeto se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluidos los virus) que puede aislarse a partir de una fuente natural y que no ha sido modificada intencionalmente por el ser humano en el laboratorio es de origen natural.

La expresión "tipo silvestre" (wt) se refiere a la forma genética natural de un organismo. Un tipo silvestre se diferencia 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. Así, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares, se encuentran incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como sus fragmentos están comprendidos por la definición. Los términos incluyen también modificaciones postexpresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, un "polipéptido" se refiere a una proteína, que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora), introducidas en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Dichos polipéptidos pueden referirse en la presente memoria como "mutantes". Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tales como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, por ejemplo a través de mutaciones que surgen con huéspedes que producen las proteínas o errores debido a amplificación por PCR.

Tal como se emplea en esta memoria, los términos "variante", "análogo" o "derivado" se refieren a un compuesto, por ejemplo, un péptido, que tiene más de aproximadamente el 70% pero menos del 100% de similitud de secuencia con un compuesto dado, por ejemplo, un péptido. Dichas variantes, análogos o derivados pueden estar formadas por residuos de aminoácidos de origen no natural, que a modo de ejemplo y sin limitación incluyen homoarginina, ornitina, penicilamina y norvalina, así como residuos de aminoácidos de origen natural. Dichas variantes, análogos o derivados pueden estar formados también por uno o una pluralidad de residuos de ácidos D-amino, y pueden contener interenlaces no peptídicos entre dos o más residuos de aminoácidos.

Como se emplea en esta memoria, la "relación" de un polipéptido de PAL (p. ej., AvPAL) y un polímero soluble en agua (p. ej., polietilenglicol o PEG) se refiere a la razón molar en condiciones de reacción entre el polipéptido de PAL y el polímero soluble en agua. Por ejemplo, una relación de aproximadamente 1:3 para AvPAL y polietilenglicol (AvPAL:PEG 1:3) significa que la PAL modificada químicamente se produjo en una condición de reacción con aproximadamente 1 mol de AvPAL por 3 moles de polietilenglicol. En las condiciones de reacción descritas en el EJEMPLO 6, mostrado más adelante, una relación de aproximadamente AvPAL:PEG 1:3 da como resultado aproximadamente 10-12 mol de PEG por mol de monómero de AvPAL.

Los términos "tratamiento" o "que trata" como se emplean en esta memoria se refieren a un tratamiento profiláctico o un tratamiento terapéutico o un tratamiento diagnóstico.

El término tratamiento "profiláctico" se refiere a un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de enfermedad o estado patológico, por ejemplo, un cáncer, o muestra solo signos tempranos con el fin de reducir el riesgo de desarrollo de un estado patológico. Las composiciones de PAL procariótica pueden proporcionarse como un tratamiento profiláctico para reducir las probabilidades de desarrollar un estado patológico, por ejemplo, un cáncer, o para minimizar la gravedad del estado patológico, si se desarrolla.

El término tratamiento "terapéutico" se refiere a un tratamiento administrado a un sujeto que muestra signos o síntomas de un estado patológico, por ejemplo, un cáncer, con el fin de disminuir o eliminar dichos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionales, subjetivos u objetivos. Las composiciones de PAL procariótica puede suministrarse como un tratamiento terapéutico o para el diagnóstico.

El término "diagnóstico" significa la identificación de la presencia o la naturaleza de un estado patológico, por ejemplo, un cáncer. Los métodos diagnósticos difieren en su especificidad y selectividad. Aunque un método diagnóstico en particular podría no proporcionar un diagnóstico definitivo de una dolencia, basta con que el método proporcione una indicación positiva que ayude al diagnóstico.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para su uso farmacéutico en un

sujeto animal, lo que incluye seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un polipéptido de PAL procariótica y comprende también un soporte farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica incluye una composición que comprende el o los ingredientes activos y el o los ingredientes inertes que constituyen el soporte, así como cualquier producto que proceda, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejo o agregación de dos o más cualesquiera de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas comprenden cualquier composición preparada por mezcla de un polipéptido de PAL procariótica y un soporte farmacéuticamente aceptable.

La expresión "soporte farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los excipientes, vehículos, diluyentes, estabilizadores, conservantes, solubilizadores, emulsionantes, adyuvantes y/o soportes farmacéuticos estándar, como, por ejemplo y no como limitación, una solución salina de tampón de fosfato, solución acuosa al 5% de dextrosa y emulsiones, como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes de humidificación y/o adyuvantes. Los soportes y formulaciones farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los soportes farmacéuticos preferidos dependen del modo pretendido de administración del agente activo. Los modos de administración típicos incluyen la inyección enteral (p. ej., oral) o parenteral (p. ej., subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal; o la administración tópica, transdérmica o transmucosa). Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que puede formularse en una composición de una variante PAL procariótica para su uso farmacéutico que incluye, por ejemplo, sales metálicas (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

Mediante las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, por ejemplo, el material puede administrarse a un sujeto sin provocar ningún efecto biológico indeseable ni interactuar de forma perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en que está contenido.

La expresión "forma de dosis unitaria", como se emplea en esta memoria, se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de la variante PAL procariótica calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones de las nuevas formas de dosis unitarias dependen de la variante PAL procariótica empleada en concreto y del efecto que se desee conseguir, y de la farmacodinámica asociada con cada variante PAL procariótica en el huésped.

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

Como se emplea en esta memoria, el término "sujeto" comprende mamíferos y no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, cualquier miembro de la clase mamíferos: seres humanos, primates no humanos como chimpancés, y otras especies de simios y monos; animales de granja como vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores, como ratas, ratones y cobayas, y similares. Los ejemplos de no mamíferos incluyen, pero no se limitan a, aves, peces y similares. El término no denota una edad o un sexo en concreto.

B. Variantes de PAL procariótica

La determinación de una estructura o modelo estructural tridimensional fiable para una macromolécula específica permite que el diseño racional se convierta en un método productivo para la optimización de una estructura y/o función específicas de dicha macromolécula. Los métodos de uso de una estructura o modelo estructural tridimensional para optimizar enzimas PAL se describen en prior solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente, n.º 11/230.374 presentada el 19 de septiembre de 2005. En los métodos que implican ingeniería de proteínas puede usarse una estructura cristalina proteínica tridimensional de alta resolución de una PAL procariótica para mejorar las propiedades bioquímicas y biofísicas de una PAL procariótica, y para aumentar la eficacia terapéutica *in vivo* de una PAL procariótica. La invención contempla variantes AvPAL con mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o inmunogenicidad reducida en comparación con una PAL procariótica de tipo silvestre. La invención contempla también variantes AvPAL con mayor estabilidad bioquímica y/o semivida bioquímica en comparación con una PAL procariótica de tipo silvestre.

Variantes de PAL procariótica con actividad catalítica mejorada

Los sitios activos biológicamente de una PAL procariótica de tipo silvestre pueden modificarse según se desee para optimizar las características cinéticas de la PAL. K_m , la concentración de sustrato que proporciona la actividad semimáxima, está asociada íntimamente con la eficacia terapéutica de la PAL para mantener los niveles de Phe dentro de un intervalo aceptable, por ejemplo, desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μM y 60 μM , preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μM , y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μM , usando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica. K_m es la afinidad de la enzima por el sustrato. Si se controla la afinidad, puede limitarse o controlarse la eficacia de cualquier enzima

frente al sustrato a diferentes concentraciones. Por ejemplo, si K_m es 1.000 μM (p. ej., PAL de *Rhodospiridium toruloides*), la actividad de la enzima se reducirá a aproximadamente el 12,5% a niveles en sangre de Phe de 240 μM y a aproximadamente el 3% a niveles en sangre de Phe de 60 μM . Si K_m es 240 μM , la actividad de la enzima se reducirá a aproximadamente el 50% a niveles en sangre de Phe de 240 μM y a aproximadamente el 12% a niveles en sangre de Phe de 60 μM . Un objetivo terapéutico preferido sería tener una enzima PAL procariótica con actividad suficiente para reducir pero también para mantener los niveles de Phe después del tratamiento dentro del intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μM y 60 μM , preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μM , y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μM , usando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica. Una enzima con una K_m de aproximadamente 1.000 μM perderá actividad rápidamente ya que los niveles de Phe descienden para situarse en el intervalo normal (aproximadamente 55-60 μM , véase Kaufmann, Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:3160-3164 (1999)) y también requerirá una administración poco práctica de volúmenes de dosis grandes o altamente concentradas. Una enzima con una K_m menor puede agotar rápidamente la Phe y mantener los niveles de Phe después del tratamiento dentro de un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μM y 60 μM , preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μM , y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μM , lo que puede ser útil en el tratamiento del cáncer.

En realizaciones preferidas, la variante AvPAL biológicamente activa tiene una k_{cat} de al menos aproximadamente 0,1 s^{-1} , preferiblemente más de aproximadamente 0,5 s^{-1} , y más preferiblemente todavía más de aproximadamente 1,0 s^{-1} . En las realizaciones más preferidas, la variante AvPAL biológicamente activa tiene una k_{cat} de al menos aproximadamente 0,4 s^{-1} , preferiblemente más de aproximadamente 2,0 s^{-1} , y más preferiblemente todavía más de aproximadamente 4,0 s^{-1} . En otras realizaciones preferidas, la variante AvPAL biológicamente activa tiene una K_m de entre aproximadamente 10 μM a aproximadamente 2.000 μM . En realizaciones más preferidas, la variante AvPAL biológicamente activa tiene una K_m de entre aproximadamente 10 μM a aproximadamente 1.000 μM . En realizaciones todavía más preferidas, la variante AvPAL biológicamente activa tiene una K_m de entre aproximadamente 10 μM a aproximadamente 500 μM . En otras realizaciones preferidas, la variante AvPAL biológicamente activa muestra una actividad enzimática de aproximadamente 50% de aproximadamente 10 veces más que la PAL de tipo silvestre. En otras realizaciones preferidas, la variante AvPAL biológicamente activa muestra una actividad enzimática de aproximadamente el 50% de aproximadamente el 100% más que la PAL de tipo silvestre. Dichas variantes AvPAL activas biológicas pueden formarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio.

Variantes de PAL procariótica que tienen inmunogenicidad reducida

En la actualidad se usan varias estrategias para reducir la inmunogenicidad de las proteínas. Preferiblemente, las modificaciones que se introducen para minimizar la respuesta inmunitaria no destruyen la estructura, función o estabilidad de la macromolécula. Las estrategias eficaces usadas incluyen el aumento del contenido de secuencia humana (quimeras y/u otras estrategias de 'humanización'), la mejora de las propiedades de la solución, la eliminación de los epítomos de anticuerpos, la introducción de derivatización química (como pegilación) y/o la identificación y eliminación de agregados de MHC. Para una estrategia terapéutica inyectada, la inmunorreactividad *in vivo* puede abordarse mediante cartografía de epítomos seguida por mutagénesis racional para modificar y/o mutar por otros medios estos sitios de inmunogenicidad, en solitario y en combinación con pegilación específica del 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 derivatización química para reducir la inmunorreactividad de proteínas a un nivel aceptable. La modificación de las regiones de proteínas 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 conservan la actividad catalítica (p. ej., se usa un ensayo de absorbancia para la medida de la actividad). También puede usarse la ingeniería de proteínas junto con el cribado mediante ELISA para identificar mutantes con inmunorreactividad reducida. Otro método introduce mutaciones puntuales para sitios Lys de superficie adicionales para derivatización por pegilación, un método que según se ha demostrado reduce la inmunogenicidad con la enzima de ensayo purina nucleósido fosforilasa (Hershfield, et al. (1991), *ibíd.*). Una vía alternativa usa la mutación de residuos situados en regiones de epítomos de proteínas para eliminar sitios inmunógenos (Yeung, et al., J. Immunol. 172(11):6658-6665 (2004)). En una estrategia que es análoga a la humanización de anticuerpos, las regiones y/o residuos de bucle homólogos de anticuerpos humanos están sustituidos en las regiones de bucle correspondientes de una proteína homóloga.

La mejora de las propiedades de la solución de proteínas puede aumentar la actividad enzimática específica y/o reducir la inmunogenicidad. Una propiedad de la solución típica de proteínas recombinantes expresadas de forma bacteriana es la formación de agregados de proteínas debida, por ejemplo, a la formación de enlaces disulfuro intercatenarios, interacciones hidrófobas y/o cationes divalentes (Chi, et al., Pharm. Res. 20(9): 1325-1336 (2003)). La agregación de proteínas expresadas de modo recombinante puede mejorar la respuesta inmunitaria (Hermeling, et al., Pharm. Res. 21(6):897-903 (2004); Schellekens, Nephrol. Dial. Transplant. 20(suppl 6):vi3-9 (2005)). Un método de mejora implica la sustitución de residuos de cisteína de superficie por otros residuos de aminoácidos (p. ej., serina) para minimizar la posibilidad de formación de enlaces de disulfuro intercatenarios. Por ejemplo, la sustitución de dos residuos de cisteína de superficie por residuos de serina redujo la agregación de corismato liasa con efectos menores en la actividad enzimática (Holden, et al., Biochim. Biophys. Acta 1594(1):160-167 (2002)). La

descripción contempla variantes de PAL procariótica que tienen uno o más residuos de cisteína sustituidos por otro residuo de aminoácidos, preferiblemente un residuo de serina. Uno o más residuos de cisteína de la PAL procariótica están sustituidos por otro residuo de aminoácidos. En realizaciones preferidas, la PAL procariótica es AvPAL. Uno o más residuos de cisteína de AvPAL pueden estar sustituidos por un residuo de cisteína.

5 C. Variantes de PAL procariótica modificadas químicamente

La modificación química de macromoléculas puede realizarse de una forma no específica (que conduce a mezclas de especies derivatizadas) o de forma específica del sitio (basado en la derivatización dirigida por la reactividad de macromoléculas de tipo silvestre y/o modificación selectiva del sitio mediante una combinación de mutagénesis dirigida al sitio y modificación química) o, alternativamente, con el uso de métodos de ligación de proteínas expresados (Hofmann, et al., Curr. Opin. Biotechnol. 13(4):297-303 (2002)). Preferiblemente, la modificación química se usa para reducir la inmunogenicidad. La pegilación es un método demostrado para reducir la inmunogenicidad de proteínas (Bhadra, et al., Pharmazie 57(1):5-29 (2002)), si bien también son posibles la glucosilación y otros procedimientos de derivatización química, que usan modificación con fosforilación, amidación, carboxilación, acetilación, metilación, creación de sales de adición ácida, amidas, ésteres, y derivados de N-acilo (Davis, Science 303:480-482 (2004)). Los métodos para la pegilación de proteínas PAL y para la determinación del grado óptimo de pegilación se describen en la solicitud de patente anterior de EE.UU., en tramitación con la presente, n.º 11/230.374 presentada el 19 de septiembre de 2005. Se contemplan variantes de PAL procariótica que comprenden un polímero soluble en agua (p. ej., polietilenglicol o PEG).

La descripción contempla la introducción de uno o más residuos de lisina en/cerca del sitio activo de una variante PAL procariótica para mejorar la actividad catalítica, reducir la inmunogenicidad y/o mejorar la estabilidad bioquímica, en parte por el bloqueo de la pegilación potencial de otros residuos de aminoácidos (p. ej., tirosina) en/cerca del sitio activo de la enzima o el bloqueo de la pegilación potencial de un residuo de lisina importante para la actividad enzimática. Sin estar limitado a ninguna teoría en particular, se establece la hipótesis de que un residuo de tirosina en/cerca del sitio activo de una PAL procariótica (p. ej., posición 78 o 314 en AvPAL) puede ser un sitio para la pegilación, que reduce la actividad enzimática. Uno o más residuos de aminoácidos en/cerca del sitio activo de la PAL procariótica, que no son necesarios para la actividad enzimática, pueden estar sustituidos por un residuo de lisina. Preferiblemente, la PAL procariótica es AvPAL. En una realización más preferida, el residuo de tirosina de la AvPAL en la posición 78 o 314 no es accesible para pegilación. De nuevo sin estar limitado a ninguna teoría en particular, se establece la hipótesis de que un residuo de lisina de una PAL procariótica (p. ej., posición 419 en AvPAL), que normalmente está bloqueado para pegilación debido a la pegilación de un residuo de lisina PAL contiguo (p. ej., posición 413 en AvPAL), puede ser un sitio para pegilación, que reduce la unión al sustrato y/o la actividad catalítica. Uno o más residuos de aminoácidos de la PAL procariótica pueden estar sustituidos por un residuo de lisina, de manera que un residuo de lisina importante para la unión al sustrato de la enzima y/o la actividad catalítica no esté accesible para pegilación. Preferiblemente, la PAL procariótica es AvPAL. En un aspecto más preferido, el residuo de lisina de la AvPAL en la posición 419 no es accesible para pegilación.

Variantes de PAL procariótica pegiladas

Los ejemplos 7 a 9 de la solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente, n.º 11/451.999 anterior presentada el 12 de junio de 2006, describe los efectos de las formas pegiladas y no pegiladas del mutante de lisina R91K PAL de *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL), la PAL producida por la cianobacteria *Nostoc punctiforme* (NpPAL) y la PAL producida por la cianobacteria *Anabaena variabilis* (AvPAL) en los niveles de fenilalanina (Phe) en el ratón ENU2 o BTBR^{enu2}. Este modelo animal es un mutante homocigoto en el locus del gen de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) que da como resultado en un animal con hiperfenilalanemia grave. Los altos niveles en plasma de Phe hacen que este animal sea el modelo apropiado para evaluar la capacidad de la PAL para reducir el Phe en plasma. La administración de formas pegiladas de NpPAL y AvPAL dio como resultado una mayor reducción en Phe en los ratones ENU2 en comparación con NpPAL y AvPAL no pegiladas, respectivamente. Dichos efectos se mantuvieron para NpPAL tras inyecciones semanales durante un periodo de diez semanas. Estos resultados muestran que la pegilación de la PAL de las cianobacterias, *Nostoc punctiforme* y *Anabaena variabilis*, es esencial para reducir los niveles de Phe en ratones afectados por PKU.

El ejemplo 14 de la solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente, n.º 11/451.999 anterior presentada el 12 de junio de 2006, describe el efecto de la sustitución de serina de los residuos de cisteína (p. ej., en las posiciones 503 y 565) en el polipéptido de AvPAL en los niveles de Phe en ratones ENU2. La administración del mutante de cisteína de AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S dio como resultado la reducción en el nivel de Phe en plasma que era comparable al conseguido con la AvPAL pegilada de tipo silvestre. Además, los títulos de anticuerpos de anti-PAL fueron inferiores en los animales a los que se inyectó la variante AvPAL pegilada en comparación con la AvPAL pegilada de tipo silvestre. Estos resultados muestran que una variante AvPAL pegilada tiene (1) una actividad enzimática PAL *in vivo* que es comparable a la AvPAL de tipo silvestre natural, y (2) una inmunogenicidad reducida en comparación con la AvPAL pegilada de tipo silvestre.

D. Uso terapéutico y administración de las variantes de PAL procariótica

1. Varias formas de cáncer

La presente invención está dirigida al tratamiento del cáncer con métodos que comprenden el uso de composiciones de AvPAL, ya sea en solitario o en combinación con otros regímenes terapéuticos, por ejemplo y no como limitación, agentes terapéuticos contra el cáncer o agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos. En particular, se contempla que las composiciones de AvPAL pueden usarse para tratar esa población de pacientes con concentraciones en sangre, suero o plasma de fenilalanina (Phe) en cualquier nivel (p. ej., de aproximadamente 40 μM a 2.000 μM), en donde el intervalo normal en plasma humano está entre aproximadamente 55 μM y 60 μM (Kaufman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3160-3164 (1999)).

Un "agente terapéutico contra el cáncer" como se emplea en esta memoria se refiere a cualquier compuesto, por ejemplo, una molécula pequeña o péptido/polipéptido, que según se ha demostrado ejerce un efecto terapéutico (por ejemplo, inhibición de proliferación y/o supervivencia) en células cancerosas. Típicamente, el agente terapéutico contra el cáncer es un agente citotóxico o un agente citostático.

Un "agente terapéutico contra el cáncer dirigido" como se emplea en esta memoria se refiere a cualquier compuesto, por ejemplo, una molécula pequeña o péptido/polipéptido, o polipéptido o polipéptido conjugado que ha demostrado que ejerce un efecto terapéutico (p. ej., inhibición de proliferación y/o supervivencia) en células o tejidos cancerosos específicos. Típicamente, el agente terapéutico contra el cáncer dirigido es un anticuerpo, un polipéptido que tiene un dominio de tipo anticuerpo u otro polipéptido, por ejemplo, enzima, hormona, factor de crecimiento, citocina, etc., que se enlaza selectivamente con la superficie de una célula diana. El anticuerpo, polipéptido que tiene un dominio de tipo anticuerpo u otro polipéptido puede estar no conjugado o puede estar conjugado con un agente terapéutico contra el cáncer. El agente terapéutico contra el cáncer dirigido puede ser un compuesto que ejerce un efecto terapéutico en células o tejidos cancerosos específicos.

Las composiciones de AvPAL de la presente invención son útiles para tratar cualquier cáncer para el que la restricción o agotamiento de Phe inhibe su proliferación y/o supervivencia. La identificación de cánceres para los que el tratamiento con las composiciones de AvPAL de la presente invención puede ser útil puede realizarse con base en experimentos de cultivos *in vitro* (véase EJEMPLO 14) o estudios de xenoinjertos de tumores humanos *in vivo* en ratones (véase EJEMPLO 15) usando, por ejemplo, una muestra de biopsia de tumor, o por comparación con tipos de tumor con sensibilidad conocida o demostrada a la restricción o agotamiento de Phe en modelos animales de cáncer humano. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer renal o melanoma metastásico. En otras realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, leucemia (p. ej., leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblástica aguda) o mieloma. En otras realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer pediátrico o un cáncer resistente (p. ej., un cáncer que ha demostrado ser resistente a los agentes terapéuticos contra el cáncer o los agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos).

Ciertas realizaciones de la presente invención se dirigen a una composición que comprende AvPAL para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con una dieta con restricción de proteínas (p. ej., sin fenilalanina), en donde la administración combinada de la AvPAL y la dieta con restricción de proteínas es eficaz para reducir la concentración de Phe en la sangre, plasma o suero de dicho sujeto en comparación con la concentración en ausencia de dicha administración combinada.

Se contempla que los métodos comprenderán el seguimiento de la concentración de Phe en plasma del individuo que deberá ser tratado mediante composiciones de AvPAL. A continuación se trata al paciente por administración de composiciones de AvPAL en solitario, o en combinación con otros regímenes terapéuticos, como agentes terapéuticos contra el cáncer o agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos, o un régimen combinado de AvPAL y una dieta con restricción de proteínas (p. ej., sin fenilalanina), de manera que se produce una disminución de al menos el 10% en las concentraciones de Phe en sangre, plasma o suero del paciente. Preferiblemente, el método producirá una disminución de al menos un 25%, y más preferiblemente al menos un 50% en la concentración de Phe en sangre, plasma o suero. Más preferiblemente todavía, el método producirá al menos una disminución del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más en la concentración de Phe en sangre, suero o en plasma del individuo (por ejemplo, cuando se trata a un paciente con una concentración de Phe en plasma de 60 μM , una disminución del 50%, 70% o 90% en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe en plasma de 30 μM , 18 μM o 6 μM , respectivamente). Naturalmente, debe comprenderse que los métodos de tratamiento de la presente invención deben intentarse para reducir las concentraciones de Phe en sangre, suero o plasma del paciente después del tratamiento a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μM y 60 μM , preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μM , y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μM , usando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica.

Pueden conseguirse vías de administración y dosificación parenterales, orales u otras estándar que usan métodos estándar.

2. Composiciones para su uso en el tratamiento

La presente invención contempla la intervención terapéutica del cáncer. Dicha intervención se basa inicialmente en el uso de composiciones, composiciones farmacéuticas y formulaciones de AvPAL, que pueden usarse en solitario o en combinación con otros regímenes terapéuticos, como agentes terapéuticos contra el cáncer o agentes

terapéuticos contra el cáncer dirigidos, o un régimen combinado de una dieta baja en proteínas (p. ej., baja en fenilalanina) y AvPAL, o ambas. Además, la AvPAL y/o las restricciones en la dieta pueden combinarse con otras composiciones terapéuticas que están diseñadas, por ejemplo, para combatir manifestaciones de bajos niveles de fenilalanina, como, por ejemplo y no como limitación, suplemento con tirosina. La presente sección proporciona una

5 exposición de las composiciones, composiciones farmacéuticas y formulaciones que pueden usarse en los tratamientos contemplados en la presente memoria.

Composiciones, composiciones farmacéuticas y formulaciones de PAL procariótica

La presente invención contempla composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones de AvPAL de la invención junto con uno o más excipientes, vehículos diluyentes, estabilizadores, conservantes, solubilizadores, emulsionantes, adyuvantes y/o soportes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones farmacéuticas incluyen diluyentes de diverso contenido en tampón (p. ej., Tris-HCl, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos como detergentes y agentes de solubilización (p. ej., Polisorbato 20, Polisorbato 80), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (p. ej., timerosol, alcohol bencílico y sustancias de formación de volumen (p. ej., lactosa, manitol); véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) páginas 1435:1712. Una cantidad eficaz de ingrediente activo es una cantidad eficaz en términos terapéuticos, profilácticos o diagnósticos, que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica teniendo en cuenta factores como el peso corporal, la edad y el objetivo terapéutico.

10

15

Las composiciones farmacéuticas de AvPAL de la presente invención pueden incluir un agente de tampón para mantener el pH de la solución dentro de un intervalo deseado. Los agentes de tampón preferidos incluyen Tris-HCl, acetato de sodio, fosfato de sodio y citrato de sodio. También pueden usarse mezclas de estos agentes de tampón. La cantidad de agente de tampón útil en la composición depende en buena medida del tampón usado en particular y del pH de la solución. Por ejemplo, el acetato es un tampón más eficaz a pH 5 que a pH 6 con lo que puede usarse menos acetato en una solución a pH 5 que a pH 6. Un agente de tampón más preferido es Tris-HCl. Un intervalo de pH preferido para las composiciones farmacéuticas de la presente invención es aproximadamente pH 6,0-8,5. Un intervalo de pH más preferido para las composiciones farmacéuticas de la presente invención es aproximadamente pH 7,0-8,0. El intervalo de pH más preferido para las composiciones farmacéuticas de la presente invención es aproximadamente pH 7,0-7,6.

20

25

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir además un agente de ajuste de la isotonicidad para hacer la solución isotónica y más compatible para inyección. Un agente preferido es cloruro de sodio en un intervalo de concentración de 50-200 mM. Un agente más preferido es cloruro de sodio en un intervalo de concentración de 100-150 mM. El agente más preferido es cloruro de sodio en un intervalo de concentración de 130-150 mM.

30

Los soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir estabilizadores, que son moléculas que estabilizan las composiciones de AvPAL de la invención. El término "estabilizar" como se emplea en esta memoria, pretende incluir, por ejemplo y no como limitación, el aumento de la vida en almacenamiento de una enzima PAL procariótica, que protege la enzima PAL procariótica de la digestión proteolítica, manteniendo la enzima PAL procariótica en una conformación activa y conservando la actividad enzimática de la PAL procariótica en almacenamiento a temperaturas elevadas.

35

Los estabilizadores de la presente invención incluyen L-fenilalanina (Phe), ácido trans-cinámico (t-CA) y ácido benzoico. Se ha demostrado una pérdida de actividad de la PAL de plantas de *Phaseolus vulgaris* (PvPAL) tras la eliminación de la L-fenilalanina del sustrato después de una purificación de afinidad (Da Cunha, Eur. J. Biochem. 178:243-248 (1988)), y se ha demostrado que una levadura PAL de *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL) protege de la inactivación de la proteasa por la tirosina (Wang, et al., Mol. Genet. Metab. 86:134-140 (2005); Piibak, et al., FEBS J. 273:1004-1019 (2006)). Como se presenta en la presente memoria más adelante, Phe y algunos de sus análogos estructurales tienen la capacidad de estabilizar los conjugados de PEG:PAL de una PAL procariótica de *Anabaena variabilis* (AvPAL) (véase EJEMPLO 11). Sin estar limitado a ninguna teoría en particular, se establece la hipótesis de que la enzima PAL procariótica es más estable como un complejo de enzima-sustrato, en donde el sustrato Phe ligado se convierte en el producto t-CA o en un análogo en estado de transición de t-CA. La t-CA permanece ligada al por otra parte altamente reactivo centro del sitio activo (grupo MIO), estabilizando así la enzima PAL. Por consiguiente, el sustrato de la enzima AvPAL, la Phe, el producto, la t-CA son estabilizadores de la invención.

40

45

50

La invención contempla una composición farmacéutica que comprende una variante AvPAL y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde el soporte farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. El estabilizador es Phe o un análogo estructural de la misma. El estabilizador se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico. Un intervalo preferido para los estabilizadores de la invención es de aproximadamente 0,1 a 20 moles de estabilizador por mol de sitio activo de AvPAL. Un intervalo más preferido para los estabilizadores de la invención es de aproximadamente 0,5 a 10 moles de estabilizador por mol de sitio activo de AvPAL. El intervalo más preferido para los estabilizadores de la invención es de aproximadamente 1 a 10 moles de estabilizador por mol de sitio activo de AvPAL.

