

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 542**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/51** (2006.01)

**A61K 47/10** (2007.01)

**A61K 47/18** (2007.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2011 E 15202466 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 3025728**

54 Título: **Método para purificar variantes de fenilalanina amoníaco-liasa procariotas**

30 Prioridad:

**04.02.2010 US 301478 P**

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

**21.11.2018**

73 Titular/es:

**BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)  
105 Digital Drive  
Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**KAKKIS, EMIL D.;  
VELLARD, MICHEL CLAUDE;  
WENDT, DANIEL J.;  
MUTHALIF, MUBARACK;  
OKHAMAFE, AUGUSTUS O.;  
BELL, SEAN M.;  
ZECHERLE, G. NICK;  
ANTONSEN, KRIS;  
ZHANG, YANHONG;  
LY, KIEU Y. y  
FITZPATRICK, PAUL A.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 690 542 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

Método para purificar variantes de fenilalanina amoniaco-liasa procariotas

**Campo de la invención**

5 En la presente memoria se proporciona un método para purificar variantes de fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) procariotas que tienen una agregación mínima. También se describen en la presente composiciones que comprenden variantes de PAL procariotas, incluyendo la optimización de tales composiciones para mejorar la actividad y/o la estabilidad catalítica de PAL procariota, mientras se reduce la inmunogenicidad y/o la sensibilidad proteolítica de PAL procariota. Adicionalmente se describen en la presente usos de dichas composiciones óptimas de variantes PAL procariotas con fines terapéuticos, por ejemplo, el tratamiento de la hiperfenilalaninemia (HPA),  
10 incluyendo la fenilcetonuria (PKU) y otros trastornos, incluido el cáncer.

Antecedentes

15 La fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) es una enzima no mamífera ampliamente distribuida en 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. 4512:1863-1872 (1967); Abell, et al, Methods Enzymol. 142: 242-253 (1987)) y bacterias (Bezanson, et al, Can. J. Microbiol. 16:147-151 (1970); Xiang, et al, J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002); Hill, et al, Chem. Commun. 1358-1359 (2003)) y se pueden producir de forma recombinante en *Escherichia coli*.

20 Se ha clonado y expresado PAL en bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*) a partir de dos cepas de cianobacterias, *Anabaena variabilis* (AV) y *Nostoc punctiforme* (Np) y se ha mostrado la actividad enzimática de PAL in vitro e in vivo (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos nº 7.531.341; 7.534.595; 7.537.923; y 7.560.263). También se ha producido una PAL de *Anabaena variabilis* recombinante pegilada (rAvPAL-PEG), en donde la proteína rAvPAL se derivatizó mediante la unión covalente de polietilenglicol (PEG) para aumentar su vida media y optimizar su perfil farmacocinético y/o reducir su inmunogenicidad (Id.). Se ha demostrado que rAvPAL-PEG metaboliza a la fenilalanina y está siendo desarrollado como una terapia de sustitución de enzima (EST) para los  
25 trastornos de pacientes o enfermedades asociadas con niveles elevados de fenilalanina, tales como HPA, incluyendo PKU, así como en la terapia del cáncer (Id.).

30 Aunque PAL potencialmente tiene varias aplicaciones terapéuticas, el uso de PAL puede estar limitado por la reducción de la actividad específica y la inestabilidad proteolítica. De manera similar a otras proteínas terapéuticas, el uso de PAL como terapia enzimática está acompañado de varias desventajas, tales como la inmunogenicidad y la sensibilidad proteolítica (véase Vellard, Curr. Opin. Biotechnol. 14:1-7 (2003)). Además, se requiere un equilibrio delicado entre la afinidad de sustrato y la actividad enzimática para lograr y mantener el control de los niveles de fenilalanina en plasma dentro de un intervalo algo estrecho normal en trastornos caracterizados por la hiperfenilalaninemia. Hasta el momento, no se ha hecho ningún esfuerzo concertado para mejorar estos parámetros debido a la escasez de conocimientos estructurales y bioquímicos en relación con esta proteína.

35 Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de moléculas de PAL con características cinéticas óptimas, incluyendo una potente actividad catalítica, una mayor vida media biológica, una mayor estabilidad bioquímica y/o una inmunogenicidad atenuada, para uso terapéutico, incluyendo el tratamiento de HPA, incluyendo PKU, y otros trastornos, incluido el cáncer.

Compendio

40 El PAL procariota o bacteriano puede servir como un tratamiento eficaz para HPA, incluyendo PKU, y otros trastornos, incluyendo el cáncer. De acuerdo con esto, la solicitud se refiere de forma general a composiciones de PAL procariota y fragmentos biológicamente activos, mutantes, variantes o análogos de los mismos, con propiedades mejoradas, tales como una actividad catalítica más potente, una mayor estabilidad bioquímica y, para aplicaciones terapéuticas, una inmunogenicidad atenuada y/o una mayor vida media biológica. La solicitud también  
45 se refiere a composiciones farmacéuticas y formulaciones que comprenden PAL procariota y fragmentos biológicamente activos, mutantes, variantes o análogos de los mismos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede incluir conservantes y/o estabilizadores. Se describen métodos de producción y purificación de PAL procariota y fragmentos biológicamente activos, mutantes, variantes o análogos de los mismos, y métodos de uso de tales composiciones para fines terapéuticos, incluyendo el tratamiento de HPA, incluyendo PKU, y otros trastornos,  
50 incluyendo el cáncer.

Específicamente, la presente invención proporciona un método para purificar una variante de fenilalanina amoniaco-liasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) con una agregación mínima que comprende:

- (a) lisar células bacterianas que contienen la variante AvPAL por homogeneización para generar un lisado celular;
- (b) calentar el lisado celular a 65°C durante 30 a 120 minutos;

(c) centrifugar el lisado celular calentado, en el que se retiene un sobrenadante que comprende la variante AvPAL;

(d) filtrar el sobrenadante para eliminar los precipitados; y

(e) separar la variante AvPAL de las proteínas contaminantes mediante cromatografía secuencial sobre una columna de intercambio aniónico (AEX) seguido de una columna de interacción hidrófoba (HIC), donde el eluato de la columna HIC comprende la variante AvPAL,

en donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID NO: 11).

En algunas realizaciones, el método es un método para purificar una variante de fenilalanina amoníaco-licasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) pegilada con agregación mínima y el método comprende además:

(f) ultrafiltrar o ultrafiltrar/diafiltrar el eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL;

(g) pegilar la variante AvPAL mezclando polietilenglicol con la variante AvPAL;

(h) eliminar el polietilenglicol libre de la variante AvPAL pegilada mediante ultrafiltración/diafiltración; y

(i) formular la variante AvPAL pegilada,

en la que dicha variante AvPAL comprende polietilenglicol. La relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol puede ser de aproximadamente 1:3.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además congelar y descongelar el eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL obtenida en la etapa (e), en donde uno o más polioles o azúcares seleccionados del grupo que consiste en glicerol, sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol y sorbitol se agregan al eluato de la columna HIC antes de la congelación. En algunas realizaciones, el poliol es glicerol. En una realización preferida, la concentración de glicerol es 10% (v/v). En algunas realizaciones, el azúcar es sacarosa. En una realización preferida, la concentración de sacarosa es 10% (v/v).

En algunas realizaciones, la congelación o la descongelación del eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL se realiza en etapas discretas de temperatura. En otras realizaciones, tanto la congelación como la descongelación del eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL se realizan en etapas discretas de temperaturas.

En algunas realizaciones, un tampón de diafiltración en la etapa (f) comprende fosfato de potasio (KPi) y uno o más agentes que consisten en ácido transcinámico (t-CA) y glicerol. En realizaciones preferidas, el tampón de diafiltración comprende 50 mM de KPi, 10 mM de t-CA, 5% de glicerol, pH 8,5.

En algunas realizaciones, se añade un detergente no iónico al eluato ultrafiltrado o ultrafiltrado/diafiltrado de la columna HIC que comprende la variante AvPAL obtenida en la etapa (f). El detergente no iónico puede ser polisorbato 80 (PS80). En una realización preferida, la concentración de PS80 es del 0,02%.

En algunas realizaciones, la columna AEX puede ser una columna Toyopearl Giga Cap Q 650M. En realizaciones adicionales, la columna HIC es una columna Toyopearl Butyl 650M.

En lo sucesivo en este documento, la variante PAL en la que los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID NO: 11), se entiende cuando se mencionan variantes PAL en el contexto de la invención o sus realizaciones.

En la presente memoria, se utilizan "PAL bacteriana" y "PAL procariota" indistintamente para significar (1) PAL de tipo salvaje partir de un organismo procariota, incluyendo, pero no limitado a PAL 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* (Lofflehardt, 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 tales enzimas PAL de tipo salvaje que retienen (es decir, al menos 50%) una actividad catalítica similar para la fenilalanina, y que puede, por ejemplo, presentar un aumento de la actividad catalítica, una mayor estabilidad bioquímica, una mayor vida media y/o disminución de la inmunogenicidad, y (3) versiones modificadas químicamente de tales enzimas PAL de tipo salvaje o fragmentos, mutantes, variantes o análogos de los mismos que están unidos con otros restos químicos que proporcionan otros efectos ventajosos, tales como, por ejemplo y no de limitación, el aumento de la vida media y/o disminución de la inmunogenicidad. Por ejemplo, todas las referencias a métodos para preparar o usar PAL procariota, y fragmentos, mutantes, variantes, análogos o versiones modificadas químicamente de los mismos, y composiciones de tal(es) enzima(s), con fines terapéuticos, pretende referirse a métodos para preparar, usando o formulando todas tales PAL procariotas de tipo salvaje o fragmentos, mutantes, variantes, análogos o modificaciones químicas de los mismos.

En un primer aspecto, se describen en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden PAL procariota y fragmentos biológicamente activos, mutantes, variantes o análogos de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un ejemplo es un PAL procariota de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO: 2) o fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo. Otro ejemplo es un PAL procariota de *Anabaena variabilis* (SEQ ID NO: 4) o fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo. También se describe en el presente documento variantes PAL procariotas que tienen mayor actividad convertidora de fenilalanina y/o inmunogenicidad reducida en comparación con un PAL tipo salvaje.

Específicamente, las variantes PAL procariotas pueden retener los restos del sitio activo de tipo salvaje en posiciones correspondientes a Ser210, tríada Ala-Ser-Gly (211-213), Asp214, Leu215, Asn270, Val269, Leu266, Leu134, His137, Lys468, Glu496, Gln500 en PAL de *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL) o sustitución o sustituciones conservadoras de este resto o restos del sitio activo, de los cuales se cree que la tríada Ala-ser-Gly en 211-213 es el sitio de unión para la fenilalanina.

Las variantes PAL procariotas incluyen proteínas en las que uno o más aminoácidos (por ejemplo, restos de cisteína) han sido sustituidos por otro resto de aminoácido (por ejemplo, serina) para reducir la agregación de proteínas que puede asociarse con una disminución de la actividad enzimática, el aumento de la inmunogenicidad, y/u otros efectos desfavorables, tal como la reducción de la biodisponibilidad, in vivo. Aquí se describe una composición farmacéutica, en la que uno o más restos de aminoácidos de la variante PAL procariota se han sustituido por otro aminoácido, en la que la sustitución aumenta la actividad de conversión de fenilalanina y/o reduce la inmunogenicidad en comparación con la PAL de tipo salvaje.

Uno o más restos de aminoácidos de la variante PAL procariota pueden ser sustituidos por otro resto de aminoácido. Uno o más restos de cisteína de la variante PAL procariota pueden ser sustituidos por un resto de serina. De acuerdo con la invención, la variante PAL procariota es una PAL de *Anabaena variabilis* (AvPAL). Uno o más restos de cisteína de la variante AvPAL pueden ser sustituidos por un resto de serina seleccionado a partir del grupo que consiste en restos de cisteína en las posiciones 64, 318, 503 y 565. De acuerdo con la invención, los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina.

Las variantes PAL procariotas también pueden incluir proteínas de fusión en las que la enzima PAL se ha fusionado a otro polipéptido heterólogo, tal como una región constante nativa o modificada de una inmunoglobulina o un fragmento del mismo que retiene el epitopo de recuperación, conocido en la técnica para aumentar la vida media.

Según la invención, pueden unirse versiones modificadas químicamente de tales polipéptidos PAL procariotas, a un resto químico que proporciona otros efectos ventajosos. Por ejemplo, la unión no específica o específica de sitio (por ejemplo, el extremo N-terminal) de polímeros solubles en agua, por ejemplo, polietilenglicol, a polipéptidos que se conocen en la técnica para mejorar la vida media, y la unión de restos químicos también puede reducir la inmunogenicidad y/o mejorar la resistencia a la proteasa.

La variante PAL procariota puede comprender un polímero soluble en agua. De acuerdo con la invención, la variante PAL procariota comprende polietilenglicol. De acuerdo con la invención, la variante PAL procariota es una AvPAL y la relación de AvPAL y polietilenglicol es aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3). Por tanto, la variante PAL procariota de la invención es una variante AvPAL, la relación de la variante AvPAL y polietilenglicol es aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), y los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina.

Además, uno o más restos de aminoácidos de la variante PAL procariota han sido sustituidos por un resto de lisina. La pegilación de un resto o varios restos de lisina adicionales en una variante PAL procariota puede dar como resultado una enzima que tiene menor inmunogenicidad, mayor actividad catalítica y/o mejor estabilidad bioquímica. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se planteó la hipótesis de que un resto de tirosina en el sitio activo, o cerca de éste, del PAL procariota (por ejemplo, la posición 78 en AvPAL) puede ser un sitio para la pegilación, que reduce la actividad de la enzima. De acuerdo con esto, uno o más aminoácidos en el sitio activo, o cerca de éste, de la variante PAL procariota, que no se requieren para la actividad de la enzima, se sustituyen por un resto de lisina. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se planteó la hipótesis de que la pegilación del resto lisina sustituido en el sitio activo, o cerca de éste, dificulta estéricamente que un resto de tirosina (por ejemplo, la posición 78 en AvPAL) sea pegilado.

Tales variantes PAL procariotas se aíslan y purifican de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento y están, por lo tanto, presentes en cantidades que permiten utilizar la enzima PAL procariota terapéuticamente. Se puede utilizar un ADNc que codifique una PAL completa o de tipo salvaje procariota. Como alternativa, se puede utilizar un ADNc que codifica un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo. Además, la presente invención describe composiciones de PAL procariota optimizada obtenida por enfoques de ingeniería molecular estructurales (por ejemplo, pegilados) y/o formas de PAL químicamente modificadas. Específicamente, se contemplan composiciones óptimas de PAL procariota con mejor actividad específica, mayor estabilidad, menor inmunogenicidad y/o la sensibilidad proteolítica adecuada para uso terapéutico. En un ejemplo, el PAL es una forma pegilada de PAL de *Nostoc punctiforme* con una mejor actividad específica, mejor estabilidad, una menor inmunogenicidad y/o sensibilidad proteolítica. De acuerdo con la invención, el PAL es

una forma pegilada de PAL de *Anabaena variabilis* con mejor actividad específica, mejor estabilidad, una menor inmunogenicidad y/o sensibilidad proteolítica.

La pegilación de una variante de PAL se describe en referencia a la relación de PAL:PEG. Como se usa en el presente documento, y a menos que se indique lo contrario, la relación de "PAL:PEG" se refiere a la proporción de restos de lisina de la variante de PAL frente a las moléculas de PEG en la reacción de pegilación. Del mismo modo, como se usa en el presente documento y, a menos que se indique lo contrario, la relación de "PEG:PAL" se refiere a la proporción de moléculas de PEG frente a los restos de lisina de la variante de PAL en la reacción de pegilación.

Se proporcionan variantes de PAL pegiladas procariotas con menor inmunogenicidad. Un ejemplo es una forma pegilada de la variante de PAL de *Nostoc punctiforme* (NpPAL) con menor inmunogenicidad. La invención proporciona una forma pegilada de la variante AvPAL con menor inmunogenicidad. En dichas variantes de AvPAL, la pegilación puede conseguirse haciendo reaccionar la variante AvPAL con un polímero PEG soluble en agua. La pegilación se puede conseguir por reacción de la variante NpPAL o AvPAL una vez con PEG en una proporción PAL:PEG de al menos 1:1, por lo menos 1:1,5, por lo menos 1:2, por lo menos 1:3, o al menos 1:4. Preferiblemente, la variante PAL procariota es una variante AvPAL, y la pegilación se consigue utilizando una relación PAL:PEG de aproximadamente 1:3.

Más específicamente, la variante PAL procariota pegilada es una variante AvPAL y los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de AvPAL se han sustituido con restos de serina (SEQ ID NO: 11).

Los sitios biológicamente activos de PAL procariota de tipo salvaje pueden modificarse para optimizar las características cinéticas de PAL. En una realización, una variante PAL procariota tiene actividad suficiente no solo para reducir, sino también para mantener, los niveles de fenilalanina en plasma dentro del intervalo óptimo de aproximadamente 120  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 240  $\mu\text{M}$ . En otras realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $k_{\text{cat}}$  de al menos aproximadamente 0,1  $\text{s}^{-1}$  o mayor de aproximadamente 0,5  $\text{s}^{-1}$ . En algunas realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $k_{\text{cat}}$  de al menos aproximadamente 0,2  $\text{s}^{-1}$  o mayor de aproximadamente 1,0  $\text{s}^{-1}$ . En otras realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $K_{\text{m}}$  de entre aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$ . En otras realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $K_{\text{m}}$  de entre aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 1.000  $\mu\text{M}$ . En una realización, la variante PAL procariota biológicamente activa muestra una actividad enzimática que es de aproximadamente dos veces a 1000 veces mayor que la de las PAL de tipo salvaje. En otras realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa muestra una actividad enzimática que es de aproximadamente 10% a 100% mayor que la de las PAL de tipo salvaje. Tales variantes PAL procariotas activas biológicas se pueden formar usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante mutagénesis dirigida al sitio. También se proporcionan en este documento usos de una variante PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo que metaboliza la fenilalanina (es decir, convierte la fenilalanina en otra sustancia) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia en la actividad de PAH, en mamíferos, tales como seres humanos, así como una composición farmacéutica que contiene una variante PAL procariota para su uso en el tratamiento de una deficiencia en la actividad de PAH.

En algunas realizaciones, los sitios biológicamente activos de PAL de tipo salvaje procariota se pueden modificar para optimizar las características cinéticas de PAL. En una realización, una variante PAL procariota tiene actividad suficiente para reducir los niveles de fenilalanina en plasma en un sujeto en un intervalo por debajo del nivel de detección, entre aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\mu\text{M}$ , tal como menos de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , o menos de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ , utilizando métodos de detección estándar bien conocidos en la técnica. En otras realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $k_{\text{cat}}$  de al menos aproximadamente 0,1  $\text{s}^{-1}$ , tal como mayor que aproximadamente 0,5  $\text{s}^{-1}$ , y mayor que aproximadamente 1,0  $\text{s}^{-1}$ . En ciertas realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $k_{\text{cat}}$  de al menos aproximadamente 0,4  $\text{s}^{-1}$ , tal como mayor que aproximadamente 2,0  $\text{s}^{-1}$ , o mayor de aproximadamente 4,0  $\text{s}^{-1}$ . En otras realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $K_{\text{m}}$  de entre aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 2000  $\mu\text{M}$ . En ciertas realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $K_{\text{m}}$  de entre aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$ . En otras realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa tiene una  $K_{\text{m}}$  de entre aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ . En aún otras realizaciones, la variante PAL procariota biológicamente activa muestra actividad enzimática desde aproximadamente al menos 50% hasta aproximadamente 10 veces más que la PAL de tipo salvaje. Tales variantes PAL procariotas activas biológicas se pueden formar usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante mutagénesis dirigida al sitio. También se discuten en este documento usos de una variante PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo que metaboliza la fenilalanina (es decir, convierte la fenilalanina en otra sustancia) en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar el cáncer en un sujeto, tal como un sujeto humano, así como una composición farmacéutica que contiene una variante PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer en un sujeto, tal como un sujeto humano.

La composición farmacéutica puede comprender variantes altamente purificadas procariotas PAL derivadas de bacterias, o un fragmento biológicamente activo, mutante o análogo de las mismas, solas o en combinación, con un vehículo farmacéuticamente adecuado. En algunas realizaciones, las preparaciones contienen la variante PAL

procariota con una pureza mayor que 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, o 99,9%. En otras realizaciones, la actividad específica relativa de la variante PAL procariota es al menos aproximadamente 50%, o más de aproximadamente 110%, de la actividad específica de PAL de tipo salvaje procariota.

5 En un segundo aspecto, se describe en este documento métodos de uso de composiciones PAL procariotas para fines terapéuticos. Los trastornos causados en su totalidad o en parte por una deficiencia en la actividad de PAH pueden tratarse mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la variante PAL procariota en un sujeto en necesidad de tal tratamiento. La deficiencia en la actividad de PAH se puede observar, por ejemplo, como niveles de actividad de 50% o menos, 25% o menos, 10% o menos, o 1% o menos, en comparación con los niveles normales de actividad de PAH y puede manifestarse como niveles de fenilalanina elevados, por ejemplo, como en la hiperfenilalaninemia, fenilcetonuria clásica leve o fenilcetonuria grave. En algunos ejemplos, la enfermedad es PKU.

En ejemplos específicos, el sujeto es uno que ha sido diagnosticado que posee una fenilalanina hidroxilasa (PAH) mutante. La PAH mutante puede comprender una mutación en el dominio catalítico de PAH. Ejemplos de tales mutaciones incluyen, pero no se limitan a mutaciones F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M E390G, A395P, P407S, y Y414C.

También se contempla un método de tratamiento de un sujeto que tiene una concentración de fenilalanina en plasma por encima de la normal (por ejemplo, mayor que 180  $\mu\text{M}$  o 360  $\mu\text{M}$ ), que comprende administrar al sujeto una composición de la variante PAL procariota en una cantidad eficaz para producir una disminución en la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto. Por ejemplo, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma mayor que 180  $\mu\text{M}$  antes de la administración de la variante PAL procariota de la invención. En algunos ejemplos, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma de entre 120  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ . En otros ejemplos, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma de entre 200  $\mu\text{M}$  y 600  $\mu\text{M}$ . En todavía otro ejemplo, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma de entre 600  $\mu\text{M}$  y 1.200  $\mu\text{M}$ . Además, otra clase de sujetos a ser tratados son los que tienen una concentración de fenilalanina en plasma sin restricciones superior a 1200  $\mu\text{M}$ .

En ejemplos específicos, el sujeto es un niño, tal como un niño que tiene una concentración de fenilalanina en plasma mayor que 1200  $\mu\text{M}$ . Se describen en este documento métodos de tratamiento de una fenilcetonuria infantil, que comprende administrar una composición de la variante PAL procariota al sujeto en una cantidad eficaz para producir una disminución en la concentración de fenilalanina en plasma del niño. En ciertos ejemplos, el niño tiene entre 0 y 3 años. En un ejemplo, el niño tiene una concentración de fenilalanina en plasma de entre aproximadamente 360  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 4800  $\mu\text{M}$ . En ciertos ejemplos, antes de la administración de la variante PAL procariota, el niño tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 1200  $\mu\text{M}$ , y la administración de la variante PAL procariota disminuye la concentración de fenilalanina en plasma, por ejemplo, a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$ . En otros ejemplos, antes de la administración de la variante PAL procariota el niño tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 800  $\mu\text{M}$  y la administración de PAL disminuye la concentración de fenilalanina en plasma, por ejemplo, en aproximadamente 600  $\mu\text{M}$ . En otros ejemplos más, antes de la administración de la variante PAL el niño tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 400  $\mu\text{M}$  y la administración de la variante PAL disminuye la concentración de fenilalanina en plasma, por ejemplo, a aproximadamente 300  $\mu\text{M}$ . En algunos ejemplos, los métodos terapéuticos contemplados en este documento reducen la concentración de fenilalanina en plasma del niño en un intervalo de entre aproximadamente 120  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 360  $\mu\text{M}$  o un intervalo de entre aproximadamente 120  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 240  $\mu\text{M}$ .

También se contempla en el presente documento un método para el tratamiento de una mujer embarazada, que tiene HPA, que comprende administrar al sujeto la variante PAL procariota sola o en combinación con una dieta pobre en proteínas, en el que la administración de la variante PAL procariota sola o en combinación con la dieta pobre en proteínas es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma del sujeto en comparación con la concentración en ausencia de la administración combinada. En ciertos ejemplos, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma sin restricción mayor que 180  $\mu\text{M}$ , pero menor de 600  $\mu\text{M}$ . En otros ejemplos, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma sin restricción mayor que 500  $\mu\text{M}$  pero menor de 1200  $\mu\text{M}$ . En otros ejemplos más, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma sin restricción mayor que 1200  $\mu\text{M}$ . Las mujeres embarazadas con una concentración de fenilalanina en plasma mayor que, por ejemplo, 1200  $\mu\text{M}$  son candidatas particularmente atractivas para este tipo de terapia, al igual que los sujetos que son mujeres en edad de procrear que están contemplando la posibilidad de un embarazo. En ejemplos, en las que el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma mayor que 1200  $\mu\text{M}$ , el método puede comprender opcionalmente además administrar una dieta pobre en proteínas para el sujeto.

También se describen en este documento métodos de tratamiento de PKU clásico severo en un sujeto que comprende administrar al sujeto una variante PAL procariota de la invención, en los que la administración de la variante PAL procariota es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma del sujeto, en comparación con la concentración en ausencia de la administración de PAL procariota. En algunos ejemplos, un sujeto que se seleccione para el tratamiento de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento tendrá una concentración de Phe en plasma elevada, tal como mayor que 1800  $\mu\text{M}$  en ausencia de terapia. Otros ejemplos contemplan un sujeto que tiene una concentración de fenilalanina en plasma de más de 1000  $\mu\text{M}$  en ausencia de un

régimen terapéutico. En algunos ejemplos, los métodos de administración combinados proporcionados en este documento disminuyen la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto a menos de 600  $\mu\text{M}$ . En un ejemplo, se redujo a menos de 500  $\mu\text{M}$ . En otro ejemplo, la administración combinada disminuye la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto en el intervalo de aproximadamente 120  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 360  $\mu\text{M}$ . En otro ejemplo, la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto se reduce en el intervalo de aproximadamente 120  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 240  $\mu\text{M}$ .

En un ejemplo, se proporcionan en este documento métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por una deficiencia en la actividad de PAH (por ejemplo, la hiperfenilalaninemia, fenilcetonuria leve o fenilcetonuria grave clásica, un sujeto que tiene por encima de la concentración normal de fenilalanina, un niño que tiene una concentración de fenilalanina en plasma mayor de 1200  $\mu\text{M}$ , o una mujer embarazada que tiene fenilalaninemia), que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una variante PAL procariota y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la variante PAL procariota tiene una mayor actividad convertidora de fenilalanina y/o una menor inmunogenicidad en comparación con un PAL tipo salvaje y es eficaz en la reducción de la concentración de fenilalanina en la sangre, el suero o el plasma, del sujeto en un intervalo como se describe anteriormente en este documento. En algunos ejemplos, uno o más restos de aminoácidos de la variante PAL procariota han sido sustituidos por otro resto de aminoácido, en los que la sustitución aumenta la actividad de conversión de fenilalanina y/o reduce la inmunogenicidad en comparación con PAL tipo salvaje. Preferiblemente, uno o más restos de cisteína de la variante PAL procariota han sido sustituidos por otro resto de aminoácido. Más preferiblemente, uno o más restos de cisteína de la variante PAL procariota han sido sustituidos por un resto de serina. De acuerdo con la invención, la variante PAL procariota es una variante AvPAL. Preferiblemente, uno o más restos de cisteína de la variante AvPAL han sido sustituidos por un resto de serina que se selecciona del grupo que consiste en restos de cisteína en las posiciones 64, 318, 503 y 565, por un resto de serina en la posición 565, o por restos de serina en las posiciones 503 y 565. En algunos ejemplos, la variante PAL procariota comprende un polímero soluble en agua. De acuerdo con la invención, el polímero soluble en agua es polietilenglicol. Más específicamente, la variante PAL procariota de la invención es una variante AvPAL, y la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3). Por tanto, la variante PAL procariota es una variante AvPAL, la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), y los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina.

Ciertos ejemplos incluyen la optimización de la dosis a las necesidades del organismo a tratar, por ejemplo, mamíferos o seres humanos, para mejorar eficazmente los síntomas de la enfermedad. La variante PAL procariota de la invención se puede administrar en una sola dosis diaria, múltiples dosis sobre una base diaria, en una dosis única semanal o dosis múltiples sobre una base semanal. La terapia de la variante PAL procariota puede no ser continua, sino más bien la variante PAL procariota se administra sobre una base diaria hasta que se disminuye la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto, por ejemplo, a menos de 360  $\mu\text{M}$ . En algunos ejemplos, en las que la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto se controla a diario, la variante PAL procariota se administra cuando se observa un aumento del 10% en la concentración de fenilalanina en plasma. En otros ejemplos, las dosis se administran una vez por semana. Se contemplan dosis de al menos 0,001 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,01 mg/kg, o 0,05 mg/kg, y pueden ser de hasta 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg o más por semana. En algunos ejemplos, la dosis es de 2 mg/kg/semana, 1 mg/kg/semana, 0,1 mg/kg/semana, o 0,01 mg/kg/semana.

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

También se contemplan otros medios de aumento de la actividad de la variante PAL procariota en los sujetos humanos, incluyendo la terapia génica. La transferencia de un gen de la variante PAL procariota es posible a través de una variedad de medios conocidos en la técnica, incluyendo vectores virales, recombinación homóloga o inyección directa de ADN. Dentro del alcance de este aspecto se encuentran secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o una parte de la variante PAL procariota o un mutante biológicamente activo o análogos de los mismos, que se puede administrar in vivo en células que se ven afectadas con la deficiencia de PAH.

La variante PAL procariota de la invención también se puede administrar en combinación con una dieta pobre en proteínas. La dieta pobre en proteínas administrada en los métodos en el presente documento es una dieta que es restringida en fenilalanina, en la que la ingesta de fenilalanina (Phe) total del sujeto se limita a menos de 600 mg por día. En otros ejemplos, la dieta pobre en proteínas es una dieta restringida en fenilalanina, en la que la Phe total se limita a menos de 300 mg por día. En todavía otros ejemplos, la dieta pobre en proteínas es una suplementada con uno o más aminoácidos, tales como, por ejemplo y no de limitación, tirosina, valina, isoleucina y/o leucina.

También se contempla una composición farmacéutica que comprende una variante PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente. La composición farmacéutica puede comprender además un suplemento de proteínas médico. La

composición variante PAL procariota puede ser parte de una fórmula infantil. El suplemento de proteínas puede estar libre de fenilalanina. El suplemento de proteínas puede ser fortificado 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 del grupo que consiste de L-leucina, L-prolina, acetato de L-lisina, L-valina, L-isoleucina, L-arginina, L-alanina, glicina, monohidrato de L-asparagina, L-triptófano, L-serina, L-treonina, L-histidina, L-metionina, ácido L-glutámico y ácido L-aspartico. Además, el suplemento puede ser fortificado con la dosis diaria recomendada de vitaminas A, D y E. El suplemento puede comprender un contenido de grasa que proporciona al menos 40% de la energía del suplemento. Un suplemento de este tipo puede proporcionarse en la forma de un suplemento en polvo o en forma de una barra de proteínas.

También se describen en el presente documento métodos para tratar varias formas de cáncer mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una variante PAL procariota a un sujeto. En un amplio sentido, el cáncer es un cáncer en el que la proliferación y/o supervivencia de las células derivadas del cáncer es sensible a la restricción de fenilalanina o el agotamiento. En algunos ejemplos, el cáncer es cáncer de pulmón, cerebro o cáncer del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de hígado o melanoma metastásico. En otros ejemplos, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblástico aguda) o mieloma. En otros ejemplos más, el cáncer es cáncer pediátrico o un cáncer resistente (es decir, un cáncer que se ha demostrado que es resistente a los agentes terapéuticos del cáncer o agentes terapéuticos dirigidos contra el cáncer).

También se describen en este documento métodos para tratar la enfermedad de Parkinson (PD) mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la variante PAL procariota a un sujeto.

En un tercer aspecto, en la presente invención se describen composiciones farmacéuticas o formulaciones de variantes PAL procariotas, que comprenden la variante PAL procariota y fragmentos biológicamente activos, mutantes, variantes o análogos de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. Preferiblemente, el estabilizador es L-fenilalanina o el análogo estructural de la misma. El estabilizador se puede seleccionar del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico. El estabilizador puede ser L-fenilalanina. El estabilizador puede ser el ácido trans-cinámico. El estabilizador puede ser el ácido benzoico.

La composición farmacéutica o formulación puede comprender una variante PAL procariota y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la variante PAL procariota es una variante AvPAL, la relación de la variante AvPAL y polietilenglicol es de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. En algunos ejemplos, el estabilizador es L-fenilalanina o un análogo estructural del mismo. En otros ejemplos, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico. En algunos ejemplos, el estabilizador es L-fenilalanina. Preferiblemente, el estabilizador es el ácido trans-cinámico. También se describen métodos de tratamiento de hiperfenilalaninemia, incluyendo fenilcetonuria, usando tales composiciones farmacéuticas o formulaciones.

En un cuarto aspecto, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas o formulaciones de variantes AvPAL pegiladas de la invención, en donde la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), y los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende uno o más (tal como al menos dos) estabilizadores y, opcionalmente, un conservante (es decir, un agente antimicrobiano). La concentración de la variante AvPAL pegilada en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 a 50 mg/ml (aproximadamente de 0,016 a 0,8 mM), tal como de aproximadamente 5 a 20 mg/ml (aproximadamente desde 0,08 hasta 0,33 mM), o de aproximadamente 5 a 15 mg/ml (aproximadamente de 0,08 a 0,25 mM). La composición farmacéutica o formulación puede comprender Tris-HCl o su equivalente como agente tampón, y/o NaCl o su equivalente como agente de ajuste de la isotonicidad. La concentración de Tris-HCl o su equivalente en la formulación puede ser de aproximadamente 5 a 50 mM, tal como de aproximadamente 5 a 20 mM, o de aproximadamente 5 a 15 mM. La concentración de NaCl o su equivalente en la formulación puede ser de aproximadamente 100 a 200 mM, tal como de aproximadamente 120 a 170 mM, o de aproximadamente 120 a 150 mM. El pH de la formulación puede ser desde aproximadamente pH 6,0 a 8,0, tal como de aproximadamente pH 6,5 a 7,5, o de aproximadamente pH 7,0 a 7,6. Los estabilizadores pueden ser L-fenilalanina (Phe) o un análogo estructural del mismo y glicina (Gly) o un análogo estructural del mismo. La concentración de Phe o el análogo estructural del mismo en la formulación puede ser de aproximadamente 0,1 a 10 mM, tal como de aproximadamente 0,5 a 5 mM, o de aproximadamente 0,5 a 1,5 mM. La concentración de Gly o del análogo estructural del mismo en la formulación puede ser de aproximadamente 0,1 a 100 mM, tal como de aproximadamente 1,0 a 100 mM, de aproximadamente 1,0 a 20 mM, o de aproximadamente 20 a 100 mM. Por ejemplo, la concentración de Gly en la formulación puede ser de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 mM. El conservante puede ser m-cresol o un análogo

estructural del mismo. La concentración de m-cresol o el análogo estructural en la formulación puede ser desde aproximadamente 0,1% a 1% (p/v), tal como de aproximadamente 0,1% a 0,5% (p/v), o de aproximadamente 0,3% a 0,5% (p/v). Los estabilizadores pueden ser Phe y Gly y el conservante puede ser m-cresol. Cualquier combinación de variantes AvPAL, estabilizantes, agentes tampón, agentes de isotonicidad, conservantes y/u otros ingredientes descritos en este documento, así como los valores de pH y concentraciones asociadas, se contemplan en las composiciones o formulaciones proporcionadas en este documento. También se describen métodos de tratamiento de HPA, o cáncer, por ejemplo, fenilcetonuria, usando tales composiciones farmacéuticas o formulaciones.

En un ejemplo específico, la composición farmacéutica o formulación comprende una variante AvPAL pegilada, en donde la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), y los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende Tris-HCl como agente tampón, NaCl como agente de isotonicidad, Phe y Gly como estabilizadores y, opcionalmente, m-cresol como conservante (es decir, un agente antimicrobiano). La concentración de la variante AvPAL pegilada en la formulación puede ser de aproximadamente 10 +/- 5 mg/ml (aproximadamente de 0,16 +/- 0,08 mM). La concentración de Tris-HCl en la formulación puede ser de aproximadamente 10 mM +/- 5 mM. El pH de la formulación puede ser de aproximadamente pH 7,3 +/- 0,3. La concentración de NaCl en la formulación es de aproximadamente 135 mM +/- 15 mM. La concentración de Phe en la formulación puede ser de aproximadamente 1 +/- 0,5 mM. En algunos ejemplos, la concentración de Gly en la formulación es de aproximadamente de 10,5 +/- 9,5 mM. En otros ejemplos, la concentración de Gly en la formulación es de aproximadamente 60 +/- 40 mM. En otros ejemplos, la concentración de Gly en la formulación es de aproximadamente de 50,5 +/- 49,5 mM. En algunas realizaciones, la formulación comprende m-cresol como conservante. La concentración de m-cresol en la formulación puede ser de aproximadamente 0,4% +/- 0,1% (p/v). También se contemplan combinaciones de las concentraciones anteriores y valores de pH. También se describen métodos de tratamiento de HPA, por ejemplo, PKU, o cáncer usando tales composiciones farmacéuticas o formulaciones.

En un quinto aspecto, se describen en este documento métodos para la producción de PAL recombinante procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo, en cantidades que permiten utilizar la enzima terapéuticamente. PAL puede derivarse de bacterias incluyendo, pero no limitadas a, *Streptomyces*, *Sorangium*, *Pseudomonas*, y cianobacterias, tales como *Nostoc* y *Anabaena*. Por ejemplo, PAL se deriva de las especies bacterianas *Streptomyces maritimus*, *S. verticillatus*, *Sorangium cellulosum*, *Nostoc punctiforme*, *Nostoc tobacum*, *Anabaena variabilis* o *Pseudomonas putida*. PAL de la invención se deriva de *Anabaena variabilis*. También puede generarse actividad de la enzima PAL procariota usando secuencias de ADNc o ADN que se derivan de las secuencias descritas a veces como codificantes para la actividad de HAL o que ofrecen un motivo PAL-HAL, pero que poseen restos de PAL clave que difieren de HAL.

En un sentido amplio, el método comprende la etapa de transformar un ADNc o ADN que codifica para la totalidad o una parte de un PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo en una célula adecuada para la expresión de la misma. Un vector de expresión se utiliza para transferir el ADN en una célula o línea celular adecuada para la expresión del mismo. De forma específica, el ADNc o el ADN se transforma en *E. coli* y se sobreexpresa PAL procariota recombinante, opcionalmente como una proteína de fusión. El método de producción de PAL procariota comprende: (a) cultivar células transformadas con un ADNc o ADN que codifica la totalidad o un fragmento, mutante, variante o análogo biológicamente activo del mismo de PAL procariota en un medio de crecimiento adecuado a una densidad apropiada para producir un cultivo de siembra, (b) introducir las células transformadas en un biorreactor, (c) suministrar un medio de crecimiento adecuado al biorreactor, y (d) separar las células transfectadas que contienen la enzima de los medios.

Se sobreexpresa PAL procariota recombinante o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo, con o sin un marcador N-terminal, por ejemplo, (Octahistidil-tag), en un vector, tal como pIBX1 (Su, et al., Appl. Environ. Microbiol. 62: 2723-2734 (1996)) o pET28a (Invitrogen) con un promotor inducible tal como con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido), en células BLR(DE3) de *E. coli*/pLysS (Novagen) o BL21(DE3) de *E. coli*/pLysS (Invitrogen). De forma específica, el método de producción de PAL procariota comprende: (1) hacer crecer un cultivo de siembra para un biorreactor/fermentador a partir de un stock de glicerol en matraces de agitación; (2) introducir tal cultivo de siembra en un biorreactor controlado en el modo de alimentación por lotes; (3) hacer crecer dicho cultivo en medios de glucosa suplementados, pH (7,8), > 20% de oxígeno disuelto, agitación hasta 1200 rpm, 30°C hasta alcanzar una densidad celular de OD600 de 70 a 100 (~22-25 h); (4) inducir dicho cultivo con IPTG 0,4 mM; (5) hacer crecer dicho cultivo a una temperatura reducida de 22 a 26°C hasta que el cambio de actividad sea <0,1 UI/ml (aproximadamente 40-48 horas y una DO600 típicamente de 200); y (5) recolectar las bacterias mediante centrifugación continua. Los medios de cultivo celular pueden comprender proteínas de extracto de levadura, peptona-triptona, glucosa, glicerol, casaminoácidos, sales traza y sales tampón de fosfato.

Cuando el PAL procariota recombinante o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo es una variante AvPAL, el método de producción de la variante AvPAL comprende: (1) hacer crecer un cultivo de siembra para un biorreactor/fermentador a partir de un stock de glicerol de bacterias que expresan la variante AvPAL en un matraz de agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad celular de 2 a 4 OD<sub>600</sub>; (2) transferir el cultivo de siembra en un primer biorreactor controlado (por ejemplo, fermentador de 4L); (3) hacer crecer el cultivo a 37°C

- hasta alcanzar una densidad celular de 10 a 20 OD<sub>600</sub>; (4) transferir el cultivo del primer biorreactor (por ejemplo, fermentación de 4L) en un segundo biorreactor controlado (por ejemplo, fermentador de 100L); (5) hacer crecer el cultivo a 37°C hasta alcanzar una densidad celular de al menos 200 OD<sub>600</sub>; (6) enfriar el cultivo a aproximadamente 15°C; y (7) separar las células bacterianas del medio de cultivo por centrifugación. Algunas veces, el método comprende además transferir el cultivo del segundo biorreactor (por ejemplo, fermentación de 100L) en un tercer biorreactor controlado (por ejemplo, el fermentador de 500 L o más grande) y hacer crecer el cultivo a 37°C hasta alcanzar una densidad celular de al menos 200 OD<sub>600</sub>, antes de enfriar el cultivo y separar las células bacterianas del medio de cultivo. Según la invención, los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina (SEQ ID NO: 11).
- En un sexto aspecto, se proporciona en este documento un método para purificar PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo. De acuerdo con un primer ejemplo, se cultiva una masa celular transformada y se rompe dejando la enzima recombinante cruda. Pueden separarse materiales exógenos de la masa cruda para evitar la contaminación de las columnas. La purificación cromatográfica se puede realizar usando una o varias resinas cromatográficas. Posteriormente, la proteína purificada se puede formular en un tampón diseñado para proporcionar una actividad estable durante un período prolongado de tiempo. En una realización, el método para purificar el PAL procariota comprende: (a) la lisis de las bacterias que contienen PAL procariota recombinante; (b) el tratamiento del lisado con calor para desnaturalizar y precipitar las proteínas de *E. coli*; (c) la clarificación de este lisado utilizando un segundo paso de centrifugación continua y/o filtración en profundidad; (d) el paso del lisado clarificado a través de una etapa de filtración de carbón; (e) el paso del filtrado en (d) a través de una etapa de filtración de profundidad intermedia (como con uno o más filtros de profundidad, por ejemplo, filtros Pall EKSP, Pall KS50P y/o Pall EKMP), seguido de una etapa de filtración final (como con un filtro Sartorius Sartopore o Pall EDF 0,2 µm); (f) el paso del filtrado final sobre una resina de cromatografía de interacción hidrófoba, tal como una cromatografía de interacción hidrofóbica de butilo; (g) el paso del material eluido en (f) a través de una resina de cromatografía aniónica, tal como una columna de intercambio iónico Q; (h) la recuperación del producto final, opcionalmente por intercambio de tampón con la filtración del flujo tangencial; e (i) la esterilización del producto final. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que una o más de las etapas de cromatografía se puede omitir o sustituir, o que se puede cambiar el orden de las etapas de cromatografía. Por último, las etapas de esterilización adecuadas se pueden realizar como se desee. También se proporciona en este documento un PAL purificado procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo (por ejemplo, producido por los métodos de purificación proporcionados en este documento), así como composiciones farmacéuticas y formulaciones de las mismas, y métodos de uso de los mismos.

- En una realización específica, el PAL procariota recombinante o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo es una variante AvPAL pegilada con la agregación mínima, el método de purificación de la variante AvPAL pegilada comprende: (a) lisar las células bacterianas que contienen la variante AvPAL por homogeneización para generar un lisado celular; (b) calentar el lisado de células a 65°C durante 30 a 120 minutos; (c) centrifugar el lisado celular calentado, en el que se retiene un sobrenadante que comprende la variante AvPAL; (d) filtrar el sobrenadante para eliminar los precipitados; (e) separar la variante AvPAL de proteínas contaminantes por cromatografía secuencial sobre una columna de intercambio aniónico (AIEX), tal como una columna Toyopearl Giga Cap Q 650M, seguido de una columna de interacción hidrófoba (HIC), tal como una columna Toyopearl Butyl 650M, en el que el eluato de la columna de HIC comprende la variante AvPAL; (f) ultrafiltrar o ultrafiltrar/diafiltrar el eluato de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL; (g) pegilar la variante AvPAL mezclando polietilenglicol con la variante AvPAL; (h) eliminar el polietilenglicol libre de la variante AvPAL pegilada por ultrafiltración/diafiltración; y (h) formular la variante AvPAL pegilada.