55

5 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una variante AvPAL y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde la variante AvPAL tiene una mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con una PAL de tipo silvestre y es eficaz para reducir la concentración de Phe en sangre, suero o plasma del sujeto a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μ M y 60 μ M, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μ M, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μ M, y en donde el soporte farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. En algunas realizaciones, el estabilizador es Phe o un análogo estructural de la misma. En algunas realizaciones, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico.

10 En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica comprende una variante PAL procariótica y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde la variante PAL procariótica es una variante PAL de *Anabaena variabilis* (AvPAL), en donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina, la variante AvPAL comprende además un polímero soluble en agua de polietilenglicol, en donde la relación entre la variante AvPAL y el polietilenglicol es aproximadamente 1:3; y la variante AvPAL es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del sujeto a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μ M y 60 μ M, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μ M, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μ M, y en donde el soporte farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. En algunas realizaciones, el estabilizador es Phe o un análogo estructural de la misma. En realizaciones preferidas, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico.

20 Como se emplea en esta memoria, cuando se contemplan composiciones de variante PAL procariótica, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz para producir el efecto beneficioso pretendido en la salud de un paciente con cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante PAL procariótica produce una disminución en sangre, plasma o suero, preferiblemente plasma, de los niveles de L-fenilalanina que aporta un beneficio al paciente. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de diversos factores, que incluyen la condición física global del paciente, la dieta y el estado patológico. La cantidad de la PAL procariótica usada para terapia proporciona una disminución aceptable en sangre, plasma o suero, preferiblemente plasma, de los niveles de L-fenilalanina, y mantiene este valor durante el tratamiento con PAL en un nivel beneficioso (típicamente en un intervalo desde menos de aproximadamente el 5% a entre aproximadamente el 35% y el 100%, preferiblemente en un intervalo desde menos de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 35%, y más preferiblemente todavía en un intervalo desde menos de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 15% del intervalo normal de L-fenilalanina en sangre, plasma o suero, preferiblemente plasma). En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante AvPAL reduce el crecimiento del tumor, el tamaño del tumor o la carga tumoral en más de aproximadamente el 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 98% o 99% en un paciente tratado en comparación con un paciente sin tratar. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante AvPAL mantiene el tumor en situación estacionaria en un paciente tratado en comparación con un paciente sin tratar. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante AvPAL aumenta el tiempo de supervivencia o el tiempo sin enfermedad en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 50%, 100%, 2 veces, 5 veces o 10 veces en un paciente tratado en comparación con un paciente sin tratar. Una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones de variante AvPAL de la invención puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica mediante materiales y procedimientos disponibles públicamente.

30 La invención proporciona la administración de variantes AvPAL menos frecuentemente que la PAL nativa. La frecuencia de dosificación variará dependiendo de la afección que se trata, pero en general será aproximadamente una vez por semana. Se entiende que las frecuencias de dosificación usadas en realidad pueden variar ligeramente entre las frecuencias descritas en la presente memoria debido a variaciones en las respuestas por parte de diferentes individuos a las variantes AvPAL; el término "aproximadamente" pretende reflejar dichas variaciones. Se contempla que las variantes AvPAL se administran aproximadamente dos veces por semana, aproximadamente una vez por semana, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez al mes o más de aproximadamente una vez al mes.

40 La presente invención puede usarse así para reducir los niveles de L-fenilalanina en sangre, plasma o suero. Numerosas afecciones relacionadas con el cáncer, en las que la depleción de los niveles de L-fenilalanina en sangre, plasma o suero sería beneficiosa, pueden ser tratadas con las composiciones farmacéuticas de la variante AvPAL de la invención.

45 Las composiciones farmacéuticas de AvPAL preparadas de acuerdo con la presente invención se administran preferiblemente por inyección parenteral, ya sea intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraarterial o intratecal. Sin embargo, sería evidente para un experto en la técnica que otras vías de suministro también podrían usarse de manera eficaz mediante las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

50 Los métodos descritos en la presente memoria usan composiciones farmacéuticas de AvPAL que comprenden las moléculas descritas anteriormente, junto con uno o más excipientes, vehículos, diluyentes, estabilizadores, conservantes, solubilizadores, emulsionantes, adyuvantes y/o soportes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. Dichos excipientes incluyen líquidos como agua,

salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, ciclodextrinas, ciclodextrinas modificadas (p. ej., ciclodextrinas de éter sulfobutílico), etc. Los excipientes adecuados para formulaciones no líquidas son conocidos también para los expertos en la técnica.

5 En las composiciones de la presente invención pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables e incluir, por ejemplo, sales de ácidos minerales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Se dispone de una minuciosa exposición de excipientes y sales farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

10 Además, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, como agentes de humidificación o emulsionantes, sustancias tampón biológicas, tensioactivos y similares. Un tampón biológico puede ser prácticamente cualquier solución que sea farmacológicamente aceptable y que proporcione la formulación con el pH deseado, por ejemplo, un pH en el intervalo fisiológicamente aceptable. Los ejemplos de soluciones tampón incluyen solución salina, solución salina con tampón de fosfato, solución salina con tampón Tris, solución salina con tampón de Hank, y similares.

15 Según el modo de administración pretendido, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, cremas, pomadas, lociones o similares, preferiblemente en forma de dosis unitaria adecuada para administración única de una dosificación precisa. Las composiciones incluirán una cantidad terapéuticamente eficaz de la PAL procariótica en combinación con un soporte farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes farmacéuticos, adyuvantes, diluyentes, tampones, etc.

20 En general, las composiciones farmacéuticas de AvPAL de la presente invención se administrarán como formulaciones farmacéuticas que incluyen las adecuadas para administración oral (lo que incluye bucal y sublingual), rectal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal o parenteral (lo que incluye intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea y intravenosa) o en una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación. La forma preferida de administración es intravenosa con uso de un régimen posológico diario conveniente, que puede ajustarse según el grado de afección.

25 Para composiciones sólidas, los soportes sólidos no tóxicos convencionales incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sólida, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones líquidas administrables farmacéuticamente pueden prepararse, por ejemplo, por disolución, dispersión, etc., de una composición de variante PAL procariótica como se describe en la presente memoria y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un excipiente, como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar así una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que se debe administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas como agentes de humidificación o emulsionantes, agentes de tampón de pH, agentes tonificantes, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitano, acetato de trietanolamina sódico, oleato de trietanolamina, etc. Los métodos reales de preparación de dichas formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, al que se remite anteriormente.

30 Para administración oral, la composición adoptará en general la forma de un comprimido, cápsula o cápsula de gelatina blanda, o puede ser una solución acuosa o no acuosa, suspensión o jarabe. Los comprimidos y las cápsulas son las formas de administración oral preferidas. Los comprimidos y las cápsulas para uso oral incluirán en general uno o más soportes usados comúnmente como lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, como estearato de magnesio. Cuando se usan suspensiones líquidas, el agente activo puede combinarse con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse también agentes saborizantes, colorantes y/o edulcorantes. Otros componentes opcionales para su incorporación en una formulación oral en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, conservantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y similares.

35 Las formulaciones parenterales pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones, en formas sólidas o liofilizadas adecuadas para reconstitución, solubilización o suspensión en líquido antes de inyección, o como emulsiones. Preferiblemente, las suspensiones inyectables estériles se formulan según técnicas conocidas en la técnica que usan soportes, agentes de dispersión o humidificación y agentes de suspensión adecuados. La formulación inyectable estéril puede ser también una solución inyectable estéril o una suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, como disolventes o medios de suspensión se emplean convencionalmente aceites fijos, ésteres grasos o polioles estériles. Además, la administración parenteral puede implicar el uso de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida de manera que se mantenga un nivel constante de dosificación.

40 Las composiciones de AvPAL de la invención descritas en la presente memoria pueden administrarse a un paciente en dosis terapéuticamente eficaces para tratar el cáncer. La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichas

composiciones de AvPAL puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, como, por ejemplo, mediante la determinación de la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Normalmente se prefieren las composiciones de AvPAL que muestran índices terapéuticos elevados.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación está situada preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE₅₀ con toxicidad baja o mínima. La dosificación puede variar dentro de este intervalo según la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada. La dosis o cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse a partir de ensayos de cultivos celulares y de modelos animales.

Proteínas en la dieta

Además de administrar composiciones de PAL procariótica a pacientes con cáncer, se contempla que además pueden restringirse o modificarse las proteínas en la dieta de los pacientes. Los expertos en la técnica conocen diversas fórmulas de proteínas disponibles comercialmente para su uso en el tratamiento de PKU. Dichas fórmulas incluyen MAXIMOID, PHENEX 1, PHENEX 2 (Ross Laboratories, Liverpool, RU), LOFENALAC, FENIL-FREE (Mead-Johnson), y similares.

Los expertos en la técnica pueden usar las fórmulas de proteínas de referencia, que en general están libres de concentraciones de Phe. Las fórmulas de proteínas están suplementadas a menudo con aminoácidos en los que los pacientes de PKU presentan deficiencia. Dichos aminoácidos incluyen, por ejemplo, L-tirosina y L-glutamina.

Por otra parte, se sabe que la L-carnitina y la taurina, que están presentes normalmente en la leche humana y en otros alimentos de origen animal, también deben suministrarse además de la restricción de proteínas. En ciertas realizaciones, la L-carnitina puede suministrarse como 20 mg/100 g de suplemento proteínico, y la taurina puede suministrarse como 40 mg/100 g de suplemento proteínico con el fin de ayudar a suministrar cantidades de estos factores presentes normalmente en la leche humana y en los alimentos de origen animal.

Además, se remite a los expertos en la técnica a las 2000 National Academy of Sciences-National Research Council Dietary Reference Intakes para obtener un listado adicional de otros componentes, como vitaminas y minerales esenciales que deben suministrarse al paciente para asegurarse de que se están proporcionando otros suplementos a pesar de la restricción de proteínas en la dieta.

En referencia a la exposición anterior relativa a las cantidades totales de proteínas y las concentraciones de Phe en plasma deseables, un experto en la técnica será capaz de determinar la cantidad de restricción de proteínas en la dieta que se requiere y así en consecuencia ajustar la dieta del paciente. Tras la administración de PAL procariótica a ese sujeto, la determinación de si los métodos son eficaces comprenderá la determinación de las concentraciones de Phe en plasma del paciente según una base regular para garantizar que las concentraciones de Phe en plasma se mantienen en un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 µM y 60 µM, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 µM, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 µM. Más adelante se describen las pruebas para determinar dichas concentraciones. Preferiblemente, se consiguen concentraciones de menos del nivel de detección a entre aproximadamente 20 µM y 60 µM, más preferiblemente a menos de aproximadamente 20 µM y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 µM.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante de fenilalanina amoníaco-liasa procariótica (AvPAL) y un soporte farmacéuticamente aceptable para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, en donde la variante AvPAL tiene una mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con una PAL de tipo silvestre, y es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del sujeto a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 µM y 60 µM, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 µM, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 µM, y que comprende además la administración al sujeto de una dieta con restricción de proteínas (p. ej., sin fenilalanina).

Algunos métodos de la invención implican el uso combinado de AvPAL y restricción de proteínas en la dieta para obtener un resultado terapéutico en pacientes con diversas formas de cáncer. Para conseguir el resultado terapéutico apropiado en las terapias de combinación contempladas en la presente memoria, preferiblemente se administraría en general al sujeto la composición de PAL procariótica y la restricción en la dieta en una cantidad combinada eficaz producir el resultado terapéutico deseado (p. ej., una disminución de la concentración de Phe en plasma a un intervalo desde por debajo del nivel de detección hasta de modo óptimo aproximadamente 20 µM a 60 µM, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 µM, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 µM, mediante métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica). Este proceso puede implicar la administración de la composición de PAL procariótica y la composición terapéutica de proteínas en la dieta al mismo tiempo. Esto puede conseguirse mediante la administración de una única composición o

5 formulación de proteínas farmacológica que incluye todos los requisitos de proteínas en la dieta e incluye también la PAL procariótica dentro de dicha formulación de proteínas. Alternativamente, la proteína en la dieta (como suplemento o como una comida proteínica normal) se toma aproximadamente al mismo tiempo que una formulación farmacológica (comprimido, inyección o bebida) de la PAL procariótica. La PAL procariótica también puede formularse en una barra de proteínas u otro alimento como pasteles, panqueques o tortas, adecuados para su ingestión.

10 Como la administración de la PAL procariótica no generaría tirosina (a diferencia de administración de PAH), dicho tratamiento dará como resultado todavía que la tirosina es un aminoácido esencial para dichos pacientes. Por lo tanto, los suplementos con tirosina en la dieta pueden ser deseables para pacientes que reciben PAL procariótica en solitario en combinación con la terapia de proteínas en la dieta.

15 En otras alternativas, el tratamiento con PAL procariótica puede preceder o seguir a la terapia de proteínas en la dieta en intervalos comprendidos entre unos minutos y unas horas. Cuando la proteína y las composiciones de PAL procariótica se administran por separado, en general se aseguraría que no transcurriera un periodo de tiempo importante entre el tiempo de cada suministro, de manera que PAL seguirá siendo capaz de ejercer un efecto ventajoso en el paciente. En estos casos, se contempla que se administraría la PAL en aproximadamente 2-6 horas (antes o después) de la ingesta de proteínas en la dieta, en donde se prefiere sobre todo un tiempo de retardo de solo aproximadamente 1 hora. Se contempla que la terapia PAL será una terapia continua en la que se administra indefinidamente al paciente una dosis diaria de la PAL.

3. Terapia de combinación

20 Por otra parte, además de terapias basadas exclusivamente en el suministro de AvPAL y regulación de las proteínas en la dieta, los métodos de la presente invención contemplan una terapia de combinación con una composición que se dirige específicamente a uno o más de los síntomas del cáncer. Dichas composiciones incluyen, por ejemplo y no como limitación, agentes terapéuticos contra el cáncer y agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos.

Agentes terapéuticos contra el cáncer

25 De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, cualquier agente que ejerce un efecto terapéutico en las células cancerosas (p. ej., inhibición de la proliferación y/o la supervivencia) puede usarse como agente terapéutico contra el cáncer en combinación con las composiciones de AvPAL de la invención. Típicamente, el agente terapéutico contra el cáncer es un agente citotóxico o un agente citostático.

30 El agente terapéutico contra el cáncer puede administrarse como una coterapia contra el cáncer con las composiciones de AvPAL de la invención. La expresión "coterapia contra el cáncer" como se emplea en esta memoria significa que el agente terapéutico contra el cáncer y la composición de PAL procariótica se administran de forma simultánea o en secuencia, ya sea el agente terapéutico contra el cáncer seguido por la composición de PAL procariótica, a la inversa.

35 Las clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auriestatinas, ligantes de surcos menores de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes de alquilación (p. ej., complejos de platino como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinuclear y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos de preformación, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de vinca, y similares.

40 Los agentes citotóxicos individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citidina arabinósido, citocalasina B, dacarbacina, dactinomicina (antes actinomicina), daunorrubicina, decarbacina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbicina, estreptoizotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

45 En algunas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer es un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolaestatinas (p. ej., auriestatina E, AFP, MMAF, MMAE), ligantes de surcos menores de ADN (p. ej., enodiínas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (p. ej., paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretaestatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina y mitoxantrona.

55 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico convencional como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, pueden usarse agentes potentes como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolaestatina 10,

rizoxina y palitoxina.

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un agente ligante de surco menor de ADN, por ejemplo, un compuesto CBI o una enodifina (p. ej., caliqueamicina).

5 En ciertas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer es un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, pero no se limitan a, taxanos (p. ej., TAXOL (paclitaxel), TAXOTERE (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de vinca (p. ej., vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y dolaestatinas (p. ej., auriestatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de la bacatina, análogos del taxano (p. ej., epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretaestatinas, discodermolida y eleuterobina.

10 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina, por ejemplo, maitansina o DM-1.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer es un radioisótopo. En otras realizaciones más, el agente terapéutico contra el cáncer no es un radioisótopo.

15 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (p. ej., azotioprina o micofenolato mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (p. ej., metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavirina, azidotimidina, citidina arabinósido, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

20 En otras realizaciones, el agente citotóxico es tacrolimus, ciclosporina o rapamicina. En realizaciones adicionales, el agente citotóxico es aldesleucina, alemtuzumab, alitreinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, darbapoyetina alfa, denileucina difitox, dexrazoxana, propionato de dromostanolona, epirubicina, epoetina alfa, estramustina, exemestano, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserrelina, idarrubicina, ifosfamida, imatinib mesilato, interferón alfa-2a, irinotecán, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, nandrolona fenpropionato, oprelvecina, oxaliplatino, pamidronato, pegademas, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobromano, plicamicina, porfímero de sodio, procarbina, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina y zoledronato.

30 En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante de fenilalanina amoníaco-liasa procariótica (AvPAL) y un soporte farmacéuticamente aceptable para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde la variante AvPAL tiene una mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con una PAL de tipo silvestre, y es eficaz para reducir la concentración de Phe en sangre, suero o plasma del sujeto a un intervalo desde por debajo del nivel de
35 detección a entre aproximadamente 20 μM y 60 μM , preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μM , y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μM , y que comprende además la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico contra el cáncer.

Agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos

40 De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, cualquier agente que ejerce un efecto terapéutico en células cancerosas específicas (p. ej., inhibición de la proliferación y/o la supervivencia) puede usarse como el agente terapéutico contra el cáncer dirigido en combinación con las composiciones de AvPAL de la invención. Típicamente, el agente terapéutico contra el cáncer dirigido es un anticuerpo o una enzima o proteína que se une selectivamente a un tipo de células o tejidos tumorales en particular, por ejemplo y no como limitación, debido a que
45 tiene un dominio de dirigido de tipo anticuerpo o por medio de unión mediada por receptor. El anticuerpo, el polipéptido que tiene un dominio de dirigido de tipo anticuerpo, la enzima o la proteína pueden estar radiomarcados, o pueden conjugarse con una toxina u otro agente que es capaz de ejercer un efecto citotóxico o citostático en las células o tejidos diana. Alternativamente, el agente terapéutico contra el cáncer dirigido puede ser un agente que ejerce un efecto terapéutico en células o tejidos cancerosos específicos (p. ej., inhibición de proliferación y/o
50 supervivencia) debido a la inhibición o activación de una proteína, por ejemplo y no como limitación, una enzima o un receptor, que preferiblemente se expresa o está activo en este tipo de célula o tejido tumoral en particular.

El agente terapéutico contra el cáncer dirigido puede administrarse como una coterapia contra el cáncer dirigida con las composiciones de AvPAL de la invención. La expresión "coterapia contra el cáncer dirigida" significa que el agente terapéutico contra el cáncer dirigido y la composición de PAL procariótica se administran de forma simultánea
55 o en secuencia, ya sea el agente terapéutico contra el cáncer dirigido seguido por la composición de PAL procariótica, o a la inversa.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer dirigido es un anticuerpo monoclonal anti-HER2

humanizado, RITUXAN (rituximab; Genentech; un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico); OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; un anticuerpo IgG2a murino); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD; Campath I/H (Leukosite, MA; un anticuerpo IgG1 humanizado); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado anticuerpo); LymphoCide (Inmunomedics, Inc., NJ; un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado); Oncolym (Techniclone, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-Dr10 murino radiomarcado); Allomune (BioTransplant, CA; un AcM anti-CD2 humanizado); Avastin (Genentech, Inc., CA; un anticuerpo humanizado anti-VEGF); Epratuzamab (Inmunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA; un anticuerpo anti-CD22); y CEAcide (Inmunomedics, NJ; un anti-CEA humanizado).

Otros anticuerpos adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125, CA 15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alfa fetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno prostático específico, fosfatasa ácida prostática, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, receptor anti-transferrina, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, antígeno prostático específico, receptor de IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, gonadotropina coriónica humana, CD38, CD40, mucina, P21, MPG y producto oncogénico Neu.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer dirigido es una enzima u otra proteína que tiene un dominio de dirigido de tipo anticuerpo o que tiene la capacidad de unirse selectivamente a células o tejidos en particular (p. ej., por unión de ligando-receptor). Típicamente, la proteína que tiene un dominio de dirigido de tipo anticuerpo, enzima u otra proteína se conjuga con un agente terapéutico contra el cáncer, por ejemplo, un compuesto o péptido/polipéptido, como una toxina, p. ej., ricina, toxina diftérica, endotoxina de *Pseudomonas* y similares (Kreitman, AAPS J. 8(3):E532-E551 (2006)) u otro agente que es capaz de ejercer un efecto citotóxico o citostático en las células o tejidos diana.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico contra el cáncer dirigido es un compuesto (p. ej., molécula pequeña o péptido/polipéptido) que ejerce un efecto terapéutico en células o tejidos cancerosos específicos, por ejemplo, un inhibidor de la serina/treonina cinasa, un inhibidor de la tirosina cinasa, un agonista de receptor nuclear, un antagonista de receptor nuclear, y similares.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante de fenilalanina amoniaco-liasa procariótica (AvPAL) y un soporte farmacéuticamente aceptable para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, en donde la variante AvPAL tiene una mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o una inmunogenicidad reducida en comparación con una PAL de tipo silvestre, y es eficaz para reducir la concentración de Phe en sangre, suero o plasma del sujeto a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a entre aproximadamente 20 μ M y 60 μ M, preferiblemente a menos de aproximadamente 20 μ M, y más preferiblemente todavía a menos de aproximadamente 10 μ M, y que comprende además la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico contra el cáncer dirigido.

4. Identificación y seguimiento de poblaciones de pacientes

Tal como se describe en la presente memoria, será necesario determinar si un paciente dado con cáncer puede responder a la terapia con PAL procariótica, y determinar las concentraciones de fenilalanina (Phe) del paciente tanto inicialmente como durante un régimen terapéutico en curso para llevar un seguimiento de la eficacia del régimen en términos de reducción en la concentración de Phe en plasma. Más adelante en la presente memoria se describen ejemplos de dichos métodos.

Identificación de pacientes que responden a la terapia con PAL procariótica

La identificación de pacientes para los que el tratamiento con las composiciones de PAL procariótica puede ser útil puede realizarse sobre la base de experimentos de cultivo *in vitro* o estudios de xenoinjertos de tumores humanos *in vivo* en ratones, o por comparación con tipos tumorales con dependencia conocida o demostrada de Phe para su crecimiento y su sensibilidad a la restricción o agotamiento de Phe en modelos animales de cáncer humano.

Los experimentos de cultivo *in vitro*, en los que las células tumorales (p. ej., de una biopsia tumoral o un aspirado clínico) se cultivan en ausencia o presencia de una composición de PAL procariótica o en ausencia o presencia de un medio deficiente en fenilalanina, pueden realizarse mediante protocolos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Abell, et al., *Cancer Res.* 32:285-290 (1972); Stith, et al., *Cancer Res.* 33:966-971 (1973); Fu, et al., *Cancer Res.* 59:758-765 (1999); Fu, et al., *J. Cell. Physiol.* 209:522-534 (2006); Elstad, et al., *Nutr. Cancer* 25:47-60 (1996); Nunez, et al., *Cancer Lett.* 236:133-141 (2006)). Véase también el EJEMPLO 14.

Los estudios de xenoinjerto de tumores humanos *in vivo* en ratones, en los que se inyectan células tumorales (p. ej., de una biopsia de tumor o un aspirado clínico) en ratones sin sistema inmune o SCID, y después se trasplantan a ratones sin sistema inmune o SCID nuevos en ausencia o presencia de una composición de PAL procariótica o en ausencia o presencia de una dieta deficiente en fenilalanina, pueden realizarse mediante protocolos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Abell, et al., *Cancer Res.* 33:2529-2532 (1973); Shen, et al., *Cancer Res.* 37:1051-105 (1977); Fu, et al., *Nutr. Cancer* 31:1-7 (1998); Fu, et al., *Nutr. Cancer* 45:60-73 (2003); Meadows, et al., *Cancer Res.*

42:3056-3063, 1982; Elstad, et al., *Anticancer Res.* 13:523-528, (1993)). Véase también EJEMPLO 15.

Los tipos tumorales con dependencia conocida o demostrada de Phe para su crecimiento y su sensibilidad a la restricción o agotamiento de Phe en modelos animales de cáncer humano incluyen, por ejemplo, leucemia, mieloma metastásico y cáncer de próstata independiente de andrógenos (Abell, et al., (1973), *ibíd.*; Shen, et al., (1977), *ibíd.*; Fu, et al., (1998), *ibíd.*; Yu, et al., (2003), *ibíd.*; Meadows, et al., (1982), *ibíd.*; Elstad, et al., (1993), *ibíd.*).

El EJEMPLO 14 muestra que la proliferación y/o supervivencia de células tumorales obtenidas de cáncer de pulmón, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer renal, melanoma metastásico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, leucemia (p. ej., leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblástico aguda) y mieloma es sensible a la restricción de Phe tras la incubación con una composición de AvPAL de la presente invención.

Determinación de concentraciones de fenilalanina

Los métodos para determinar la concentración de fenilalanina (Phe) en sangre, suero o plasma son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en la anterior solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente, n.º 11/230.374 presentada el 19 de septiembre de 2005. Se contempla que los niveles de Phe en plasma de los pacientes serán objeto de seguimiento en intervalos convenientes (p. ej., diariamente, cada dos días o semanalmente) durante el curso de tiempo del régimen terapéutico. Mediante el seguimiento de los niveles en plasma de Phe con esta regularidad, el clínico podrá evaluar la eficacia del tratamiento y ajustar en consecuencia la PAL procariótica y/o los requisitos de proteínas en la dieta.

E. Producción de PAL procariótica

Otro aspecto es un método para producir PAL procariótica o un fragmento, variante mutante o análogo biológicamente activo de la misma. La PAL procariótica recombinante o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma están sobreexpresados, con o sin una marca en el extremo N (p. ej., marca de octahistidilo), en un vector, preferiblemente pIBX1 (Su, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2723-2734 (1996)) o pET28a (Invitrogen) con un promotor inducible como con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido), en células de *E. coli* BLR(DE3)/pLysS (Novagen) o *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Invitrogen). Se cultiva el cultivo de siembra para un biorreactor/fermentador a partir de una cantidad de glicerol en matraces de agitación. Dicho cultivo de siembra se usa a continuación para picos en un biorreactor controlado en modo de alimentación por lotes. La glucosa se suplementa y el pH se controla con una base (NH₄OH) y se realiza agitación a 1.200 rpm. El suministro de O₂ mantiene el oxígeno disuelto en más del 20%. Las células se cultivan a una temperatura de 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 70-100 (~22-25 h) y después se induce con IPTG 0,4 mM. La temperatura se reduce a 30°C y se cultiva hasta que el cambio de actividad es < 0,1 UI/ml (aproximadamente 40-48 h y una DO₆₀₀ típicamente de 200). El medio de cultivo celular se define de forma típica y está compuesto por proteína de extracto de levadura, peptona-triptona, glucosa, glicerol, casaminoácidos, sales traza y sales de tampón de fosfato. El producto de la PAL procariótica recombinante o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo del mismo es producido de forma intracelular y no se secreta. Las bacterias se recogen mediante centrifugación continua (Alfa-Laval, Carr, Ceba o equivalente).

F. Purificación de la PAL procariótica

Un aspecto adicional consiste en un método para purificar PAL procariótica o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma. Se cultiva una masa de células transformadas y se rompe para dejar una enzima recombinante en bruto. Los materiales exógenos se separan normalmente de la carga en bruto para evitar que se ensucien las columnas. Se realiza purificación cromatográfica mediante una o varias resinas cromatográficas. Posteriormente, se formula la proteína purificada en un tampón diseñado para proporcionar actividad estable durante un periodo de tiempo extendido. El método para purificar la PAL procariótica o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma comprende: (a) lisis de las bacterias que contienen PAL procariótica recombinante o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo de la misma que usan un homogeneizador de presión (aunque potencialmente por otros medios físicos como lisis en perlas de vidrio); (b) tratamiento por calor; (c) aclaramiento de este lisado mediante una segunda etapa de centrifugación continua y/o filtración en profundidad (por ejemplo con filtros Cuono Zeta Plus o Maximizer, Pall Filtron, o Millipore Millistak o Opticao); (d) paso a través de una etapa de filtración con carbón (por ejemplo con Millipore Millistak 40AC); (e) paso a través de una etapa de filtración final (por ejemplo con filtro Sartorius Sartopore de 0,2 µm); (f) paso sobre una cromatografía de interacción hidrófoba de butilo (por ejemplo en Toyopearl Butyl 650M de Tosoh Biosciences); (g) paso sobre una columna de intercambio iónico Q (por ejemplo Macroprep High Q de BioRad); y (h) recuperación del producto final por intercambio de tampón con filtración de flujo tangencial (por ejemplo con una membrana Sartorius Hydrosart o PES de 100 kDa). Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que puede omitirse o sustituirse una o más de las etapas de cromatografía, o que el orden de las etapas de cromatografía puede modificarse. Finalmente, pueden realizarse las etapas de esterilización apropiadas según se desee.