- De acuerdo con la invención, los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina (SEQ ID NO: 11). De acuerdo con la invención, la variante AvPAL pegilada comprende polietilenglicol. En una realización, la variante AvPAL pegilada comprende polietilenglicol, en donde la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1:3. En una realización, la columna de la AIEX es una columna Toyopearl Giga Cap Q 650M. La columna de HIC puede ser una columna Toyopearl Butyl 650M.

- En una realización, el método de purificación de la variante AvPAL pegilada comprende además la congelación y la descongelación del eluato de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL, en el que uno o más polioles o azúcares, tal como aproximadamente 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% o 15% de glicerol, sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol o sorbitol, o similares se añade al eluato de la columna HIC antes de la congelación. En una realización, el poliol es glicerol. En una realización, la concentración de glicerol es 10% (v/v). En una realización, el azúcar es sacarosa. En una realización la concentración de sacarosa es 10% (v/v). En una realización, el método de purificación de las variantes AvPAL pegiladas comprende además concentrar el eluato de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL por ultrafiltración hasta aproximadamente 16X o más (por ejemplo, aproximadamente 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 8X, 10X, 12X, 14X, 16X, 18X, 20X o 25X) antes de la congelación. En una realización, el eluato de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL se congela usando etapas de temperatura discretas. En una realización, el eluato de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL se descongela usando etapas de temperatura discretas. En una realización, el eluato de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL se congela y descongela usando etapas de temperatura discretas. En una realización, el eluato de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL se somete a diafiltración en un tampón de diafiltración que comprende fosfato de

potasio (KPi) y uno o más agentes que reducen la agregación y/o preservan la actividad enzimática en la pegilación, tales como ácido trans-cinámico (t-CA) y glicerol. En una realización, el tampón de diafiltración comprende KPi 50 mM, t-CA 10 mM, 5% de glicerol, pH 8,5. En una realización, un detergente no iónico, tal como polisorbato 80 (PS80), se añade al eluato ultrafiltrado/diafiltrado de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL. En una realización, el detergente no iónico es PS80. En una realización, la concentración de PS80 es 0,02% (v/v). También se proporcionan en este documento variantes AvPAL pegiladas con agregación mínima, (por ejemplo, producidas por los métodos de purificación proporcionados en este documento), así como composiciones farmacéuticas y formulaciones de las mismas y métodos de uso de las mismas.

En una realización específica, Cuando el PAL procariota recombinante o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo es una variante AvPAL con agregación mínima y el método de purificación de la variante AvPAL comprende: (a) lisar las células bacterianas que contienen la variante AvPAL por homogeneización para generar un lisado celular; (b) calentar el lisado de células a 65°C durante 30 a 120 minutos; (c) centrifugar el lisado celular calentado, en el que un sobrenadante que comprende la variante AvPAL se retiene; (d) filtrar el sobrenadante para eliminar los precipitados; y (e) separar la variante AvPAL de proteínas contaminantes por cromatografía secuencial sobre una columna de AIEX, tal como Toyopearl Giga Cap Q 650M, seguido por una columna HIC de interacción hidrófoba, tal como Toyopearl Butyl 650M, en el que el eluato de la columna de HIC comprende la variante AvPAL. En una realización, los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina (SEQ ID NO: 11). En una realización, la columna AIEX, es una columna Toyopearl Giga Cap Q 650M. En una realización, la columna de HIC es una columna Toyopearl Butyl 650M. También se proporcionan en el presente documento variantes AvPAL con agregación mínima, (por ejemplo, producidas por los métodos de purificación proporcionados en este documento), así como composiciones farmacéuticas y formulaciones de las mismas y métodos de uso de las mismas.

En un séptimo aspecto, la presente invención describe ensayos de cribado y métodos de los mismos para la identificación de PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo que puede prevenir, mejorar o tratar niveles aumentados de fenilalanina poniendo en contacto una célula que contiene niveles elevados de fenilalanina con la PAL bacteriana y determinando si el PAL bacteriano reduce tales niveles elevados de fenilalanina. Dichos ensayos de cribado pueden incluir también los pasos de crear variantes que incluyen sustituciones conservadoras o no conservadoras en los sitios activos, por ejemplo, Gly142, tríada Thr-Ser-Gly (143-145), Asp146, Leu147, Asn196, Ile 195, Leu192, Leu76, Asn79, Met400, Thr428, Gln432 en EncP de *Streptomyces maritimus*, o sus equivalentes en otros PAL procariotas, tales como *Nostoc punctiforme* o *Anabaena variabilis*, que son equivalentes a los restos Ser210, tríada Ala-Ser-Gly (211-213), Asp214, Leu215, Asn270, Val269, Leu266, Leu134, His137, Lys468, Glu496, Gln500 en PAL de *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL), en las regiones adyacentes a los sitios activos, o en toda la secuencia del polipéptido, seguido de pruebas de las variantes para la actividad de conversión de fenilalanina *in vitro*. El método puede ser un ensayo de alto rendimiento. Los genomas completos de las especies bacterianas pueden secuenciarse y se cribaron para la presencia de homólogos de PAL procariotas usando un enfoque bioinformático. Se puede confirmar la actividad catalítica de PAL de la proteína producto de tales homólogos, por ejemplo, por pruebas de la capacidad de convertir la fenilalanina en trans-cinamato *in vitro*.

En un octavo aspecto, se describen en este documento métodos de uso de composiciones PAL procariotas para el diagnóstico de enfermedades, incluyendo pero no limitado a trastornos causados todo o en parte por una deficiencia en la actividad de PAH. El PAL procariota se puede utilizar para medir los niveles de Phe en muestras de sangre, plasma o suero. También se describen en el presente documento un kit de diagnóstico que comprende PAL procariota para su uso en el control de muestras de sangre, plasma o suero de sujetos para los niveles de Phe.

#### Descripción de las figuras

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

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

FIGURA 3. Árbol de relaciones de aminoácidos aromáticos amoniaco-liasas de procariotas y eucariotas. Las secuencias fueron recuperadas del GenBank (los números de entrada se dan entre paréntesis) y se alinean con ClustalX (1.83) utilizando el método de empalme de vecinos.

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

FIGURA 5. Figura 5 A: La 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 proteína 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 cisteína a la sustitución de 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 en negrita.

5 FIGURA 6. Figura 6A: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en la posición 565 o ambas posiciones 565 y 503 de AvPAL no pegilado respecto a la actividad enzimática de PAL in vitro específica tras la incubación durante diversos períodos de tiempo a 37°C. Figura 6B: Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en la posición 565 o ambas posiciones 565 y 503 de AvPAL pegilado respecto a la actividad enzimática de PAL in vitro específica tras la incubación durante diversos períodos de tiempo a 37°C.

10 FIGURA 7. Figura 7A: Efecto de sustituciones de cisteína a serina en AvPAL sobre la formación de agregados de proteínas en solución como se analizó por electroforesis de gel en condiciones desnaturalizantes (panel izquierdo) o condiciones nativas (panel derecho). Figura 7B: Efecto de sustituciones de cisteína a serina en AvPAL sobre la formación de agregados de proteínas en solución como se analizó por SEC-HPLC.

15 FIGURA 8. Efecto de las sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (Mutante dbI) en AvPAL sobre la pegilación específica de sitio en 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 como se analizó por SEC-HPLC.

20 FIGURA 10. Figura 10A: Efecto del tratamiento de AvPAL por ditioneitol (DTT) sobre la formación de agregados de proteínas en solución como se analizó mediante SEC-HPLC. Figura 10B: Efecto del tratamiento de AvPAL por TDT y N-etilmaleimida (NEM) sobre la formación de agregados de proteínas en solución como se analizó mediante SEC-HPLC.

25 FIGURA 11. Efecto de Phe y del ácido trans-cinámico (t-CA) como se indica en la actividad enzimática de una AvPAL pegilado con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) (rAV-PAL-PEG) almacenados durante diversos tiempos (días) a 4°C (panel superior), a 25°C (panel central) y a 37°C (panel inferior).

FIGURA 12. Efecto de la tirosina (Tyr) a 1 y 5 mM, como se indica en la actividad enzimática de un AvPAL pegilado con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) (rAV-PAL-PEG) almacenados durante diversos tiempos (días) a 4°C (panel superior), a 25°C (panel central) y a 37°C (panel inferior).

30 FIGURA 13. Figura 13 A: Efecto de Phe, ácido benzoico y piridoxamina, solo o en combinación como se indica, sobre la actividad enzimática de un AvPAL pegilado con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) (rAV-PAL-PEG) almacenados durante varios tiempos (semanas) a 4°C (panel superior) y a 37°C (panel inferior). Figura 13B: Las estructuras químicas de ácido benzoico (izquierda), fenilalanina (medio) y ácido trans-cinámico (derecha) se representan.

35 FIGURA 14. Efecto de los conservantes alcohol de bencilo (Benz'OH, 1,5%) o m-cresol (mCresol, 0,3%) y/o estabilizadores de L-fenilalanina (Phe, 1 mM) y/o glicina (Gly, 1 mM) como se indica en la actividad específica (U/mg) de un AvPAL pegilado con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) (rAV-PAL-PEG) almacenados durante diversos tiempos (semanas) a 4°C (panel superior), a 25°C (panel central) y a 40°C (panel inferior).

40 FIGURA 15. Figura 15 A: Efecto de la glicina (Gly) de 1 a 20 mM, como se indica en la actividad normalizada (%) de un AvPAL pegilado con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) almacenados durante diversos tiempos (semanas o meses como se indica) a 25°C (panel superior) y a 40°C (panel inferior). Figura 15B: Efecto de la glicina (Gly) a 20, 50 ó 100 mM, como se indica en la actividad de la enzima (U/ml) de un AvPAL pegilado con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) almacenados durante diversos tiempos (semana como se indica) a 40°C.

45 FIGURA 16. Efecto de sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) en AvPAL pegilado en niveles in vivo de Phe en ratones ENU2 dosificados con 0,25 UI (panel superior), 1,0 UI (panel central) o 4,0 UI (panel inferior) de la enzima en comparación con ratones ENU2 dosificados con vehículo o 4,0 UI de AvPAL pegilado tipo salvaje.

50 FIGURA 17. Efecto de sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) en AvPAL pegilado sobre los pesos corporales de los ratones ENU2 dosificados con 0,25 UI, 1,0 UI ó 4,0 UI de enzima en comparación con los ratones ENU2 dosificados con vehículo o 4,0 UI de AvPAL pegilado de tipo salvaje.

55 Figura 18. Efecto de sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL C503S/565S) en AvPAL pegilado en los niveles de Phe in vivo en ratones ENU2 dosificados con 4 UI de enzima en varias proporciones de AvPAL:PEG: 1:1,6 (panel superior), 1:2,4 (panel medio) o 1:3 (panel inferior), en comparación con los ratones ENU2 dosificados con vehículo o 4,0 UI de AvPAL pegilado tipo salvaje respecto a una relación AvPAL:PEG de 1:3.

FIGURA 19. Efecto de sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) en AvPAL pegilado sobre los pesos corporales de los ratones ENU2 dosificados con 4 UI de enzima en varias proporciones de AvPAL:PEG: 1:1,6, 1:2,4 ó 1:3, en comparación con ratones ENU2 dosificados con vehículo o 4,0 UI de AvPAL pegilada tipo salvaje a una relación de AvPAL:PEG de 1:3.

5 FIGURA 20. Figura 20A: El efecto de una sola inyección subcutánea de un AvPAL pegilado con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) a 4 mg/kg (diamantes) y a 12 mg/kg (cuadrados) en macacos de Java en los niveles AvPAL\_C565SC503S en plasma con el tiempo (horas). Figura 20B: Efecto de una inyección subcutánea única de AvPAL\_C565SC503S a 4 mg/kg en macacos de Java en los AvPAL\_C565SC503S en plasma (diamantes) y niveles de fenilalanina (cuadrados) respecto al tiempo (horas).

10 FIGURA 21. Figura 21 A: Efecto de una sola inyección intravenosa de un AvPAL pegilado con sustituciones de cisteína a serina en las posiciones 565 y 503 (AvPAL\_C565SC503S) a 1 mg/kg (diamantes), en 5 mg/kg (cuadrados) y en 25 mg/kg (triángulos) en ratas en los niveles de AvPAL\_C565SC503S en a lo largo del tiempo (horas). Figura 21B: Efecto de una única inyección subcutánea de AvPAL\_C565SC503S a 10 mg/kg (diamantes), en 25 mg/kg (cuadrados) y en 250 mg/kg (triángulos) en ratas en los niveles de AvPAL\_C565SC503S en plasma a lo largo del tiempo (horas).

15 FIGURA 22. Diagrama de flujo del proceso de producción para la fabricación a gran escala de un polipéptido de la variante AvPAL pegilado con la agregación mínima. Las flechas que apuntan hacia la izquierda indican los pasos del proceso que son objetivos para la reducción de la agregación.

#### Descripción detallada

20 La solicitud generalmente se refiere a composiciones de PAL procariota y fragmentos biológicamente activos, mutantes, variantes o análogos de los mismos y su uso para fines terapéuticos, incluyendo el tratamiento de hiperfenilalaninemia, incluyendo la fenilcetonuria, y otros trastornos, incluyendo el cáncer.

#### A. Definiciones

25 Específicamente, la presente invención proporciona un método para purificar una variante de fenilalanina amoniaco-liasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) con una agregación mínima que comprende:

- (a) lisar células bacterianas que contienen la variante AvPAL por homogeneización para generar un lisado celular;
- (b) calentar el lisado celular a 65°C durante 30 a 120 minutos;
- (c) centrifugar el lisado celular calentado, en el que se retiene un sobrenadante que comprende la variante AvPAL;
- (d) filtrar el sobrenadante para eliminar los precipitados; y

30 (e) separar la variante AvPAL de las proteínas contaminantes mediante cromatografía secuencial sobre una columna de intercambio aniónico (AIEX) seguido de una columna de interacción hidrófoba (HIC), donde el eluato de la columna HIC comprende la variante AvPAL,

en donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID NO: 11).

35 En algunas realizaciones, el método es un método para purificar una variante de fenilalanina amoniaco-liasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) pegilada con agregación mínima y el método comprende además:

- (f) ultrafiltrar o ultrafiltrar/diafiltrar el eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL;
- (g) pegilar la variante AvPAL mezclando polietilenglicol con la variante AvPAL;
- (h) eliminar el polietilenglicol libre de la variante AvPAL pegilada mediante ultrafiltración/diafiltración; y

40 (i) formular la variante AvPAL pegilada,

en la que dicha variante AvPAL comprende polietilenglicol. La relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol puede ser de aproximadamente 1:3.

45 En algunas realizaciones, el método puede comprender además congelar y descongelar el eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL obtenida en la etapa (e), en donde uno o más polioles o azúcares seleccionados del grupo que consiste en glicerol, sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol y sorbitol se agregan al eluato de la columna HIC antes de la congelación. En algunas realizaciones, el poliol es glicerol. En una realización preferida, la concentración de glicerol es 10% (v/v). En algunas realizaciones, el azúcar es sacarosa. En una realización preferida, la concentración de sacarosa es 10% (v/v).

En algunas realizaciones, la congelación o la descongelación del eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL se realiza en etapas discretas de temperatura. En otras realizaciones, tanto la congelación como la descongelación del eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL se realizan en etapas discretas de temperaturas.

- 5 En algunas realizaciones, un tampón de diafiltración en la etapa (f) comprende fosfato de potasio (KPi) y uno o más agentes que consisten en ácido transcinámico (t-CA) y glicerol. En realizaciones preferidas, el tampón de diafiltración comprende 50 mM de KPi, 10 mM de t-CA, 5% de glicerol, pH 8,5.

- 10 En algunas realizaciones, se añade un detergente no iónico al eluato ultrafiltrado o ultrafiltrado/diafiltrado de la columna HIC que comprende la variante AvPAL obtenida en la etapa (f). El detergente no iónico puede ser polisorbato 80 (PS80). En una realización preferida, la concentración de PS80 es del 0,02%.

En algunas realizaciones, la columna AIEX puede ser una columna Toyopearl Giga Cap Q 650M. En realizaciones adicionales, la columna HIC es una columna Toyopearl Butyl 650M.

- 15 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos utilizados en esta solicitud, incluyendo la memoria descriptiva y las reivindicaciones, tienen las definiciones que figuran a continuación. Hay que señalar que, tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La definición de los términos de química estándar se puede encontrar en las obras de referencia, incluyendo Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3ª Edición, Vols. A y B (Plenum Press, New York 1992). La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química orgánica sintética, espectroscopia de masas, métodos preparativos y de análisis de la cromatografía, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and 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 eds., Academic Press, Inc.); Remington *Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990).

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

- |                             |                          |
|-----------------------------|--------------------------|
| Alanina: Ala (A)            | Arginina: Arg (R)        |
| Asparagina: Asn (N)         | Ácido aspártico: Asp (D) |
| Cisteína: Cys (C)           | Glutamina: Gln (Q)       |
| 30 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)          |
| 35 Treonina: Thr (T)        | Triptófano: Trp (W)      |
| Tirosina: Tyr (Y)           | Valina: Val (V)          |

- 40 "Polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto de unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de origen natural, tales como ácido desoxirribonucleico ("ADN") y ácido ribonucleico ("ARN"), así como análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos que incluyen bases no naturales, nucleótidos que se unen a los enlaces con otros nucleótidos distintos del enlace fosfodiéster natural o que incluyen bases unidas a través de enlaces distintos de los enlaces fosfodiéster. Por lo tanto, los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, fosfonatos de quiral-metilo, ribonucleótidos de 2-O-metilo, péptido-ácidos nucleicos (PNA) y similares. Tales polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado. La expresión "ácido nucleico" se refiere típicamente a polinucleótidos grandes. El término "oligonucleótido" se refiere típicamente a polinucleótidos cortos, generalmente no mayores de aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en el que "U" sustituye a "T."

- 50 "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, tanto en forma de cadena sencilla o de cadena doble.

La notación convencional se usa en este documento para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polinucleótidos monocatenario es el extremo 5'; la dirección izquierda de una secuencia de polinucleótido de doble cadena se conoce como la dirección 5'. La dirección de adición 5' a 3' de nucleótidos a transcritos de ARN nacientes se denomina como la dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante"; secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que un ARNm transcrito a partir de ese ADN y que están situadas 5' al extremo 5' del transcrito de ARN son referidas como "secuencias cadena arriba"; secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 3' al extremo 3' del transcrito de ARN de codificación se denominan como "secuencias cadena abajo".

"Complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o a hacer coincidir juntas las superficies de interacción de dos polinucleótidos. Por lo tanto, 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 a un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del primer polinucleótido es idéntica a la secuencia de nucleótidos de la pareja de unión de polinucleótidos del segundo polinucleótido. De este modo, 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 respecto a la secuencia de nucleótidos objeto es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc, o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen ya sea una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Así, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm producido por ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, la secuencia de nucleótidos de la cual es idéntica a la secuencia de ARNm y que por lo general se proporciona en los listados de secuencia, y la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción, de un gen o ADNc puede ser referido como que codifica la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos 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 una de la otra y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

"Polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas naturalmente juntas. Un polinucleótido recombinante amplificado o montado puede incluirse en un vector adecuado, y el vector puede usarse para transformar una célula huésped adecuada. Una célula huésped que comprende el polinucleótido recombinante se denomina "célula huésped recombinante". El gen se expresa entonces en la célula huésped recombinante para producir, por ejemplo, un "polipéptido recombinante". Un polinucleótido recombinante puede servir como una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión de ribosomas, etc.) también.

"Secuencia de control de 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 la misma. "Unido operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos partes en las que la actividad de una parte (por ejemplo, la capacidad para regular la transcripción) da lugar a una acción en la otra parte (por ejemplo, la transcripción de la secuencia). Las secuencias de control de expresión pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, secuencias de promotores (por ejemplo, inducible o constitutiva), potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG), señales de empalme para intrones y codones de parada.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que se expresa. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en el sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

"Amplificación" se refiere a cualquier medio por el que una secuencia de polinucleótidos se copia y de este modo se expandió a un mayor número de moléculas de polinucleótidos, por ejemplo, por transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa y reacción en cadena de la ligasa.

"Cebador" se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a una plantilla de polinucleótido designado y proporcionar un punto de iniciación para la síntesis de un polinucleótido complementario. Tal síntesis se produce cuando el cebador de polinucleótido se coloca bajo condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, una plantilla polinucleotídica complementaria y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa. Un cebador es típicamente monocatenario, pero puede ser de doble cadena. Los cebadores son típicamente ácidos desoxirribonucleicos, pero una amplia variedad de cebadores sintéticos y de origen natural

son útiles para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario a la plantilla a la que está diseñado para hibridarse para servir como un sitio para la iniciación de la síntesis, pero no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla. En tal caso, la hibridación específica del cebador al molde depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden marcarse con, por ejemplo, restos cromogénicos, radiactivos, fluorescentes y usarse como restos detectables.

"Polipéptido" se refiere a un polímero compuesto de restos de aminoácidos, en relación con las variantes estructurales naturales y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos unidos a través de enlaces peptídicos, relacionados con variantes estructurales naturales y análogos sintéticos no naturales 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" típicamente se refiere a polipéptidos cortos.

La notación convencional se usa en el presente documento para retratar secuencias de polipéptidos: el extremo izquierdo de una secuencia polipeptídica es el extremo amino terminal; el extremo derecho de una secuencia polipeptídica es el extremo carboxilo terminal.

"Sustitución conservadora" se refiere a la sustitución en un polipéptido de un aminoácido con un aminoácido funcionalmente similar. Los seis grupos siguientes contienen cada uno 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 también se pueden agrupar de la siguiente manera:

- (1) hidrofóbica: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutral hidrofílico: Cys, Ser, Thr;
- (3) ácida: Asp, Glu;
- (4) básica: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o restos de aminoácidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, según se mide usando un algoritmo de comparación de secuencia descrita en la anterior Patente de los Estados Unidos Número de solicitud 11/230.374 co-pendiente, presentada el 19 de septiembre de 2005 o mediante inspección visual.

La frase "sustancialmente homólogos" o "sustancialmente idénticos", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere generalmente a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidad de restos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. La identidad sustancial puede existir en una región de las secuencias que es al menos aproximadamente 50 restos de longitud, tales como sobre una región de al menos aproximadamente 100 restos, o sobre una región de al menos aproximadamente 150 restos. Las secuencias pueden ser sustancialmente idénticas sobre toda la longitud de uno o ambos biopolímeros de comparación.

"Sustancialmente puro" o "aislado" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar, más abundante que cualquier otra especie macromolecular en la composición), y una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50% (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura significa que de aproximadamente 80% a 90% o más de las especies macromoleculares presentes en la composición es la especie purificada de interés. La especie objeto se purifica hasta homogeneidad

- esencial (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales) si la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. Especies de disolventes, moléculas pequeñas (<500 Daltons), estabilizadores (por ejemplo, BSA) y especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares para los propósitos de esta definición. A veces, las composiciones de la variante PAL procariota son sustancialmente puras o aisladas. Por ejemplo, las composiciones de las variantes PAL procariotas son sustancialmente puras o están aisladas con respecto a los materiales de partida macromoleculares utilizados en su síntesis. A veces, las composiciones farmacéuticas comprenden una variante PAL procariota sustancialmente purificada o aislada en mezcla con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- "Origen natural" como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o de polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo un virus), que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionadamente por el hombre en el laboratorio, tiene origen natural.
- "Tipo salvaje" (wt) es una expresión que se refiere a la forma genética natural de un organismo. Un tipo salvaje se distingue de una forma mutante (un organismo con una mutación genética).
- Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares, se incluyen dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa y los fragmentos de los mismos se incluyen en la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, "polipéptido", tal como se utiliza en este documento, se refiere a una proteína, que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Tales polipéptidos pueden ser referidos como "mutantes" de este documento. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones que surgen con los huéspedes que producen las proteínas o los errores debidos a la amplificación por PCR.
- Como se usa en el presente documento, "variante", "análogo" o "derivado" es un compuesto, por ejemplo, un péptido, que tiene una secuencia de más de aproximadamente 70% pero menos del 100% de similitud de secuencia con un compuesto dado, por ejemplo, un péptido. Tales variantes, análogos o derivados pueden estar compuestos de restos de aminoácidos no presentes en la naturaleza, incluyendo a modo de ejemplo y no de limitación, homoarginina, ornitina, penicilamina y norvalina, así como de origen natural los restos de aminoácidos. Tales variantes, análogos o derivados también pueden estar compuestos de uno o una pluralidad de restos de ácido D-aminoácidos, y pueden contener vínculos no peptídicos entre dos o más restos de aminoácidos.
- Tal como se usa en el presente documento, la "relación" de un polipéptido PAL (por ejemplo, AvPAL) y un polímero soluble en agua, por ejemplo (polietilenglicol o PEG) se refiere a la relación molar de las condiciones de reacción entre el polipéptido 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 el PAL modificado químicamente se produjo en una condición de reacción con aproximadamente 1 mol del resto de lisina en la AvPAL por 3 moles de polietilenglicol. Debido a que un monómero AvPAL tiene 18 restos de lisina, una relación de aproximadamente AvPAL:PEG 1:3 corresponde a 1 mol de AvPAL por 54 moles de PEG en la reacción de pegilación. En las condiciones de reacción descritas en el Ejemplo 6, infra, una relación de aproximadamente 1:3 de AvPAL:PEG da como resultado aproximadamente de 10 a 12 moles de PEG por mol de monómero AvPAL.
- "Tratamiento" o "tratar", como se usa en este documento, se refiere al tratamiento profiláctico o al tratamiento terapéutico o al tratamiento diagnóstico.
- Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de enfermedad o patología, es decir, un cáncer, o exhibe solamente signos tempranos con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar una patología. Las composiciones PAL procariotas, incluyendo formulaciones, proporcionadas en este documento se pueden administrar como un tratamiento profiláctico para reducir la probabilidad de desarrollar una patología, es decir, un cáncer, o para minimizar la gravedad de la patología, si se desarrolla.
- Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que exhibe signos o síntomas de la patología, es decir, un cáncer, con el fin de disminuir o eliminar estos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos y funcionales, subjetivos u objetivos. Las composiciones PAL procariotas se pueden administrar como un tratamiento terapéutico o para diagnóstico.
- "Diagnóstico" significa identificar la presencia o naturaleza de un estado patológico, es decir, un cáncer. Los métodos de diagnóstico difieren en su especificidad y selectividad. Mientras que un método de diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el procedimiento proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

"Composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto animal, incluyendo seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un polipéptido PAL procariótica y comprende también un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica abarca una composición que comprende el ingrediente o los ingredientes activos, y el ingrediente o los ingredientes inertes que constituyen el vehículo, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de cualquiera de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. De acuerdo con ello, las composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición preparada mezclando un polipéptido PAL procariota proporcionado en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los excipientes farmacéuticos estándares, vehículos, diluyentes, estabilizantes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos, tales como, por ejemplo y no de limitación, una solución salina tamponada con fosfato, solución acuosa de dextrosa al 5% y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes y/o adyuvantes humectantes. Se describen vehículos y formulaciones farmacéuticas adecuadas en Remington Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los vehículos farmacéuticos a utilizar pueden depender del modo pretendido de administración del agente activo. Los modos típicos de administración incluyen la administración enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, inyección 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 la variante PAL procariota para uso farmacéutico incluyendo, por ejemplo, sales de metales (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente indeseable o de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la variante PAL procariota calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitarias pueden depender de la variante PAL procariota particular empleada y del efecto a conseguir y la farmacodinámica asociada con cada variante PAL procariota en el huésped.

Por "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, ambos inclusive.

Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" incluye mamíferos y no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, cualquier miembro de la clase de los mamíferos: seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y monos; animales de granja tales como vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos como conejos, perros, y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas, y similares. Ejemplos de no mamíferos incluyen, pero no se limitan a, aves, peces, y similares. El término no denota una edad o sexo en particular.

#### B. Variantes PAL procariotas

La elucidación de una estructura tridimensional fiable o modelo estructural para una macromolécula específica permite el diseño racional para convertirse en un método productivo para la optimización de la estructura y/o función específica de dicha macromolécula. Métodos de utilización de una estructura tridimensional o modelo estructural para la optimización de enzimas PAL se describen en tramitación junto con la solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/230.374 presentada el 19 de septiembre de 2005. Se puede utilizar una estructura cristalina de proteína tridimensional de alta resolución de una PAL procariota en métodos que implican la ingeniería de proteínas para mejorar las propiedades bioquímicas y biofísicas de un PAL procariota, y para aumentar la eficacia terapéutica in vivo de un PAL procariota. Se proporcionan en este documento variantes PAL procariotas con una mayor actividad convertidora de fenilalanina y/o menor inmunogenicidad en comparación con un PAL procariota tipo salvaje. También se proporcionan en este documento variantes PAL procariotas con una mayor estabilidad bioquímica y/o vida media bioquímica en comparación con un PAL procariota tipo salvaje.

Los experimentos anteriores han descrito formas modificadas de PAL, tales como mutantes de PAL (Schuster, et al, FEBS Lett. 349(2): 252-254 (1994); Schuster, et al, Proc Natl Acad Sci USA 92 (18): 8433-8437 (1995); Langer, et al., Biochemistry 36: 10867-10871 (1997); El-Batal, et al, Acta Microbiol Pol. 49(1): 51-61 (2000); Rother, et al, Eur. J. Biochem. 269: 3065-3075 (2002)) y mutantes Hal (Taylor, et al, J. Biol. Chem. 269(44): 27473-27477 (1994); Baedeker, et al, Eur. J. Biochem. 269(6): 1790-1797 (2002)).

Variantes PAL procariotas con mejor actividad catalítica

Los sitios biológicamente activos de PAL tipo salvaje proporcionados en este documento pueden modificarse para optimizar las características cinéticas de PAL. La  $K_m$ , la concentración de sustrato que da la actividad máxima media, está íntimamente asociada con la eficacia terapéutica de PAL en el mantenimiento de los niveles de Phe en un intervalo aceptable, es decir, de 120  $\mu\text{M}$  a 240  $\mu\text{M}$ . La  $K_m$  es la afinidad de la enzima por el sustrato. Mediante el control de afinidad, se puede limitar o controlar la eficacia de cualquier enzima frente al sustrato a diferentes concentraciones. Por ejemplo, si la  $K_m$  es 1000  $\mu\text{M}$  (por ejemplo, PAL de *Rhodospiridium toruloides*), la actividad de la enzima se reduce a aproximadamente 12,5% en los niveles sanguíneos de Phe de 240  $\mu\text{M}$  y hasta aproximadamente 3% en los niveles de Phe en sangre de 60  $\mu\text{M}$ . Si la  $K_m$  es 240  $\mu\text{M}$ , la actividad de la enzima se reducirá a aproximadamente el 50% en los niveles de Phe en sangre de 240  $\mu\text{M}$  y hasta aproximadamente de 12% en los niveles sanguíneos de Phe de 60  $\mu\text{M}$ . Si la  $K_m$  es 120  $\mu\text{M}$ , la actividad de la enzima se reducirá a aproximadamente el 70% en los niveles de Phe en sangre de 240  $\mu\text{M}$  y hasta aproximadamente de 35% en los niveles de Phe en sangre de 60  $\mu\text{M}$ . De manera óptima, un objetivo terapéutico sería tener una enzima con actividad suficiente para reducir, sino también para mantener Phe dentro del intervalo óptimo de aproximadamente de 120  $\mu\text{M}$  a aproximadamente de 240  $\mu\text{M}$ . Una enzima con una alta  $K_m$  (es decir, 1000  $\mu\text{M}$ ) perderá la actividad rápidamente a medida que los niveles de fenilalanina caen dentro del intervalo normal y también requerirá la administración práctica de volúmenes muy concentrados o grandes de dosis. Por otro lado, una enzima con una  $K_m$  muy baja puede agotar rápidamente los niveles de Phe, lo que puede ser fatal para las hiperfenilalaninurias, pero puede ser útil en el tratamiento de cáncer.

En algunas realizaciones, el PAL modificado biológicamente activo tiene una  $k_{cat}$  de al menos aproximadamente 0,1 s<sup>-1</sup> o mayor de aproximadamente 0,5 s<sup>-1</sup>. En otras realizaciones, el PAL de la invención modificado biológicamente activo tiene una  $k_{cat}$  de al menos aproximadamente 0,2 s<sup>-1</sup> o mayor de aproximadamente 1,0 s<sup>-1</sup>. En otras realizaciones, el PAL modificado biológicamente activo tiene una  $K_m$  de entre aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$ . En otras realizaciones, el PAL modificado biológicamente activo tiene una  $K_m$  de entre aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$ . En otras realizaciones, el PAL modificado biológicamente activo muestra una actividad enzimática que es de aproximadamente dos veces a aproximadamente 1000 veces mayor que la de los de tipo salvaje. En otras realizaciones, el PAL modificado biológicamente activo muestra actividad enzimática que es de aproximadamente 10% a aproximadamente 100% mayor que la de los de tipo salvaje. Tales proteínas modificadas PAL activas biológicas se pueden formar usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante mutagénesis dirigida al sitio.

Todos los restos del sitio activo en HAL se mostraron que estaban presentes en EncP, a excepción de H83 y E414, que se sustituye con restos de valina y glutamina, respectivamente (Xiang, L., et al, *J. Biol. Chem.* 277: 32505-32509 (2002)). Se investigó el papel de H83 en HAL en la unión y orientación del resto imidazol de L-histidina en el sitio activo y en la estabilización de un intermedio catiónico unido a enzima (Xiang, et al, *J. Bacteriology* 187 (12): 4286-4289 (2005); Xiang, et al, *J. Bacteriology* 188 (14): 5331 (2006)). Se propuso que el grupo carboxilato de E414 puede actuar como una base en la catálisis. En el estudio, los mutantes EncP fueron generados por mutagénesis dirigida al sitio para evaluar la contribución de V83 a la formación de ácido cinámico por EncP. La sustitución de valina con histidina generó un mutante, V83H, que se caracteriza por una pérdida de la actividad PAL. La sustitución de la valina por alanina dio lugar a un mutante, V83A, que era más activo que EncP V83A de tipo salvaje, tenía una afinidad ligeramente inferior a L-fenilalanina con un  $K_m$  de 120  $\mu\text{M}$  frente a 23  $\mu\text{M}$  para la enzima tipo salvaje. Sin embargo, en comparación con EncP tipo salvaje, V83A tenía una  $k_{cat}$  superior más alta y era más activa que la enzima tipo salvaje.

#### Variantes PAL procariotas que tienen una menor inmunogenicidad

Se utilizan actualmente un número de estrategias para reducir la inmunogenicidad de la proteína. Las modificaciones que se introducen para minimizar la respuesta inmune no destruyen la estructura, la función o la estabilidad de la macromolécula. Estrategias eficaces utilizadas incluyen aumentar el contenido de la secuencia humana (quimeras y/u otros enfoques de "humanización"), mejorar las propiedades de la solución, eliminar los epítopos de anticuerpos, introducir una derivatización química (tal como una pegilación) y/o identificar y eliminar epítopos de MHC. Para una terapia inyectada, la inmunorreactividad in vivo puede abordarse mediante la realización del mapeo de epítopos seguido de mutagénesis racional para modificar y/o mutar de otra manera estos sitios de inmunogenicidad, solo y en combinación con la pegilación específica de sitio (Hershfield, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7185-7189 (1991); Leong, et al, *Cytokine* 16 (3): 106-119 (2001); Lee, et al, *Pharm. Res.* 20 (5): 818-825 (2003)) u otros métodos de derivatización química para reducir la inmunorreactividad de la proteína 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 retienen la actividad catalítica (por ejemplo, se utiliza un ensayo de absorbancia para la medición de la actividad). La ingeniería de proteínas acoplada a la detección mediante ELISA, también se puede utilizar para identificar mutantes con inmunorreactividad reducida. Otro método introduce mutaciones de punto para otros sitios de Lys de superficie para la derivatización de la pegilación, un método que se muestra que reduce la inmunogenicidad con la prueba de la enzima purina nucleósido fosforilasa (Hershfield, et al. (1991), *ibid.*). Una vía alternativa utiliza la mutación de los restos situados en las regiones de epítipo de proteína para eliminar sitios inmunogénicos (Yeung, et al, *J. Immunol.* 172(11): 6658-6665 (2004)). En un enfoque que es análogo a la humanización de anticuerpos, las regiones de bucle homólogas y/o los restos de anticuerpos humanos se sustituyen en las regiones de bucle correspondientes de una proteína homóloga.

La mejora de las propiedades de disolución de las proteínas puede aumentar la actividad enzimática específica y/o reducir la inmunogenicidad. Una propiedad de solución típica de las proteínas recombinantes expresadas en bacterias es la formación de agregados de proteínas, debido, por ejemplo, a la formación de puentes disulfuro entre cadenas, interacciones hidrófobas y/o cationes divalentes (Chi, et al, *Pharm. Res.* 20(9): 1325-1336 (2003)). La agregación de proteínas expresadas de forma recombinante puede mejorar la respuesta inmune (Hermeling, et al, *Pharm. Res.* 21(6): 897-903 (1994); Schellekens, *Nephrol. Dial. Transplant.* 20 (Supl. 6): vi3-9 (2005)). Un método de mejora implica la sustitución de restos de cisteína de superficie con otros restos de aminoácidos (por ejemplo, serina) para minimizar la posibilidad de la formación de enlaces disulfuro entre cadenas. Por ejemplo, la sustitución de dos restos de cisteína de superficie con restos de serina reduce la agregación de corismato liasa con efectos menores sobre la actividad enzimática (Holden, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1594 (1): 160-167 (2002)).

En este documento se describen variantes PAL procariotas que tienen uno o más restos de cisteína sustituidos por otro resto de aminoácido, tal como un resto de serina. En algunos ejemplos, uno o más restos de cisteína de la PAL procariota son sustituidos por otro resto de aminoácido. De acuerdo con la invención, el PAL procariota es AvPAL y dos restos de cisteína de AvPAL son sustituidos por un resto de serina.

#### C. Variantes PAL procariotas químicamente modificadas

La modificación química de la macromolécula se puede realizar de una manera no específica (lo que conduce a mezclas de especies derivatizadas) o de una manera específica de sitio (basado en la derivatización dirigida por la reactividad de la macromolécula tipo salvaje y/o la modificación selectiva de sitio utilizando una combinación de mutagénesis dirigida al sitio y modificación química) o, alternativamente, usando métodos de ligación de proteínas expresadas (Hofmann, et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(4): 297-303 (2002)). Preferiblemente, la modificación química puede usarse para reducir la inmunogenicidad. La pegilación es un método que se ha demostrado que reduce la inmunogenicidad de las proteínas (Bhadra, et al, *Pharmazie* 57 (1): 5-29 (2002)), pero la glicosilación y otros procedimientos de derivatización química, que usan modificación con fosforilación, amidación, carboxilación, acetilación, metilación, creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres y derivados de N-acilo son también posibles (Davis, *Science* 303: 480-482 (2004)).

#### Proteínas pegiladas

Una serie de diferentes reacciones de pegilación en PAL, que utilizan un intervalo de proporciones de reactivos químicos de PEG frente a proteína PAL, proporcionará derivados de PEG-PAL para cada método de modificación. El grado óptimo de pegilación se puede determinar en base a la actividad residual obtenida para cada especie PAL derivatizada utilizando el ensayo de absorbancia en combinación con PAGE y análisis de gel nativo, o mediante el uso de SE-HPLC con dispersión de luz multiángulo (MALS), para determinar el grado de derivatización de PEG. Después de que se determinan los intervalos iniciales de modificación óptima, el análisis cinético comparativo (incluyendo determinaciones  $V_{max}$  y  $K_m$ , las constantes de unión de los sustratos, la estabilidad proteolítica, la dependencia del pH de la actividad, la dependencia de la temperatura de la actividad) y la inmunorreactividad de las especies PEG-PAL óptimas se pueden determinar por ELISA, inmunoprecipitación y transferencia de Western. También se puede utilizar ingeniería de proteínas para generar el mutante PAL más favorable para la pegilación usando las condiciones óptimas de derivatización; reduciendo al mínimo el tamaño de la proteína PAL y modificando sólo las regiones más antigénicas de la superficie PAL, el coste de la modificación con PEG se reducirá mientras que al mismo tiempo se retiene la máxima cantidad de actividad enzimática y la cantidad mínima de inmunogenicidad. Del mismo modo, se puede utilizar pegilación específica de sitio para proporcionar derivados de enzimas.

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

Para descubrir si la vida media terapéutica in vivo de una proteína tal como PAL se beneficiaba de la pegilación, se sintetizaron una gran variedad de conjugados PEG:PAL, caracterizados in vitro y probados in vivo para la reducción de L-Phe. Con el fin de optimizar tanto los efectos potenciales de la pegilación como para identificar uno o más sitios de unión de PEG, se emplea una estrategia de diseño en la que la longitud del polímero, la conformación y el grado de unión de PEG se varían. Los métodos para la preparación del PAL pegilado generalmente comprenden: (a) hacer reaccionar PAL con polietilenglicol en condiciones mediante las que PAL se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener el producto o los productos de reacción. Debido a que los sitios específicos de la modificación PAL podrían alterar significativamente la actividad intrínseca del conjugado, se exploraron diferentes tipos y cantidades de PEG. La química utilizada para la pegilación de PAL fue la acilación de las aminas primarias de PAL utilizando el NHS-éster de metoxi-PEG (O-[(N-succinimidiloxycarbonil)-metil]-O'- metilpolietilenglicol). La acilación con metoxi-PEG-NHS o metoxi-PEG-SPA da como resultado un enlace amida que elimina la carga de la amina primaria original.

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

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

De acuerdo con la invención, un polímero soluble en agua para su uso en este documento es el polietilenglicol, abreviado PEG. En la presente memoria, el polietilenglicol está destinado a abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono-(C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol.

La proporción de moléculas de polietilenglicol frente a moléculas de proteína variará, como lo harán sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (en términos de eficiencia de la reacción en la que no hay proteína en exceso sin reaccionar o polímero) se determinará por el peso molecular del polietilenglicol seleccionado y por el número de grupos reactivos disponibles (grupos ε amino típicamente) presentes. En general, cuanto mayor sea el peso molecular del polímero utilizado, menor será el número de moléculas de polímero que se pueden unir a la proteína. Del mismo modo, la ramificación del polímero puede ser tomada en cuenta cuando se optimizan estos parámetros. En general, cuanto mayor sea el peso molecular (o cuantas más ramificaciones) mayor será la proporción polímero:proteína. Se contemplan varias longitudes de polímero PEG lineal diferentes, incluyendo pero no limitadas a, 5 kDa y 20 kDa, conjugados de polímeros de PEG ramificados de dos brazos, incluyendo pero no limitados a 10 kDa y 40 kDa. En algunas realizaciones, para las reacciones de pegilación contempladas en este documento, el peso molecular medio es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica +/- 1 kDa). En otras realizaciones, el peso molecular medio es de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa. La relación de polímero soluble en agua frente a PAL variará generalmente de 1:1 para monoPEG, 2:1 para diPEG, etc.

#### Variantes PAL pegiladas procarióticas

Los Ejemplos 7 a 9 de la Patente de Estados Unidos No. 7.531.341 de propiedad común describen los efectos de las formas pegiladas y no pegiladas del mutante de lisina R91K PAL de *Rhodosporidium toruloides* (RtPAL), NpPAL y AvPAL sobre los niveles de Phe en el ratón ENU2 o BTBR<sup>enu2</sup>. Este modelo animal es un mutante homocigoto en el locus PAH que resulta en un animal con hiperfenilalaninemia grave. Los niveles de fenilalanina en plasma altos hacen que este animal sea el modelo adecuado para evaluar la capacidad de PAL para reducir Phe en plasma. La administración de las formas pegiladas de NpPAL y AvPAL dio lugar a una mayor reducción de Phe en los ratones ENU2 en comparación con NpPAL y AvPAL no pegilado, respectivamente. Tales efectos se mantuvieron durante NpPAL en inyecciones semanales durante un período de diez semanas. Estos resultados muestran que la pegilación de PAL a partir de las cianobacterias, *Nostoc punctiforme* y *Anabaena variabilis*, es esencial en la reducción de los niveles de fenilalanina en ratones afectados de PKU.

El Ejemplo 14 en el presente documento describe el efecto de sustitución de serina de los restos de cisteína (por ejemplo, en las posiciones 503 y 565) en el polipéptido AvPAL en los niveles de Phe en ratones ENU2. La administración del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S da como resultado una reducción en Phe en plasma que es comparable a la conseguida con AvPAL pegilado de tipo salvaje. Además, los títulos de anticuerpos de anti-PAL son más bajos en los animales inyectados con la variante AvPAL pegilada en comparación con la AvPAL pegilada de tipo salvaje. Estos resultados muestran que una variante AvPAL pegilada tiene (1) actividad enzimática de PAL in vivo que es comparable a la de AvPAL pegilado tipo salvaje, y (2) tiene menor inmunogenicidad en comparación con AvPAL pegilado tipo salvaje.

Se proporcionan en este documento variantes PAL pegiladas con menor inmunogenicidad. Un ejemplo es una forma pegilada de la variante NpPAL con menor inmunogenicidad. La invención proporciona una forma pegilada de la variante AvPAL con menor inmunogenicidad. En las variantes NpPAL o AvPAL, la pegilación se puede conseguir por reacción de la variante NpPAL o AvPAL con un polímero soluble en agua, polietilenglicol (PEG). En algunos ejemplos, la pegilación se consigue por reacción de la variante NpPAL o AvPAL una vez con PEG en una proporción PAL:PEG de al menos 1:1, por lo menos 1:1,5, por lo menos 1:2, por lo menos 1:3, o al menos 1:4. De acuerdo con la invención, la variante PAL es una variante AvPAL, y la pegilación se consigue utilizando una relación PAL:PEG de 1:3. Los métodos para preparar las variantes PAL pegiladas también se describen en el presente documento.