Una vez descrita la invención en general, la misma puede comprenderse más fácilmente a través de la siguiente

referencia a los ejemplos siguientes. Los ejemplos se ofrecen solamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), aunque naturalmente debe permitirse cierto error experimental y desviación.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

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

Manipulaciones de ADN

10 Se adquirió ADN genómico de *N. punctiforme* de ATCC (29133D) y el gen PAL (ZP_00105927) se amplificó por PCR a partir de cebadores 5'-C ACTGTCATATGAATATAACATCTCTACAACAGAACAT-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.

15 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'-CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO: 14) y el cebador 2 (5'-GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO: 15) se usaron para amplificar los nucleótidos 1-1.190 y el cebador 3 (5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO: 16) y el cebador 4 (5'-CACTGTGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO: 17) se usaron para amplificar los nucleótidos 1.142-1.771. 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), después se digirió con NotI. El fragmento de 1,7 kb se ligó en pET-28a(+) y pET-30a(+) (Novagen). Este plásmido recibió el nombre de 3p86-23.

25 El gen PAL de *A. variabilis* (AvPAL) también se clonó en el vector pIBX7 (Tkalec, et al., Appl. Environ. Microbiol. 66:29-35 (2000)), que se obtuvo de pIBX1 (Su, et al., Appl. Environ. Microbiol. 62:2723-2734 (1996)) (véase EJEMPLO 7).

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

30 Para PAL de *N. punctiforme* (NpPAL), las células de *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) se transformaron con células pGro7 (TaKaRa) y se prepararon BL21(DE3)pGro7 competentes por el método de Inoue (Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª 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 toda la noche a 37°C. Se sembraron 20 ml de este cultivo 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, se enfrió el cultivo en hielo. Después de 5 minutos, se indujo el cultivo 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.

40 La AvPAL clonada en el vector pIBX7 (véase EJEMPLO 7) se introdujo por transformación en células BLR(DE3)pLysS (Novagen) y se cultivó en 25 ml de LB con 50 mg/L de kanamicina durante toda la noche a 37°C. Se sembraron 20 ml de este cultivo en 1 L de medio LB con kanamicina, y se cultivó a 37°C. A una DO₆₀₀ de 0,6, se enfrió el cultivo en hielo. Después de 5 minutos, se indujo el cultivo con IPTG 0,3 mM y se cultivó durante 16 horas a 30°C. Las células se recolectaron por centrifugación.

Ejemplo 2

45 Purificación de NpPAL y AvPAL

Los cultivos se centrifugaron en una centrífuga de mesa a 5.000 g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Los sedimentos celulares se congelaron típicamente a -70°C antes de tratamiento posterior. Después de descongelar, 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). Se lisaron las células mediante dos pasadas a través de un homogeneizador de presión APV a 82.737,09-96.526,60 kPa (12-14.000 psi). A continuación el lisado en bruto se trató por calor a 55°C durante 2 horas. Se centrifugó el lisado a 10.000 g durante 30 minutos y se retuvo el sobrenadante y se filtró con un filtro de vacío de 0,2 µm (Corning).

Se purificó la PAL a partir del lisado aclarado por el paso secuencial sobre una columna 650M de butilo (Tosoh

BioSciences) y una columna MacroPrep High Q (BioRad). El producto eluido presentó un alto nivel de pureza por SDS PAGE y HPLC de fase inversa.

Ejemplo 3

Generación de variantes de PAL pegiladas

- 5 A continuación se describe un método para pegilación de PAL a partir de *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL). Se describen métodos similares para pegilación de PAL procariótica (p. ej., *Nostoc punctiforme* (NpPAL) o *Anabaena variabilis* (AvPAL)) en el EJEMPLO 6.

Pegilación de proteínas

10 La pegilación usa modificaciones de los métodos de la bibliografía (Hershfield, et al., (1991), *ibíd.*; patente de EE.UU. 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 las hidrosuccinimidias PEG ramificadas (éster de mPEG₂-NHS, 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 determinación experimental de proteínas pegiladas óptimas (Veronese, et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:196-207 (1997)). Las condiciones óptimas de pegilación se determinan usando diferentes proporciones de PAL:PEG (teniendo en cuenta la razón molar de proteína junto con el número de lisinas por monómero de proteína), diferentes pH, diferentes tampones, diversas temperaturas y tiempos de incubación. Se necesitan proporciones elevadas de derivatización de proteína PAL:PEG dado que la PAL nativa tiene un gran número de lisinas (29 por monómero de *Rhodospiridium toruloides* (Rt)) y dado que la PAL no modificada presenta inmunorreactividad tras inyecciones repetidas en ratones y que la PAL desnuda (tipo silvestre) es inactivada rápidamente tras 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.

25 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 de fosfato de potasio 0,05 M pH 8,5, durante toda la noche a 4°C con agitación usando dializadores Tube-O (GenoTechnology). Después de determinar la concentración de proteínas usando el equipo de ensayo de proteínas NI (GenoTechnology), las mediciones de la actividad PAL se realizarán en muestras de PAL no derivatizadas y derivatizadas con PEG usando condiciones de reacción estándar, como se describe anteriormente. Después de caracterización *in vitro*, se realizarán ensayos *in vivo* con los candidatos terapéuticos pegilados más prometedores usando el modelo de ratón de PKU.

Caracterización

35 La concentración de proteínas se determina mediante el coeficiente de extinción de la PAL (0,5 y 0,75 mg mL⁻¹cm⁻¹ para RtPAL y AvPAL, respectivamente) a 280 nm para muestras de proteínas no modificadas y para muestras de proteínas pegiladas la concentración se calcula con el ensayo de proteínas NI (GenoTechnology) que incluye tratamiento de muestras para eliminar contaminantes no proteínicos que podrían interferir con una determinación precisa de la concentración de proteínas.

40 Los productos de PEG-PAL se caracterizan por técnicas de cartografía de péptidos para determinar la pegilación específica del sitio (LC/ESI-MSD), y sulfonato de trinitrobenzoceno (TNBS) para determinar la titulación de aminas libres antes y después de la pegilación. La cartografía de péptidos determina la ocupación relativa de pegilación en una mayoría de los péptidos trípticos que terminan con lisina, sin embargo, debido al tamaño y a múltiples péptidos trípticos de lisina adyacentes, no todos los sitios son visibles con el uso de esta técnica. El ensayo de TNBS define de forma más precisa el número medio de moléculas PEG por mol de enzima, pero no ofrece información acerca de los sitios que experimentan pegilación. Por este motivo se usan los dos ensayos y son complementarios entre sí. Las estimaciones aproximadas de porcentaje de derivatización de los productos de PAL por PEG pueden determinarse mediante SDS-PAGE y análisis de gel nativos. Se usan ensayos enzimáticos para evaluar la actividad específica antes y después de pegilación y para proporcionar evidencias de que no existe pérdida de la estructura PAL tetramérica.

Ensayo de actividad de PAL

50 El ensayo de actividad de la PAL se realiza mediante un espectrofotómetro Cary UV (Cary 50) en el modo de cinética. La actividad de la PAL con el sustrato de L-fenilalanina se ensaya a temperatura ambiente (25°C) midiendo 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 10.238 litros M⁻¹ cm⁻¹. Las mezclas de reacción contienen fenilalanina 22,5 mM en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,5. Para medidas estándar la concentración final de enzimas es 0,0035 mg/ml, pero para estudios cinéticos la concentración de enzimas en el ensayo se ajusta de manera que la pendiente en 290 nm por min esté en el intervalo de 0,005 a 0,02. Los datos de actividad se expresan como actividad específica (μmol x min⁻¹mg⁻¹). Una unidad de la 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 semivida *in vitro* e inmunogenicidad

Después de la caracterización bioquímica, los candidatos PEG-PAL más prometedores se analizan para detectar la inmunorreactividad frente a los anticuerpos generados por ratones PKU a los que se inyectó PAL nativa (no pegilada) usando tres técnicas diferentes y complementarias (transferencia Western, ELISA e inmunoprecipitación (IP)).

Para el análisis de transferencia Western, se usa el antisuero PAL (de ratones a los que se inyectó PAL nativa) en una dilución 1: 10.000. Como control negativo se usa también el suero de los ratones tratados con tampón en la misma dilución. Se diluye el anticuerpo secundario, la anti-IgG de ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Promega), a 1:5.000 y el color se desarrolla con el sustrato AP Western Blue (Promega). La prueba de ELISA se realiza usando placas Nunc/Immuno Maxisorp (Nalge Nunc International) según los procedimientos estándar que usan 1 mg/ml de la PAL en PBS y se bloquea con PBS, Tween-20 al 0,05%, BSA al 2%. Se diluyen los antisueros de ratón (de ratones expuestos a PAL nativa) a 1:10.000 en solución de bloqueo EB (PBS, Tween-20 al 0,05%, BSA al 2%), y se usa una anti-IgG de ratón de cabra HRP como anticuerpo secundario con TMB usado para detección a 450 nm.

La inmunoprecipitación se usa para probar la unión de anticuerpo PAL. Las muestras de proteína (PAL o PAL pegilada) se incuban en tampón TTBS (solución salina con tampón Tris con Tween al 0,1%) y la actividad PAL se mide antes de añadir la muestra de anticuerpo. Cada muestra se incuba con exceso de 8 veces de suero anti-PAL de control positivo y una reacción de control negativa en duplicado usando suero de ratón no inmune. Después de la incubación, se añade la proteína G Sefarosa 4 (50%, volumen/volumen) 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 toda la noche con rotación. Los sobrenadantes se recuperan por centrifugación y la actividad PAL de cada muestra se somete a ensayo en los sobrenadantes. Los sedimentos de las perlas no se descartan, de manera que se puede realizar un análisis adicional por transferencia Western. Para confirmar que la unión de anticuerpo-perla ha tenido lugar, se usa la transferencia Western para detectar el antígeno de PAL en las perlas. Las perlas que se han recuperado por centrifugación después de la etapa de unión a PAL se lavan varias veces con tampones TTBS y TBS. Después de estos aclarados, se añade tampón de carga de SDS-PAGE a las perlas y se calientan las muestras a 95°C durante 5 minutos. A continuación se analizan las muestras por transferencia Western usando antisuero de PAL. Las variantes de enzimas que muestran una baja unión a anticuerpos tienen una PAL baja correspondiente en las fracciones de perlas en sedimento detectado por transferencia Western y muestran mayores actividades restantes en el sobrenadante en comparación con la PAL nativa no modificada que muestra una alta unión al anticuerpo.

Ejemplo 5

Prueba de sensibilidad de proteasa

Los estudios de cartografía de la proteasa en PAL nativa de *R. toruloides* han indicado los sitios primarios de sensibilidad proteolítica. La eliminación de dichos sitios puede reducir o eliminar la sensibilidad proteolítica y contribuir al desarrollo de un sustituto de la enzima PKU eficaz. Sin embargo, la eliminación de dichos sitios para la sensibilidad proteolítica puede dar como resultado la reducción o la pérdida de actividad enzimática.

Después de que la ingeniería de proteínas ha creado mutantes de PAL (y PEG-PAL) mejorados que conservan la actividad, la detección de la resistencia a la proteasa mediante incubación con un cóctel de tripsina/quimotripsina proteasa, seguido por el seguimiento para la retención de actividad (por medio de la medida de DO₂₉₀) y la reducción de la escisión de la proteína (por medio de análisis en gel PAGE) permite la identificación de mutantes con propiedades *in vitro* apropiadas para su uso en las pruebas *in vivo*.

La estabilidad proteolítica se evaluará mediante incubación con un cóctel de proteasas que se aproxima al medio intestinal y contiene tripsina 2,3 mM, quimotripsina 3,5 mM, carboxipeptidasa A 3,05 mM y carboxipeptidasa B 3,65 mM. Las pruebas de proteólisis implicarán incubaciones enzimáticas, adición de proteasas a las soluciones PAL, para determinar el grado de sensibilidad de proteasa para las diferentes variantes de proteínas sometidas a examen (proteína nativa o mutante con o sin pegilación u otra modificación química), lo que incluye los cursos de tiempo de retención de la actividad y retención de la estabilidad después de la exposición a la proteasa. Se usarán experimentos de cartografía por espectrometría de masas SDS-PAGE y MALDI-TOF para determinar la localización de cualquier sitio sensible a la proteasa (Kriwacki, R. W., et al., J. Biomol. Tech. 9(3):5-15 (1980)). Estos resultados de cartografía serán importantes para determinar los sitios primarios de susceptibilidad a la proteasa (como los dos sitios primarios ya identificados), de manera que puedan eliminarse todos los sitios de sensibilidad principales por medio de protección por pegilación y/o mutación para eliminar y/o proteger las regiones susceptibles de la arquitectura PAL.

Ejemplo 6

Generación de NpPAL y AvPAL PEGiladas

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

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

- 5 1) La proteína se evaluó en términos de la presencia de endotoxina. Se diluyó una solución de proteína (0,1 ml) en 0,9 ml de agua MQ fresca y se probó con un aparato Charles River manual (EndoPTS) en cuanto a presencia de endotoxina en el nivel de sensibilidad 0,5 EU/ml. Si la endotoxina era superior a 0,5 EU/ml, entonces la endotoxina se redujo inicialmente por filtración Mustang E, seguido por resina Sterogene Etox, y menos preferiblemente por purificación cromatográfica adicional. La reducción fue limitada pero suficientemente útil mediante el paso sobre DEAE FF (Amersham) a pH 7,8.
- 10 2) Concentración e intercambio de tampón de proteína. Se concentró la proteína a más de 25 mg/ml pero menos o igual que 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 probó primero para determinar la endotoxina por centrifugación a velocidad y tiempo reducidos (3.000 rpm, 3 minutos) con tampón en solitario, y después se probó el tampón retenido para determinar la endotoxina de la misma forma que la proteína en la etapa 1. El registro/receta de lote de tampón para KPO₄ 50 mM, pH 8,5 consistía en agua (QS a 1 L), fosfato de potasio dibásico (8,4913 g/L de 48,75 mM) y fosfato de potasio monobásico (0,17011 g/L de 1,25 mM). Se filtró la solución a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó a temperatura ambiente. Se filtró lentamente el producto concentrado (1-2 ml/min) a través de un filtro Mustang E Acrodisc. Se midió una muestra diluida y sellada con TBS estéril, pH 7,5 a A280 para determinar la concentración de proteínas. El coeficiente de extinción fue de 0,83 para NpPAL y 0,75 para AvPAL.
- 15 3) PEGilación de NPPAL y AvPAL. PEG almacenado normalmente a -80°C se calentó a temperatura ambiente. Se añadió tampón KPO₄ a PEG para resuspender por agitación en vórtex a velocidad máxima, y agitación manual fuerte para garantizar que todos los pedazos grandes se suspendieron. Se añadió la proteína a la solución de PEG bien suspendida dentro de un minuto después 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 balancearon muy suavemente a temperatura ambiente durante 3 horas. Los tubos se llenaron con TBS (pH 7,5) y se filtraron de forma estéril. Las suspensiones se formularon inmediatamente o se almacenaron a 4°C hasta que estuvieron listas para formulación.
- 20 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 mediante un Vivaflow 50 (lotes pequeños) o Vivaflow 200 (lotes grandes) con una membrana de celulosa regenerada MWCO 100. La solución se lavó con agua MQ, NaOH 0,1 N y de nuevo 200 ml de agua. La solución se equilibró con TBS, pH 7,5 a 50 ml/min de flujo transversal. Se determinó el pH del permeado para garantizar un pH de 7,5.
- 25 La solución se intercambió con el tampón mediante primero la dilución con TBS aproximadamente 3 veces y el retorno al volumen original al menos cuatro veces. El flujo transversal fue típicamente de 180-200 ml/min para Vivaflow 50 y 200.

30 Se filtró el producto final a través de Mustang E. Se evaluó la presencia de endotoxina después de diluir 0,1 ml con 1,9 ml de agua fresca estéril. Si la endotoxina era de más de 1 EU/ml, se llevó a cabo la reducción con gel Sterogene Etox. Se selló la NpPAL o AvPAL PEGilada estéril en viales y se colocó -70°C hasta que estuvo lista para estudios *in vivo*.

Ejemplo 7

Generación de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

35 Se realizaron sustituciones de aminoácidos en la el polipéptido AvPAL para reducir la agregación que tiene lugar en proteínas recombinantes expresadas en bacterias. La agregación de proteínas puede reducir la actividad enzimática y/o aumentar la inmunogenicidad *in vivo*. Una de estas formas de agregación tiene lugar como resultado de la formación de enlaces de disulfuro intercatenarios. Para minimizar esta posibilidad, diversos residuos de cisteína AvPAL, en solitario o en combinación, se sustituyeron por residuos de serina.

40 El polipéptido AvPAL tiene 6 residuos de cisteína, en las posiciones 64, 235, 318, 424, 503 y 565 (SEQ ID NO: 4). Se generaron los siguientes mutantes de cisteína únicos 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). Se generó también un mutante de cisteína doble AvPAL, AvPAL_S565SC503S (SEQ ID NO: 11). La FIGURA 5A-5E presenta las secuencias de aminoácidos de estos mutantes de cisteína AvPAL.

Clonación

45 El gen AvPAL se amplificó a partir de ADN genómico de *Anabaena variabilis* (ATCC 29413 -U, Qiagen DNeasy Kit) con cebador directo 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 después se ligó en pCR2,1 TOPO TA (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó 1p40.

5 Se añadió un sitio 5' NheI y se eliminó un sitio NheI interno por SOE-PCR. El fragmento AvPAL en la dirección 5' 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 en la dirección 3' se amplificó a partir de 1p40 con cebador directo Nhe-AvPALfor (5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO: 22) y cebador inverso AvPALrev-r (5'-ACAGTGGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO: 23). En una sola reacción de PCR, se hibridaron los dos productos de PCR y se extendieron con ADN polimerasa para producir el gen AvPAL de longitud completa, y después se amplificó con 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.

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

Mutantes de cisteína

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

35 Los codones de cisteína en el gen AvPAL en las posiciones 64, 318 y 565 del polipéptido AvPAL se sustituyeron de forma similar por codones de serina que usan los siguientes pares de cebadores: C64S, cebador directo Av_C64S (5'-GCAGGGTATTACGGCATCTTCTGATTACATTAATAATGCTGTTG-3') (SEQ ID NO: 30) y cebador inverso Av_C64Srev (5'-CAACAGCATTATTAATGTAATCAGAGAGATGCCTGAATACCCTGC-3') (SEQ ID NO: 31); C318S, cebador directo Av_C318S (5'-CAAGATCGTTACTCACTCCGATCCCTTCCCAGTATTTGGGGC-3') (SEQ ID NO: 32) y cebador inverso Av_C318Srev (5'-GCCCAATAACTGGGGAAGGGATCGGAGTGAGTAACGATCTTG-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 de G a C en las cadenas codificantes y las mutaciones de C a G en las cadenas no codificantes se indican en negrita.

Ejemplo 8

Actividad enzimática *in vitro* de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

45 El propósito de este estudio era determinar el efecto de la sustitución de serina de los diversos residuos de cisteína en el polipéptido AvPAL en la actividad enzimática *in vitro* de fenilalanina amoníaco-liasa (PAL).

Se clonaron variantes AvPAL p. ej., mutantes de cisteína) como se describe en el EJEMPLO 7. Se transformaron los plásmidos de expresión de los mutantes de cisteína AvPAL en bacterias y se expresaron los polipéptidos del mutante de cisteína AvPAL como se describe en el EJEMPLO 1 y se purificó como se describe en el EJEMPLO 2.

50 Se analizaron los mutantes de cisteína AvPAL de tipo silvestre (WT) y AvPAL para determinar la actividad enzimática PAL *in vitro* como se describe en el EJEMPLO 3. La Tabla 1 presenta que en comparación con AvPAL WT no pegilada, la actividad específica de PAL *in vitro*, las proteínas de mutante de cisteína AvPAL se redujo mediante sustitución de serina del residuo de cisteína en la posición 64 (AvPAL_C64S), pero no se vio afectada negativamente por la sustitución de serina de los residuos de cisteína en las posiciones 503 o 565, o en las posiciones 503 y 565 (AvPAL_C503S, AvPAL_C565S, y AvPAL_C565SC503S, respectivamente).

Tabla 1: Actividad específica de mutantes de cisteína AvPAL

Proteína AvPAL	Pegilación	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
AvPAL_C565SC503S	-	2,2
WT AvPAL	+	1,1
AvPAL_C565SC503S	+	1,1

5 Para determinar si la introducción de los residuos de serina tuvo algún efecto en la actividad enzimática de las proteínas de AvPAL pegilada, la AvPAL WT y el mutante de cisteína doble, se pegiló AvPAL_C565SC503S como se describe en el EJEMPLO 6. La Tabla 1 muestra que la actividad específica *in vitro* de PAL de la proteína de AvPAL pegilada no se vio afectada negativamente por la sustitución de serina de los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565.

Ejemplo 9

Caracterización bioquímica *in vitro* de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

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

Estabilidad acelerada

15 El efecto de la sustitución de serina de residuos de cisteína en AvPAL en la estabilidad *in vitro* se determinó mediante almacenamiento de los mutantes de cisteína AvPAL purificados, ya fueran pegilados o no pegilados, durante diversos periodos de tiempo a 37°C, y después la medida de la actividad específica *in vitro* de PAL de estas proteínas como se describe en el EJEMPLO 3.

Los mutantes de cisteína de AvPAL de tipo silvestre y AvPAL, ya fueran pegilados o no pegilados, se prepararon como se describe en el EJEMPLO 8.

20 Como se presenta en la FIGURA 6A, las actividades específicas de las proteínas AvPAL no pegiladas fueron estables durante al menos 5 días a 37°C, y no se vieron afectadas negativamente por la sustitución de serina de los residuos de cisteína en la posición 565, o en las posiciones 503 y 565. De modo similar, como se presenta en la FIGURA 6B, las actividades específicas de las proteínas AvPAL pegiladas fueron estables durante al menos 6 días a 37°C. El mutante de cisteína único AvPAL, AvPAL_C565S, presentó una estabilidad algo reducida en comparación con la AvPAL de tipo silvestre y la mutante de cisteína doble AvPAL, AvPAL_C565SC503S, después de 6 días a 37°C.

Formación de agregados

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

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

35 Las preparaciones de AvPAL purificadas se separaron por SEC-HPLC. Se cargaron las proteínas AvPAL en una columna en gel TSK (G3000SWxl, 7,8 mm x 30 cm, 5 µm (Tosoh Bioscience, LLC)) en fosfato de Na 20 mM, NaCl 300 mM, pH 6,9, y se eluyeron a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Las proteínas AvPAL separadas se analizaron en un espectrómetro Agilent serie 1100.

Los agregados estuvieron presentes en la preparación de AvPAL de tipo silvestre y en las preparaciones AvPAL_C503S y AvPAL_C64S, pero no en las preparaciones AvPAL_C565S y AvPAL_C565SC503S, valorado por

electroforesis en gel (FIGURA 7A) o por SEC-HPLC (FIGURA 7B).

Pegilación específica del sitio

El efecto de la sustitución de serina de residuos de cisteína en AvPAL en pegilación específica del sitio se determinó por pegilación de la AvPAL de tipo silvestre y el mutante de cisteína doble AvPAL_C503SC565S como se describe en el EJEMPLO 6, y después por comparación de 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 de AvPAL pegiladas o no pegiladas en urea 8 M. Después se digirieron las proteínas desnaturalizadas en un volumen de reacción de 100 µl con tripsina en urea 0,8 M a pH 8,2 durante toda la noche (~20 horas) a 37°C. Las proteínas digeridas con tripsina se redujeron por tratamiento con 1 µl de DTT 1 M durante 1 hora a 37°C, seguido por enfriamiento rápido con 3 µl de TFA al 15%. Se separaron las proteínas digeridas en una columna de fase inversa C18. Se calculó el porcentaje de pegilación de cada uno de los péptidos AvPAL pegilados por cartografía de péptidos sustractiva del péptido no pegilado correspondiente.

Como se presenta en la FIGURA 8, en una relación de proteína AvPAL:PEG de 1:3, no se observó ninguna diferencia notable en el porcentaje de pegilación de ninguno de los residuos de lisina (K) con la posible excepción de K419, en la que el porcentaje de pegilación de la mutante de cisteína doble C565SC503S fue menor en comparación con la AvPAL de tipo silvestre. Sin embargo, los resultados obtenidos usando la mutante de cisteína doble en proporciones crecientes de proteína AvPAL:PEG, en los que no se observó relación dosis-respuesta, tomados junto el porcentaje relativamente pequeño de pegilación, indica que las diferencias observadas en K1419 probablemente no son significativas. Así, la sustitución de serina de residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 no parece afectar a la pegilación específica del sitio de AvPAL.

Ejemplo 10

Mecanismo de agregación de las proteínas AvPAL

Se realizaron estudios para investigar el mecanismo de agregación de proteínas AvPAL expresadas en bacterias.

Mediante concentración de las preparaciones de AvPAL purificadas, e incubación de las soluciones de proteínas concentradas durante 2 horas a 37°C, se aceleró la agregación de proteínas AvPAL purificadas en solución. La agregación se detectó por separación de las proteínas AvPAL por SEC-HPLC. Para determinar si la reticulación del disulfuro fue responsable de la agregación, se añadió ditioneitol (DTT) 50 mM a la solución de proteínas concentrada, seguido por 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 usando un filtro giratorio (Millipore Biomax – 10K NMWL). Las proteínas se centrifugaron a aproximadamente 15.000 g durante unos minutos en una centrifuga Eppendorf 5415C. Para los mutantes de cisteína que tienden a agregarse (p. ej., AvPAL_C503S y AvPAL_C64S), las proteínas se concentraron a aproximadamente 20 mg/ml y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Para los mutantes de cisteína que son resistentes a la agregación (p. ej., 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 presenta en la Tabla 2, las preparaciones de mutantes de cisteína AvPAL purificadas AvPAL_C64S y AvPAL_C503S formaron agregados tras incubación durante 2 horas a 37°C. Como se esperaba, esta agregación se intensificó cuando las proteínas AvPAL se concentraron antes de incubación durante 2 horas a 37°C. La agregación podría ser bloqueada por exposición de las proteínas concentradas a DTT, lo que indica que la agregación se debe a la reticulación del disulfuro. En contraste, las preparaciones de mutantes de cisteína AvPAL purificados AvPAL_C565S y AvPAL_C565SC503S no formaron agregados tras 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 por medio de la reticulación del disulfuro.

Tabla 2: Agregación relacionada con la reticulación del disulfuro de 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	-

ES 2 602 618 T3

AvPAL_C503S	Concentrado + 37 °C/2 h	++
AvPAL_C64S	Concentrado + 37 °C/2 h	++
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	-

5 Para determinar cuáles son los residuos de cisteína que existen como sulfhidrilos libres, se desnaturalizó una preparación de AvPAL purificada en presencia de urea 8 M, se alquiló mediante 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 (datos no mostrados).

10 Para determinar los residuos de cisteína que están presentes en la superficie de la proteína nativa, primero se trató una preparación de AvPAL purificada con N-etilmaleimida (NEM), después de desnaturalizó en presencia de urea 8 M, se alquiló con yodoacetamida, se digirió con tripsina y se analizó por LC/MS. Los residuos de cisteína en las posiciones 235 y 424 no se alquilaron con NEM, y el residuo de cisteína en la posición 318 solo se alquiló parcialmente con NEM, lo que indica que los residuos de cisteína en las posiciones 64, 503 y 565 están en la superficie de AvPAL nativa y que el residuo de cisteína en la posición 318 está expuesto parcialmente en la superficie de AvPAL nativa (datos no mostrados).

15 Para determinar los residuos de cisteína que están implicados en la reticulación de disulfuro intercatenario, se desnaturalizaron 67 µl de una solución de 0,7 mg/ml de una preparación de AvPAL no pegilada purificada de tipo silvestre preparación y se alquiló en urea 8 M que contenía yodoacetamida 20 mM durante 1 hora a 37°C, y después se digirió en un volumen de reacción de 100 µl con tripsina a pH 8,2 durante toda la noche (~17,5 horas) a 25°C. Las proteínas digeridas con tripsina se separaron y se analizaron por espectrometría de masas, en la que se identificaron los péptidos correspondientes a los pares de disulfuro predichos y se cuantificó como recuentos de iones totales (TIC).

20 La Tabla 3 muestra que se detectaron pares de disulfuro para C503-C503, C503-C565, C565-C318 y C565-C565. Se encontraron residuos de cisteína en la posición 565, y en menor medida en la posición 503, en pares de disulfuro en la preparación de AvPAL purificada.

Tabla 3: 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
C503-C565	112
C565-C318	13

C565-C565	37
C318-C318	n.d.

no detectado

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

5 Las preparaciones de AvPAL purificadas se incubaron con Tween al 0,05% o EDTA 10 mM, y después se separaron por SEC-HPLC como se describe en el EJEMPLO 9. Tween reduce la agregación de proteínas debido a interacciones hidrófobas, y EDTA reduce la agregación de proteínas debido a la presencia de cationes divalentes. Como se presenta en la FIGURA 9, la exposición a Tween al 0,05% o EDTA 10 mM no tuvo ningún efecto en agregación de proteínas AvPAL. El pico adicional a 10 minutos en la AvPAL tratada con EDTA 10 mM se debe a absorbancia de EDTA a 210 nm.