Pueden introducirse uno o más restos de lisina en el sitio activo y/o cerca de una variante PAL procariota para mejorar la actividad catalítica, reducen la inmunogenicidad y/o mejoran la estabilidad bioquímica, en parte mediante el bloqueo de pegilación potencial de otros restos de aminoácidos (por ejemplo, tirosina) en y/o cerca del sitio activo de la enzima o mediante el bloqueo de pegilación potencial de un resto de lisina importante para la actividad enzimática. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se planteó la hipótesis de que un resto de tirosina en y/o cerca del sitio activo de una PAL procariota (es decir, la posición 78 ó 314 en AvPAL) puede ser un sitio para la pegilación, que reduce la actividad de la enzima. En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos en y/o cerca del sitio activo de PAL procariota, que no son necesarios para la actividad enzimática, son sustituidos por un resto de lisina. El PAL procariota es AvPAL. En una realización, el resto de tirosina de AvPAL en la posición 78 ó 314 no es accesible para la pegilación. Nuevamente sin estar ligado a ninguna teoría particular, se planteó la hipótesis de que un resto de lisina de un PAL procariota (es decir, la posición 419 en AvPAL), que normalmente está bloqueado de la pegilación debido a la pegilación de un resto de lisina vecino PAL (es decir, la posición 413 en AvPAL), puede ser un sitio para la pegilación, lo que reduce la unión del sustrato y/o actividad catalítica. En algunas realizaciones, uno o más restos aminoácidos de la PAL procariota son sustituidos por un resto de lisina, de manera que un resto de lisina importante para la unión del sustrato de la enzima y/o la actividad catalítica no es accesible para la pegilación. En una realización específica, el PAL procariota es AvPAL. En una realización, el resto de lisina de AvPAL en la posición 419 no es accesible para la pegilación.

#### D. Usos terapéuticos y administración de variantes PAL procariotas

##### 1. Diversas formas de hiperfenilalaninemia (HPA)

Se describen en este documento métodos de tratamiento de una variedad de poblaciones de pacientes HPA que comprenden el uso de composiciones de la variante PAL procariota, ya sea solas o en combinación con otros regímenes terapéuticos, para el control de HPA y/o PKU. En particular, se contempla que las composiciones de la variante PAL procariota se pueden utilizar para tratar aquella población de pacientes con concentraciones de fenilalanina que son lo suficientemente bajas de modo que la intervención con dieta no se utiliza normalmente (es decir, los pacientes con HPA leve), los pacientes con PKU moderada, los pacientes con PKU clásica o grave, y cualquier subpoblación de los mismos. Tales pacientes que son susceptibles de tratamiento con composiciones de la variante PAL procariota que mejoran los efectos de HPA leve incluyen mujeres embarazadas y niños con concentraciones séricas de menos de 200  $\mu\text{M}$ . Las diversas poblaciones de pacientes y sus diferentes necesidades terapéuticas, se discuten con más detalle en la presente sección.

Ciertos ejemplos se dirigen a tratar PKU clásico severa mediante la administración al sujeto de una dieta pobre en proteínas en combinación con una composición que comprende la variante PAL procariota o una variante biológicamente activa, mutante, o fragmento de la misma, en la que la administración combinada de la dieta pobre en proteínas y la variante PAL procariota es eficaz para bajar la concentración de fenilalanina en el plasma de dicho sujeto en comparación con dicha concentración en ausencia de dicha administración combinada. Además, se proporcionan métodos para el tratamiento de una mujer embarazada que tiene HPA que comprende la administración a la mujer de una dieta pobre en proteínas en combinación con la variante PAL procariota o un derivado biológicamente activo del mismo, de manera que la administración combinada de la dieta pobre en proteínas y la variante PAL procariota es eficaz para reducir la concentración de fenilalanina en el plasma de la mujer embarazada, en comparación con una concentración tal, en ausencia de dicha administración combinada. La terapia se contempla para un paciente que manifiesta mayores niveles de fenilalanina que 420  $\mu\text{M}$ .

Otros ejemplos implican la administración de una composición de la variante PAL procariota a cualquier individuo que tiene HPA, que se caracteriza por una concentración de Phe en plasma mayor que 180  $\mu\text{M}$  antes de la administración de la variante PAL procariota, en una cantidad eficaz para producir una disminución de una concentración de Phe en plasma tal del paciente. Los métodos proporcionados en este documento también pueden ser útiles en el tratamiento de un niño que tiene una PKU caracterizada por una elevación de las concentraciones de Phe de entre más de 300  $\mu\text{M}$  con composiciones de la variante PAL procariota descritas en este documento. Por "niño" se entiende un paciente que se encuentra entre las edades de 0 a aproximadamente 36 meses.

##### Características de la fenilcetonuria clásica severa y métodos de tratamiento de la misma

La PKU severa se manifiesta a una concentración de Phe en plasma mayor que 1200  $\mu\text{M}$  y se puede encontrar que es tan alta como 4800  $\mu\text{M}$ . Los pacientes que tienen este trastorno deben ser tratados con una dieta sin Phe con el fin de llevar sus concentraciones de fenilalanina en plasma a un nivel que sea clínicamente aceptable (por lo general, menos de 600  $\mu\text{M}$  o menos de 300  $\mu\text{M}$ ). Estos pacientes sólo son capaces de tolerar un máximo de entre 250 a 350 mg de Phe dietética por día (Spaapen et al., Mol. Genet Metab. 78: 93-99 (2003)). Como tales, estos pacientes se inician en una dieta de fórmula restringida en Phe entre 7-10 días después del nacimiento y obligados a esta restricción en la dieta para el resto de su vida. Cualquier alivio en las estrictas restricciones dietéticas a la que estos individuos están forzados sería beneficioso.

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico de los individuos con Phe clásica se describen con más detalle a continuación. Estas pruebas han revelado que los pacientes con fenilcetonuria clásica severa requieren una dieta baja en fenilalanina (Lucke et al., Pediatr. Neurol. 28: 228-230 (2003)). Por lo tanto, se contempla que ciertos

métodos proporcionados en este documento implicarán la determinación de que el paciente está sufriendo de PKU clásica mediante el control de la concentración de Phe en plasma del individuo. El paciente puede entonces ser tratado mediante la administración de composiciones variantes PAL procariotas solo o un régimen combinado de una variante de dieta baja en proteínas y PAL de tal manera que se produce al menos una disminución del 25% en las concentraciones en plasma de Phe del paciente. En algunos ejemplos, el método producirá una disminución del 30% en la concentración de Phe en plasma. En otros ejemplos, el método producirá un 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o mayor disminución en la concentración de Phe en plasma del individuo (por ejemplo, cuando un paciente con PKU severa clásica tiene una concentración de Phe de 4800  $\mu\text{M}$ , una disminución del 90% en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe en plasma de 480  $\mu\text{M}$ , una concentración que es lo suficientemente baja para requerir poca restricción en la dieta). Por supuesto, se debe entender que los métodos de tratamiento proporcionados en la presente invención, ya sea para el tratamiento de PKU grave clásica o cualquier otra HPA descrita en este documento, deben tratar de disminuir las concentraciones en plasma de Phe del paciente a niveles tan cerca de un intervalo de aproximadamente 120  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 360  $\mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ , cuando sea posible, o para un intervalo óptimo de aproximadamente 120  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 240  $\mu\text{M}$ .

Las concentraciones de Phe en plasma del paciente con PKU clásica que está siendo tratado se pueden reducir de cualquier cantidad de la concentración de Phe en plasma sin restricciones que es mayor que 1000  $\mu\text{M}$  a cualquier nivel de Phe en plasma que es menor que 600  $\mu\text{M}$ . Por supuesto, incluso si el tratamiento combinado con la variante PAL procariota y la dieta pobre en proteínas produce una disminución menor en la concentración de Phe en plasma, por ejemplo, a un nivel de entre 800  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1200  $\mu\text{M}$ , esto se considera como un resultado clínicamente útil de la terapia ya que los pacientes que tienen una concentración de Phe en plasma en este intervalo pueden manejar la enfermedad simplemente con la restricción de la cantidad de proteína en la dieta en lugar de comer una fórmula con Phe restringido, lo que resulta en una notable mejora en la calidad de vida del individuo, así como dando lugar a un mayor cumplimiento del paciente con la restricción en la dieta.

Cualquier aumento en la cantidad de los niveles dietéticos de Phe que pueden ser tolerados por el paciente como resultado del tratamiento se considera que es un resultado terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, se contempla que, como resultado de la administración de la terapia de la variante PAL procariota, el paciente será capaz de aumentar su ingesta de Phe dietética 250-350 mg/día a 350-400 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia de Phe del paciente se ve alterada de la de un paciente con PKU clásica a un paciente con PKU moderada). Por supuesto, sería deseable que la intervención terapéutica enseñada en el presente documento permitiera al paciente aumentar su ingesta de Phe dietética 250-350 mg/día a 400-600 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia de Phe del paciente se altera de la de un paciente PKU clásica a un paciente PKU leve), o en algunos casos, para permitir que el paciente tenga un consumo de más de 600 mg Phe/día (es decir, la ingesta dietética normal).

Características de pacientes de PKU que no responden a BH4 y métodos de tratamiento de los mismos

Un segundo grupo de pacientes que pueden ser tratados con las composiciones y métodos proporcionados en este documento son aquellos individuos que se han determinado que tienen una concentración de Phe en plasma elevada, es decir, cualquier concentración que es mayor que 200  $\mu\text{M}$ , pero que se han diagnosticado como no sensibles a la terapia con BH4 (como se determina por el ensayo de carga con BH4 descrito a continuación en este documento). Tales pacientes pueden incluir aquellos individuos que tienen niveles PKU (es decir, las concentraciones en plasma de fenilalanina de hasta 600  $\mu\text{M}$ ), las personas que tienen PKU moderada (es decir, las concentraciones plasmáticas de Phe de entre 600  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1200  $\mu\text{M}$ ), así como los pacientes que tienen PKU severa clásica (es decir, las concentraciones de plasma de fenilalanina que son mayores que 1200  $\mu\text{M}$ ).

A los pacientes que no son sensibles a la terapia BH4 se les puede dar la variante PAL en combinación con una cantidad reducida de proteína en su dieta con el fin de disminuir las concentraciones en plasma de Phe del paciente. La administración de la variante PAL procariota puede producir una mayor disminución de las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente en comparación con la disminución que se produce con el mismo protocolo dietético administrado en ausencia de la terapia de la variante PAL procariota. Las restricciones en la dieta pueden ser una dieta que restringe la ingesta de Phe, proporcionando una fórmula de proteína médica sintética que tiene una menor cantidad de Phe o alternativamente, la restricción en la dieta puede ser una que simplemente requiera que el paciente limite su ingesta de proteínas en general pero que, sin embargo, permita que el paciente coma los productos alimenticios normales en cantidades limitadas.

Los resultados terapéuticos para los pacientes tratados con PKU clásicos se incorporan en la presente sección por referencia. Por ejemplo, los resultados terapéuticos para pacientes con moderada PKU (es decir, pacientes que tienen una concentración de Phe en plasma sin restricciones de 600  $\mu\text{M}$  a 1200  $\mu\text{M}$ ) pueden incluir al menos una disminución del 25% en las concentraciones de Phe en plasma del paciente. El método producirá una disminución del 30% en la concentración de Phe en plasma. En otras realizaciones, el método producirá un 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o una mayor disminución en la concentración de Phe en plasma del individuo (por ejemplo, cuando un paciente con PKU moderada clásica tiene una concentración de Phe de 1000  $\mu\text{M}$ , una disminución del 90% en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe en plasma de 100  $\mu\text{M}$ , una concentración que es lo suficientemente baja para requerir poca o ninguna restricción en la dieta).

Las concentraciones de Phe en plasma del paciente con PKU moderada que está siendo tratado se pueden reducir desde cualquier cantidad de la concentración de Phe en plasma sin restricciones, que se encuentra entre 600  $\mu\text{M}$  a 1200  $\mu\text{M}$ , a cualquier nivel de Phe en plasma que sea menor que 300  $\mu\text{M}$ . En una realización, el tratamiento con la variante PAL procariota (ya sea sola o en combinación con una restricción en la dieta) produce una disminución en la concentración de Phe en plasma, por ejemplo, a un nivel de entre 200  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 400  $\mu\text{M}$ , lo que se considera como un resultado clínicamente útil de la terapia ya que los pacientes que tienen una concentración de Phe en plasma en este intervalo pueden controlar la enfermedad simplemente restringiendo la cantidad de proteína en la dieta en lugar de comer una fórmula de Phe restringida. De hecho, en muchos estudios, se enseña que estos pacientes pueden incluso comer una dieta normal.

Cualquier aumento en la cantidad de los niveles dietéticos de Phe que pueden ser tolerados por el paciente como resultado del tratamiento se considera que es un resultado terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, se contempla que, como resultado de la administración de la terapia de la variante PAL procariota (ya sea sola o en combinación con otra intervención terapéutica), el paciente será capaz de aumentar su ingesta de Phe dietética de 350-400 mg/día a 400-600 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia de Phe del paciente se ve alterado del de un paciente con PKU moderada a un paciente con PKU leve). Por supuesto, sería deseable que la intervención terapéutica enseñada en el presente documento permitiera al paciente aumentar su ingesta de Phe dietética de 350-400 mg/día para tener una ingesta mayor que 600 mg Phe/día (es decir, normal en la dieta consumo).

Un paciente que manifiesta solamente PKU moderada, es decir, que tiene una cantidad diaria de 400 a 600 mg de Phe ingesta/día, puede ser tratado utilizando las composiciones y los métodos proporcionados en este documento y puede beneficiarse de las terapias basadas en la variante PAL procariota, ya que es deseable producir una concentración plasmática de Phe normalizada que es lo más cercano a  $360 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ , cuando sea posible. Para tales pacientes, un resultado terapéutico ventajoso incluirá al menos una disminución del 25% en las concentraciones de Phe en plasma del paciente. En una realización, el método producirá una disminución del 30% en la concentración de Phe en plasma. En otra realización, el método producirá un 40%, 50%, 60%, o una mayor disminución en la concentración de Phe en plasma del individuo (por ejemplo, cuando un paciente con PKU leve tiene una concentración de Phe de 600  $\mu\text{M}$ , una disminución del 60% en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe en plasma de 360  $\mu\text{M}$ , es decir, una concentración aceptable y normal de Phe en plasma).

Las concentraciones de Phe en plasma del paciente con PKU leve que está siendo tratado se pueden reducir de cualquier cantidad de la concentración de Phe en plasma no restringido, que está entre 400  $\mu\text{M}$  y 600  $\mu\text{M}$ , a cualquier nivel de Phe en plasma que sea menor que 100  $\mu\text{M}$ . Por supuesto, incluso si el tratamiento con la variante PAL procariota (ya sea sola o en combinación con una restricción en la dieta) produce una disminución menor en la concentración de Phe en plasma, por ejemplo, a un nivel de entre 200  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 400  $\mu\text{M}$ , esto se considera como un resultado clínicamente útil de la terapia.

Se considerará como un resultado terapéuticamente eficaz cualquier aumento de la cantidad de los niveles de Phe de la dieta que pueda ser tolerado por el paciente como resultado del tratamiento. Por ejemplo, se contempla que, como resultado de la administración de la terapia de la variante PAL procariota (ya sea sola o en combinación con otra intervención terapéutica), el paciente será capaz de aumentar su ingesta de Phe dietética de 400-600 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia de Phe del paciente se ve alterado del de un paciente con PKU leve a un paciente con HPA leve) para permitir que el paciente tenga una ingesta de más de 600 mg Phe/día (es decir, la ingesta dietética normal).

Además, incluso si el paciente es uno que sólo manifiesta los síntomas de HPA no PKU, es decir, tiene una concentración de Phe plasmática elevada de hasta 600  $\mu\text{M}$ , pero que se le permite de otra forma comer una dieta normal de proteínas, se beneficiará de la terapia de la variante PAL procariota porque se ha demostrado que las concentraciones elevadas de Phe tienen efectos significativos en el IQ de tales individuos. Por otra parte, como veremos a continuación, la intervención terapéutica de la variante PAL procariota de los sujetos con necesidades especiales, por ejemplo, mujeres embarazadas y niños, es particularmente importante incluso si los niveles de Phe en plasma del paciente se encuentran dentro de un nivel "seguro" de percepción de menos de 200  $\mu\text{M}$ .

#### PKU materna y métodos de tratamiento de la misma

El control metabólico de los niveles plasmáticos de Phe en mujeres con PKU que planean una concepción y aquellas que están embarazadas es importante debido a las graves consecuencias para los fetos expuestos a elevados niveles de fenilalanina incluso moderadamente en el útero, independientemente del estado de HAP del feto. El control terapéutico de la concentración de Phe en plasma es especialmente importante en el primer trimestre del embarazo, como la falta de un control adecuado resultará en trastornos que incluyen microcefalia, deficiencia mental y enfermedad cardíaca congénita.

Por ejemplo, la Declaración de Consenso del NIH (vol. 17 N° 3, octubre de 2000) en la fenilcetonuria informó que la exposición del feto a niveles maternos de Phe de 3-10 mg/dL produjo una incidencia del 24% de microcefalia, mientras que personas expuestas a más de 20 mg/dL (es decir, más que 1200  $\mu\text{M}$ ) tenían una incidencia del 73% de microcefalia. Del mismo modo, fue encontrada cardiopatía congénita en más del 10% de los niños expuestos a niveles maternos de Phe que eran mayores que 20 mg/dL. Es importante destacar que se ha observado que los

5 niveles de Phe mayor que 6 mg/dL disminuyen significativamente el IQ del niño. Por lo tanto, es imperativo asegurar que la concentración de Phe en plasma de mujeres con todas las formas de fenilcetonuria, incluso las que se manifiestan con HPA más leve, debe ser estrictamente controlada con el fin de evitar el riesgo del síndrome de PKU materna. Sin embargo, los niveles objetivo aceptables para las concentraciones de Phe en plasma de mujeres con PKU que se han utilizado en clínicas de Estados Unidos han oscilado entre 10 mg/dL y 15 mg/dL, que son mucho más altos que los niveles de 2-6 mg/dL recomendados para mujeres embarazadas o los 1-4 mg/dL que se utilizan en las clínicas británicas y alemanas para disminuir los riesgos de desarrollar el síndrome de PKU materna.

10 Otra consideración importante para las mujeres embarazadas es su ingesta de proteínas en general. Durante el embarazo, es importante que las mujeres coman proteínas suficientes, ya que se ha sugerido que una dieta baja en proteínas durante el embarazo dará como resultado un desarrollo renal retardado y la posterior reducción en el número de nefronas y potencialmente lleva a la hipertensión en la edad adulta. (D'Agostino, N. Engl. J. Med. 348(17) 1723-1724, (2003)). La siguiente tabla proporciona directrices ejemplares para la ingesta de proteínas de la dieta total recomendada por varias personas.

Directrices de los Estados Unidos para las necesidades de proteínas en la dieta

	<b>Edad</b>	<b>Ingesta de proteínas recomendada total (g)</b>
Niños	6 meses o menos	13
	6 meses- 1 año	14
	1-3 años	16
Niños	(4-6 años)	24
	7-10 años	28
Hombres	11-14 años	45
	15-18 años	59
	19-24	58
	25-50	63
	51+	63
Mujeres	11-14 años	46
	15-18 años	44
	19-24	46
	25-50	50
	51+	50
Embarazadas		60
Lactantes		65

15 Como puede verse a partir de las directrices ejemplares anteriores, en los Estados Unidos, la ingesta de proteínas recomendada para mujeres en edad de procrear (por ejemplo, menos de 51) es de aproximadamente 44 a 50 g/día, mientras que las mujeres embarazadas requieren que se recomiende una ingesta de aproximadamente 60 g/día. En Canadá y el Reino Unido, la ingesta de proteínas recomendada para las mujeres embarazadas es del orden de aproximadamente 70 g/día y 52 g/día. Por lo tanto, la necesidad de garantizar que los niveles de concentración de Phe en plasma de mujeres embarazadas estén estrechamente controlados se complica más por el hecho de que este grupo de pacientes con PKU requiere más proteínas que las mujeres con PKU no embarazadas de edad comparable.

25 En vista de lo anterior, se contempla que las terapias de la variante PAT proporcionadas en este documento serán particularmente útiles en mujeres embarazadas. Se contempla que una mujer, que padece algún tipo de HPA que esté embarazada o que esté contemplando un embarazo, pueda ser embarcada en un curso de terapia con variante PAL procariota para asegurarse de que sus niveles de concentración plasmática de fenilalanina se mantengan tan

cerca de 180  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 360  $\mu\text{M}$ , cuando sea posible. Tal curso de terapia permitiría que la mujer aumente su nivel de ingesta de proteína normal.

La discusión de los niveles de concentraciones de fenilalanina en plasma y los grados en que tales concentraciones de fenilalanina deben disminuirse discutidos anteriormente en este documento se incorporan en la presente sección para mujeres embarazadas.

Control de PKU en niños y métodos de tratamiento de los mismos

Como se discute a lo largo del presente documento, se ha determinado que una elevación en la concentración de Phe plasmática en niños pequeños (edades de cero a 3 años de edad) se traduce en una disminución significativa en el coeficiente intelectual del niño. Sin embargo, como se ha discutido en otra parte de la memoria descriptiva, los pacientes que tienen elevadas concentraciones en plasma de fenilalanina en cualquier lugar de hasta 400  $\mu\text{M}$  normalmente no reciben ninguna intervención dietética. Por lo tanto, los niños en edad de cero a 3 años sufren efectos deletéreos significativos de las presentes terapias. La presente solicitud contempla el tratamiento de cualquier infante que tiene una concentración de Phe en plasma sin restricciones que es mayor que 360  $\mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$  con una composición terapéutica que comprende una variante PAL procariota a fin de producir una disminución beneficiosa de la concentración de Phe en plasma de ese sujeto.

El niño puede tener entre cero y 3 años de edad y tiene una concentración de Phe plasmática sin restricción de aproximadamente 1200  $\mu\text{M}$  antes de la administración de la variante PAL procariota de la invención y dicha administración disminuye la concentración plasmática de Phe. En una realización, la concentración de Phe en plasma se disminuye desde más de 1800 a aproximadamente 1500  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1200  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1100  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 900  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 800  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 700  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 600  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 550  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 450  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 400  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 350  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 300  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 275  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 250  $\mu\text{M}$  tras la administración. En otras realizaciones, el niño tiene entre cero y 3 años de edad y tiene una concentración de Phe en plasma sin restricciones de más de 1200  $\mu\text{M}$  y, esta concentración de Phe en plasma se reduce a aproximadamente 800  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ , o hasta aproximadamente 360  $\mu\text{M}$ , tras la administración de la variante PAL procariota, ya sea solo o en combinación con la dieta. Los expertos en la técnica entenderán que se contempla el tratamiento de niños con concentraciones plasmáticas de Phe sin restricciones de más de 360  $\mu\text{M}$  con la variante PAL procariota que producen disminuciones en dichas concentraciones de Phe en plasma. Además, cualquier disminución mayor del 10% de la concentración inicial de Phe en plasma sin restricciones se considerará un resultado terapéutico para los regímenes terapéuticos para los niños. Se debe entender que las terapias de la variante PAL procariota pueden combinarse con restricciones dietéticas que efectúan una disminución terapéutica en concentraciones plasmáticas de Phe en estos niños.

2. Otros usos terapéuticos

Diversas formas de cáncer y métodos de tratamiento de los mismos

También se discuten en este documento métodos de tratamiento de diversas formas de cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la variante PAL procariota a un sujeto. En un sentido amplio, el cáncer es un cáncer en el que la proliferación y/o supervivencia de las células derivadas del cáncer es sensible a la restricción de fenilalanina o al agotamiento. De forma específica, el cáncer es un cáncer de pulmón, cáncer de cerebro o del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de hígado, o melanoma metastásico. En otros casos, el cáncer es un cáncer de cabeza y de cuello, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblastoide aguda) o mieloma. En aún otros casos, el cáncer es un cáncer pediátrico o un cáncer resistente (es decir, un cáncer que se ha demostrado que es resistente a los agentes terapéuticos del cáncer o agentes terapéuticos dirigidos contra el cáncer).

De acuerdo con esto, se describe en este documento un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una variante PAL procariota y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la variante PAL procariota tiene una mayor actividad de fenilalanina y/o una menor inmunogenicidad en comparación con un PAL tipo salvaje, y es eficaz en la reducción de la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del sujeto en un intervalo por debajo del nivel de detección de entre aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\mu\text{M}$ , tal como menos de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , o menos de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y, opcionalmente, que comprende además administrar al sujeto una dieta pobre en proteínas (es decir, libre de fenilalanina).

Enfermedad de Parkinson y métodos de tratamiento de la misma

Una evaluación neuropatológica detallada de los cerebros de ratones  $\text{Pah}^{\text{enu}2}$ , un modelo para PKU, reveló un mayor número de microglia activada o macrófagos (células  $\text{CD11b}^+$ ), así como una mayor inmunoreactividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en dos regiones dopaminérgicas del cerebro, la sustancia negra (SN) y el hipotálamo (véase Embury et al, *Pediatr. Res.* 58: 283-287, 2005). Esta presencia de la infiltración de células  $\text{CD11}^+$  y

sobrerregulación de iNOS en el SN también se observa en la enfermedad de Parkinson (EP). Otra característica común de PD y HPA/PKU es la reducción de la dopamina en el cerebro, esta última se produce como resultado de que la Phe no sea convertida a tirosina (Tyr), que es un precursor de la L-Dopa, que a su vez es un precursor de la dopamina. Además, tanto PD como PKU están asociados con la pérdida o daño a neuronas dopaminérgicas y ambos PD y al menos los ratones Pah<sup>enu2</sup> muestran clínicamente una alteración en la función motora.

La presente invención describe métodos de tratamiento de PD que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la variante PAL procariota a un sujeto. La terapia de la variante PAL procariota puede estar en combinación con otras terapias que tratan EP, incluyendo, por ejemplo, neurotransmisores como el precursor de la dopamina, la L-dopa, que se sabe que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

Indicaciones de enfermedades, en las que la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de la variante PAL procariota sería beneficiosa, incluyen, pero no se limitan a, HPA, PKU, tirosinemia, cáncer y enfermedad de Parkinson. Rutas de administración estándar parenterales, orales u otras y de dosificación se pueden determinar usando métodos estándar.

## 2. Composiciones para uso en el tratamiento

También se describen en el presente documento intervenciones terapéuticas de PKU/HPA. Tal intervención se basa inicialmente en el uso de la variante PAL procariota, que puede ser utilizada sola o en combinación con restricciones dietéticas. Otras variantes PAL procariotas y/o restricciones dietéticas se pueden combinar además con otras composiciones terapéuticas que están diseñadas, por ejemplo, para combatir otras manifestaciones de PKU, tales como, por ejemplo, aminoácidos neutros grandes para prevenir la acumulación de Phe en el cerebro (véase Koch, et al., Mol. Genet. Metabol. 79: 110-113 (2003)) o la administración de suplementos de tirosina. La presente sección proporciona una discusión de las composiciones que se pueden utilizar en los tratamientos contemplados en este documento.

Composiciones de la variante PAL procariota, composiciones y formulaciones farmacéuticas

Se describen composiciones farmacéuticas en el presente documento, que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de una variante PAL procariota junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, vehículos diluyentes, estabilizantes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos. Tales composiciones farmacéuticas incluyen diluyentes de diversos contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimerosal, alcohol bencílico) y sustancias de aumento de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol); véase, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Edición (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.), páginas 1435:1712. Una cantidad eficaz del ingrediente activo es una cantidad terapéuticamente, profilácticamente o diagnósticamente eficaz, que puede ser determinada fácilmente por una persona experta en la técnica teniendo en cuenta factores tales como el peso corporal, la edad y el objetivo terapéutico.

A veces, la composición farmacéutica de la variante PAL procariota incluye un agente tampón para mantener el pH de la solución dentro de un intervalo deseado. Tales agentes tampón incluyen Tris-HCl, acetato de sodio, fosfato de sodio y citrato de sodio. También se pueden utilizar mezclas de estos agentes tampón. La cantidad del agente tampón útil en la composición depende en gran medida del tampón utilizado en particular y el pH de la solución. Por ejemplo, el acetato es un tampón más eficaz a pH 5 que a pH 6, de modo que se puede utilizar menos acetato en una solución a pH 5 que a pH 6. El agente tampón puede ser Tris-HCl. El intervalo de pH de las composiciones farmacéuticas puede ser de aproximadamente pH 6,0 a 8,0, tal como de aproximadamente pH 6,5 a 7,5 o aproximadamente de pH 7,0 a 7,6.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además un agente de ajuste de la isotonicidad para hacer la solución isotónica y más compatible para su inyección. El agente de isotonicidad de ajuste puede ser cloruro de sodio dentro de un intervalo de concentración de 100 a 200 mM, tal como de 120 a 170 mM o de 120 a 150 mM.

Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir estabilizadores, que son moléculas que estabilizan la composición de la variante PAL procariota proporcionada en este documento. El término "estabilizar" como se usa en el presente documento, se entiende que incluye, por ejemplo y sin limitación, el aumento de la vida útil de una enzima PAL procariota, la protección de la enzima PAL procariota de la digestión proteolítica, el mantenimiento de la enzima PAL procariota en una conformación activa y/o la preservación de la actividad de la enzima PAL procariota tras el almacenamiento a temperaturas elevadas. Por ejemplo, un estabilizador puede aumentar en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más (por ejemplo, aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces, o dentro de cualquier intervalo del mismo) el tiempo de conservación ( $T_{90}$ ) de una variante PAL procariota pegilada (por ejemplo, en comparación con una variante PAL procariota pegilada sin la presencia de un estabilizador), es decir, el tiempo en el que la actividad enzimática específica in vitro, determinada según el ensayo descrito en el ejemplo 3, se ha reducido en  $\geq 10\%$  a una

temperatura dada, por ejemplo, 4°C, 25°C, 37°C, 40°C o 42°C. La  $T_{90}$  puede ser entre 6 veces y 7 veces mayor a 4°C; entre 4 veces y 5 veces mayor a 25°C, entre 2 veces y 3 veces mayor a 37°C, entre 2 veces y 3 veces mayor a 42°C, o una combinación de las mismas. La variante PAL procariota pegilada es un mutante de cisteína doble pegilado AvPAL\_C565SC503S y el estabilizador puede ser Phe. Alternativamente, un estabilizador puede conservar la actividad enzimática de una variante PAL procariota pegilada durante el almacenamiento a temperaturas elevadas, es decir, la variante retiene al menos aproximadamente 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más, o dentro de cualquier intervalo del mismo, de su actividad enzimática específica in vitro, determinada según el ensayo que se describe en el Ejemplo 3, tras el almacenamiento a 25°C, 37°C o 40°C durante un período determinado de tiempo, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años, 5 años o más, o cualquier intervalo del mismo (por ejemplo, en comparación con una variante PAL procariota pegilada sin la presencia del estabilizador).

Los estabilizantes incluyen L-fenilalanina (Phe) y análogos estructurales de la misma, tales como el ácido trans-cinámico (t-CA), ácido benzoico, tirosina (Tyr) y similares. Se ha demostrado pérdida de actividad de una PAL de planta a partir de *Phaseolus vulgaris* (PvPAL) después de la retirada de su sustrato de L-fenilalanina después de la purificación por afinidad (Da Cunha, Eur. J. Biochem. 178: 243-248 (1988)) y se ha demostrado que un PAL de levadura de *Rhodosporidium toruloides* (RtPAL) protege de la inactivación de proteasa por tirosina (Wang, et al., Mol. Genet. Metab. 86:134-140 (2005); Pilbak, et al, FEBS J. 273: 1004-1019 (2006)). Como se muestra a continuación en el presente documento, Phe y algunos de sus análogos estructurales tienen la capacidad de estabilizar los conjugados de PEG:PAL de un PAL procariota a partir de AvPAL (véase el Ejemplo 11). Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se planteó la hipótesis de que la enzima PAL procariota es más estable como un complejo enzima-sustrato, en el que el sustrato unido Phe se convierte en el producto t-CA o a un análogo del estado de transición de t-CA. El t-CA permanece unido a la otra forma del centro del sitio activo altamente reactivo (grupo MIO), lo que estabiliza la enzima PAL procariota. En consecuencia, se puede utilizar como estabilizadores el sustrato de la enzima PAL procariota, Phe, producto, t-CA, o análogos estructurales de los mismos.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una variante PAL procariota y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. El estabilizador puede ser Phe o un análogo estructural del mismo. El estabilizador puede ser seleccionado del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico. Un intervalo ejemplar para los estabilizadores es de aproximadamente 0,1 a 20 moles del estabilizador por mol del sitio activo del PAL procariota, tal como de aproximadamente 0,5 a 10 moles de estabilizador por mol del sitio activo del PAL procariota, o de aproximadamente 1 a 10 moles del estabilizador por mol del sitio activo del PAL procariota.

La composición farmacéutica comprende una variante procariota PAL y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la variante PAL procariota tiene una mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o una menor inmunogenicidad en comparación con el PAL tipo salvaje, y en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. El estabilizador puede ser Phe o un análogo estructural del mismo. Específicamente, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico.

La composición farmacéutica puede comprender una variante PAL procariota y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la variante PAL procariota es una variante AvPAL, en la que los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina, la variante AvPAL comprende además un polímero soluble en agua de polietilenglicol, en donde la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1:3, y en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un estabilizador. El estabilizador puede ser Phe o un análogo estructural del mismo. Específicamente, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en L-fenilalanina, ácido trans-cinámico y ácido benzoico.

Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir conservantes, por ejemplo, agentes antimicrobianos, que son sustancias que terminan o previenen el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos o protozoos, además de destruir los virus. Los agentes antimicrobianos pueden o bien matar a los microbios (microbicidas) o prevenir su crecimiento (microbiostática). Los conservantes son útiles, por ejemplo y sin limitación, para la protección de la enzima PAL procariota de la contaminación microbiana, lo que aumenta la vida útil de una enzima PAL procariota, el mantenimiento de la enzima PAL procariota en una conformación activa y la preservación de la actividad de la enzima PAL procariota tras el almacenamiento a temperaturas elevadas.

Los conservantes proporcionados en este documento pueden incluir el fenol y análogos estructurales del mismo, tales como m-cresol y similares. Un intervalo ejemplar de concentraciones para los conservantes, por ejemplo, m-cresol, es de aproximadamente 0,1% a 1% (p/v). El intervalo para m-cresol puede ser de aproximadamente 0,1% a 0,5% (p/v). Específicamente, el intervalo de para m-cresol es de aproximadamente 0,3% a 0,5% (p/v).

Los estabilizadores proporcionados en este documento, cuando se utilizan solos o en combinación con un conservante, incluyen Phe y análogos estructurales del mismo y Gly y análogos estructurales del mismo. Un intervalo ejemplar de las concentraciones de estabilizadores, por ejemplo, Phe, es de aproximadamente 0,1 a 10 mM. El intervalo de Phe puede ser de aproximadamente 0,5 a 5 mM. Específicamente, el intervalo de Phe es de aproximadamente 0,5 a 1,5 mM. Un intervalo ejemplar de las concentraciones para estabilizadores, por ejemplo,

Gly, es de aproximadamente 0,1 a 100 mM. Preferiblemente, el intervalo para Gly es de aproximadamente 1 a 100 mM. En un ejemplo, el intervalo para Gly es de aproximadamente 1 a 20 mM. En otros ejemplos, el intervalo para Gly es de aproximadamente 20 a 100 mM.

5 La composición farmacéutica puede comprender una variante PAL procariota y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la variante PAL procariota tiene una mayor actividad de conversión de fenilalanina y/o una menor inmunogenicidad en comparación con un PAL tipo salvaje, y en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende al menos dos estabilizadores y, opcionalmente, un conservante (es decir, un agente antimicrobiano). En algunas realizaciones, los al menos dos estabilizadores son Phe o un análogo estructural del mismo y Gly o un análogo estructural del mismo, o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, los  
10 estabilizadores son Phe y Gly. En algunos ejemplos, el conservante es m-cresol o un análogo estructural del mismo. Específicamente, los estabilizadores son Phe y Gly y el conservante es m-cresol.

15 La composición farmacéutica o formulación puede comprender una variante AvPAL pegilada y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la relación de la variante AvPAL y polietilenglicol es de aproximadamente 1:3 (AvPAL:PEG 1:3), y los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de la variante AvPAL han sido sustituidos por restos de serina, y en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende al menos dos estabilizadores y, opcionalmente, un conservante (es decir, un agente antimicrobiano). En algunos casos, los al menos dos estabilizadores son Phe o un análogo estructural del mismo y Gly o un análogo estructural del mismo, o cualquier combinación de los mismos. Específicamente, los estabilizadores son Phe y Gly. El conservante puede ser m-cresol o un análogo estructural del mismo. Específicamente, los estabilizadores son Phe y Gly y el conservante es m-  
20 cresol.

Como se usa en este documento, y cuando se contemplan variantes PAL procariotas, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad, lo que da una disminución de L-fenilalanina en la sangre, el plasma o el suero que proporciona beneficios para un paciente. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de un número de factores, incluyendo la condición física general del estado del paciente, la dieta y la  
25 enfermedad. La cantidad de la variante PAL procariota utilizada para la terapia da una disminución aceptable de los niveles de L-fenilalanina en sangre, plasma o suero, y mantiene este valor durante el tratamiento de la variante PAL procariota a un nivel beneficioso (por lo general al menos aproximadamente 30% y típicamente en un intervalo de 10% a 50%). Una cantidad terapéuticamente eficaz de las presentes composiciones se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica utilizando materiales y procedimientos disponibles para el público.

30 Las variantes PAL procariotas, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se pueden administrar con menos frecuencia que la PAL nativa. La frecuencia de dosificación variará dependiendo de la condición a tratar, pero en general será de aproximadamente una vez por semana. Se entiende que las frecuencias de dosificación realmente utilizadas pueden variar algo de las frecuencias descritas en este documento debido a variaciones en las respuestas de individuos diferentes a las de las variantes del PAL procariota; el término "aproximadamente" pretende reflejar  
35 dichas variaciones. Se contempla que las variantes PAL procariotas 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 tiempo que aproximadamente una vez por mes.

Las composiciones y métodos descritos en este documento pueden utilizarse para reducir los niveles de L-fenilalanina en sangre, plasma o séricos. Como se discutió anteriormente, más comúnmente, los niveles séricos de L-fenilalanina se incrementan debido a la HPA. Entre las condiciones que pueden tratarse mediante las  
40 composiciones y métodos proporcionados en este documento incluyen HPA asociada con PKU. También se pueden tratar las condiciones que pueden conducir a aumentar los niveles séricos de L-tirosina tal como se encuentra en la tirosinemia. Numerosas enfermedades relacionadas con el cáncer, donde el agotamiento de los niveles de L-fenilalanina en sangre, plasma o séricos sería beneficioso, pueden ser tratadas con las composiciones  
45 farmacéuticas de la variante PAL procariota y métodos proporcionados en este documento.

Las composiciones farmacéuticas de la variante PAL procariota proporcionadas en este documento son administradas mediante inyección parenteral, ya sea por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraarterial o intratecal. Sin embargo, sería evidente para un experto en la técnica que también se podrían utilizar eficazmente otras vías de administración.

50 Los métodos descritos en el presente documento utilizan composiciones farmacéuticas de las variantes PAL procariotas que comprenden las moléculas descritas anteriormente, junto con un excipiente o más farmacéuticamente aceptable, vehículos, diluyentes, estabilizantes, conservantes (por ejemplo, agentes antimicrobianos), solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. Tales excipientes incluyen líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, ciclodextrinas, ciclodextrinas modificadas (es decir, ciclodextrinas de sufobutil-éter), etc. Los excipientes adecuados para formulaciones no líquidas también son conocidos por los  
55 expertos en la técnica.

Las sales farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en las composiciones incluyen, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclocloruros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos

orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una discusión completa de excipientes y sales farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990).

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

10 Dependiendo del modo de administración pretendido, las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de formas de dosificación sólidas, semi-sólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, cremas, ungüentos, lociones o similares, tales como en forma de dosificación unitaria adecuada para la administración única de una dosis precisa. Las composiciones pueden incluir una cantidad terapéuticamente efectiva de la variante PAL procariota en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir opcionalmente otros agentes farmacéuticos, adyuvantes, diluyentes, tampones, etc.

En general, las composiciones farmacéuticas de la variante PAL procariota proporcionadas en este documento serán administradas como formulaciones farmacéuticas, incluyendo aquellas adecuadas para la administración oral (incluyendo bucal y sub-lingual), administración rectal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para la administración por inhalación o insuflación. Las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por vía intravenosa, utilizando un régimen de dosificación diario conveniente, que puede ser ajustado de acuerdo con el grado de afección.

Para las composiciones sólidas, los vehículos sólidos no tóxicos convencionales incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, 25 sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables pueden, por ejemplo, prepararse disolviendo, dispersando, etc., una composición de la variante PAL procariótica tal como se describe en la presente memoria y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un excipiente, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar de este modo una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener cantidades menores 30 de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, agentes tonificantes, y similares; por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, acetato de sodio trietanolamina, oleato de trietanolamina, etc. Los métodos actuales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington Pharmaceutical Sciences, referidos anteriormente.

35 Para la administración oral, la composición tendrá generalmente 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 pueden usarse como formas de administración oral. Los comprimidos y las cápsulas para uso oral incluirán generalmente uno o más vehículos comúnmente utilizados tales como lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Cuando se utilizan suspensiones 40 líquidas, el agente activo se puede combinar con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir también aromatizantes, colorantes y/o agentes edulcorantes. Otros componentes opcionales para su incorporación en una formulación oral en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, conservantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y similares.

Las formulaciones parenterales se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o 45 suspensiones líquidas, formas sólidas o liofilizadas adecuadas para la reconstitución, la solubilización o la suspensión en líquidos antes de la inyección, o como emulsiones. Las suspensiones inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica utilizando vehículos adecuados, agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión. La formulación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en un diluyente no tóxico parenteralmente aceptable o disolvente. Entre los vehículos y 50 disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles, ésteres grasos o polioles como disolventes o medios de suspensión. Además, la administración parenteral puede implicar el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida de tal manera que se mantenga un nivel constante de dosificación.

Las composiciones de la variante PAL procariota descritas en este documento pueden administrarse a un paciente 55 en dosis terapéuticamente eficaces para tratar una variedad de enfermedades, incluyendo la hiperfenilalaninemia, incluyendo la fenilcetonuria, y otros trastornos, incluyendo el cáncer. La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales composiciones de la variante PAL procariota se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, tales como, por ejemplo, mediante la determinación de la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La 60 relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la

relación LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Pueden ser utilizadas composiciones de la variante PAL procariota que exhiben grandes índices terapéuticos.

5 Pueden usarse los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios con animales para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede estar dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o mínima toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La dosis terapéuticamente eficaz o cantidad se puede determinar a partir de ensayos de cultivos celulares, y a partir de modelos con animales.

#### Proteína dietética

10 Además de la administración de composiciones de la variante PAL procariota a pacientes HPA/PKU, también se puede restringir o modificar la proteína de la dieta de los pacientes. Los expertos en la técnica son conscientes de las diversas fórmulas de proteína disponibles en el mercado para su uso en el tratamiento de PKU. Tales fórmulas incluyen MAXIMAID, PHENEX 1, PHENEX 2 (Ross Laboratories, Liverpool, Reino Unido), LOFENALAC, FENIL-FREE (Mead-Johnson) y similares.

15 Los expertos en la técnica pueden usar las fórmulas de proteína de referencia, que están en general libres de las concentraciones de Phe. A menudo se complementan fórmulas de proteína con aminoácidos que son deficientes en pacientes con PKU. Tales aminoácidos incluyen, por ejemplo, L-tirosina y L-glutamina. Se ha sugerido que puede ser deseable complementar la dieta de los pacientes de PKU con valina, isoleucina y leucina (véase, la Patente de EE.UU. No. 4.252.822). En ciertas manifestaciones clínicas, los efectos tóxicos de PKU son causados por el bloqueo de la captación cerebral de Phe de otros aminoácidos tales como tirosina y triptófano. Se ha encontrado que la suplementación de la dieta de un paciente con PKU con exceso de tales aminoácidos neutros grandes bloquea la absorción de Phe en el cerebro y reduce los niveles de Phe en el cerebro. Por lo tanto, se contempla que para los métodos proporcionados en este documento, el régimen dietético puede además ser complementado con composiciones que comprenden uno o más de estos aminoácidos (Koch, et al., Mol. Genet. Metabol. 79:110-113 (2003)).

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

30 Además, los expertos en la técnica hacen referencia a la Academia Nacional de las Ciencias 2000-Ingestas Dietéticas de Referencia del Consejo Nacional de Investigación para obtener una lista adicional de otros componentes, tales como vitaminas y minerales esenciales que deben suministrarse al paciente para asegurar que otros suplementos sean ofrecidos a pesar de la restricción de las proteínas en la dieta.