10 Para investigar adicionalmente el papel de la reticulación de disulfuro en la agregación de proteínas AvPAL, se redujo AvPAL purificada por tratamiento con DTT y después se desalinizó antes de la separación por SEC-HPLC. Como se presenta en la FIGURA 10A, la agregación de proteínas AvPAL se minimizó mediante tratamiento con DTT, y se volvieron a formar agregados después de incubación durante 18 horas a 37°C. En contraste, como se presenta en la FIGURA 10B, los agregados no se volvieron a formar una vez que se modificaron las cisteínas de superficie AvPAL (p. ej., por alquilación) mediante tratamiento con N- metilmaleimida (NEM) después de exposición a DTT, pero antes de desalinizar e incubar durante 18 horas a 37°C.

15 Sobre la base de lo anterior, la agregación de AvPAL expresada en bacterias parece deberse exclusivamente a la formación de enlaces de disulfuro intercatenarios, y no debido a efectos hidrófobos o presencia de cationes divalentes. Los residuos de cisteína en las posiciones 565 y 503 están implicados en la formación de enlaces de disulfuro intercatenarios en preparaciones de AvPAL.

Ejemplo 11

Formulaciones líquidas de formas PEGiladas de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

25 Se realizaron estudios para investigar el efecto de diversos excipientes, por ejemplo, estabilizadores, en la estabilidad acelerada de una forma PEGilada de una variante de polipéptidos AvPAL (p. ej., con sustitución de serina de los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565) en formulaciones de la invención.

La mutante de cisteína doble de AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se preparó como se describe en el EJEMPLO 7.

30 La estabilidad acelerada de diferentes formulaciones de AvPAL_C565SC503S pegilada se determinó usando un ensayo de actividad *in vitro* actividad, ya fuera un ensayo en cubeta o un ensayo en placa. Para el ensayo de cubeta, se diluyó AvPAL_C565SC503S pegilada purificada en tampón de dilución TBS y después se añadió a un tampón de ensayo que contenía fenilalanina 22,5 mM (Phe), Tris-HCl 100 mM, pH 8,5. Después de incubación durante 2 minutos a 30°C, se midió la cantidad de ácido trans-cinámico (t-CA) liberada por absorbancia a 290 nm. Para el ensayo en placa, se diluyó la AvPAL_C565SC503S pegilada purificada en tampón de dilución TBS más BSA/Phe/Brij y después se añadió a un tampón de ensayo que contenía Phe 22,5 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,5.

35 Después de incubación durante 10-20 minutos a 30°C, se midió la cantidad de ácido trans-cinámico (t-CA) liberada por absorbancia a 290 nm. Una UI de la actividad PAL es igual a 1 µmol de TCA/min.

40 En un primer estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto de pH en la estabilidad del mutante de cisteína doble AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S. Se preformuló la AvPAL_C565SC503S pegilada purificada en tampón 10 mM y NaCl 140 mM a diversos pH, de 4 a 9. Tampones probados: citrato (pH 4), acetato (pH 5), histidina (pH 6), fosfato (pH 7), Tris (pH 7,5, pH 8) y arginina (pH 9). Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante hasta 30 días a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad *in vitro*. Se observó una pérdida total de la actividad enzimática PAL a pH 4. Se eligió un intervalo de pH de 7 a 8 para evaluación posterior.

45 En un segundo estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto del pH y de una diversidad de excipientes en la estabilidad del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S. Se preformuló AvPAL_C565SC503S pegilada purificada en Tris 10 mM y NaCl 140 mM a pH 7, 7,5 o 8,0 en ausencia o presencia de EDTA al 0,5%, EDTA al 0,5% más ácido ascórbico al 0,5% o EDTA al 0,5% más metionina (Met) 5 mM. Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante hasta 60 días a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad *in vitro*. El pH 7,0 y 7,5 parecía equivalente para mantener la actividad enzimática, EDTA tenía un efecto nulo o bajo en la actividad enzimática, y los antioxidantes ácido ascórbico y metionina influyeron negativamente en la actividad enzimática.

50 En el mismo estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto de pegilación de la AvPAL mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S. La velocidad de pérdida de actividad enzimática fue similar entre y

AvPAL_C565SC503S pegilada y no pegilada.

En un tercer estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto del sustrato enzimático y el producto como excipiente en la estabilidad del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S. Se preformuló la AvPAL_C565SC503S pegilada purificada a aproximadamente 12 mg/ml (0,2 mM) en Tris 10 mM y NaCl 140 mM a pH 7,5 en ausencia o presencia de Phe 1 mM (sustrato a 5 moles por mol de sitio activo), TCA 2 mM (producto a 10 moles por mol de sitio activo) o Tween 80 al 0,05% (un tensioactivo). Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante varios tiempos a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad *in vitro* semanalmente. Phe y t-CA aumentaron significativamente la estabilidad de la enzima, mientras que Tween no tuvo efecto en la estabilidad enzimática.

En la FIGURA 11 se muestra un compendio de los estudios de estabilidad acelerada 1, 2 y 3.

En un cuarto estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto de Phe y t-CA a bajas concentraciones como excipiente en la estabilidad del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S. Se preformuló la AvPAL_C565SC503S pegilada purificada a aproximadamente 12 mg/ml (0,2 mM) en Tris 10 mM y NaCl 140 mM a pH 7,5 en ausencia o presencia de Phe 0,4 mM (sustrato a 2 moles por mol de sitio activo) o TCA 0,4 mM (producto a 2 moles por mol de sitio activo). Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante varios tiempos a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad *in vitro* semanalmente. Tanto Phe como t-CA a baja concentración fueron eficaces en la estabilización de la actividad enzimática.

En un quinto estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto de un sustrato enzimático débil, tirosina (Tyr), como excipiente en la estabilidad del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S. Se preformuló AvPAL_C565SC503S pegilada purificada a aproximadamente 12 mg/ml (0,2 mM) en Tris 10 mM y NaCl 140 mM a pH 7,5 en ausencia o presencia de 1 o Tyr 5 mM (sustrato a 5 o 25 moles por mol de sitio activo, respectivamente). Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante varios tiempos a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad *in vitro* semanalmente. Tyr tenía un efecto estabilizador mínimo no dependiente de la dosis en la actividad enzimática (FIGURA 12).

En un sexto estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto de los absorbedores nucleófilos como excipiente en la estabilidad del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S. Se preformuló AvPAL_C565SC503S pegilada purificada a aproximadamente 20 mg/ml (0,33 mM) en Tris 10 mM y NaCl 140 mM a pH 7,5 en ausencia o presencia de Phe 1 mM (sustrato a 3 moles por mol de sitio activo), absorbedor nucleófilo 2 mM (ácido benzoico o bien piridoxamina a 6 moles por mol de sitio activo), o Phe 1 mM y absorbedor nucleófilo 2 mM. Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante varios tiempos a 4°C o 37°C, se midió la actividad *in vitro* semanalmente. El ácido benzoico, pero no la piridoxamina, fue eficaz para estabilizar la actividad enzimática (FIGURA 13A). No se produjo efecto aditivo de Phe y ácido benzoico, lo que sugiere un mecanismo de estabilización similar.

Los efectos de estabilización del ácido benzoico y t-CA sugieren que actúan como análogos estructurales de Phe (véase FIGURA 13B).

Los datos de los seis estudios de estabilidad acelerada se combinaron con el fin de predecir la vida en almacenamiento eficaz del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en varias formulaciones. La vida en almacenamiento se determinó del modo siguiente: (1) determinación de la velocidad de descenso de la actividad (k_{descenso}), que siguió una cinética de primer orden, para cada condición de formulación; (2) representación gráfica de $\ln(k_{\text{descenso}})$ con respecto a $1/\text{Temperatura (}^\circ\text{K)}$; (3) determinación de la E_a ($\Delta G_{\text{descenso}}$) requerida para el descenso de la actividad para una condición de formulación dada; (4) extrapolación de la k_{descenso} a 4°C con el uso de la E_a calculada y la k_{descenso} observada a una temperatura dada; y (5) determinación de la vida en almacenamiento (T_{90}), que es el tiempo en el que la actividad enzimática específica ha descendido en $\geq 10\%$ a 4°C.

La Tabla 4 presenta que Phe y t-CA mejora enormemente la vida en almacenamiento predicha del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S.

Tabla 4: Vida en almacenamiento predicha T_{90} (en semanas) del mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada con varios excipientes

Excipiente	42°C	37°C	25°C	4°C*	4°C (observado)
Ninguno (TBS)	0,67	0,8	2,1	12,9	~9-13
Phe	1,63	2,2	9,1	85	>20
t-CA	ND	2,0	7,1	85,8	>20

* Los números son estimaciones basadas en datos de hasta 6 experimentos diferentes.

En resumen, los estudios de preformulación anteriores indican que el pH óptimo para el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S es de 7 a 7,5. La presencia de antioxidantes da como resultado una pérdida drástica de actividad enzimática. Tanto la fenilalanina (Phe) como el ácido trans-cinámico (t-CA) aumentan la estabilidad de rAvPAL-PEG en el 50% o más en condiciones aceleradas (25°C y 37°C). Un exceso de 2 veces la Phe o la t-CA por sitio activo de rAvPAL-PEG es suficiente para estabilizar la actividad y para que concentraciones superiores no parezcan tener un beneficio adicional. Un sustrato de PAL más débil, tirosina (Tyr), no parece estabilizar la actividad enzimática, mientras que el ácido benzoico, estabiliza la actividad de rAvPAL-PEG en un grado similar a su análogo estructural, Phe. Cuando se combina con Phe, no se observa estabilización adicional de la actividad con ácido benzoico, lo que sugiere un mecanismo común para la estabilización de la actividad.

5

10 Ejemplo 12

Formulaciones liofilizadas de formas PEGiladas de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

Se realizaron estudios para investigar el efecto de varias fórmulas sólidas (p. ej., liofilizadas) en la actividad de una forma PEGilada de una variante de polipéptido AvPAL (p. ej., con sustitución de serina de los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565) de la invención.

15 La mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se preparó como se describe en el EJEMPLO 7.

La mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se formuló del modo siguiente: (F1) 10 mg/ml de AvPAL_C565SC503S, Tris 10 mM, pH 7,5; (F2) 10 mg/ml de AvPAL_C565SC503S, Tris 10 mM, pH 7,5, 25 mg/ml de manitol; o (F3) 10 mg/ml de AvPAL_C565SC503S, Tris 10 mM, pH 7,5, 20 mg/ml de manitol, 5 mg/ml de sacarosa. Después de la formulación, la actividad enzimática PAL de cada uno fue de 1,7 a 1,8 U/mg. Después de liofilización, las formulaciones se almacenaron durante hasta 26 a 4°C, y después se resuspendieron en agua MiliQ fresca filtrada en condiciones estériles. Las actividades enzimáticas de PAL se determinaron como se describe en el EJEMPLO 11. La Tabla 5 presenta que aparentemente no existe pérdida de actividad tras liofilización, almacenamiento o resuspensión de las diversas formulaciones de AvPAL_C565SC503S.

20

25 Tabla 5: Actividad específica de mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada tras formulación liofilizada (FL)

FL	Antes de FL	Después de FL	Después de FL + 5 días/4°C	Después de FL + 11 días/4°C	Después de FL + 26 días/4°C
F1	1,78 +/- 0,04	1,60	1,59	1,71	1,48
F2	1,72 +/- 0,01	1,67	1,62	1,68	1,72
F3	1,65 +/- 0,09	1,66	1,73	1,76	1,59

Ejemplo 13

Estudios de toxicidad/farmacocinéticos de formas PEGiladas de variantes AvPAL (mutantes de cisteína) en monos Cynomolgus y ratas

30

Los estudios de toxicidad/farmacocinéticos se realizaron para determinar el efecto de administración de una única dosis de una forma PEGilada de una variante de polipéptido AvPAL (p. ej., con sustitución de serina de los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565) en monos Cynomolgus y en ratas.

La mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se preparó como se describe en el EJEMPLO 7.

35

Estudio de toxicidad/farmacocinético en monos Cynomolgus

Este estudio usó cuatro (4) grupos de monos, cada uno con tres machos y tres hembras. El Grupo 1 recibió placebo (ml/kg); y los Grupos 2, 3 y 4 recibieron una única inyección subcutánea de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en solución a 4, 12 y 60 mg/kg, respectivamente. Se recogieron muestras de plasma de los monos antes de la dosis, y en varios momentos después de la dosis, de 3 a 504 horas. Se encontró que la dosis de 60 mg/kg era tóxica para los monos, con lo que se puso fin a la parte del Grupo 4 de este estudio.

40

La FIGURA 14A presenta la concentración de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en el plasma en varios instantes después de una única inyección subcutánea a 4 y 12 mg/kg. Los datos muestran eliminación monofásica del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S. Un modelo de compartimento único con absorción de primer orden parece describir el perfil plasmático del mutante de cisteína

45

doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S después de una única inyección subcutánea.

5 La FIGURA 14B presenta las concentraciones de fenilalanina (Phe) y mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en el plasma en varios instantes después de una única inyección subcutánea a 4 mg/kg. Para esta dosis, la concentración de Phe en plasma se redujo por debajo del límite de cuantificación en el ensayo de GC/MS en un plazo de 24 horas, y la disminución de Phe en plasma se mantuvo durante 10 días.

Estudio de toxicidad/farmacocinético en ratas

10 Este estudio usó ocho (8) grupos de ratas, con 3 machos y 3 hembras en los grupos placebo, y 6 machos y 6 hembras en los grupos de ensayo. Los Grupos 1 y 5 recibieron inyecciones intravenosa y subcutánea únicas de placebo. Los Grupos 2, 3 y 4 recibieron inyecciones intravenosas únicas de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S a 1, 5 y 25 mg/kg, respectivamente. Los Grupos 6, 7 y 8 recibieron inyecciones subcutáneas únicas de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S a 10, 25 y 250 mg/kg, respectivamente. Se recogieron muestras de sangre de las ratas antes de la dosis, y en varios instantes después de la dosis, de 1 a 360 horas. En cada tiempo de recogida, se recogió sangre de 3 ratas en cada grupo. En este estudio no se observó toxicidad en las ratas.

15 La FIGURA 15A presenta la concentración de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en el plasma en varios instantes después de una única inyección intravenosa a 1, 5 y 25 mg/kg. Los datos presentan eliminación monofásica del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S a partir del plasma después de una única inyección intravenosa.

20 La FIGURA 15B presenta la concentración de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en el plasma en varios instantes después de una única inyección subcutánea a 10, 25 y 250 mg/kg. Un modelo de compartimento único con absorción de primer orden parece describir el perfil plasmático del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S después de una única inyección subcutánea.

La Tabla 6 presenta los parámetros farmacocinéticos del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S después de una única inyección intravenosa o subcutánea.

25 Tabla 6: Parámetros farmacocinéticos de mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada después de una única dosis intravenosa o subcutánea

Vía	Dosis (mg/kg)	AUC _{0-∞} (ng-h/ml)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} (h)	t _{1/2} * (h)	F (%)
Intravenosa	1	657.131	12.600	4,5	27,9	—
	5	3.579.327	87.667	2	39,1	—
	25	10.860.907	202.238	9,0	30,4	—
Subcutánea	10	1.304.016	16.674	18,0	46,9	19,7
	25	2.290.754	29.260	42,0	21,0	12,5 [#]
	250	37.254.683	225.200	72,0	62,8	34,0

* Para la vía de administración subcutánea, el valor de t_{1/2} terminal es mayor que en la intravenosa; esto puede deberse a una menor velocidad de absorción de los tejidos subcutáneos que la velocidad de eliminación (de manera que el t_{1/2} observado es en realidad por absorción).

30 [#] La biodisponibilidad usando datos de ABC intravenosos a 25 mg/kg es del 21,5%.

Al parecer en este estudio farmacocinético no existen diferencias por sexo. Los valores de ABC_{inf} y C_{máx} fueron aproximadamente proporcionales a la dosis para las vías de administración intravenosa y subcutánea.

Estudios de toxicidad con dosis múltiples en Ratas y monos Cynomolgus

35 Se evaluó la seguridad de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en estudios de toxicidad de dosis repetida en ratas y monos Cynomolgus.

Las ratas a las que se administró hasta 25 mg/kg de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S dos veces por semana, por vía subcutánea durante 28 días no mostraron toxicidad.

40 Los monos Cynomolgus a los que se administraron dosis de hasta 1 mg/kg de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S dos veces por semana, por vía subcutánea durante 28 días, no mostraron toxicidad significativa. Después de la primera dosis se observó una disminución dependiente de la dosis en los niveles en plasma de Phe; sin embargo, después de la séptima dosis, los niveles plasmáticos de Phe volvieron a los

valores de referencia en todos los grupos de dosis, lo que indica una posible respuesta de anticuerpos hacia la enzima administrada. Se observaron titulaciones mínimas de IgG anti-AvPAL_C565SC503S en la mayoría de los animales tratados con 1 mg/kg en el día 28. No se observaron titulaciones de IgM en ningún animal en el estudio en el día 28.

5 Ejemplo 14

Efectos de las variantes AvPAL (mutantes de cisteína) en células tumorales en cultivo

Se realizaron estudios para investigar el efecto una forma PEGilada de una variante de polipéptido AvPAL (p. ej., con sustitución de serina de los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565) en la proliferación de células tumorales cultivados en cultivo *in vitro*.

10 El mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se preparó como se describe en el EJEMPLO 7.

La proliferación de células tumorales *in vitro* se midió mediante un ensayo de fluorescencia con yoduro de propidio como se describe en Dengler, et al., *Anti-Cancer Drugs* 6:522-532 (1995).

Tumores hematológicos

15 Se evaluó un panel de veinticuatro (24) líneas celulares de tumores hematológicos, que incluían 14 leucemias, 5 linfomas y 5 mielomas, para determinar el efecto del mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada en la proliferación celular *in vitro*.

Se sembraron las líneas celulares de tumores hematológicos en placas de cultivo a 5.000 células/pocillo en el Día 0. En el Día 1, se añadió el mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada a los cultivos en varias concentraciones, de 0,01 a 100 µg/ml. En el Día 5, se recolectaron las células y se midió el contenido de ADN por tinción con yoduro de propidio. Se determinó el valor de CI₅₀, CI₇₀ y CI₉₀. Estos experimentos se realizaron dos veces o tres veces para determinar cada línea celular de tumor hematológico.

20 La Tabla 7 presenta que el mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada fue eficaz para inhibir la proliferación *in vitro*, medida por tinción con yoduro de propidio, de varias líneas celulares de tumores hematológicos.

25 Tabla 7: Inhibición de la tinción con yoduro de propidio de líneas de tumores hematológicos *in vitro* por mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada

Línea tumoral	Tipo de célula	CI ₅₀ µg/mL	CI ₇₀ µg/mL
CCRF CEM	TODOS – linfoma de células T	1	>100
		>100	>100
		>100	>100
EM2	LMC	>100	>100
		>100	>100
		>100	>100
HL-60	LPA	0,904	>100
		>100	>100
		46,41	>100
JURKAT	Leucemia de células T humanas	0,38	2,928
		14,125	>100
		10,000	>100
JURLMK1	LMC	0,766	>100
		10	>100

ES 2 602 618 T3

		3,162	>100
K562	LMC	0,701	59,948
		>100	>100
		11,659	>100
KCL22	LMC	0,9	15,399
		>100	>100
		1	>100
KG1	LMA	43,287	>100
		>100	>100
		>100	>100
MEG01	LMC	1,258	>100
		>100	>100
		0,926	>100
MOLT4	TODO – linfoma de células T	0,326	1,873
		1,082	5,298
		1,096	6,918
Mv411	LMA	5,994	74,989
		>100	>100
		>100	>100
NOMO1	LMA	0,304	2,511
		0,732	8,659
		0,863	6,449
OCIAML2	LMA	0,261	0,938
		>100	>100
		7,305	>100
PL21	LMA	>100	>100
		>100	>100
		>100	>100
HUT78	CTL Lin	6,105	18,276
		17,782	>100
		0,096	>100
L5178Y	Leucemia de células T murina	6,683	41,595
		3,981	10
		3,019	7,585
MYLA	CTL Lin	4,436	>100

		5,379	>100
		8,171	>100
RAJI	Linfoma de Burkitt	0,261	0,938
		21,544	>100
		2,154	>100
U937	Linfoma histio	0,803	>100
		>100	>100
		>100	>100
8226	Mieloma	0,229	0,825
		>100	>100
		0,691	7,742
IM9	Células linfoblásticas humanas	0,271	1,467
		0,295	1,311
		0,063	0,188
L363	Leucemia de células plasmáticas humanas	7,943	>100
		1,73	15,505
LP1	Mieloma múltiple humano	0,774	100
		0,71	6,309
NCIH929	Mieloma múltiple humano	>100	>100
		11,288	>100
		2,154	>100

En la FIGURA 14A y 21B se presenta la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación celular, determinada por una reducción en la tinción con yoduro de propidio, por el mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada en dos células de tumores hematológicos sensibles, NOMO1 e IM9, respectivamente. Estas líneas de células tumorales tenían CI_{50} y CI_{70} de menos de 1,0 y 10,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Como comparación, la asparaginasa tiene una CI_{50} de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ en líneas celulares de leucemia humana. En general, sin embargo, las líneas celulares de tumores hematológicos fueron más resistentes, según criterio por los valores de CI_{70} , que las líneas de tumores sólidos (véase a continuación).

Tumores sólidos

Se evaluó un panel de treinta y seis (36) líneas de células de tumores sólidos, que incluían tumores derivados de vejiga, encéfalo, colon, estómago, cabeza y cuello, pulmón, mama, ovario, páncreas, próstata, riñón y útero, para determinar el efecto del mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada en la proliferación celular *in vitro*. Las líneas celulares de tumores sólidos se sembraron en placas de cultivo a 5.000 células/pocillo en el Día 0. En el Día 1, se añadió mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada a los cultivos a varias concentraciones, de 0,01 a 100 $\mu\text{g/ml}$. En el Día 5, se midió el contenido de ADN por tinción con yoduro de propidio. Se determinaron los valores de CI_{50} , CI_{70} y CI_{90} .

La Tabla 8 presenta que el mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada fue eficaz para inhibir la proliferación *in vitro*, medida por tinción con yoduro de propidio, de varias líneas celulares de tumores sólidos.

Tabla 8: Inhibición de la tinción con yoduro de propidio de líneas de tumores sólidos *in vitro* por mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada

Línea	Órgano/tipo de célula	CI_{50}	CI_{70}
-------	-----------------------	-----------	-----------

ES 2 602 618 T3

tumoral		µg/ml	µg/ml
	Vejiga		
1218L	ATCC, Friburgo; adenocarcinoma urotelial	1,1	7,498
T24	Xenoinjerto	0,617	2,154
	Encéfalo/SNC		
498NL	Xenoinjerto, Friburgo	0,691	2,154
SF268	NCI	0,59	1,492
	Colon		
HCT116	NCI; adenocarcinoma, poco diferenciado	0,316	0,9
HT29	NCI; adenocarcinoma, poco diferenciado	0,508	0,94
	Gástrico		
251L	Xenoinjerto, Friburgo; adenocarcinoma, poco diferenciado	2,682	37,275
	Cabeza y cuello		
536L	Xenoinjerto, Friburgo; carcinoma de hipofaringe	0,606	1,887
	Pulmón		
1121L	Xenoinjerto	0,715	3,548
289L	Xenoinjerto, Friburgo; adenocarcinoma, poco diferenciado	2,807	23,101
529L	Xenoinjerto, Friburgo; de células grandes, ductal	0,539	1,73
629L	Xenoinjerto, Friburgo; adenocarcinoma, poco diferenciado	0,457	1,467
H460	NCI; carcinoma de células grandes	0,215	0,644
	Mama		
401NL	Xenoinjerto, Friburgo; adenocarcinoma pap, bien diferenciado	1,873	7,564
MCF7	NCI; carcinoma mamario	0,599	1,623
	Melanoma		
276L	Xenoinjerto	4,124	268,269
394NL	Xenoinjerto	0,887	3,856
462NL	Xenoinjerto	0,954	6,189
514L	Xenoinjerto	0,828	4,216
520L	Xenoinjerto	1,359	6,309
	Ovario		
1619L	Xenoinjerto, Friburgo; adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	0,322	0,688
899L	Xenoinjerto, Friburgo; Carcinoma seroso Pap, moderadamente diferenciado	1,279	6,628
OVCAR3	NCI; adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	1,185	6,528
	Pancreático		
1657L	Xenoinjerto, Friburgo; adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	1,951	8,619

PANC1	ATCC	0,825	5,179
	Próstata		
22RV1	ATCC; adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	0,87	7,079
DU145	NCI; adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	0,622	1,873
LNCAP	DSMZ; adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	0,584	0,974
PC3M	NCI; adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	0,501	1,274
	Mesotelioma pleural		
1752L	Xenoinjerto, Friburgo; mesotelioma pleural	1,637	8,483
	Renal		
1781L	Xenoinjerto, Friburgo; carcinoma renal	2,371	10
393NL	Xenoinjerto, Friburgo; hipernefoma, bien diferenciado	0,55	1,995
486L	Xenoinjerto	0,859	5,336
944L	Xenoinjerto	0,71	3,727
	Uterino		
1138L	Xenoinjerto, Friburgo; carcinosarcoma, bien diferenciado	0,621	1,258

La inhibición de proliferación celular dependiente de la dosis, según se determina por una reducción de la tinción con yoduro de propidio, por el mutante de cisteína doble AvPAL_C565SC503S pegilada en líneas de células tumorales obtenidas de cáncer del encéfalo/SNC, de colon, de pulmón y de próstata se presenta en la FIGURA 17A-D, respectivamente.

5

La AvPAL_C565SC503S mostró una actividad antiproliferativa selectiva en este amplio panel de líneas celulares de tumores sólidos, y fue potente especialmente (p. ej., CI_{50} entre 0,2 y 0,7 $\mu\text{g/ml}$) en líneas de células tumorales obtenidas del pulmón, el encéfalo/SNC, el colon, la próstata y el riñón. Al menos en línea de células tumorales obtenida de la vejiga, cabeza y cuello, mama, ovario y útero también fueron sensibles a la destrucción celular por la AvPAL_C565SC503S. Varios melanomas también fueron sensibles a la destrucción celular por la AvPAL_C565SC503S.

10

Ejemplo 15

Actividad antitumoral de variantes AvPAL (mutantes de cisteína) en ratones sin sistema inmune

Se realizaron estudios para investigar el efecto de una forma PEGilada de una variante de polipéptido AvPAL (p. ej., con sustitución de serina de los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565) en la proliferación de células tumorales cultivadas en ratones sin sistema inmune *in vivo*.

15

El mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se prepara como se describe en el EJEMPLO 7.

Los xenoinjertos subcutáneos de células tumorales humanas en ratones sin sistema inmune o SCID inmunodeficientes se han usado con éxito como modelos de cánceres humanos para probar la eficacia *in vivo* de los agentes terapéuticos contra el cáncer así como los agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos, como conjugados de toxinas y anticuerpos (para revisión, véase Kerbel, Cancer Biol. Ther. 2(4):Suppl. 1:S134-S139 (2003)).

20

La actividad antitumoral *in vivo* del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S puede probarse en solitario o en combinación con agentes terapéuticos contra el cáncer o agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos, o en combinación con una dieta con restricción de fenilalanina, usando xenoinjertos de células tumorales humanas en ratones sin sistema inmune.

25

Para establecer los xenoinjertos de tumores humanos, en los ratones sin sistema inmune se inyectan por vía subcutánea aproximadamente 5×10^6 células tumorales humanas en 0,2 ml de PBS. El tamaño medio del tumor aumenta con el tiempo. Los tumores de xenoinjertos humanos se extirpan de los ratones sin sistema inmune portadores de tumores y se preparan bloques de tejido tumoral de aproximadamente 30 mm^3 . En cada uno de los

30

ratones sin sistema inmune nuevos que se usarán para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se implanta por vía subcutánea un bloque de tejido tumoral. El tratamiento terapéutico se inicia antes del inicio del tumor o cuando el tamaño medio del tumor dentro de un grupo de ratones sin sistema inmune es de aproximadamente 100-150 mm³ (modelo de prevención), y/o después del establecimiento de los tumores cuando el tamaño medio del tumor dentro de un grupo de ratones sin sistema inmune es superior a 500 mm³ (modelo de tratamiento).

En una primera etapa, se determina la dosis de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S que reducirá los niveles de fenilalanina (Phe) en plasma casi a cero. Los experimentos se realizan como se describe en los Ejemplos 7 a 9 y 14 en la anterior solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente, n.º 11/451.999 presentada el 12 de junio de 2006, con la salvedad de que se usan ratones sin sistema inmune en lugar de ratones ENU2. En esta etapa inicial se determina la dosis de enzima PAL y la frecuencia de administración.

En una segunda etapa, se evalúa la actividad antitumoral de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en diversos xenoinjertos de tumores humanos obtenidos de pacientes o líneas celulares. Los modelos de tumores incluyen diferentes tipos de cáncer, por ejemplo y no como limitación, del sistema nervioso central (SNC), colon, pulmón, próstata, melanoma metastásico y cáncer renal. Se proporcionan listas no exhaustivas de tumores y líneas de células tumorales que pueden someterse a ensayo en las Tablas 7 (tumores hematológicos) y 8 (tumores sólidos).