35 Haciendo referencia a la discusión anterior con respecto a las cantidades de la proteína total y las concentraciones plasmáticas de Phe deseable, un experto en la técnica será capaz de determinar la cantidad de proteínas de la dieta de restricción que se requiere y por lo tanto ajustar la dieta del paciente en consecuencia. Tomando por ejemplo, un varón de aproximadamente 11 a 14 años de edad, esa persona debe recibir 45 g de proteína/día. En el caso de que el individuo sea uno que tiene PKU grave clásica, su concentración de Phe en plasma sin restricciones es probable que sea mayor que 1200 µM, y la mayoría, si no todas las fuentes de proteínas de la dieta para ese individuo, es probable que sean un suplemento de proteínas en polvo, lo que puede disminuir sus concentraciones en plasma de fenilalanina a menos de 600 µM. Mediante la administración de la variante PAL procariota a ese sujeto, un resultado terapéutico sería uno que produciría una mayor disminución en las concentraciones de Phe en plasma del paciente o, alternativamente, el resultado terapéutico sería uno en el que las concentraciones de fenilalanina en plasma del individuo reducidas a un grado similar, pero que el individuo sea capaz de tolerar las proteínas de una dieta normal en lugar de partir de una fórmula dietética.

40 Del mismo modo, para un varón de aproximadamente 11 a 14 años de edad que tiene PKU moderada, puede ser posible utilizar los métodos proporcionados en este documento para darle 45 g de proteína/día asignado a través de un producto de la proteína normal en lugar de una fórmula restringida. La determinación de si los métodos proporcionados en este documento son eficaces implicará la determinación de las concentraciones en plasma de fenilalanina del paciente sobre una base regular para asegurarse de que las concentraciones de fenilalanina en plasma permanecen por debajo de al menos 400 µM. Las pruebas para la determinación de tales concentraciones se describen a continuación. Se pueden alcanzar concentraciones de menos de o aproximadamente de 360 µM.

#### 3. Identificación y seguimiento de las poblaciones de pacientes

55 Como se discute en este documento, puede ser necesario determinar si un determinado paciente es sensible a la terapia de la variante PAL procariota, y determinar las concentraciones de fenilalanina del paciente tanto inicialmente, para identificar la clase de paciente PKU que está siendo tratado, como durante un régimen terapéutico en curso para supervisar la eficacia del régimen. Tales métodos de ejemplo se describen a continuación.

#### Prueba de carga de BH4

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

5 La prueba de carga de BH4 más simple es una en la que se administra BH4 exógeno y los efectos de la administración sobre la reducción de las concentraciones plasmáticas de Phe se determinan. La carga intravenosa de 2 mg/kg de BH4 fue propuesta inicialmente por Danks, et al., *Lancet* 1: 1236 (1976), ya que el BH4 de mayor pureza se ha vuelto disponible, se hace posible llevar a cabo la prueba usando una administración oral de BH4 en cantidades de aproximadamente 2,5 mg/kg de peso corporal.

10 En última instancia, fue propuesto un enfoque estandarizado por Niederwieser et al. en el que se administra una dosis de 7,5 mg/kg oral única de BH4 (Niederwieser, et al., *Eur. J. Pediatr.* 138: 441 (1982)), aunque algunos laboratorios no utilizan todavía más de 20 mg de BH4/kg de peso corporal.

15 Para que el simple análisis de carga de BH4 produzca resultados fiables, los niveles en sangre de Phe del paciente tienen que ser más altos que 400 µM. Por lo tanto, a menudo es habitual que al paciente le sea retirada la dieta PKU durante 2 días antes de realizar la prueba de carga. Está disponible un kit de ensayo BH4 que es distribuido por el Dr. Schircks Laboratories (Jona, Suiza). Este kit recomienda una dosis de 20 mg de BH4/kg de peso corporal aproximadamente 30 minutos después de la ingesta de una comida normal.

#### Determinación de concentraciones de Phe

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

25 El método más popular para determinar las concentraciones de Phe es la prueba de Guthrie, en la que se perforan discos de papel de filtro que han sido saturados con una muestra de sangre del paciente. Los discos uniformes se incuban en una bandeja de agar que se ha sembrado con *Bacillus subtilis* y que contiene un inhibidor específico del crecimiento de *Bacillus subtilis*. Cuando se transfiere la fenilalanina de los discos uniformes sobre el agar, la Phe invierte la inhibición del crecimiento bacteriano produciendo de ese modo un área de crecimiento de las bacterias que se puede correlacionar con la concentración de fenilalanina en comparación con ensayos similares realizados usando discos que contienen cantidades conocidas de Phe.

30 Otros métodos para cuantificar la concentración de Phe incluyen HPLC, espectrometría de masas, cromatografía en capa fina y similares. Tales métodos se pueden utilizar para determinar la concentración de Phe en plasma de un paciente antes de la terapia y para monitorear la concentración de Phe durante el régimen terapéutico para determinar la eficacia de la misma.

35 Se contempla que los niveles de Phe en plasma de los pacientes serán monitorizados a intervalos convenientes (por ejemplo, a diario, cada dos días o semanalmente) en todo el curso de tiempo del régimen terapéutico. Mediante el control de los niveles plasmáticos de Phe con dicha regularidad, el médico será capaz de evaluar la eficacia del tratamiento y ajustar la variante PAL procariota y/o las necesidades de las proteínas en la dieta como consecuencia de esto.

#### 40 4. Terapia de combinación

La variante PAL procariota y la restricción de proteínas de la dieta se pueden utilizar en combinación para efectuar un resultado terapéutico en pacientes con diversas formas de HPA. Para lograr el resultado terapéutico apropiado en las terapias de combinación contempladas en el presente documento, se administraría generalmente al sujeto la composición de la variante PAL procariota y la restricción de la dieta en una cantidad combinada eficaz para producir el resultado terapéutico deseado (es decir, una disminución de la concentración de Phe en plasma y/o la capacidad de tolerar mayores cantidades de aporte de Phe/proteína sin producir un aumento concomitante de las concentraciones plasmáticas de Phe). Este proceso puede implicar la administración de la composición de la variante PAL procariota y la composición terapéutica de las proteínas en la dieta al mismo tiempo. Esto se puede lograr mediante la administración de una sola composición o una formulación de proteína farmacológica que incluya todas las necesidades de proteínas en la dieta y que también incluya la variante PAL procariota dentro de dicha formulación de proteína. Alternativamente, la proteína de la dieta (el suplemento o una comida normal de proteínas) se toma aproximadamente al mismo tiempo como una formulación farmacológica (comprimido, inyección o bebida) de la variante PAL procariota. La variante PAL procariota también se puede formular en una barra de proteínas u otro producto alimenticio, como brownies, tortas, pasteles, adecuadas para su ingestión.

55 En otras alternativas, el tratamiento de la variante PAL procariota puede preceder o seguir a la terapia de proteínas de la dieta por intervalos que van de minutos a horas. Cuando la proteína y las composiciones de la variante PAL

- procariota se administran por separado, en general, se asegurará que el período de tiempo significativo no expire entre el tiempo de cada entrega, de tal manera que la variante PAL procariota todavía sea capaz de ejercer un efecto ventajoso en el paciente. En tales casos, se contempla que se deba administrar la variante PAL procariota entre aproximadamente 2-6 horas (antes o después) de la ingesta de proteínas de la dieta, con un tiempo de retraso de sólo aproximadamente 1 hora. La terapia de la variante PAL procariota puede ser una terapia continua, cuando se administre una dosis diaria de la variante PAL procariota para el paciente de forma indefinida. En otras situaciones, por ejemplo, en las mujeres embarazadas que tienen sólo las formas más leves de PKU y HPA, puede ser que la terapia de la variante PAL procariota solamente sea continúa durante el tiempo que la mujer esté embarazada y/o dando de mamar.
- 5
- 10 También, además de las terapias basadas solamente en la administración de la variante PAL procariota y la regulación de proteínas de la dieta, los métodos proporcionados en este documento también contemplan la terapia de combinación con una tercera composición que se dirige específicamente a uno o más de los síntomas de HPA. Por ejemplo, se sabe que el déficit de tirosina causado por HPA da como resultados una deficiencia de los neurotransmisores dopamina y serotonina. Por lo tanto, se contempla que la variante PAL procariota y los métodos basados en la ingesta de proteína en la dieta podrían combinarse adicionalmente con la administración de los neurotransmisores L-dopa, carbidopa y 5-hidroxitriptófano para corregir los defectos que resultan de la disminución de cantidades de tirosina en la dieta.
- 15

Como la administración de la variante PAL procariota no generaría tirosina (a diferencia de la administración de PAH), tal tratamiento todavía dará lugar a la tirosina que es un aminoácido esencial para tales pacientes. Por lo tanto, la suplementación dietética con tirosina puede ser deseable para pacientes que reciben la variante PAL procariota en combinación con la terapia de BH4.

20

#### E. Producción de variantes PAL procariotas

También se describe en este documento un método de producción de PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, una variante mutante o un análogo del mismo. En un ejemplo, PAL procariota recombinante o su fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo se sobreexpresa, con o sin un marcador N-terminal (por ejemplo, octahistidil-marcador), en un vector, tal como pIBXI (Su, et al., Appl. Environ. Microbiol. 62: 2723-2734 (1996)) o pET28a (Invitrogen) con un promotor inducible tal como con IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido), en BLR(DE3)/pLysS de células de E. coli (Novagen) o BL21(DE3)/pLysS de E. coli (Invitrogen). El cultivo de siembra para un biorreactor/fermentador se cultiva a partir de un stock de glicerol en matraces de agitación. Tal cultivo de siembra se usa entonces para dosificar en un biorreactor controlado en el modo de alimentación por lotes. La glucosa se complementa y el pH se controla con base (NH<sub>4</sub>OH) y con agitación hasta 1200 rpm. La alimentación de O<sub>2</sub> mantiene el oxígeno disuelto a más del 20%. Las células se cultivan a una temperatura de 37°C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 70-100 (~22-25 h) y después se inducen con IPTG 0,4 mM. La temperatura se reduce a 30°C y se hace crecer hasta que el cambio de actividad sea <0,1 UI/ml (aproximadamente 40-48 horas y una OD<sub>600</sub> típicamente de 200). Los medios de cultivo celulares se definen típicamente y están compuestos de proteína de extracto de levadura, peptona-triptona, glucosa, glicerol, casaminoácidos, sales traza y sales de tamponamiento de fosfato. El producto PAL procariota recombinante o el fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo se produce intra-celularmente y no se secreta. Las bacterias se cosechan por centrifugación continua (Alfa-Laval, Carr, Cepa o equivalente). Otras variaciones de este protocolo a modo de ejemplo serán evidentes para los expertos en la técnica.

25

30

35

40

#### F. Purificación de variantes PAL procariotas

Se proporciona en este documento un método para purificar PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo. De acuerdo con un ejemplo, se cultiva una masa celular transformada y se rompe dejando la enzima recombinante cruda. Los materiales exógenos normalmente se separan de la masa cruda para evitar la contaminación de las columnas. La purificación cromatográfica se lleva a cabo utilizando una o varias resinas cromatográficas. Posteriormente, la proteína purificada se formula en un tampón diseñado para proporcionar una actividad estable durante un período prolongado de tiempo. En otra realización, el método para purificar el PAL procariota o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo comprende: (a) la lisis de las bacterias que contienen PAL procariota recombinante o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o análogo del mismo usando un homogeneizador de presión (pero potencialmente por otros medios físicos tales como la lisis de perlas de vidrio); (b) tratamiento térmico; (c) la clarificación de este lisado utilizando un segundo paso continuo de centrifugación y/o filtración en profundidad (como con filtros Cuono Zeta Plus o Maximizer, Pall Filtron, o Millipore Millistak o Optica); (d) paso a través de una etapa de filtración de carbón vegetal (como con Millipore Millistak 40AC); (e) el paso a través de una etapa de filtración de profundidad intermedia (como con uno o más filtros de profundidad, por ejemplo, filtros Pall EKSP, Pall KS50P y/o Pall EKMP), seguido de una etapa de filtración final (como con un filtro Sartopore Sartorius o Pall EDF 0,2 µm); (f) paso sobre una cromatografía de interacción hidrofóbica de butilo (como en Toyopearl Butyl 650M de Tosoh Biosciences); (g) paso sobre una columna de intercambio iónico Q (como en un Macrorep High Q de BioRad); y (h) recuperación del producto final, opcionalmente por intercambio de tampón con filtración de flujo tangencial (como con una membrana Hydrosart Sartorius o PES 30 kDa). Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que una o más de las etapas de cromatografía o de las etapas de filtración se puede omitir o sustituir, o que el orden de las etapas de cromatografía

45

50

55

60

o de las etapas de filtración se puede cambiar. Por último, se pueden realizar medidas de esterilización adecuadas cuando se desee.

Habiendo ahora descrito en general la invención, la misma se puede entender más fácilmente a través de la siguiente referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero deberían, por supuesto, ser permitidos algunos errores y desviaciones experimentales.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

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

#### Manipulaciones de ADN

Se adquirió ADN genómico de *N. punctiforme* de ATCC (29133D) y el gen PAL (ZP\_00105927) se amplificó por PCR a partir de los cebadores 5'-CACTGTCATATGAATATAACATCTCTACAACAGAACAT-3' (SEQ ID NO: 12) y 5'-GACAGTGGCGGCCGCTCACGTTGACTTTAAGCTCGAAAAAATATG-3' (SEQ ID NO: 13). El producto de la PCR  
15 resultante se digirió con NdeI y NotI y el fragmento de 1,7 kb se ligó en pET-28a(+) y pET-30a(+) (Novagen) para N-His marcado y sin marcar, respectivamente.

Se adquirieron células de *A. variabilis* de ATCC (29413). Se extrajo el ADN genómico (Qiagen) y el gen PAL (YP\_324488) se amplificó mediante SOE-PCR para eliminar un sitio NheI. El cebador 1 (5'-CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAAG-3') (SEQ ID NO: 14) y el cebador 2 (5'-GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO: 15) se utilizaron para  
20 amplificar los nucleótidos 1-1190 y el cebador 3 (5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO: 16) y el cebador 4 (5'-CACTGTGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO: 17) se utilizaron para amplificar los nucleótidos 1142-1771. Estos dos productos de la PCR se combinaron para amplificar el gen de longitud completa  
25 con los cebadores 1 y 4. El producto de la PCR resultante se digirió con NheI, extremos romos con Klenow (NEB), a continuación, digeridos con NotI. El fragmento de 1,7 kb se ligó en pET-28a(+) y pET-30a(+) (Novagen). Este plásmido se denominó 3p86-23.

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

30 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para PAL de *N. punctiforme* (NpPAL), células *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) se transformaron con pGro7 (TaKaRa) y fueron preparados BL21(DE3)pGro7 competentes por el método de Inoue (Sambrook y 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  
35 kanamicina y 20 mg/L de cloranfenicol durante la noche a 37°C. Se sembraron veinte mililitros 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 OD<sub>600</sub> de 0,6, el cultivo se enfrió en hielo. Después de 5 minutos, el cultivo se indujo con IPTG 0,3 mM y se cultivó durante 16 horas a 20°C. Las células se recogieron por centrifugación.

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

Se introdujo AvPAL clonado en el vector pIBX7 (véase el Ejemplo 7) por transformación en células BLR(DE3)/pLysS (Novagen) y se cultivaron en 25 mL de LB con 50 mg/L de kanamicina durante la noche a 37°C. Veinte mililitros de este cultivo se sembraron en 1 L de medio LB con kanamicina, y se cultivaron a 37°C. A una OD<sub>600</sub> de 0,6, el cultivo se enfrió en hielo. Después de 5 minutos, el cultivo se indujo con IPTG 0,3 mM y se cultivó durante 16 horas a 30°C.  
45 Las células se recogieron por centrifugación.

### Ejemplo 2

#### Purificación de NpPAL y AvPAL

Los cultivos se centrifugaron en una centrífuga de sobremesa a 5000 g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Los sedimentos celulares se congelaron típicamente a -70°C antes de otro procesamiento. Tras la  
50 descongelación, los sedimentos de células se suspendieron a aproximadamente 80 unidades de densidad óptica (600 nm) en TBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,8). Las células se lisaron mediante dos pases a través de un homogeneizador de presión APV a 12-14.000 psi. El lisado bruto se trató térmicamente a continuación a 55°C durante 2 horas. El lisado se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se retuvo y se filtró con un filtro de 0,2 µm al vacío (Corning).

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

### Ejemplo 3

#### 5 Generación de variantes PAL pegiladas

Se describe a continuación un método para la pegilación de PAL de *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL). Métodos similares se utilizan para la pegilación de PAL procariota (por ejemplo, NpPAL o AvPAL) como se describen en el Ejemplo 6.

#### Pegilación de proteínas

10 La pegilación utiliza modificaciones de procedimientos de la bibliografía (Hershfield, et al., (1991), *ibid.*; Patente de EE.UU. nº 6.057.292; Lu, et al., *Biochemistry* 40 (44): 13288-13301 (2001); Catálogo Nektar Therapeutics, 2003). Los PEG activados incluyen tanto succinatos de PEG succinimidilo lineales (MPEG-SPA, PM 5 kDa o 20 kDa) y las hidrosuccinimidias de PEG ramificado (éster de mPEG<sub>2</sub>-NHS, PM 10 kDa o 40 kDa), que son ambas terminadas en un extremo con un grupo metoxi y que están disponibles en Nektar Therapeutics; se requiere normalmente la  
15 determinación experimental de proteínas pegiladas óptimas (Veronese, et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12: 196-207 (1997)). Se determinan las condiciones de pegilación óptimas usando diferentes proporciones de PAL:PEG (teniendo en cuenta la relación molar de la proteína junto con el número de lisinas por monómero de proteína), diferentes pH, diferentes tampones, diferentes temperaturas y tiempos de incubación. Son necesarias relaciones de derivatización altas de proteína PAL:PEG ya que PAL nativo tiene un gran número de lisinas (29 y 18 por monómero  
20 de *Rhodospiridium toruloides* (RT) y *Anabaena variabilis*, respectivamente) y porque PAL no modificado muestra inmunoreactividad después de la inyección repetida en ratones y ya que PAL sin modificar (de tipo salvaje) se inactiva rápidamente tras la exposición a proteasas. Las reacciones de pegilación se detienen por congelación a -20°C, y las muestras se analizan por SDS-PAGE, espectroscopia de masas MALDI-TOF, evaluación de la actividad, sensibilidad proteolítica e inmunoreactividad.

25 Antes de la actividad, la proteólisis y la evaluación inmune, y con el fin de eliminar el exceso de PEG sin reaccionar, las reacciones se dializan frente a pH 8,5, tampón fosfato de potasio 0,05 M durante la noche a 4°C con agitación usando Tube-O-dializadores (GenoTechnology). Después de que la concentración de la proteína se determina usando el kit de ensayo de proteínas NI (GenoTechnology), se realizan mediciones de la actividad PAL en muestras PAL derivatizadas con PEG y no derivatizadas usando condiciones de reacción estándar, como se describe  
30 anteriormente. Tras la caracterización *in vitro*, se llevan a cabo ensayos *in vivo* con los candidatos terapéuticos pegilados más prometedores utilizando el modelo de ratón PKU.

#### Caracterización

35 La concentración de proteína se determina mediante el coeficiente de extinción de PAL (0,5 y 0,75 mg ml<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para RtPAL y AvPAL, respectivamente) a 280 nm para muestras de proteínas no modificadas y para las muestras de proteína pegilada se calcula la concentración usando la proteína de ensayo NI (GenoTechnology) que incluye el procesamiento de la muestra para eliminar los contaminantes no proteicos que podrían interferir con la determinación de la concentración de proteína precisa.

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

45 Los productos PEG-PAL se caracterizan por técnicas de mapeo de péptidos para determinar la pegilación específica de sitio (LC/ESI-MSD) y trinitrobenzeno sulfonato (TNBS) para determinar la titulación de la amina libre antes y después de la pegilación. El mapeo de péptidos determina la ocupación relativa de la pegilación en la mayoría de los péptidos tripticos que terminan con lisina, sin embargo, debido al tamaño y a los múltiples péptidos tripticos de lisina adyacentes, no todos los sitios son visibles usando esta técnica. El ensayo TNBS define con mayor precisión el número medio de moléculas de PEG por mol de enzima, pero no da ninguna información acerca de qué sitios  
50 consiguen pegilarse. Por esta razón, se utilizan ambos ensayos y son complementarios entre sí. Los cálculos aproximados de tanto por ciento de derivatización de los productos de PAL por PEG se pueden determinar por SDS-PAGE y análisis de gel nativo. Los ensayos enzimáticos se utilizan para evaluar la actividad específica antes y después de la pegilación y para proporcionar evidencias de que no hay pérdida de la estructura tetramérica de PAL.

#### Ensayo de la actividad de PAL

55 El ensayo de la actividad de PAL se lleva a cabo usando un espectrofotómetro Cary UV (Cary 50) en el modo de cinética. La actividad de PAL con sustrato de L-fenilalanina se ensaya a temperatura ambiente (25°C) mediante la

medición de la producción de trans-cinamato monitorizado por el aumento de la absorbancia a 290 nm (Hodgins, (1968), *ibid.*). El coeficiente de extinción molar del 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 las mediciones estándar, la concentración de enzima final es 0,0035 mg/mL, pero para los estudios cinéticos se ajusta la concentración de enzima en el ensayo de modo que la pendiente a 290 nm por minuto se encuentra en el intervalo de 0,005 a 0,02. Los datos de la actividad se expresan como actividad específica ( $\mu mol \times min^{-1} mg^{-1}$ ). Una unidad de PAL se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu mol$  de ácido trans-cinámico por minuto a temperatura ambiente.

#### Ejemplo 4

##### 10 Prueba in vitro de la vida media y de la inmunogenicidad

Después de la caracterización bioquímica, los candidatos PEG-PAL más prometedores son examinados para detectar la inmunoreactividad contra los anticuerpos producidos por los ratones PKU inyectados con PAL nativo (no pegilado) usando tres técnicas diferentes y complementarias (Western blot, ELISA, e inmunoprecipitación (IP)).

15 Para el análisis de transferencia Western, se utiliza PAL anti-suero (de ratones inyectados con PAL nativo) a una dilución 1:10000. Como control negativo, también se utiliza el suero de ratones tratados con tampón en la misma dilución. El anticuerpo secundario, IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Promega), se diluye a 1: 5000 y el color se desarrolla usando el sustrato de AP Western Blue (Promega). La prueba de ELISA se lleva a cabo usando placas Nunc/Immuno Maxisorp (Nalge Nunc International) siguiendo los procedimientos estándar que utilizan 1 mg/ml de PAL en PBS y que bloquean con PBS, 0,05% de Tween-20, 2% de BSA. Los antisueros de ratón 20 (de ratones expuestos a PAL nativo) se diluyen 1:10000 en solución de bloqueo EB (PBS, 0,05% de Tween-20, 2%, BSA), y se utilizó una IgG anti-ratón de HRP-cabra como anticuerpo secundario con TMB utilizado para la detección a 450 nm.