Para evaluar la actividad antitumoral de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S, se trata a ratones sin sistema inmune portadores de diferentes xenoinjertos de tumores humanos por vía subcutánea con AvPAL_C565SC503S administrada por vía subcutánea, por ejemplo, a tres niveles de dosis diferentes, comprendidos entre aproximadamente 5 y 500 mg/kg. Esta dosis puede dar como resultado una dosis humana de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg. La actividad antitumoral se analiza como el volumen de inhibición del tumor y/o el retraso absoluto del crecimiento. También se evalúa la tolerabilidad de la AvPAL_C565SC503S como cambios en la mortalidad y/o el peso corporal.

Cada estudio antitumoral *in vivo* consiste en al menos cuatro grupos, un grupo de control de vehículo y al menos tres grupos tratados con la enzima PAL procariótica. El tamaño del grupo será de al menos 8 ratones, para dar como resultado un total de 32 ratones que reciben implantaciones de tumores subcutáneos. Los ratones con tumores de un tamaño similar (100-150 mm³) se usarán para aleatorización (Día 0).

En el caso de un efecto antitumoral, puede llevarse un seguimiento de los ratones durante 2 semanas adicionales después de la terminación del tratamiento con la enzima PAL procariótica para detectar un posible reinicio del crecimiento del tumor. Según las regulaciones para experimentos con animales, se sacrifica a los ratones si el diámetro del tumor supera 1,6 cm.

Los diámetros del tumor se miden dos veces por semana junto con el peso corporal. El volumen del tumor se calcula según la fórmula $a \cdot b^2 / 2$ (donde 'a' es el mayor diámetro del tumor y 'b' es el eje perpendicular). Se calculan los volúmenes y pesos corporales relativos del tumor para cada tumor individual sobre la base del valor en el Día 0 (el primer día de administración de dosis). El tratamiento comienza cuando los tumores han alcanzado un volumen de aproximadamente 100-150 mm³. Se sacrifica a los ratones si el volumen del tumor supera 1.600 mm³, según las regulaciones de los estudios con animales.

Los tumores obtenidos de paciente establecidos en paso en serie en ratones sin sistema inmune también pueden usarse como tumores de prueba. Típicamente, estos tumores conservan características importantes del tumor del paciente original, lo que incluye la histología y la sensibilidad a los fármacos. Para algunos tumores, por ejemplo, del SNC o de próstata, se usan tumores derivados de las líneas celulares del cáncer.

Ejemplo 16

Formulaciones de PAL procariótica de ejemplo

El siguiente ejemplo ofrece orientación sobre los parámetros que se usarán para formular composiciones que comprenden la PAL procariótica o fragmentos, mutantes, variantes o análogos biológicamente activos de la misma, que son útiles para tratamiento de enfermedad neoplásica y cáncer. Los parámetros que se usarán para formular las composiciones de PAL procariótica incluyen, pero no se limitan a, agentes de tampón para mantener el pH, agentes de ajuste de la isotonicidad, ausencia o presencia de estabilizadores y ausencia o presencia de otros excipientes, vehículos, diluyentes, y similares.

En el EJEMPLO 11, el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se formuló a una concentración de aproximadamente 12-20 mg/ml (aproximadamente 0,2-0,33 mM). Una variante PAL procariótica preferida se formula a una concentración comprendida entre aproximadamente 1 y 50 mg/ml (aproximadamente de 0,016 a 0,8 mM), preferiblemente de aproximadamente 5 a 20 mg/ml (aproximadamente 0,08 a 0,33 mM), y más preferiblemente de aproximadamente 5 a 15 mg/ml (aproximadamente 0,08 a 0,25 mM). La formulación más preferida de las composiciones de PAL procariótica de la invención tiene una concentración de enzima PAL de

aproximadamente 10 +/- 5 mg/ml (aproximadamente 0,16 +/- 0,08 mM).

5 En el EJEMPLO 11, el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se formuló en Tris 10 mM-HCl, NaCl 140 mM a pH 7,0, 7,5 y 8,0. Un agente preferido de tampón es Tris-HCl, o su equivalente, con una concentración comprendida entre 5 y 50 mM, preferiblemente de 5 a 20 mM, y más preferiblemente de 5 a 15 mM. La formulación más preferida de las composiciones de PAL procariótica de la invención tiene una concentración de tampón Tris-HCl de aproximadamente 10 +/- 5 mM.

Un pH preferido de la composición farmacéutica es aproximadamente pH 6,0-8,5, preferiblemente aproximadamente pH 7,0-8,0, y más preferiblemente aproximadamente pH 7,0-7,6. La formulación más preferida de las composiciones de PAL procariótica de la invención tiene un pH de aproximadamente pH 7,3 +/- 0,3.

10 Un agente de ajuste de la isotonicidad preferido es NaCl, o su equivalente, con una concentración comprendida entre aproximadamente 100 y 200 mM, preferiblemente de aproximadamente 130 a 170 mM, y más preferiblemente de aproximadamente 130 a 150 mM. La formulación más preferida de las composiciones de PAL procariótica de la invención tiene una concentración de NaCl de aproximadamente 140 +/- 10 mM.

15 Como se presenta en el EJEMPLO 11, el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se estabilizó en presencia de fenilalanina (Phe), y algunos de sus análogos estructurales, lo que incluye, por ejemplo, ácido trans-cinámico (t-CA) y ácido benzoico; la tirosina (Tyr) tenía un efecto estabilizador mínimo en la enzima PAL. Un estabilizador preferido es Phe, o un análogo estructural de la misma, con un intervalo para el estabilizador de aproximadamente 0,1 a 20 moles de estabilizador por mol de sitio activo de la PAL procariótica, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 10 moles de estabilizador por mol de sitio activo de la PAL procariótica, y más preferiblemente de aproximadamente 1 a 10 moles de estabilizador por mol de sitio activo de la PAL procariótica. La formulación más preferida de las composiciones de PAL procariótica de la invención tiene una concentración de estabilizador de aproximadamente 5 +/- 4 moles de estabilizador por mol de sitio activo de la PAL procariótica.

25 El mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S no se estabilizó significativamente a pH < 7 o pH > 7,6, o en presencia de EDTA, aminoguanidina o Tween 80; los antioxidantes ácido ascórbico y metionina desestabilizaron la enzima PAL (EJEMPLO 11 y datos no mostrados).

30 Las composiciones de PAL procariótica de la invención se preparan preferiblemente como formulaciones líquidas, pero pueden prepararse también como formulaciones sólidas (p. ej., liofilizadas). En este caso, pueden añadirse excipientes, por ejemplo, agentes de formación de volumen, como manitol y/o sacarosa. En el EJEMPLO 12, el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S se formuló y liofilizó en Tris 10 mM-HCl, NaCl 140 mM a pH 7,5 en ausencia de manitol o sacarosa, en presencia de 25 mg/ml de manitol, o en presencia de 20 mg/ml de manitol más 5 mg/ml sacarosa. Una formulación liofilizada preferida comprende manitol a una concentración de aproximadamente el 1 al 5% (peso/volumen) o 10 a 50 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente el 2 al 4%, y más preferiblemente de aproximadamente el 2 al 3%. Otra formulación liofilizada preferida comprende manitol y sacarosa, con una concentración de manitol de aproximadamente el 1 al 5% (peso/volumen) o de 10 a 50 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente el 1 al 3%, y más preferiblemente de aproximadamente el 1,5 al 2,5%, y una concentración de sacarosa de aproximadamente el 0,1 al 2% (peso/volumen) o de 0,1 a 2 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente el 0,2% al 1%, y más preferiblemente de aproximadamente el 0,3% al 0,7%. La formulación liofilizada más preferida de las composiciones de PAL procariótica de la invención tiene una concentración de manitol de aproximadamente el 2,5 +/- 0,5% de manitol o el 2,0 +/- 0,5% de manitol más el 0,5 +/- 0,2% de sacarosa.

Por consiguiente, en la Tabla 9 se presenta una formulación preferida de las composiciones de PAL procariótica de la invención.

Tabla 9: Formulaciones de ejemplo de variantes de la PAL procariótica

Clase de ingrediente	Tipo de ingrediente	Intervalo de concentración
Variante PAL procariótica	AvPAL_C565SC503S pegilada	10 +/- 5 mg/mL (0,16 +/- 0,08 mM)
Agente de tampón	Tris-HCl	10 mM +/- 5 mM, y pH 7,3 +/- 0,3
Agente de ajuste de la isotonicidad	NaCl	140 mM +/- 10 mM
Estabilizador	Phe, t-CA, o ácido benzoico	5 +/- 4 moles de estabilizador por mol de sitio activo de PAL

Clase de ingrediente	Tipo de ingrediente	Intervalo de concentración
Otros excipientes, agentes de formación de volumen	Manitol +/- sacarosa	2,5 +/- 0,5% (peso/volumen) de manitol; 2,0 +/- 0,5% (peso/volumen) de manitol + 0,5 +/- 0,2% (peso/volumen) de sacarosa

* Para formulaciones liofilizadas de PAL procariótica

Ejemplo 17

Evaluación clínica con composiciones de PAL procariótica para el tratamiento del cáncer

5 El siguiente ejemplo ofrece orientación sobre los parámetros que se usarán para la evaluación clínica de composiciones que comprenden la PAL procariótica o fragmentos, mutantes, variantes o análogos biológicamente activos de la misma en los métodos terapéuticos. Como se expone a lo largo de la presente memoria, las composiciones de PAL procariótica se usarán en el tratamiento de cáncer. Se realizarán ensayos clínicos que proporcionarán una evaluación de dosis orales o subcutáneas de la PAL procariótica para determinar la seguridad, la farmacocinética y la respuesta inicial tanto de criterios de valoración clínica sustitutos como definidos. El ensayo se realizará durante como mínimo, pero sin limitarse necesariamente a ello, 24 semanas para recoger suficiente información sobre seguridad para 100 pacientes evaluables. La dosis inicial para los ensayos variará de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg/kg/semana. En caso de que esta dosis no produzca una reducción en los niveles de fenilalanina (Phe) en plasma en un paciente, por ejemplo, una reducción del intervalo normal de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 70 µM a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a menos de aproximadamente 30 µM, preferiblemente menos de aproximadamente 20 µM, y más preferiblemente todavía menos de aproximadamente 10 µM, la dosis debería incrementarse en la medida necesaria y mantenerse durante un período mínimo adicional de, pero no necesariamente limitado a, 24 semanas para establecer la seguridad y evaluar la eficacia posterior.

20 Las medidas de seguridad incluirán acontecimientos adversos, reacciones alérgicas, panel de química clínica completo (función renal y hepática), análisis de orina y hemograma con diferencial. Además, se llevará también un seguimiento de otros parámetros que incluyen la reducción en los niveles de Phe en sangre, pruebas neuropsicológicas y cognitivas y evaluaciones globales. El presente ejemplo contempla también la determinación de los parámetros farmacocinéticos del fármaco en la circulación, y la distribución general y la semivida de la PAL en sangre. Se prevé que estas medidas ayudarán a relacionar la dosis con la respuesta clínica.

25 Métodos

Los pacientes de control sin cáncer y los pacientes a los que se haya diagnosticado una forma de cáncer se someterán a una base de historia médica y exploración física, pruebas neuropsicológicas y cognitivas, un conjunto estándar de pruebas clínicas de laboratorio (hemograma, Panel 20, CH50, análisis de orina), niveles de pterinas urinarias, dihidropteridina reductasa (DHPR) y un panel en sangre (plasma) de aminoácidos séricos en ayunas. Se medirán los niveles de base de Phe en sangre, suero o plasma. El paciente será objeto de un seguimiento estricto con visitas semanales a la clínica. Los pacientes volverán a la clínica para una evaluación completa una semana después de terminar el período de tratamiento. Si se necesitara aumentar la dosis, los pacientes seguirán el mismo programa expuesto anteriormente. Se llevará un seguimiento de la seguridad durante todo el ensayo.

Diagnóstico y criterios de inclusión/exclusión

35 El paciente puede ser macho o hembra, con un diagnóstico documentado de una forma de cáncer. El estudio incluirá pacientes con cáncer que se han sometido previamente a cirugía, quimioterapia, radioterapia y/u otra terapia contra el cáncer y están en remisión (p. ej., sin enfermedad durante al menos 5 años). Se excluirá a un paciente de este estudio inicial si al paciente se le ha diagnosticado una forma de cáncer, pero no se ha sometido a ninguna forma de terapia contra el cáncer.

40 Seguridad de la PAL procariótica

Se determinará que la terapia con PAL procariótica 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 las exploraciones clínicas, los ensayos clínicos de laboratorio u otros estudios apropiados.

45 Eficacia de la PAL procariótica

Una vez que se ha determinado que la terapia con PAL procariótica es segura y eficaz para reducir los niveles de fenilalanina (Phe) en plasma en un paciente, por ejemplo, una reducción desde el intervalo normal de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 70 µM a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a menos

de aproximadamente 30 μM , preferiblemente menos de aproximadamente 20 μM y más preferiblemente todavía menos de aproximadamente 10 μM , las composiciones de PAL procariótica pueden probarse en pacientes con cáncer que se han sometido previamente a cirugía, quimioterapia, radioterapia y/u otra terapia contra el cáncer y están en remisión (p. ej., sin enfermedad durante al menos 5 años), así como en pacientes a los que se les ha diagnosticado una forma de cáncer, pero que no se han sometido todavía a ninguna forma de terapia contra el cáncer.

Para pacientes con cáncer en remisión, la PAL procariótica se administra, en solitario o en combinación con terapia estándar contra el cáncer para la forma particular de cáncer, con el fin de determinar si los pacientes a los que se administró la terapia de PAL permanecen en remisión (p. ej., sin enfermedad) durante un periodo de tiempo más largo que los pacientes a los que no se administraron composiciones de PAL procariótica.

Para pacientes con cáncer con una forma activa de cáncer, la PAL procariótica se administra, en solitario o en combinación con terapia estándar contra el cáncer para la forma particular de cáncer, con el fin de determinar si los pacientes a los que se administró la terapia de PAL tienen una mejor respuesta a la terapia contra el cáncer (p. ej., siguen sin enfermedad más tiempo, tienen un tiempo de supervivencia mayor o presentan un menor crecimiento del tumor, tamaño del tumor o carga tumoral) que los pacientes a los que no se administraron composiciones de PAL procariótica.

La terapia con PAL procariótica puede administrarse en solitario, o en combinación con un agente terapéutico contra el cáncer o un agente terapéutico contra el cáncer dirigido, o con una dieta con restricción de proteínas (p. ej., sin fenilalanina), o ambos.

Ejemplo 18

Actividad antitumoral de variantes AvPAL (mutantes de cisteína) en un modelo de xenoinjerto con línea celular de tumor de melanoma B16

Se evaluaron los efectos antitumorales de administración de dosis profilácticas o terapéuticas del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S, preparado como se describe en el EJEMPLO 7 y formulado a 2,86 y 7,14 mg/ml en Tris 10 mM-HCl, NaCl 140 mM, ácido trans-cinámico (t-CA) 1 mM, pH 7,5, en un modelo de xenoinjerto de líneas celulares de tumor de melanoma B16. Tratamiento profiláctico significa un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de enfermedad, y tratamiento terapéutico significa un tratamiento administrado a un sujeto que muestra signos de enfermedad. La eficacia antitumoral del tratamiento profiláctico o terapéutico con la variante AvPAL pegilada se midió según el retraso en el crecimiento del xenoinjerto de melanoma B16 y por el aumento en el tiempo de supervivencia de los ratones.

Para establecer los xenoinjertos tumorales, se inyectó a 96 ratones B6J hembra de seis semanas por vía subcutánea aproximadamente 1×10^6 células tumorales de melanoma B16 en el flanco trasero. Se asignó aleatoriamente a los ratones inyectados en dos grupos, que representaban las cohortes de tratamiento profiláctico y tratamiento terapéutico.

Los ratones asignados al grupo profiláctico se dividieron adicionalmente en cuatro grupos, donde cada grupo recibió dos inyecciones subcutáneas por semana de vehículo (Tris 10 mM-HCl, NaCl 140 mM, ácido trans-cinámico (t-CA) 1 mM, pH 7,5) o mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en diferentes niveles de dosis (40, 80 o 100 mg/kg). El Día 1 en el grupo profiláctico indica el día en que se inyectaron las células de melanoma B16 en los ratones, como se indica en la FIGURA 18 (arriba).

Sin embargo, en el grupo terapéutico, el Día 1 indica el día en que los tumores de melanoma B16 inyectados en los ratones alcanzaron un volumen de 200-300 mm^3 , como se indica en la FIGURA 18 (abajo). Cuando los tumores en los ratones asignados al grupo terapéutico alcanzaron un volumen de 200-300 mm^3 , estos ratones se dividieron adicionalmente en cuatro grupos, donde cada grupo recibió dos inyecciones subcutáneas por semana de vehículo (Tris 10 mM-HCl, NaCl 140 mM, t-CA 1 mM, pH 7,5) o mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S en diferentes niveles de dosis (40, 80 o 100 mg/kg) en el flanco opuesto al tumor.

Se palpó diariamente a todos los ratones hasta que los tumores fueron mensurables. El volumen del tumor se determinó tres veces por semana por medida con calibre digital mediante la fórmula $(l \times w^2)/2$, donde w es el más corto de los 2 ejes perpendiculares del tumor

Los pesos corporales se midieron tres veces por semana, y diariamente se realizaron observaciones clínicas (mortalidad, anomalías y signos de dolor o sufrimiento). Se realizaron recogidas de sangre por el seno retroorbitario cada semana antes de la administración de la dosis (día 1 de cada semana), 48 horas después de la dosis (día 3 de cada semana) y al terminar.

Se sacrificó a los ratones en el día 36 o individualmente cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1.500 mm^3 , según lo que sucediera primero. Al terminar se recogieron los tumores y se fijaron con formalina para examen histológico.

Algunos ratones en el grupo profiláctico tenían un volumen del tumor de 1.500 mm³ en el día 16 (véase FIGURA 18 (arriba)). Algunos ratones en el grupo de tratamiento tenían un volumen del tumor de 1.500 mm³ en el día 10 (véase FIGURA 18 (abajo)).

5 La FIGURA 18 muestra que el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S fue capaz de retrasar el crecimiento del xenoinjerto de línea celular de melanoma B16 de una forma dependiente de la dosis cuando la enzima se administró profilácticamente (arriba) o terapéuticamente (abajo).

La Tabla 10 muestra que el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S fue capaz de incrementar la supervivencia, determinado por el porcentaje de ratones con un volumen del tumor de menos de 1.500 mm³, de una forma dependiente de la dosis cuando la enzima se administró de forma profiláctica o terapéutica.

10 Tabla 10: Efecto de rAVPAL-PEG_C565SC503S en la supervivencia en un modelo de xenoinjerto de tumor de melanoma B16

Grupo de tratamiento	Supervivencia (profiláctico)	Supervivencia (terapéutico)
Vehículo	Día 13	Día 10
40 mg/kg de rAVPAL-PEG	Día 18	Día 13
80 mg/kg de rAVPAL-PEG	Día 20	Día 15
100 mg/kg de rAVPAL-PEG	Día 25	Día 15

*Día en el que al menos el 50% de los ratones en el grupo de tratamiento tienen un volumen del tumor de más de 1.500 mm³

15 Este estudio muestra que el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S ejerce un efecto antitumoral cuando se administra de forma profiláctica o terapéutica en un modelo murino de melanoma.

Ejemplo 19

Actividad antitumoral de variantes AvPAL (mutantes de cisteína) en modelos de xenoinjerto con líneas celulares de tumores de hepatoma

20 Se evaluaron los efectos antitumorales de la administración de dosis profilácticas de mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S, preparado como se describe en el EJEMPLO 7 y formulado a 9,1 mg/ml en Tris 10 mM-HCl, NaCl 140 mM, ácido trans-cinámico (t-CA) 1 mM, pH 7,5, en dos modelos de xenoinjerto de líneas celulares de tumor de hepatoma. Tratamiento profiláctico significa un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de enfermedad. La eficacia antitumoral del tratamiento profiláctico con la variante AvPAL pegilada se midió por el retraso en el crecimiento de los xenoinjertos de hepatoma y por el aumento en el tiempo de supervivencia de los ratones.

25 Para establecer los xenoinjertos tumorales, se inyectó a 20 ratones B6J hembra de seis semanas por vía subcutánea aproximadamente 1 x 10⁷ células tumorales de hepatoma SNU398 o aproximadamente 5 x 10⁶ células tumorales de hepatoma HepG2 en el flanco trasero.

30 Los ratones a los que se inyectó SNU398 y HepG2 se dividieron en dos grupos, donde cada grupo recibió tres inyecciones subcutáneas por semana de vehículo (Tris 10 mM, HCl, NaCl 140 mM, ácido trans-cinámico (t-CA) 1 mM, pH 7,5) o mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S a 60 mg/kg. El Día 1 indica el día en que se inyectaron células SNU398 o células HepG2 en los ratones, como se indica en la FIGURA 19.

35 Se palpó diariamente a todos los ratones hasta que los tumores fueron mensurables. El volumen del tumor se determinó tres veces por semana mediante la medida con calibre digital con la fórmula $(l \times w^2)/2$, donde w es el más corto de los 2 ejes perpendiculares del tumor.

Se midieron los pesos corporales tres veces por semana, y diariamente se realizaron observaciones clínicas (mortalidad, anomalías y signos de dolor o sufrimiento). Se realizaron recogidas de sangre a través del seno retroorbitario antes del estudio, 48 horas después de la 7^a dosis y al terminar.

40 Se sacrificó a los ratones en el día 60 o individualmente cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1.500 mm³, según lo que sucediera primero. Se recogieron los tumores al terminar y se fijaron con formalina para examen histológico.

La FIGURA 19 muestra que la administración profiláctica del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S fue capaz de retrasar el crecimiento de los xenoinjertos de líneas celulares de hepatoma SNU398 (arriba) y HepG2 (abajo).

La Tabla 11 muestra que la administración profiláctica del mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S fue capaz de aumentar supervivencia determinada por el porcentaje de ratones con un volumen del tumor inferior a 1.500 mm³ de los xenoinjertos de líneas celulares de hepatoma SNU398 y HepG2.

5 Tabla 11: Efecto de rAVPAL-PEG_C565SC503S en la supervivencia en dos modelos de xenoinjerto de tumor de hepatoma

Grupo de tratamiento	Supervivencia (SNU398)	Supervivencia (HepG2)
Vehículo	Día 33	Día 54
60 mg/kg de rAVPAL-PEG	> Día 60	> Día 60

*Día en el que al menos el 50% de los ratones en el grupo de tratamiento tienen un volumen del tumor de más de 1.500 mm³

Estos estudios demuestran que el mutante de cisteína doble de la AvPAL pegilada AvPAL_C565SC503S ejerce un efecto antitumoral cuando se administra profilácticamente en dos modelos murinos de hepatoma.

10 *****

Es de esperar que a los expertos en la técnica se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones en la invención tal como se expone en los ejemplos ilustrativos anteriores. En consecuencia sobre la invención solo se considerarán dichas limitaciones cuando aparezcan en las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> BioMarin Pharmaceutical Inc.
 Vellard, Michel C
 Fitzpatrick, Paul A
 Kakkis, Emil D
 Wendt, Daniel J
 Muthalif, Mubarak
 10 Bell, Sean M
 Okhamafe, Augustus O.

<120> Composiciones de fenilalanina amoníaco-liasa procariótica y métodos de tratamiento del cáncer que usan composiciones de la misma

15 <130> 11808-030-228

<150> US 61/066,125
 <151> 17-08-2007

20 <160> 33

<170> Patent In versión 3.4

25 <210> 1
 <211> 1710
 <212> ADN
 <213> Nostoc punctiforme

30 <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 ggcagatggt gtcatctctc gcgaacaagc agcgggaactt 300
 cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgcaggaa acaaattatc gttagcagac 360
 gtgcggtcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggtgctgc tggatatacga 420
 ctcgaaactta ttcagcggat tgaactttc ctaaacgctg gogtgacacc coatgtctat 480
 gagtttggtt ctatcgggtc tagcggcgat ttggtgcat tatectacat tactggggca 540
 ctaatcggtc tagatectag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccggtt 600
 acagccttgt ctggtttggg ttgccaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca 660
 atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcaaaa 720
 gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaaggttt atacggaacg 780
 aatcaatctt tccaccggtt tattcatcag tgaagccac atcccggtca actatggaca 840
 gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcatctttag ttcgtgaaga gttggatggt 900

ES 2 602 618 T3

```

aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcggtt attctctccg ctgtctggca    960
cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa    1020
atgaactcag tcaccgataa occattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc    1080
ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg    1140
ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac    1200
ggcttaccac cctctttagt tggaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt    1260
ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcc a ctggtgagct tctatggaaa ttccctagcc    1320
gatcgctttc ctaccacgc cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt    1380
tccgcaaatt tgacacgtcg ttcgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg    1440
atgtttgag ttcaagctgt tgacctcgc acatataaga tgaaaggcca ttatgatgca    1500
cgtacatgcc tctacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga    1560
aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag    1620
catattgcc ggatttcagc tgatctgct ggtggtggtt taattgtgca agcagttgag    1680
catatTTTTT cgagcttaaa gtcaacgtaa                                     1710

```

<210> 2

<211> 569

5

<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

```

10

ES 2 602 618 T3

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

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

ES 2 602 618 T3

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
 <212> ADN
 <213> *Anabaena variabilis*

5

<400> 3
 atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga 60
 aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg 120
 gttagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggatt 180
 caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg 240
 acatctgggtt ttggcgggat ggccaatggt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc 300
 caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcagga acaaattacc cttggcggat 360
 gtgcgcgcag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcatc tggcatcaga 420
 ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgtat 480
 gagtttggtt caattggtgc aagtgggtgat ttagtgccac taccctacat tactggttca 540
 ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcca 600
 acagctctac gtcaactgaa tttgtcacc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg 660

10

ES 2 602 618 T3

```

atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgtcta cgataactcaa 720
atTTTaaactg cgatecgtat gggcgTTCac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc 780
aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctgggtca attatgggca 840
gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gttagatggt 900
aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcactccg atgccttccc 960
cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaaat tgaatcgaa 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 gcggtaactc aattatgcca ctgTtgacct tctatggaaa ttocatgcc 1320
gatcgcttTc ctacctatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact 1380
tcagcgactc tagcccgcgcg ttctgtggat atcttccaga attatgtggc gatcgctctg 1440
atgTttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactgggtca ttacgatgca 1500
cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga 1560
caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag 1620
catattgcc cggatttctgc tgatateget gctggTggtg tgattgtgca agcagttcaa 1680
gatatcttac cctgcttgca ttaa 1704

```

<210> 4

<211> 567

5 <212> PRT

<213> *Anabaena variabilis*

<400> 4

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

10

ES 2 602 618 T3

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

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

ES 2 602 618 T3

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		

5 <210> 7
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sustitución de cisteína a serina en la posición 64 en Anabaena variabilis PAL

5 <400> 7

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		

ES 2 602 618 T3

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 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

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

ES 2 602 618 T3

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
Asp Ile Leu Pro Cys Leu His 565		

<210> 8
 <211> 567
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sustitución de cisteína a serina en la posición 318 en *Anabaena variabilis* PAL

10

<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	
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

ES 2 602 618 T3

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
 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

ES 2 602 618 T3

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
Asp Ile Leu Pro	Cys Leu His		
	565		

<210> 9
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Sustitución de cisteína a serina en la posición 503 en Anabaena variabilis PAL

10

<400> 9

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
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

ES 2 602 618 T3

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 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

ES 2 602 618 T3

450	455	460
Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu 465	470	475
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
Asp Ile Leu Pro Cys Leu His 565		

<210> 10
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Sustitución de cisteína a serina en la posición 565 en *Anabaena variabilis* PAL

10

<400> 10		
Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe 1	5	10
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
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

ES 2 602 618 T3

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 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

ES 2 602 618 T3

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
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
Asp Ile Leu Pro Ser Leu His 565		

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

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

<400> 11

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	

ES 2 602 618 T3

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 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

ES 2 602 618 T3

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 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		

- 5 <210> 12
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

- 10 <220>
<223> Cebador 1 de Nostoc punctiforme PAL (directo)

- <400> 12
cactgtcata tgaatataac atctctacaa cagaacat 38

- 15 <210> 13
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

- 20 <220>
<223> Cebador 2 de Nostoc punctiforme PAL (inverso)

- <400> 13
gacagtgccg gccgctcacg ttgactttaa gctcgaaaaa atatg 45

- 25 <210> 14
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

- 30 <220>
<223> Cebador 1 Anabaena variabilis PAL (directo, fragmento N-terminal)

- <400> 14
cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38

- 35 <210> 15
<211> 49
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 602 618 T3

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

5 <400> 15
ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggg tatcaacatc aattagtgg 49

<210> 16
<211> 49
10 <212> ADN
<213> Artificial

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

15 <400> 16
ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc 49

<210> 17
<211> 41
20 <212> ADN
<213> Artificial

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

25 <400> 17
cactgtgctg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g 41

30 <210> 18
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cebador directo de Anabaena variabilis PAL

<400> 18
cactgtcata tgaagacact atctcaagca caaag 35

40 <210> 19
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Cebador inverso de Anabaena variabilis PAL

<400> 19
50 cactgtctcg agatgcaagc aggtaagat atcttg 36

<210> 20
<211> 38
<212> ADN
55 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear el sitio 5' NheI y borrar el sitio interno NheI (directo, N-terminal)

60 <400> 20
cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38

<210> 21
65 <211> 49
<212> ADN

ES 2 602 618 T3

<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear el sitio 5' Nhel y borrar el sitio interno Nhel (inverso, N-terminal)

5

<400> 21
ggaaattcc tccatgatag ctggcttgg tatcaacatc aattagtgg 49

10

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

15

<220>
<223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear el sitio 5' Nhel site y borrar el sitio interno Nhel (directo, fragmento C-terminal)

20

<400> 22
ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttc 49

25

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

30

<220>
<223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear el sitio 5' Nhel site y borrar el sitio interno Nhel (inverso, fragmento C-terminal)

35

<400> 23
acagtggcgg cgcctaatg caagcagggt aagatatctt g 41

40

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

45

<220>
<223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear el sitio 5' Nhel y el sitio 3' Smal (directo)

50

<400> 24
cactgtgaat tcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38

55

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

60

<220>
<223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear el sitio 5' Nhel y el sitio 3' Smal (inverso)

65

<400> 25
cactgtcccg ggtaatgca agcagggtaa gatattct 37

70

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

75

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

80

<400> 26
gtcattacga tgcacgcgcc tctctatcac ctgcaactga g 41

ES 2 602 618 T3

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

5
<220>
<223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 503 (inverso)

<400> 27
10 ctcagttgca ggtgatagag aggcgcgtgc atcgtaatga c 41

<210> 28
<211> 42
<212> ADN
15 <213> Artificial

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

<400> 28
20 cagttcaaga tatcttacc tccttgatt aacccgggct gc 42

<210> 29
<211> 42
25 <212> ADN
<213> Artificial

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

<400> 29
30 gcagccccggg ttaatgcaag gagggaaga tatcttgaac tg 42

<210> 30
<211> 44
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
40 <223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 64 (directo)

<400> 30
gcagggatt caggcatctt ctgattacat taataatgct gttg 44

<210> 31
<211> 44
45 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> Cebador de Anabaena variabilis PAL para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 64 (inverso)

<400> 31
55 caacagcatt attaatgtaa tcagaagatg cctgaatacc ctgc 44

<210> 32
<211> 43
60 <212> ADN
<213> Artificial

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

<400> 32
65 caagatcgtt actcactccg atccctccc cagtattgg ggc 43

ES 2 602 618 T3

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

5
<220>
<223> Cebador de *Anabaena variabilis* PAL para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 318 (inverso)

10
<400> 33
gccccaata ctgggaagg gatcggagtg agtaacgatc ttg 43

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una variante de fenilalanina amoníaco-liasas (AvPAL) de *Anabaena variabilis* y un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde:
- 5 (i) la variante AvPAL tiene una secuencia de SEQ ID NO: 10, en donde la posición 565 de la variante AvPAL tiene un residuo de serina; o
- (ii) la variante AvPAL tiene una secuencia de SEQ ID NO: 11, en donde las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL tienen un residuo de serina, y
- en donde el soporte farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador seleccionado entre el grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico.
- 10 2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la AvPAL tiene una secuencia de SEQ ID NO: 10.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la AvPAL tiene una secuencia de SEQ ID NO: 11.
- 15 4. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el estabilizador es L-fenilalanina.
5. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el estabilizador es ácido trans-cinámico.
6. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el estabilizador es ácido benzoico.
- 20 7. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha variante AvPAL comprende además un polímero soluble en agua.
8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, en donde el polímero soluble en agua es un polietilenglicol.
9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, en donde la relación entre dicha variante AvPAL y polietilenglicol es de aproximadamente de 1:3 (AvPAL:PEG 1:3).
- 25 10. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de tratamiento del cáncer.
11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de pulmón, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer renal, melanoma metastásico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, mieloma y un cáncer pediátrico.
- 30 12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde la proliferación y/o la supervivencia de células obtenidas del cáncer es sensible a la restricción o agotamiento de fenilalanina.
13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde dicho método comprende además la administración de un agente terapéutico contra el cáncer, o un agente terapéutico contra el cáncer dirigido, o una dieta con restricción de proteínas.
- 35 14. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método para reducir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma de un paciente.
15. La composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 10 a 14, en donde la composición farmacéutica es para reducir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del paciente a un intervalo desde por debajo del nivel de detección a menos de aproximadamente 20 μM a menos de aproximadamente 10 μM .
- 40

FIGURA 1A**Secuencia génica de PAL de Nostoc punctiforme**

```

1   atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc tttcactaat
61  agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga ggttgtaaat
121 gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcgggggtgt
181 caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacgggggtg
241 acatctggct ttggcgggat ggcagatggt gtcatctctc gcgaacaagc agcgggaactt
301 cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgcaggaa acaaattatc gttagcagac
361 gtgcgtagcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggtgctgc tggatatacga
421 ctcgaactta ttcagcggat tgaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat
481 gagtttggct ctatcgggtg tagcggcgat ttggtgccat tctctacat tactggggca
541 ctaatcggtc tagatcctag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccggtt
601 acagccttgt ctcgtttggg tttgccaaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggtttagca
661 atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa
721 gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaaggttt atacggaacg
781 aatcaatctt tccaccggtt tattcatcag tgcaagccac atcccggtea actatggaca
841 gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcacttttag ttcgtgaaga 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 gcctacgta ttacataggg
1141 ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac
1201 ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt
1261 ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctgttgagct tctatggaaa ttccttagcc
1321 gatcgcttcc ctaccacgcg cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt
1381 tccgcaaatt tgacaogtgc ttcogtagac atatttcaga attatatggc gatcgcgttg
1441 atgtttggag ttcaagctgt tgacctcgcg acatataaga tgaaaggtea ttatgatgca
1501 cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga
1561 aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaaacgaca acgagcaatg tttagatgag
1621 catattgccc ggatttcagc tgatatcgtt ggtgggtggtt taattgtgca agcagttgag
1681 catatTTTTT cgagcttaaa gtcaacgtaa

```

FIGURA 1B

Secuencia de proteínas de PAL de Nostoc punctiforme

MNITSLQQNITRSWQIPFTNSSDSIVTVGDRNLTIDEVVNVARH
GTQVRLTDNADVIRGVQASCDYINNAVETAQPIYGVTSGFGGMADVVISREQAAELQT
NLIWFLKSGAGNKLSLADVRAAMLLRANSHLYGASGIRLELIQRIETFLNAGVTPHVY
EFGSIGASGDLVPLSYITGALIGLDPSFTVDFDGKEMDAVTALSRLGLPKLQLOPKEG
LAMMNGTSVMTGIAANCVYDAKVLLALTMGVHALAIQGLYGTNQS FHPFIHQCKPHPG
QLWTADQMFSLLKDSSLVREELDGKHEYRGKDLIQDRYSLRCLAQFIGPIVDGVSEIT
KQIEVEMNSVTDNPLIDVENQVSYHGGNFLGQYVGVTMDRLRYIIGLLAKHIDVQIAL
LVSPEFSNGLPPSLVGNSDRKVNMGKGLQISGNSIMPLLSFYGNLADRFPHTAEQF
NQNINSQGYISANLTRRSVDIFQNYMAIALMFGVQAVDLRITYKMKGHYDARTCLSPNT
VQLYTAVCEVVGKPLTSVRPYIWNENEQCLDEHIARISADIAGGGLIVQAVEHIFSSL
KST

FIGURA 2A**Secuencia génica de PAL de *Anabaena variabilis***

1 atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga
 61 aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg
 121 gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggatt
 181 caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg ggaaccaat ttatggagt
 241 acatctgggt ttggcgggat ggccaatggt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc
 301 caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcagga acaattacc ctggcggat
 361 gtgcgcgcag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcatc tggcatcaga
 421 ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgat
 481 gagtttggtt caattggtgc aagtgggat ttagtgccac taccctacat tactggttca
 541 ctgataggct tagatcccag tttaagggt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcca
 601 acagctctac gtcaactgaa ttgtcaccc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg
 661 atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgctca cgatactcaa
 721 attttaactg cgatcgctat gggcgttccac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc
 781 aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggcca attatggga
 841 gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tccagtttag ttcgtgatga gttagatggt
 901 aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcaactccg atgccttccc
 961 cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tccagattg ccaaacaaat tgaatcgaa
 1021 atcaactcag tcaccgataa ccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga
 1081 ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg
 1141 ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat
 1201 ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaagg
 1261 ctgcaaatat gcggtaactc aattatgcca ctggtgacct tctatggaaa ttccatcgcc
 1321 gatcgctttc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact
 1381 tcagcgactc tagcccgcg ttctgtggat atcttcaga attatgtggc gatcgctctg
 1441 atgtttggag tccaagctgt tgacctcgc acatataaaa agactggcca ttacgatgca
 1501 cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga
 1561 caaaaacca cttcagatcg cccatatatt tggaaatgata atgagcaagg actggatgag
 1621 catattgccc ggatttctgc tgatctgct gctgggtggtg tgattgtgca agcagttcaa
 1681 gatattctac cctgcttgca ttaa

FIGURA 2B**Secuencia de proteínas de PAL de *Anabaena variabilis***

```

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

```

FIGURA 3

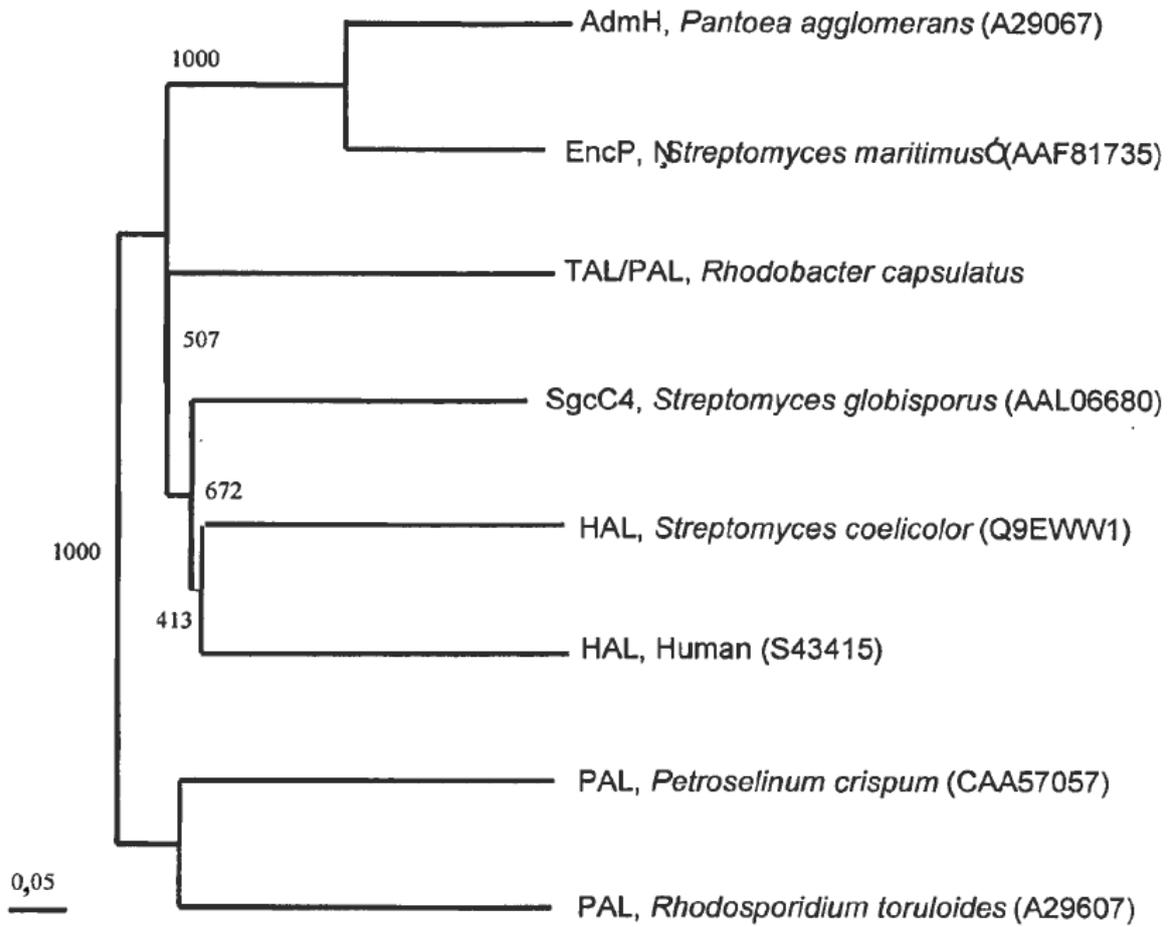


FIGURA 4

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

```
Avar03005300      MKTLSQAQSK TSSQQFSFTG NSSANVIIGN QKLTINDVAR VARNGTLVSL
Npun02008223      MNITSLQONI 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 GAGNKLSLAD VRAAMLLRAN SHLYGASGIR LELIQRIETF
EncP              QENLINA VAT NVGAYLDDTT ARTIMLSRIV SLARGNSAIT PANLDKLVAV
PputidaHAL        QRSLVLSHAA GIGAPLDDDL VRLIMVLKIN SLSRGFSGIR RKVIDALIAL
```

```
Avar03005300      LNAGVTPYVY EFGSIGASGD LVPLSYITGS LIGLDPSFKV DFNGKEMDAP
Npun02008223      LNAGVTPHVV EFGSIGASGD LVPLSYITGA LIGLDPSFTV DFDGKEMDAV
EncP              LNAGIVPCIP EKGSLGTSGD LGPLAAIALV CAGQW...KA RYNGQIMPGR
PputidaHAL        VNAEVYPHIP LKGSV GASGD LAPLATMSLV LLGEG...KA RYKQWLSAT
```

```
Avar03005300      TALRQLNLSP LTLKPKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDTQ ILTAIAMGVH
Npun02008223      TALSRLGLPK LQLQPKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDAK VLLALTMGVH
EncP              QALSEAGVEP MELSYKDGLA LINGTSGMVG LGTMVLQAAR RLVDRYLQVS
PputidaHAL        EALAVAGLEP LTLAAKEGLA LLNGTQASTA YALRGLFYAE DLYAAAIAACG
```

```
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 LSHKNCCKVQ DPYSLRCQPQ VMGACLTQLR QAAEVLGIEA

Avar03005300 NSVTDNPLID VDNQASYHGG NFLGQYVGMG MDHLRYYIGL LAKHLDVQIA
 Npun02008223 NSVTDNPLID VENQVSYHGG NFLGQYVGVV MDRLRYYIGL LAKHIDVQIA
 EncP NSSNDNPIVL PEEAEVFNHG HFHQYVAMA MDHLNMLAT VTNLANRRVD
 PputidaHAL NAVSDNPLVF AAEGDVISGG NFHAEPVAMA ADNLALAIIE IGSLSERIS

Avar03005300 LLASPEFSNG LPPSLLGNRE RKVNMGLKGL QICGNSIMPL LTFYGN SIAD
 Npun02008223 LLVSPEFSNG LPPSLVGNSD RKVNMGLKGL QISGNSIMPL LSFYGN SLAD
 EncP RFLDKSNSNG LPAFLCREDP .GLRLGLMGG QFMTASITAE TRTLTIPMSV
 PputidaHAL LMMDKHMS.Q LPPFLVENG. .GVNSGFMA QVTAAALASE NKALSHPHSV

Avar03005300 RFPTHAEQFN QNINSQGYTS ATLARRSVDI FQNYVAIALM FGVQAVDLRT
 Npun02008223 RFPTHAEQFN QNINSQGYIS ANLTRRSVDI FQNYMAIALM FGVQAVDLRT
 EncP QSLTSTADF. QDIVSFGFVA ARRAREVLTN AAYVVAPELL CACQAVDIRG
 PputidaHAL DSLPTSANQ. EDHVSMAPAA GKRLWEMAEN TRGVPAIEWL GACQGLDLRK

Avar03005300 YKKTGHYDAR ACLSPATERL YSAVRHVVGQ KPTSDRPYIW NDNEQGLDEH
 Npun02008223 YKMKGHYDAR TCLSPNTVQL YTAVCEVVGK PLTSVRPYIW NDNEQCLDEH
 EncP ADKL..... .SSFTRPL YERTRKIVP.F FDRDETITDY
 PputidaHAL GLKT..... .SAKLEKA RQALRSEVA.H YDRDRFFAPD

Avar03005300 IARISADIAA GGVIVQAVQD ILPCLH..
 Npun02008223 IARISADIAG GGLIVQAVEH IFSSLKST
 EncP VEKLAADLIA GEPVDAVAA H.....
 PputidaHAL IEKAVELLAK GSLTGLLPAG VLPSL...

FIGURA 5A-5E**Secuencia de proteínas de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)****A. AvPAL_C64S (SEQ ID NO:7)**

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANV IIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASSDYINNA
 VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
 LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMI SLLANSQ LVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGP IVDG I SQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKLG
 LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNENEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

B. AvPAL_C318S (SEQ ID NO:8)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANV IIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
 LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMI SLLANSQ LVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRSLPQYLGP IVDG I SQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKLG
 LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNENEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

C. AvPAL_C503S (SEQ ID NO:9)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANV IIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
 LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMI SLLANSQ LVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGP IVDG I SQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKLG
 LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARASLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNENEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

D. AvPAL_C565S (SEQ ID NO:10)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANV IIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
 LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMI SLLANSQ LVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGP IVDG I SQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKLG
 LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNENEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPSLH

E. AvPAL_C565SC503S (SEQ ID NO:11)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANV IIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
 LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMI SLLANSQ LVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGP IVDG I SQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKLG
 LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARASLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNENEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPSLH

FIGURA 6A

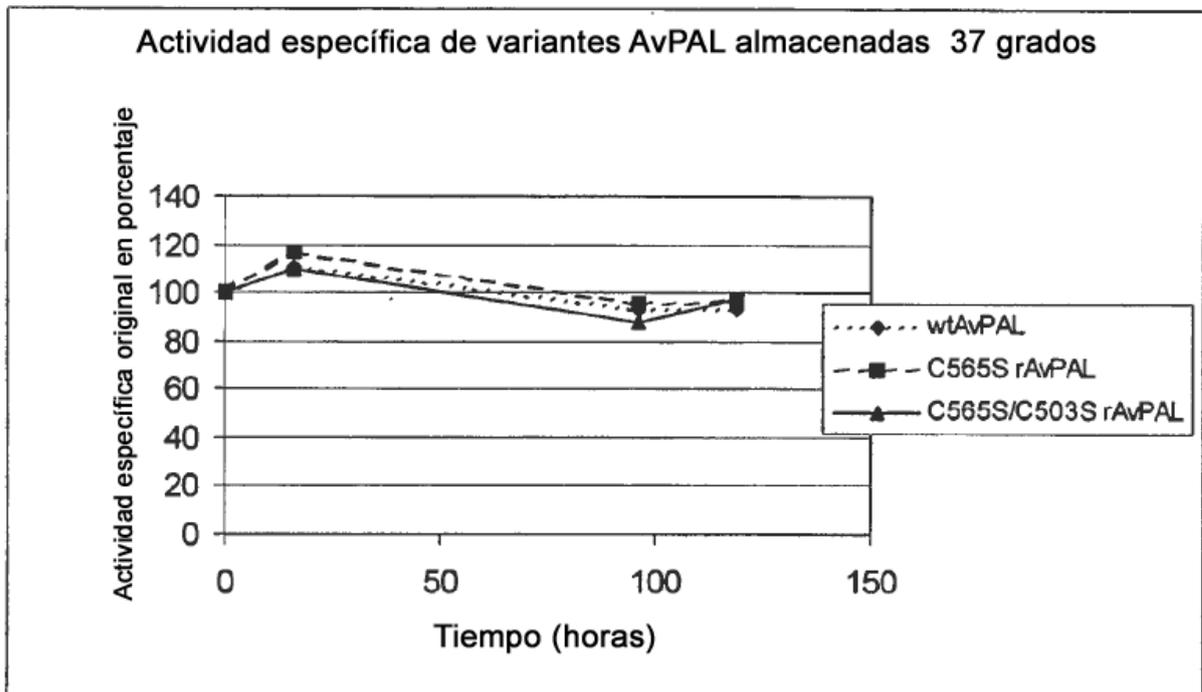


FIGURA 6B

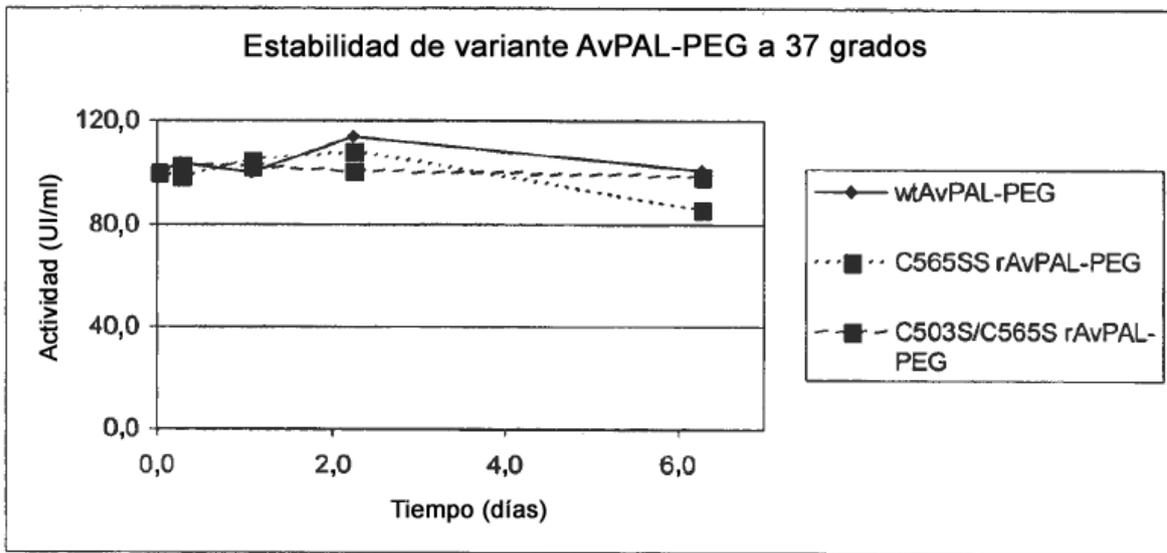


FIGURA 7A

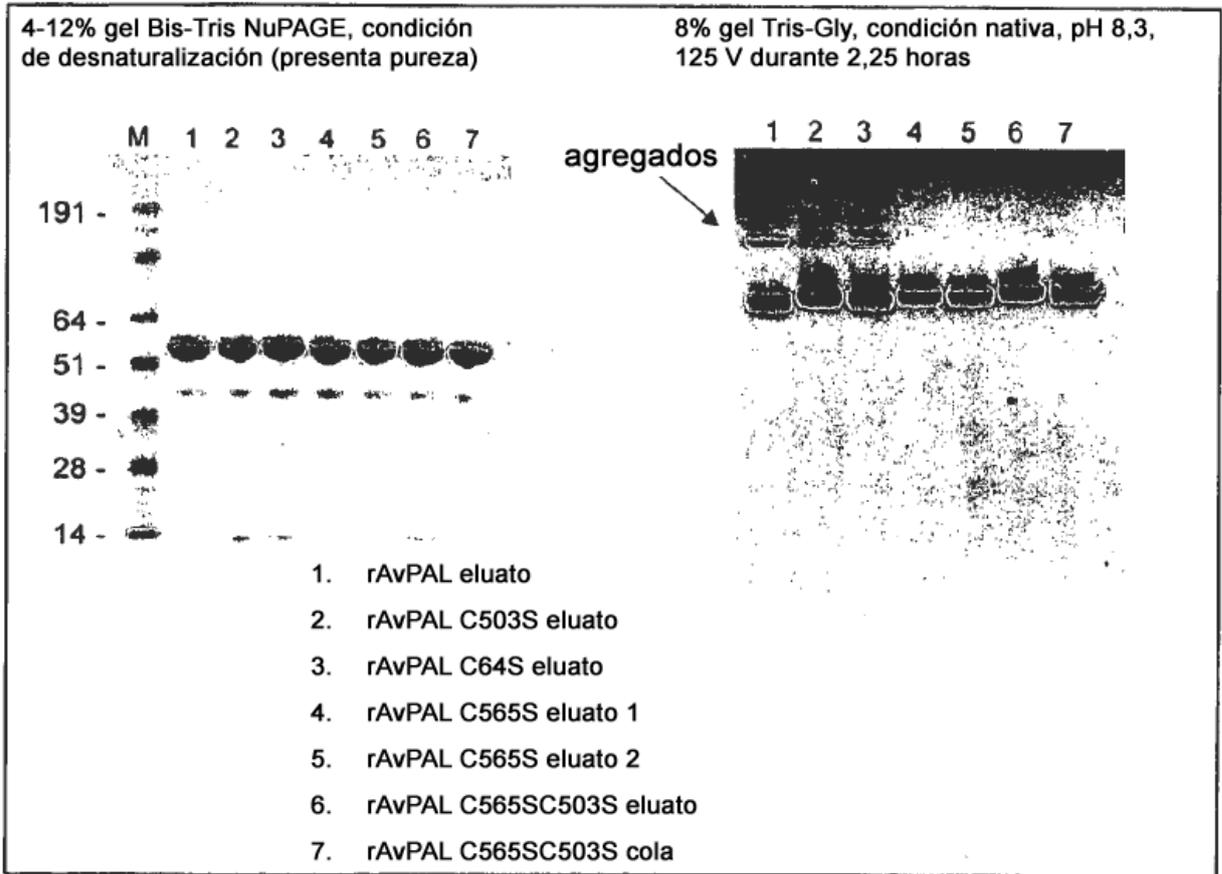


FIGURA 7B

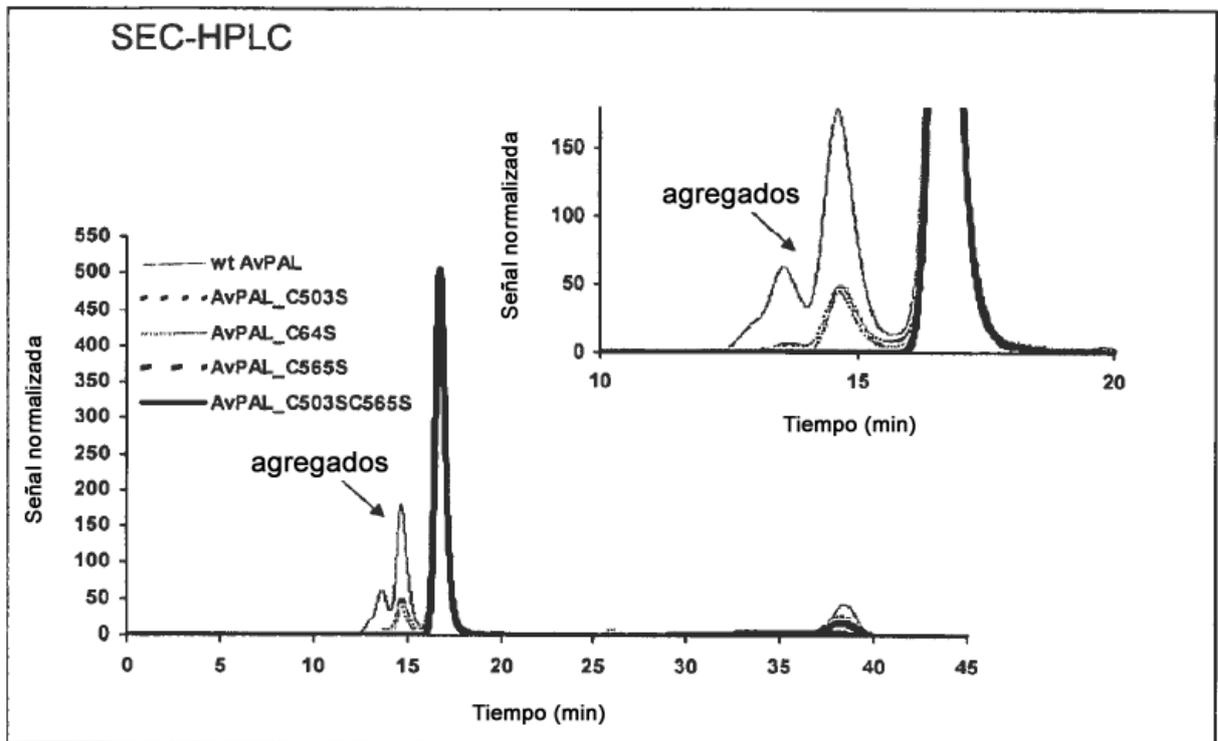


FIGURA 8

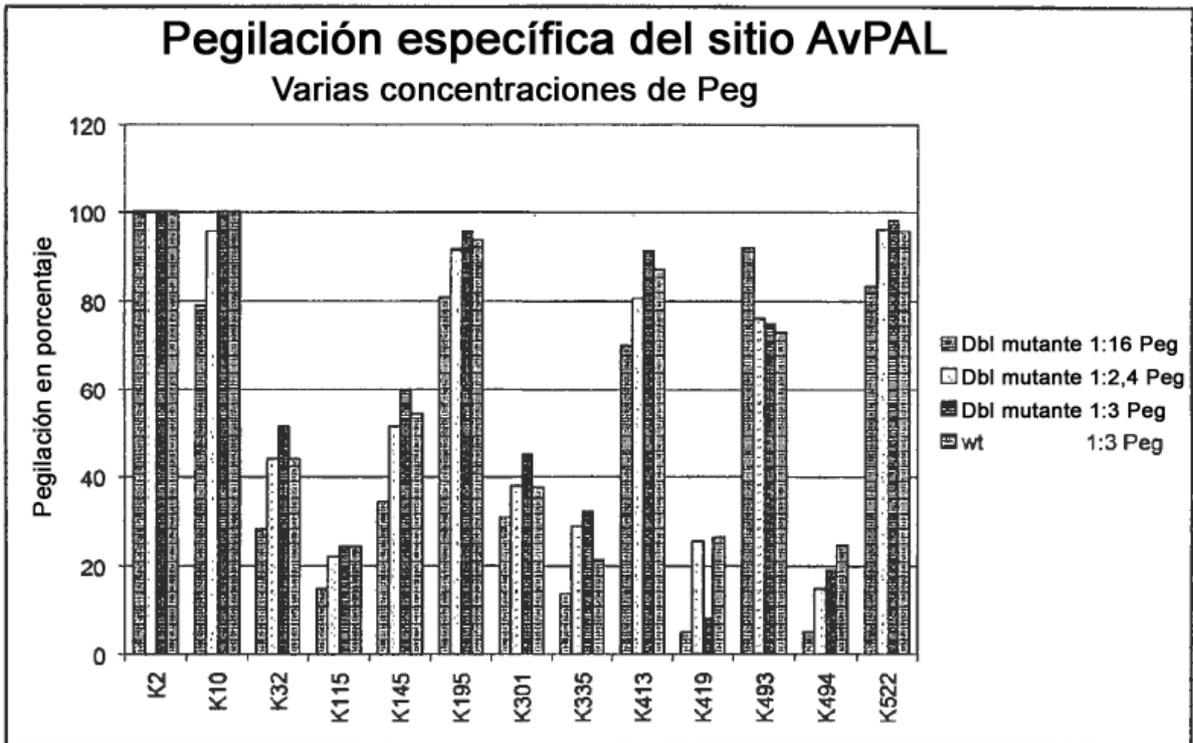


FIGURA 9

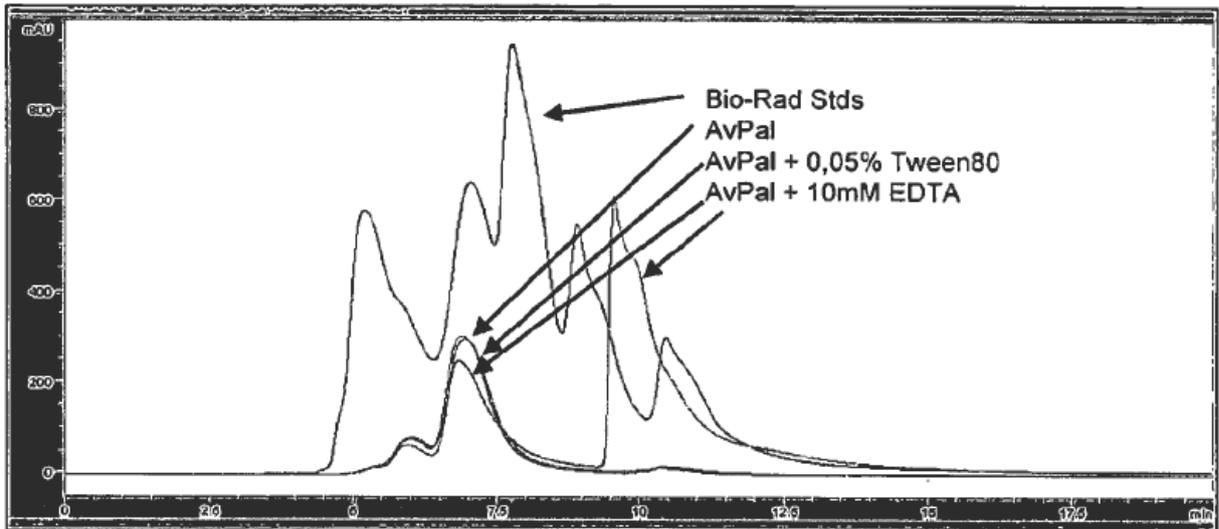


FIGURA 10A

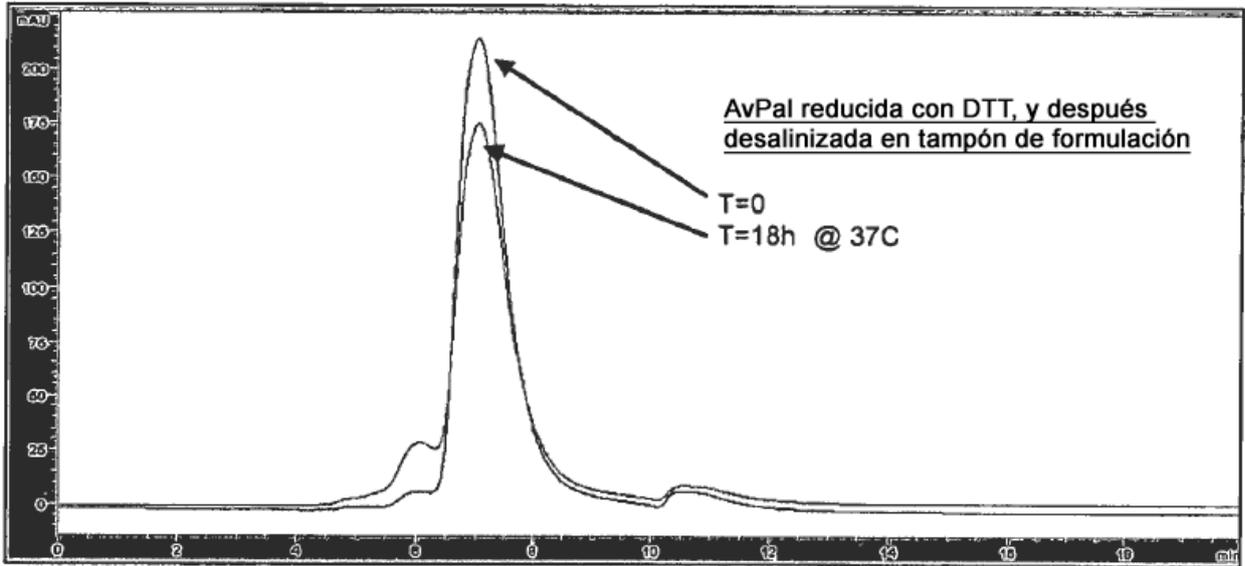


FIGURA 10B

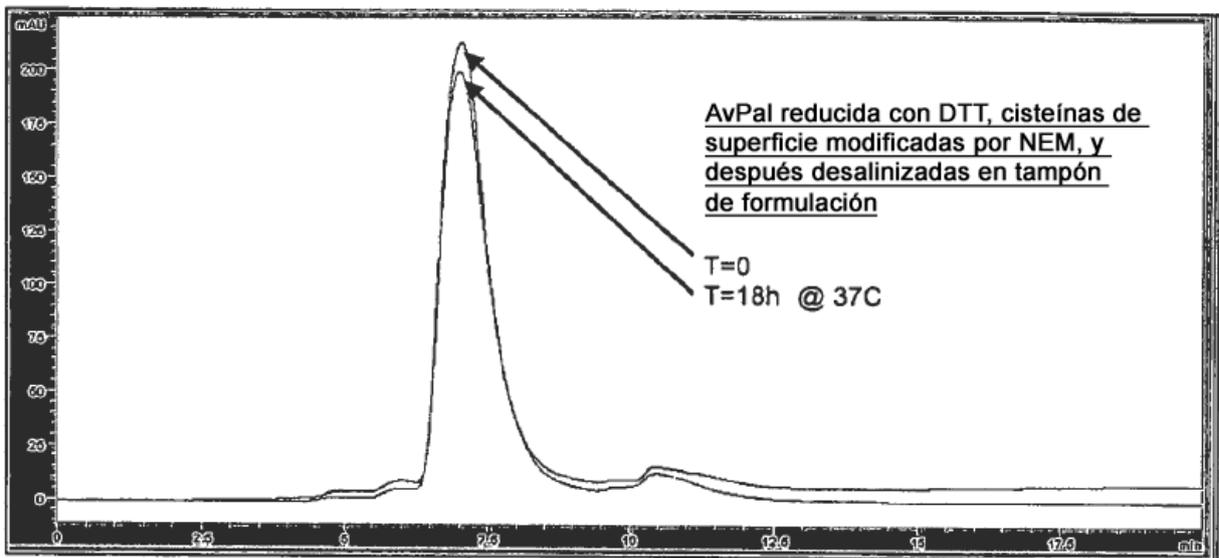


FIGURA 11

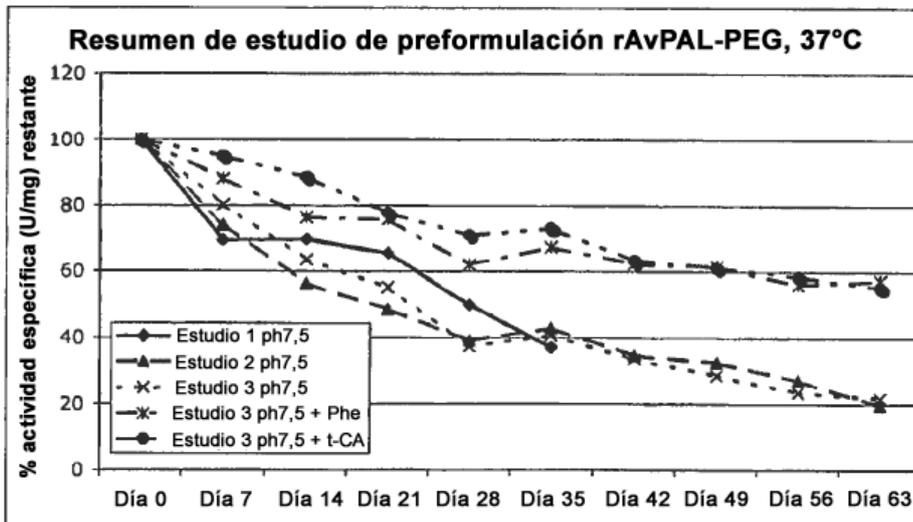
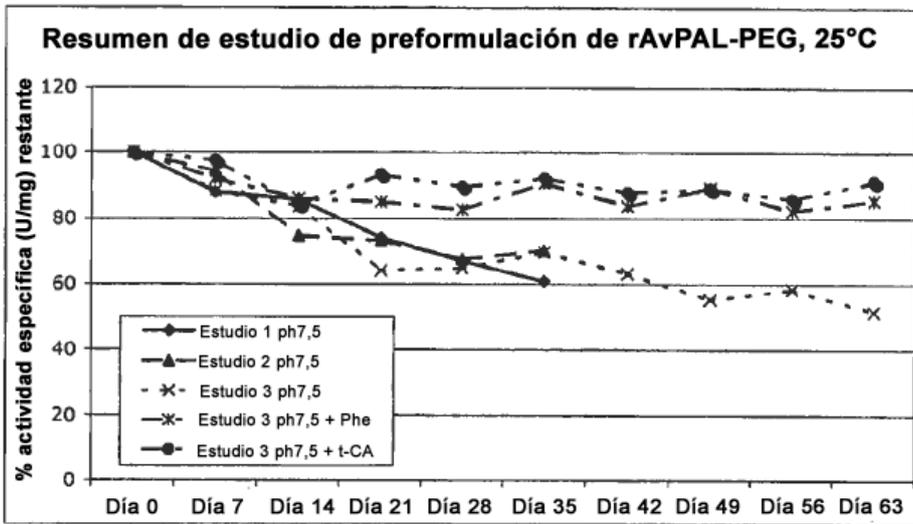
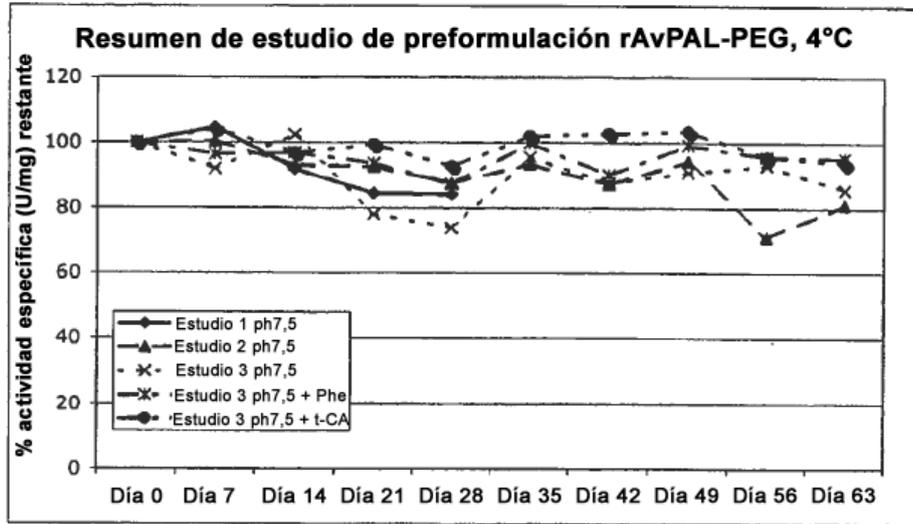


FIGURA 12

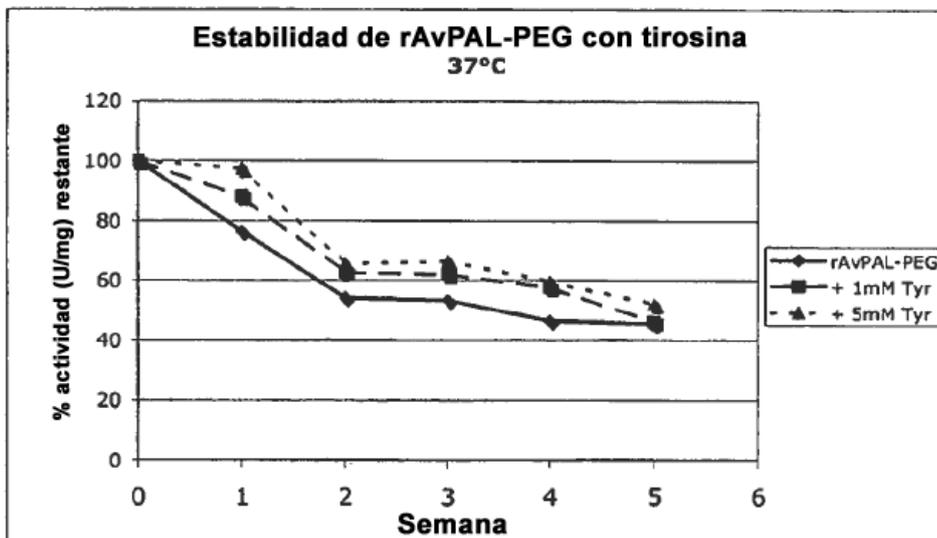
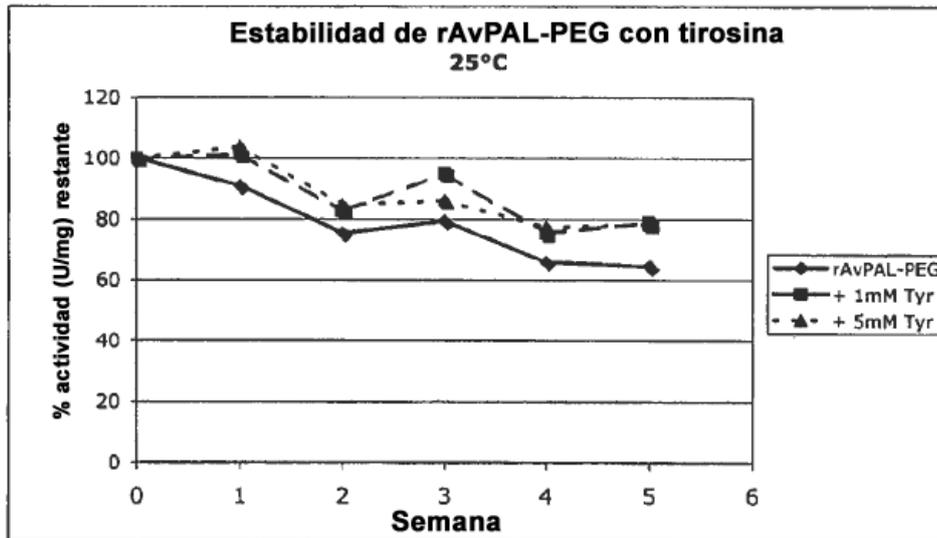
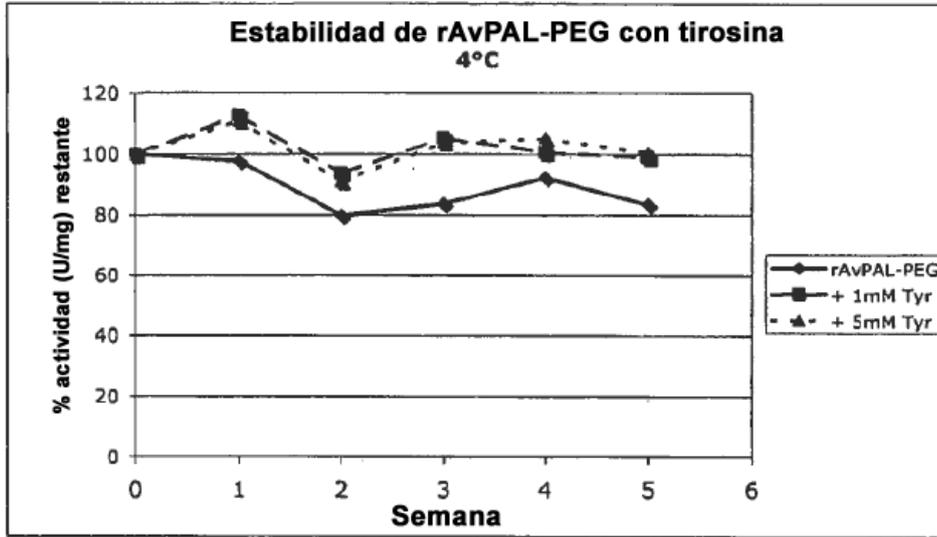
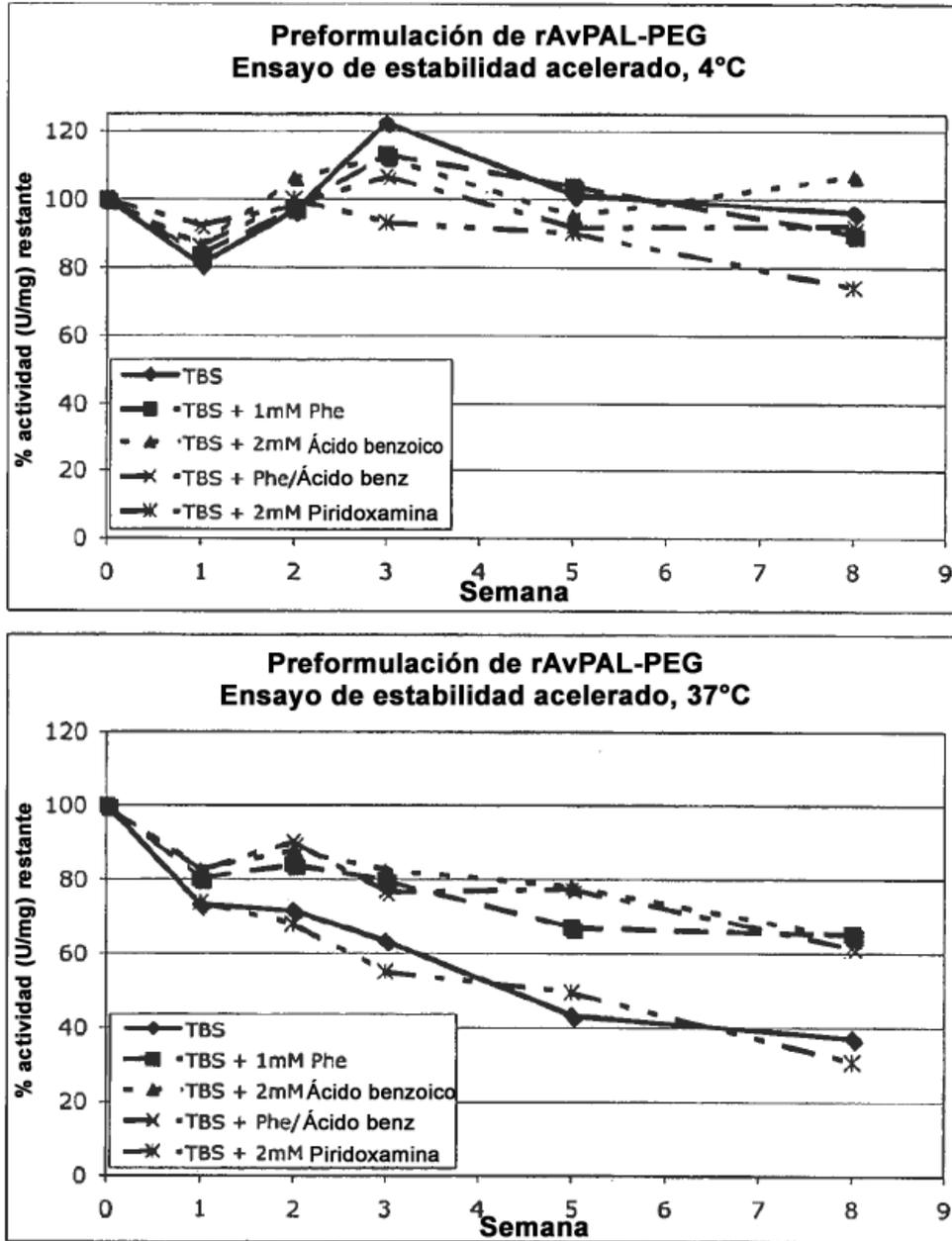
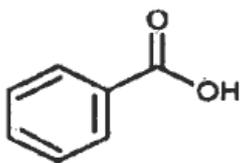


FIGURA 13A-B

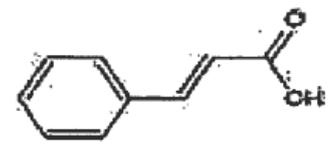
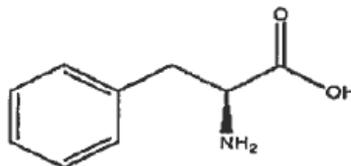
A.



B.



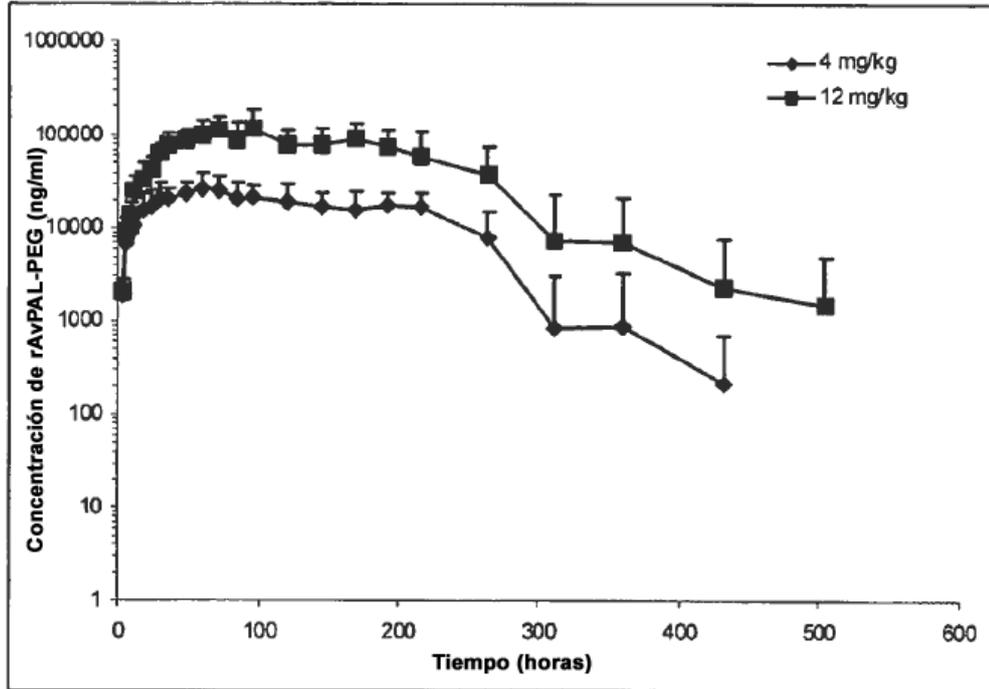
Ácido benzoico



Ácido t-cinámico

FIGURA 14A-B

A. Concentración de AvPAL_C565SC503S en plasma de monos Cynomolgus después de una única inyección subcutánea



B. Concentración de fenilalanina (Phe) y AvPAL_C565SC503S en plasma de monos Cynomolgus después de una única inyección subcutánea

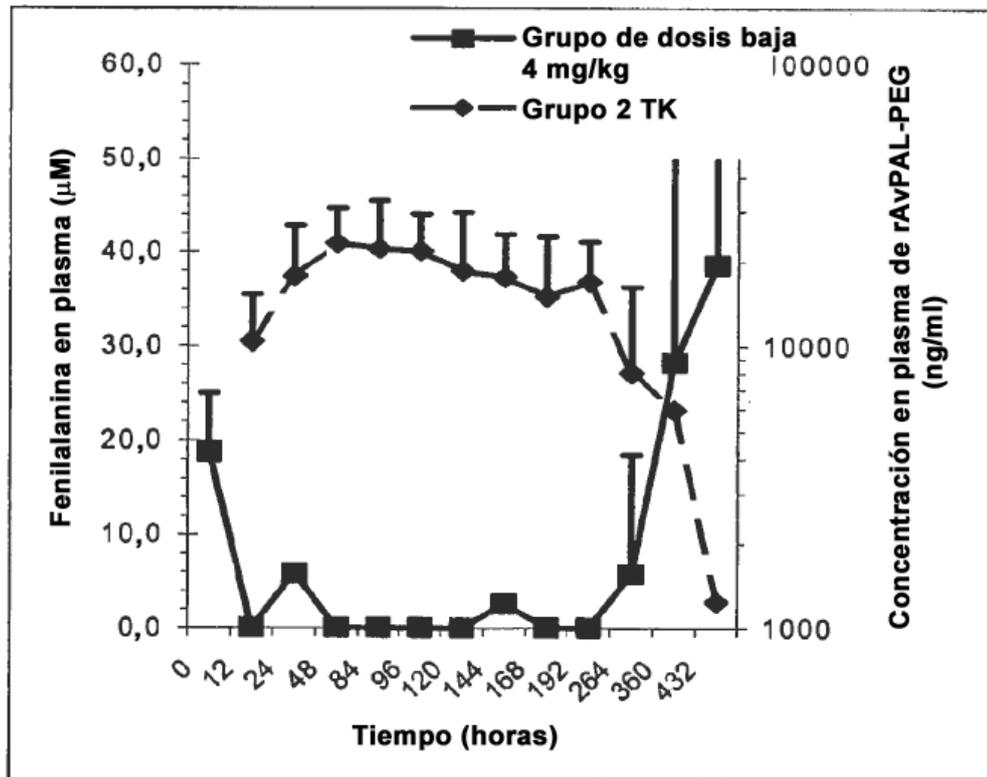
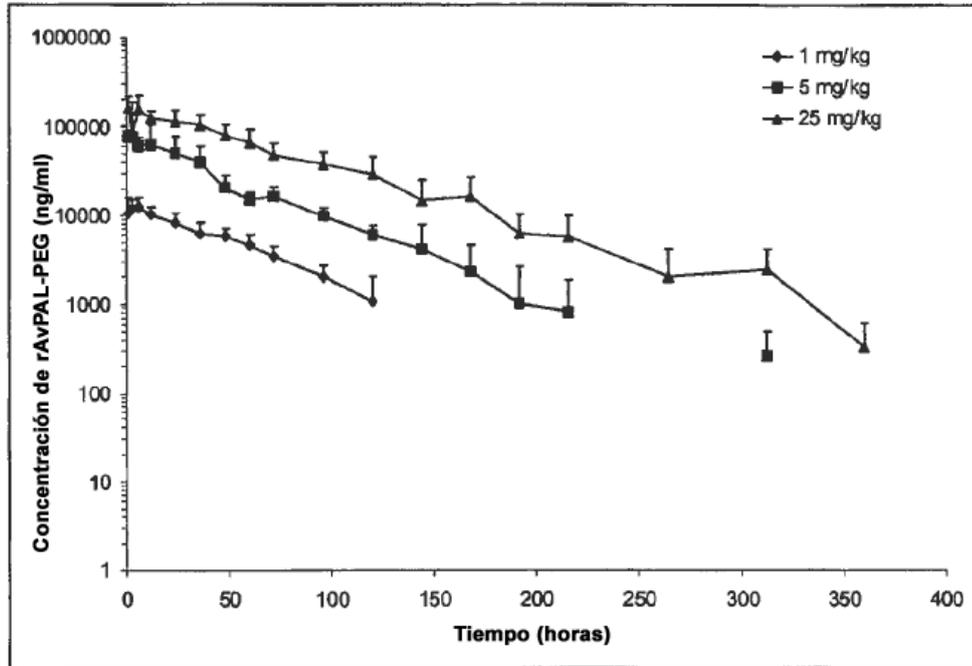


FIGURA 15A-B

A. Concentración de AvPAL_C565SC503S en plasma de ratas después de una única inyección intravenosa



B. Concentración de AvPAL_C565SC503S en plasma de ratas después de una única inyección subcutánea

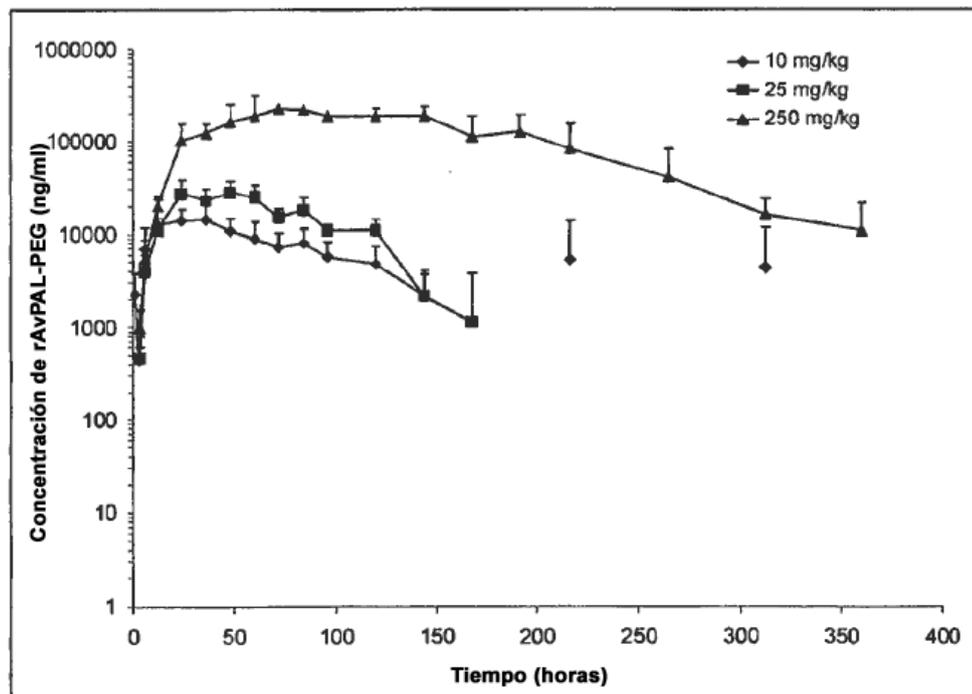
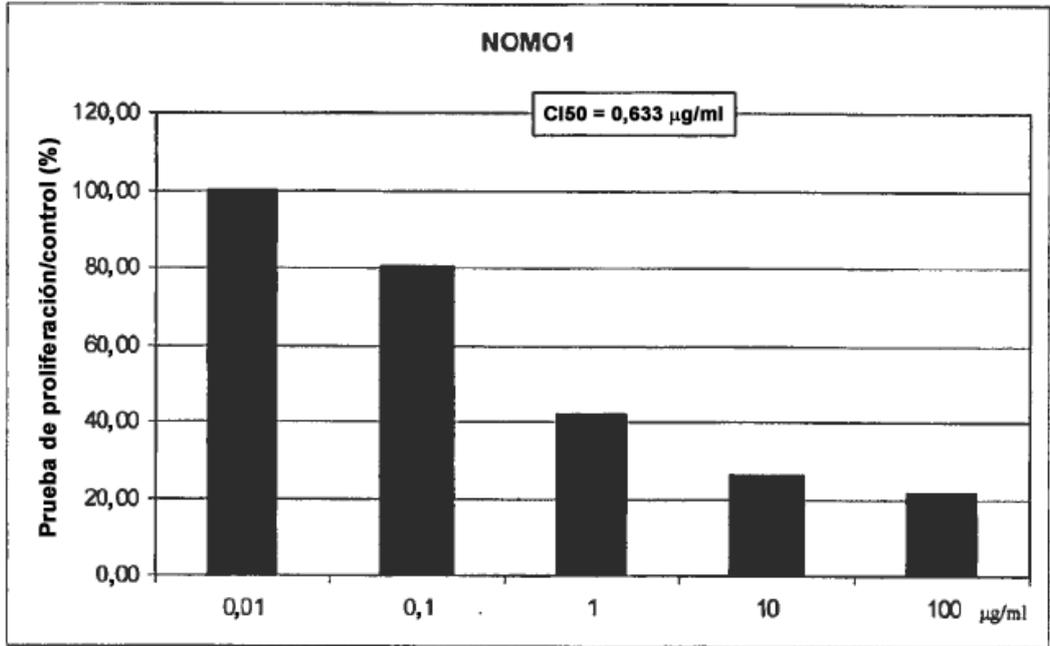


FIGURA 16A-B

A. Células NOMO1 de leucemia mieloide aguda (LMA)



B. Células de mieloma IM9

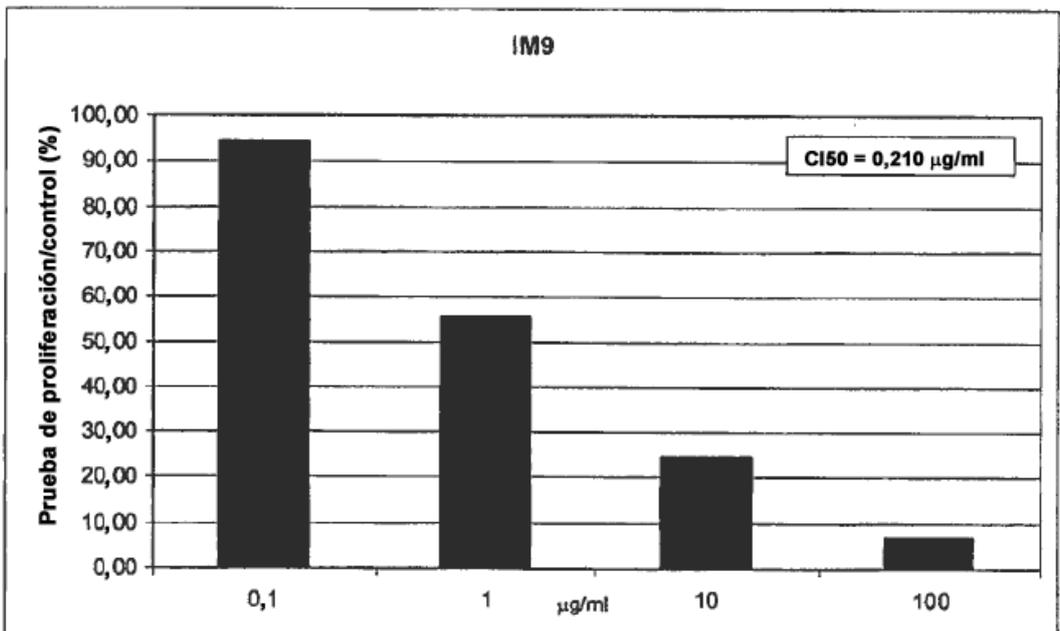


FIGURA 17A

A. Encéfalo/SNC – SF268 (arriba) y 498L (abajo)

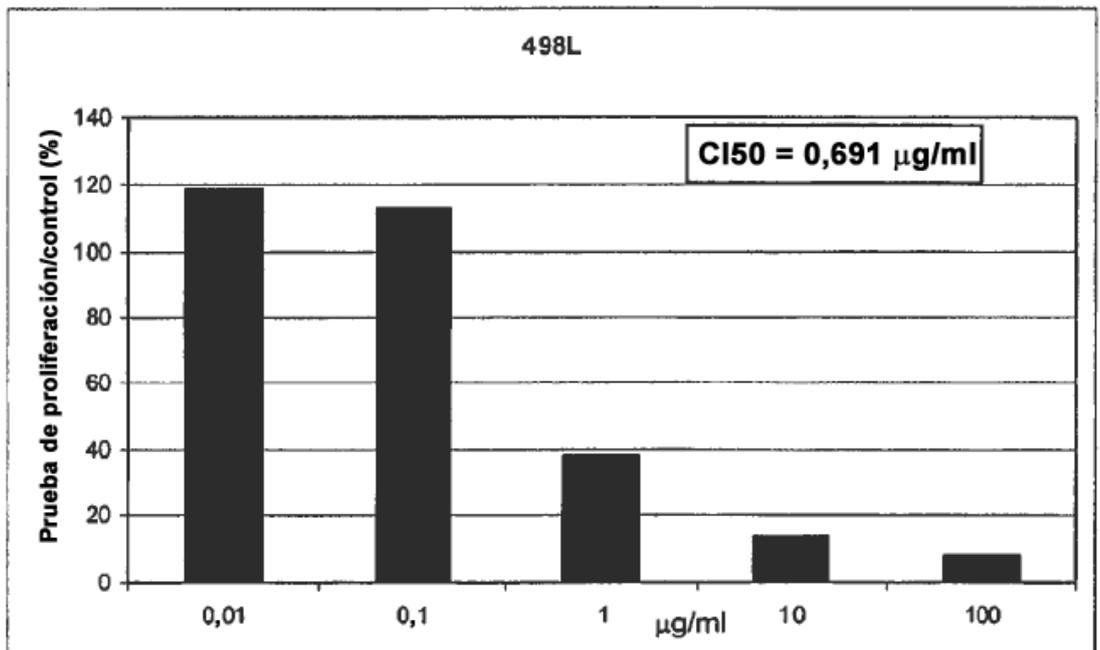
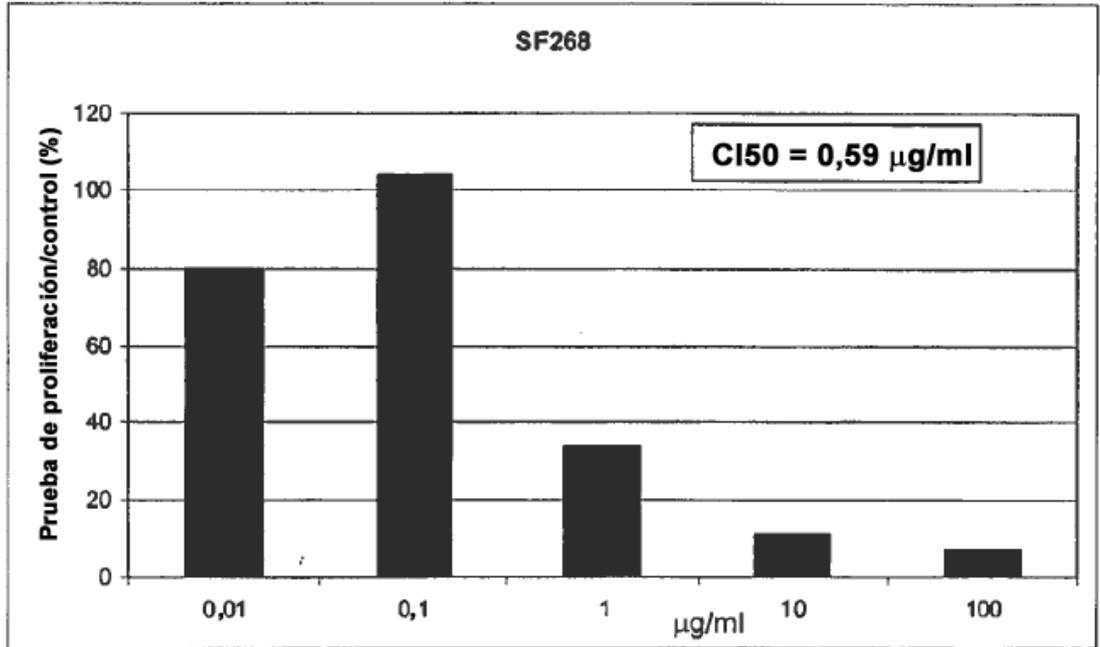


FIGURA 17B

B. Colon – HT29 (arriba) y HCT116 (abajo)

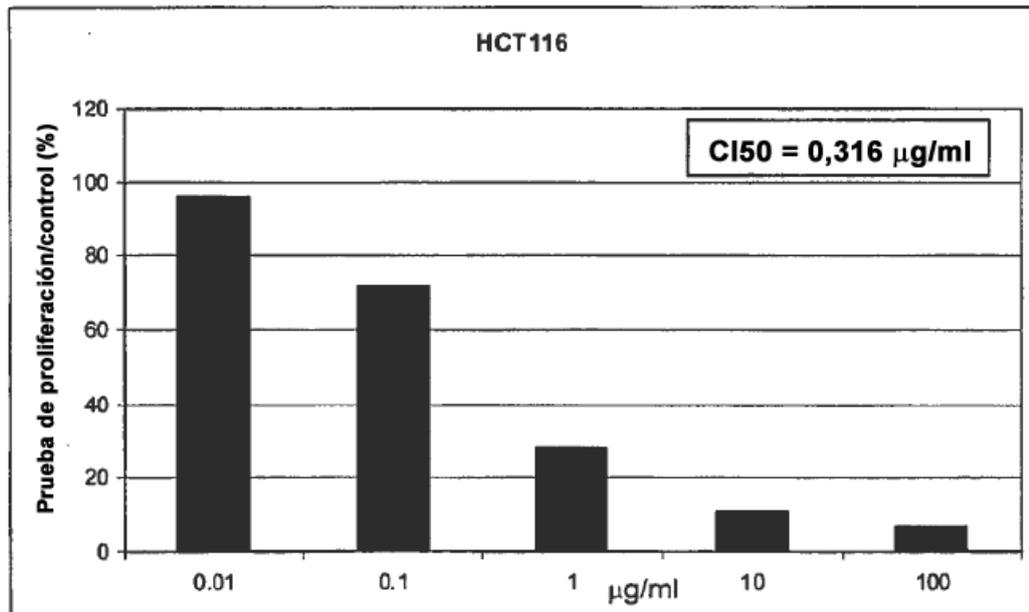
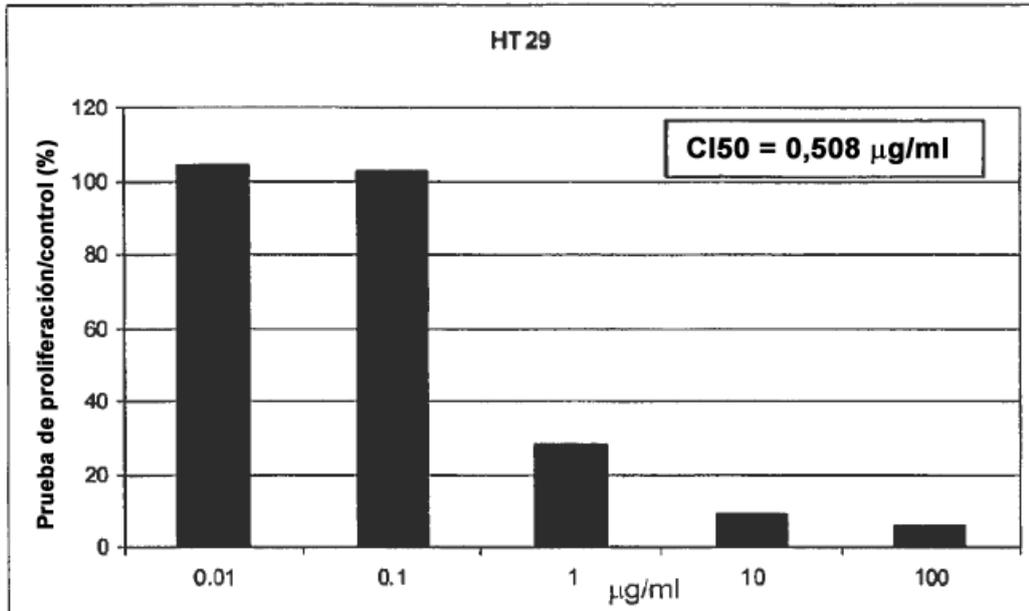


FIGURA 17C

C. Pulmón – H460 (arriba), 529L (centro) y 629L (abajo)

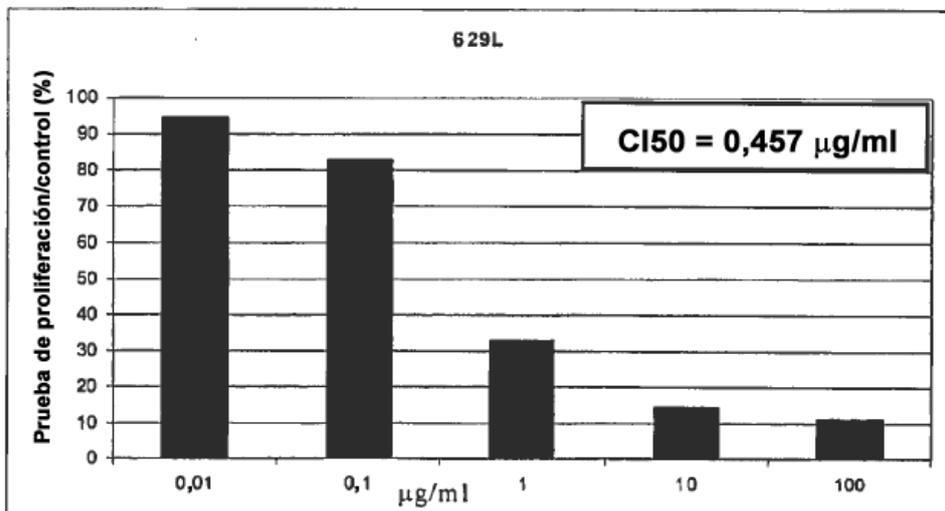
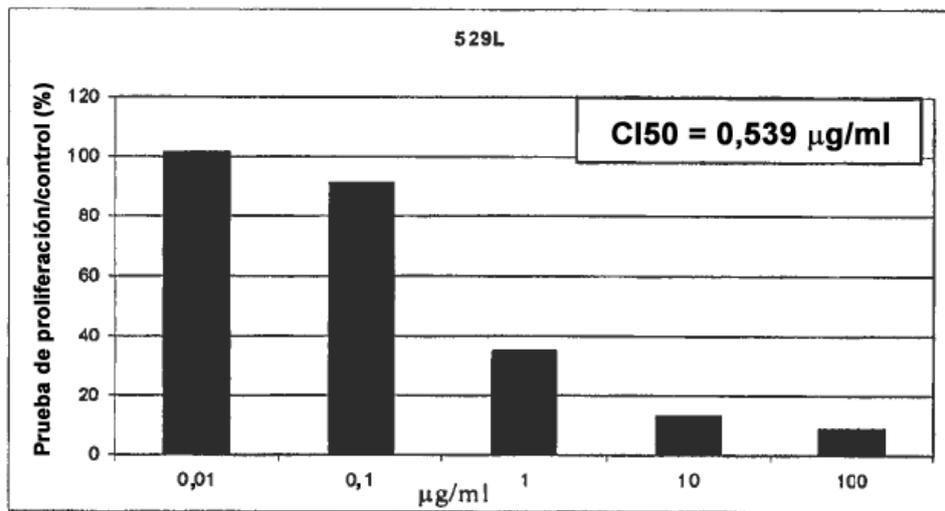
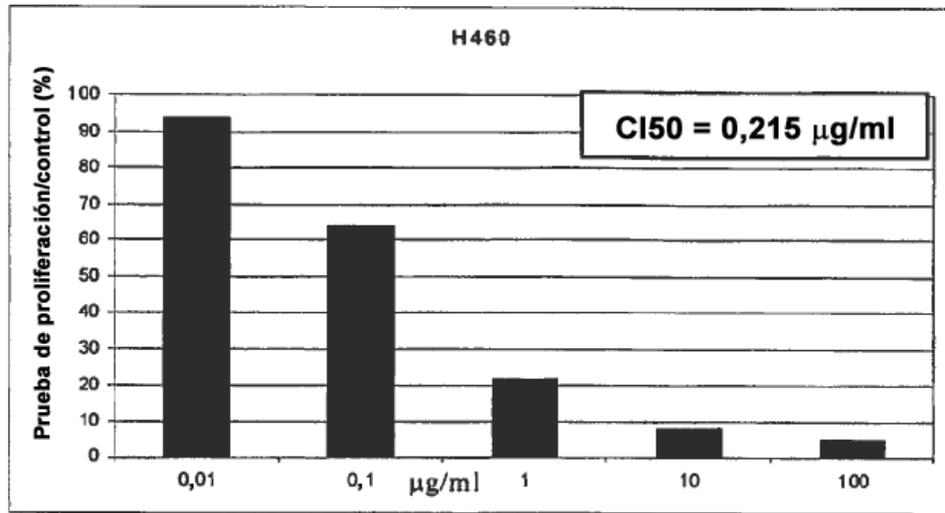


FIGURA 17D

D. Próstata – LNCAP (arriba), PC3M (centro) y DU145 (abajo)

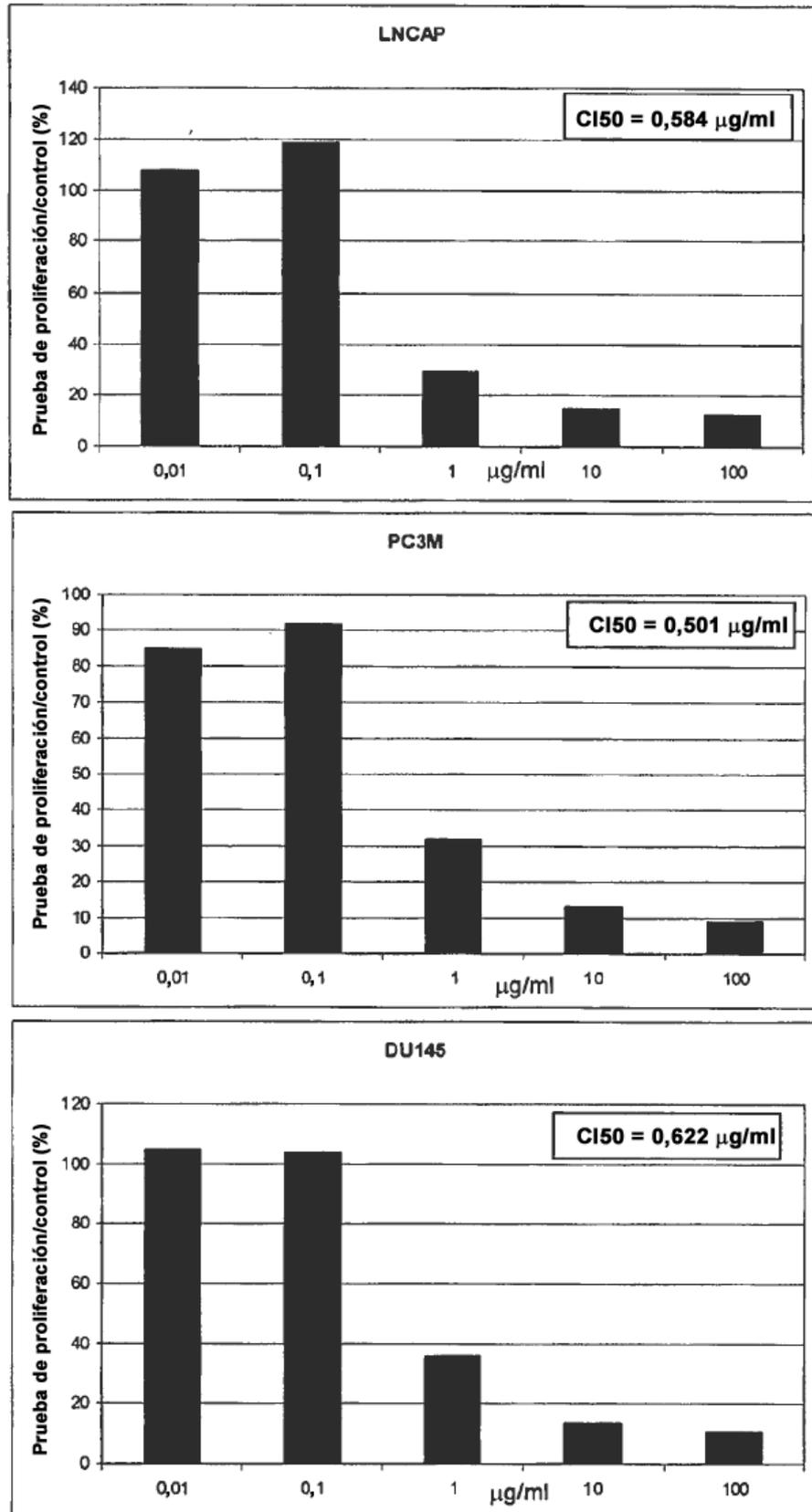


FIGURA 18

Estudio de melanoma B16: tamaño del tumor – profiláctico (arriba) y terapéutico (abajo)

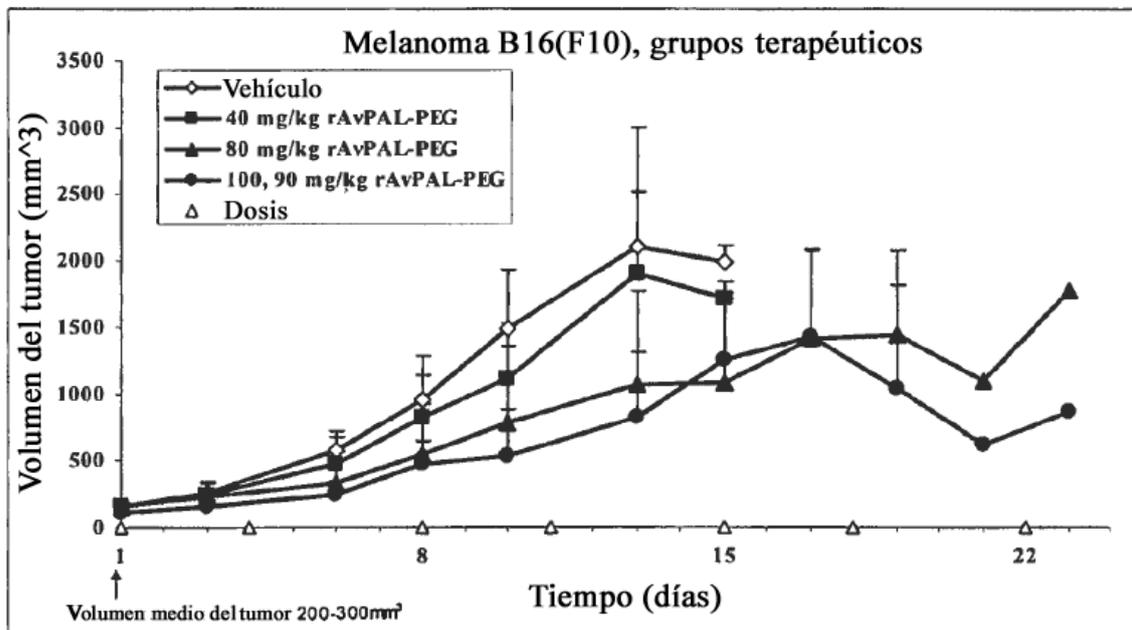
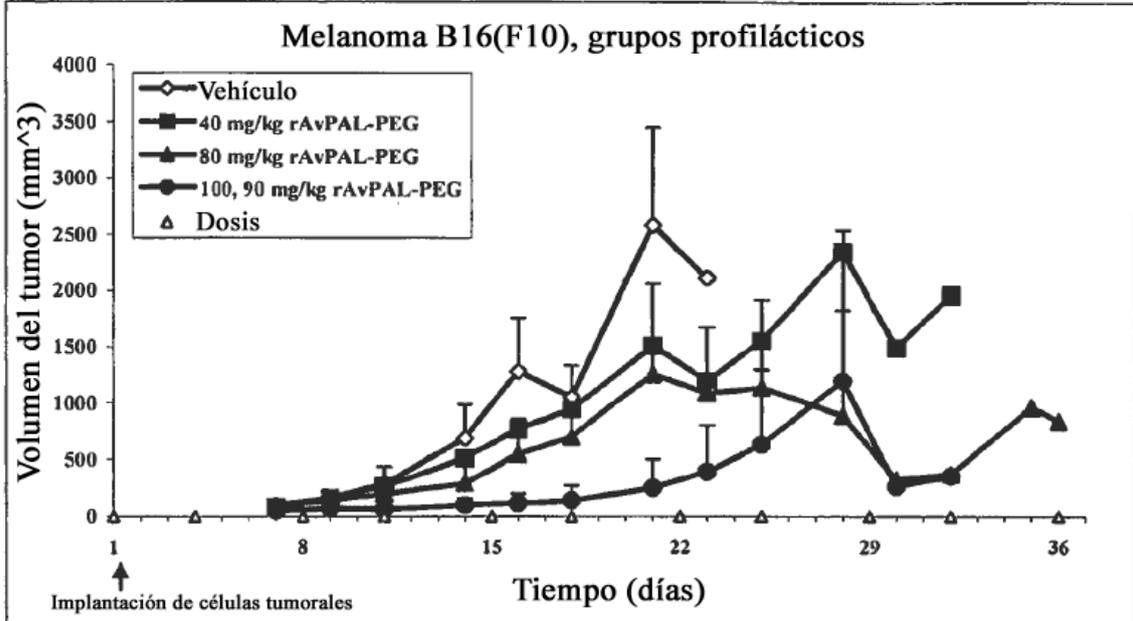


FIGURA 19

Estudio de hepatoma: SNU398 (arriba) y HepG2 (abajo)