25 La inmunoprecipitación se utiliza para probar la unión de anticuerpos PAL. Las muestras de proteína (PAL o PAL pegilado) se incuban en tampón TTBS (solución salina tamponada de Tris con 0,1% de Tween) y la actividad de PAL se mide antes de añadir la muestra del anticuerpo. Cada muestra se incuba con un exceso de 8 veces el control positivo del suero anti-PAL y una reacción de control negativo por duplicado utilizando suero de ratón no inmune. Después de la incubación, se añade proteína G Sepharose 4 (50% v/v) en exceso, teniendo en cuenta la capacidad de unión a IgG de ratón de las perlas, y las muestras se incuban de nuevo a 4°C durante la noche con rotación. Los sobrenadantes se recuperan por centrifugación y la actividad de PAL de cada muestra se ensaya en los sobrenadantes. Los peletes de perlas no se descartan, de modo que se puede realizar su posterior análisis por 30 Western blot. Para confirmar que la unión de perlas de anticuerpos se ha producido, se utiliza Western blot para detectar el antígeno de PAL en las perlas. Las perlas que se recuperan por centrifugación después de la etapa de unión de PAL se lavan varias veces con tampones TTBS y TBS. Después de estos lavados, se añade tampón de carga SDS-PAGE a las perlas y las muestras se calientan a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se analizan entonces mediante transferencia Western usando anti-suero de PAL. Las variantes de enzima que muestran una pobre unión del anticuerpo tienen poco PAL correspondiente en las fracciones de perlas sedimentadas como se detectó por Western blot y muestran mayores actividades restantes en el sobrenadante en comparación con PAL 35 nativa no modificada que muestra una unión de anticuerpos elevada.

#### Ejemplo 5

##### 40 Ensayo de sensibilidad de proteasa

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

45 Después de que la ingeniería de proteínas ha creado mejores mutantes PAL (y PEG-PAL) que retienen la actividad, la detección de la resistencia a proteasa usando incubación con un cóctel de tripsina/quimotripsina de la proteasa, seguido del monitoreo para la retención de la actividad (a través de la medición  $OD_{290}$ ) y la reducción de corte de la proteína (a través del análisis en gel PAGE) permite la identificación de mutantes con propiedades apropiadas in vitro que se utilizan para la prueba in vivo.

50 La estabilidad proteolítica se evaluó mediante incubación con un cóctel de proteasas que se aproxima al medio ambiente intestinal y que contiene tripsina 2,3 mM, quimotripsina 3,5 mM, carboxipeptidasa A 3,05 mM, y carboxipeptidasa B 3,65 mM. La prueba de la proteólisis implicará incubaciones enzimáticas, añadiendo proteasas a las soluciones PAL, para determinar el grado de sensibilidad de la proteasa para las diferentes variantes de la proteína que se examinan (proteína nativa o mutante con o sin pegilación u otra modificación química), incluidos los cursos de tiempo de retención de la actividad y la retención de la estabilidad de la proteasa después de la exposición. Se utilizan experimentos de mapeo de espectrometría de masas SDS-PAGE y MALDI-TOF para determinar la ubicación de los sitios sensibles de la proteasa (Kriwacki, R. W., et al., *J. Biomol. Tech.* 9(3): 5-15 (1980)). Estos resultados de los mapas serán importantes para determinar los sitios principales de la susceptibilidad 55

de la proteasa (tal como los dos sitios principales ya identificados), de modo que todos los principales sitios de sensibilidad se pueden eliminar con la protección de pegilación y/o mutación para eliminar y/o proteger las zonas sensibles de la arquitectura PAL.

#### Ejemplo 6

##### 5 Generación de NpPAL y AvPAL PEGilados

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

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

10 1) Se evaluó la proteína para la presencia de endotoxina. Una solución de proteína (0,1 ml) se diluyó en 0,9 ml de agua MQ reciente y se probó con un aparato Charles River operado manualmente (EndoPTS) para la endotoxina a un nivel de sensibilidad de 0,5 UE/ml. Si la endotoxina era mayor que 0,5 UE/ml, entonces la endotoxina se reducía inicialmente por filtración Mustang E, seguido por la resina Sterogene Etox, o por purificación cromatográfica adicional. La reducción era limitada, pero lo suficientemente útil mediante el paso sobre DEAE FF (Amersham) a pH 7,8.

15 2) Concentración e intercambio de tampón de proteínas. La proteína se concentró hasta más de 25 mg/ml, pero inferior o igual a 75 mg/ml y el tampón se intercambió a KPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8,5. Si se utilizaba un filtro giratorio para preparar esta concentración, el filtro se ensayaba primero para la endotoxina por centrifugación a velocidad reducida y tiempo (3000 rpm, 3 minutos) con tampón solo, probando entonces el tampón retenido para la endotoxina en la misma forma que la proteína en el paso 1. El registro/receta del lote de tampón para KPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8,5 consistió en agua (QS a 1 L), fosfato dibásico de potasio (8,4913 g/L de 48,75 mM), y fosfato monobásico de potasio (0,17011 g/L de 1,25 mM). La solución se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó a temperatura ambiente. El producto concentrado se filtró lentamente (1-2 mL/min) a través de un filtro Acrodisc Mustang E. Una muestra diluida y cubierta con TBS estéril, pH 7,5 se midió a A280 para determinar la concentración de proteínas. El coeficiente de extinción fue de 0,83 para NpPAL y 0,75 para AvPAL.

25 3) PEGilación de NpPAL y AvPAL. Se calentó a temperatura ambiente PEG almacenado normalmente a -80°C. Se añadió tampón KPO<sub>4</sub> al PEG para volver a suspender por agitación a velocidad máxima, y agitando el tubo duro en la mano para asegurar que todos los trozos grandes se suspendieran. Alternativamente, el PEG se resuspendió en agua a pH ~5). La proteína se añadió a la solución de PEG bien suspendida al minuto de haber primero humedecido el PEG y se mezcló por inversión muy suave. Fueron colocados tubos envueltos en papel de aluminio en el eje de un balancín y se agitó muy suavemente a temperatura ambiente durante 3 horas. Los tubos se llenaron con TBS (pH 7,5) y se filtró estéril. Las suspensiones se formularon o bien inmediatamente o bien se almacenaron a 4°C hasta el momento de la formulación.

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

40 La solución se sometió a intercambio de tampón primero diluyendo con TBS aproximadamente 3 veces y volviendo al volumen original al menos cuatro veces. El flujo cruzado fue típicamente de 180 a 200 mL/min para ambos Vivaflow 50 y 200.

45 El producto final se filtró 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 mayor que 1 EU/ml, la reducción se llevaba a cabo con gel Sterogene Etox. Formulados, NpPAL PEGilado estéril o AvPAL se sellaron en viales y se colocaron a -70°C hasta el momento de los estudios in vivo.

#### Ejemplo 7

##### Generación de variantes AvPAL (mutantes cisteína)

50 Se realizaron sustituciones de aminoácidos en el polipéptido AvPAL para reducir la agregación que se produce en proteínas recombinantes expresadas por bacterias. La agregación de la proteína puede reducir la actividad de la enzima y/o aumentar la inmunogenicidad in vivo. Una tal forma de agregación se produce como resultado de la formación de enlaces disulfuro entre cadenas. Para reducir al mínimo esta posibilidad, diversos restos de cisteína AvPAL, solos o en combinación, fueron reemplazados con restos de serina.

El polipéptido AvPAL tiene 6 restos de cisteína, en las posiciones 64, 235, 318, 424, 503 y 565 (SEQ ID NO: 4). Se generaron los siguientes mutantes de cisteína individuales de 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). Un mutante de cisteína doble de AvPAL, AvPAL\_S565SC503S (SEQ ID NO: 11), también se generó. La Figura 5A-5E muestra las secuencias de aminoácidos de estos mutantes de cisteína AvPAL.

#### Clonación

- 5 El gen AvPAL se amplificó a partir de ADN genómico de *Anabaena variabilis* (ATCC 29413-U, Qiagen DNeasy Kit) con el cebador directo AvarPALfor (5'-CACTGTTCATATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO: 18) y el cebador inverso AvarPALrev (5'-CACTGTCTCGAGATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO: 19). El producto de la PCR resultante se trató con Taq y luego se ligó en pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó lp40.
- 10 Se añadió un sitio 5' NheI y se eliminó un sitio interno NheI mediante SOE-PCR. El fragmento AvPAL cadena arriba se amplificó a partir lp40 con el cebador directo N-Nhe-AvPAL (5'-CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO: 20) y el cebador inverso Nhe-AvPALrev (5'-GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO: 21), y el fragmento de AvPAL cadena abajo se amplificó a partir lp40 con el cebador directo Nhe-AvPALfor (5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO: 22) y el 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 la ADN polimerasa para producir el gen AvPAL de longitud completa, y luego se amplificaron con los cebadores N-Nhe-AvPAL y AvPALrev-r.
- 15 El producto PCR resultante se digirió con NheI, extremos romos con Klenow, se digirió con NotI, y se ligó en el vector pET28a+ (preparado por digestión con NdeI, terminado con Klenow y digestión con NotI). El plásmido resultante se denominó 3p86-23.
- 20

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

#### Mutantes de cisteína

- Dos codones de cisteína en el gen AvPAL, correspondientes a las posiciones 503 y 565 del polipéptido AvPAL, se sustituyeron con codones de serina por mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange XL II, Stratagene). El codón de cisteína en la posición 503 se cambió a un codón de serina en el plásmido 7p56 Av3 por PCR con el cebador directo Av\_C503S (5'-GTCATTACGATGCACGCGCCTCTCTATCACCTGCAACTGAG-3') (SEQ ID NO: 26) y el cebador inverso Av\_C503Srev (5'-CTCAGTTGCAGGTGATAGAGAGGCGCGTGCATCGTAATGAC-3') (SEQ ID NO: 27). El codón de serina está subrayado y la mutación G a C en la cadena codificante (mutación C a G 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 a un codón de serina en el plásmido j282 con el cebador directo Av\_C565S (5'-CAGTTCAAGATATCTTACCCTCCTTGCATTAACCCGGGCTGC-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 G a C en la cadena codificante (mutación C a G en la cadena no codificante) se indica en negrita. El plásmido resultante se denominó j298a.
- 30
- 35
- 40 Los codones de cisteína en el gen AvPAL en las posiciones 64, 318 y 565 del polipéptido AvPAL fueron similarmente sustituidos con codones de serina utilizando los siguientes pares de cebadores: C64S, cebadores directos Av\_C64S (5'-GCAGGGTATTCAGGCATCTTCTGATTACATTAATAATGCTGTTG-3') (SEQ ID NO: 30) y el cebador inverso Av\_C64Srev (5'-CAACAGCATTATTAATGTAATCAGAAAGATGCCTGAATACCCTGC-3') (SEQ ID NO: 31); C318S, el cebador directo Av\_C318S (5'-CAAGATCGTACTCACTCCGATCCCTTCCCAGTATTTGGGGC-3') (SEQ ID NO: 32) e inverso Av\_C318Srev cebador (5'-GCCCAAATACTGGGGAAGGGATCGGAGTGAGTAACGATCTTG-3') (SEQ ID NO: 33); y C565S, cebador directo Av\_C565S (SEQ ID NO: 28) y cebador inverso Av\_C565Srev (SEQ ID NO: 29). Los codones de serina están subrayados, y las mutaciones G a C en las cadenas de codificación y las mutaciones C a G en las cadenas no codificantes se indican en negrita.
- 45

#### Ejemplo 8

- 50 Actividad enzimática in vitro de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la sustitución de serina de los diversos restos de cisteína en el polipéptido AvPAL sobre la actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL) in vitro.

- Se clonaron variantes AvPAL (es decir, mutantes de cisteína) como se describe en el Ejemplo 7. Los plásmidos de expresión del mutante de cisteína de AvPAL se transformaron 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.
- 55

Los mutantes de cisteína de AvPAL de tipo salvaje (WT) y AvPAL se ensayaron para la actividad enzimática de PAL in vitro como se describe en el Ejemplo 3. La Tabla 1 muestra que en comparación con la WT AvPAL no pegilada, la actividad específica in vitro de PAL de las proteínas mutantes purificadas de cisteína de AvPAL no pegiladas, se redujo por sustitución de serina del resto de cisteína en la posición 64 (AvPAL\_C64S), pero no se vio afectada negativamente por la sustitución de serina de los restos de cisteína en cualquiera de las posiciones 503 ó 565, o en ambas posiciones 503 y 565 (AvPAL\_C503S, AvPAL\_C565S y AvPAL\_C565SC503S, respectivamente).

Tabla 1: Actividad específica de mutantes de cisteína de 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

Para determinar si la introducción de los restos de serina tenía algún efecto sobre la actividad enzimática de las proteínas AvPAL pegiladas, WT AvPAL y el doble mutante de cisteína, AvPAL\_C565SC503S, se pegilaron como se describe en el Ejemplo 6. La Tabla 1 muestra que la actividad específica de PAL in vitro de la proteína AvPAL pegilada no se vio afectada negativamente por la sustitución de la serina de los restos de cisteína en ambas posiciones 503 y 565.

#### Ejemplo 9

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

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

#### Estabilidad acelerada

20 El efecto de la sustitución de la serina de restos de cisteína en AvPAL en la estabilidad in vitro se determinó mediante el almacenamiento de los mutantes de cisteína AvPAL purificados, ya sea pegilados o no pegilados, durante varios períodos de tiempo a 37°C, y luego con la medición de la actividad específica de PAL in vitro de estas proteínas como se describe en el Ejemplo 3.

25 Los mutantes de cisteína AvPAL y AvPAL de tipo salvaje, ya sea no pegilados o pegilados, se prepararon como se describe en el Ejemplo 8.

Como se muestra en la Figura 6 A, las actividades específicas de las proteínas AvPAL no pegiladas fueron estables durante al menos 5 días a 37°C, y no se vieron afectadas adversamente por la sustitución de la serina de los restos de cisteína en la posición 565, o en ambas posiciones 503 y 565 .

30 Del mismo modo, como se muestra en la Figura 6B, las actividades específicas de las proteínas AvPAL pegiladas fueron estables durante al menos 6 días a 37°C. El único mutante AvPAL de cisteína, AvPAL\_C565S, mostró una reducción de un poco de estabilidad en comparación con el AvPAL de tipo salvaje y el mutante AvPAL de cisteína doble, AvPAL\_C565SC503S, después de 6 días a 37°C.

#### Formación de agregados

35 El efecto de la sustitución de la serina de los restos de cisteína en AvPAL sobre la formación de agregados de proteínas en solución se determinó mediante la separación de mutantes purificados de cisteína, de tipo salvaje no pegilado AvPAL y AvPAL por cualquiera de desnaturalización y electroforesis en gel nativo o por SEC-HPLC.

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

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

10 Los agregados estaban presentes en la preparación AvPAL de tipo salvaje y en las preparaciones AvPAL\_C503S y AvPAL\_C64S, pero no en las preparaciones AvPAL\_C565S y AvPAL\_C565SC503S, a juzgar por la electroforesis en gel (Figura 7A) o SEC-HPLC (Figura 7B).

#### Pegilación específica de sitio

15 El efecto de la sustitución de la serina de restos de cisteína en AvPAL en la pegilación específica de sitio se determinó sometiendo a pegilación a la AvPAL de tipo salvaje y al mutante de cisteína doble AvPAL\_C503SC565S como se describe en el Ejemplo 6, y luego comparando la pegilación relativa a los restos de lisina de AvPAL: K2, K10, K32, K115, K145, K195, K301, K335, K413, K419, K493, K494 y K522.

20 Aproximadamente 100 µg (de 10 µL a 10 µg/µL) de las proteínas AvPAL no pegiladas o pegiladas fueron desnaturalizadas en urea 8 M. Las proteínas desnaturalizadas fueron digeridas en un volumen de reacción de 100 µL con tripsina en urea 0,8 M a pH 8,2 durante la noche (~20 horas) a 37°C. Las proteínas digeridas con tripsina se redujeron mediante el tratamiento con 1 µL de DTT 1 M durante 1 hora a 37°C, seguido de inactivación con 3 µL de TFA al 15%. Las proteínas digeridas se separaron en una columna de fase inversa C18. El tanto por ciento de pegilación de cada uno de los péptidos AvPAL pegilados se calculó mediante la sustracción del mapeo de péptidos del péptido correspondiente no pegilado.

25 Como se muestra en la figura 8, en una proporción de proteína AvPAL:PEG de 1:3, no hubo ninguna diferencia notable en el porcentaje de pegilación de cualquiera de los restos de lisina (K) con la posible excepción de K419, en el que el porcentaje de pegilación del doble mutante de cisteína C565SC503S fue menor en comparación con los AvPAL de tipo salvaje. Sin embargo, los resultados obtenidos con el doble mutante de cisteína aumentando las proporciones de proteína AvPAL:PEG, en las que no se observó una relación dosis-respuesta, tomados juntos con el relativamente pequeño porcentaje de pegilación, indica que las diferencias observadas en K1419 no es probable que sean significativas. Por lo tanto, la sustitución de serina de los restos 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 proteínas AvPAL

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

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

40 Se purificaron proteínas AvPAL expresadas en bacterias como se describe en el Ejemplo 2 y se concentraron utilizando un filtro giratorio (Millipore Biomax -10K NMWL). Las proteínas se hicieron girar a aproximadamente 15.000 g durante unos minutos en una centrifuga Eppendorf 5415C. Para los mutantes de cisteína que tienden a agregarse (por ejemplo, AvPAL\_C503S y AvPAL\_C64S), las proteínas se concentraron a aproximadamente 20 mg/ml y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Para los mutantes de cisteína que son resistentes a la agregación (por ejemplo, AvPAL\_C565S y AvPAL\_C565SC503S), las proteínas se concentraron a aproximadamente 40 mg/ml y se incubaron durante 2 horas a 37°C.

50 Como se muestra en la Tabla 2, las preparaciones de mutantes de cisteína de AvPAL purificadas AvPAL\_C64S y AvPAL\_C503S forman agregados durante la incubación durante 2 horas a 37°C. Como era de esperar, esta agregación se agravó cuando las proteínas AvPAL se concentraron antes de la incubación durante 2 horas a 37°C. La agregación podría ser bloqueada por la exposición de las proteínas se concentradas a DTT, lo que indica que la agregación es debida a la reticulación de disulfuro. En contraste, las preparaciones purificadas de mutantes de cisteína AvPAL AvPAL\_C565S y AvPAL\_C565SC503S no forman agregados después de la incubación durante 2 horas a 37°C, lo que indica que el resto de cisteína en la posición 565 está implicada en la agregación de AvPAL través de la reticulación del disulfuro.

55 Tabla 2: Agregación relación con la reticulación de disulfuro de mutantes de cisteína de AvPAL

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

5 Para determinar que restos de cisteína existen como sulfhidrilos libres, fue desnaturalizada una preparación AvPAL purificada en presencia de urea 8 M, alquilada por yodoacetamida, digerida con tripsina, y analizada por LC/MS. Todos los restos de cisteína AvPAL estaban marcados con yodoacetamida, lo que indica que todos los restos de cisteína de AvPAL expresada en bacterias existen como sulfhidrilos libres (datos no presentados).

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

15 Para determinar qué restos de cisteína están implicados en la reticulación del disulfuro intercatenario, 67 µL de una solución de 0,7 mg/ml de la preparación purificada AvPAL tipo salvaje no pegilado se desnaturalizó y se alquiló en urea 8 M que contenía yodoacetamida 20 mM durante 1 hora a 37°C y, a continuación, se digirió en un volumen de reacción de 100 µL con tripsina a pH 8,2 durante la noche (~17,5 horas) a 25°C. Las proteínas digeridas con tripsina se separaron y se analizaron por espectrometría de masas, en la que los péptidos correspondientes a los pares de disulfuro predichos fueron identificados y cuantificados como cuentas de iones totales (TIC).

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

Tabla 3: Pares de disulfuro del agregado

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

Par disulfuro	Resultados (TIC/1000)
C503-C318	n.d.
C503-C503	11
C503-C565	112
C565-C318	13
C565-C565	37
C318-C318	n.d.

#no detectado

Se llevaron a cabo estudios para determinar si otros mecanismos además de reticulación con disulfuro podían estar implicados en la agregación de proteínas AvPAL.

5 Se incubaron preparaciones AvPAL purificadas 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 las interacciones hidrofóbicas, y EDTA reduce la agregación de proteínas debido a la presencia de cationes divalentes. Como se muestra en la Figura 9, la exposición a Tween al 0,05% o EDTA 10 mM no tuvo ningún efecto sobre la agregación de proteínas AvPAL. El otro pico a los 10 minutos en el AvPAL tratado con EDTA 10 mM es debido a la absorbancia de EDTA a 210 nm.

10 Para investigar más a fondo el papel de la reticulación con disulfuro en la agregación de proteínas AvPAL, el AvPAL purificado se redujo mediante tratamiento con DTT y luego se desaló antes de la separación por SEC-HPLC. Como se muestra en la Figura 10A, la agregación de proteínas AvPAL se redujo al mínimo mediante tratamiento con DTT, y los agregados se conformaron de nuevo después de una incubación durante 18 horas a 37°C. En contraste, como se muestra en la Figura 10B, los agregados no se vuelven a formar una vez que las cisteínas de la superficie AvPAL fueron modificadas (es decir, alquiladas) por tratamiento con N-metilmaleimida (NEM) después de la exposición con DTT, pero antes de desalar y de la incubación durante 18 horas a 37°C.

15 Con base en lo anterior, la agregación de AvPAL expresada en bacterias parece deberse únicamente a la formación de enlaces disulfuro entre cadenas, y no debido a la interacción hidrofóbica o a la presencia de cationes divalentes. Los restos de cisteína en las posiciones 565 y 503 están implicados en la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en los preparados de AvPAL.

#### Ejemplo 11

Formulaciones líquidas de las formas pegiladas de las variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

25 Se realizaron estudios para investigar el efecto de diversos excipientes, por ejemplo, estabilizadores, sobre la estabilidad acelerada de una forma pegilada de una variante del polipéptido AvPAL (por ejemplo, con la sustitución de serina de los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565) en las formulaciones proporcionadas en este documento.

El mutante de cisteína doble AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se preparó como se describe en el Ejemplo 7.

30 La estabilidad acelerada de diferentes formulaciones de AvPAL\_C565SC503S pegilado se determinó usando un ensayo de actividad in vitro, ya sea un ensayo de cubeta o un ensayo de placa. Para el ensayo de cubeta, se diluyeron AvPAL\_C565SC503S pegiladas purificadas en tampón de dilución TBS y después se añadió a un tampón de ensayo que contenía Phe 22,5 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,5. Después de la incubación durante 2 minutos a 30°C, la cantidad de ácido trans-cinámico (t-CA) liberado se midió por absorbancia a 290 nm. Para el ensayo de placa, se diluyó AvPAL\_C565SC503S purificado pegilado en tampón de dilución TBS plus 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. Después de la incubación durante 10-20 minutos a 30°C, la cantidad de ácido trans-cinámico (t-CA) liberado se midió por absorbancia a 290 nm. Una UI de la actividad PAL es igual a 1 µMol TCA/min.

40 En un primer estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto del pH sobre la estabilidad del mutante de cisteína doble pegilado AvPAL AvPAL\_C565SC503S. Se pre-formuló AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado en tampón 10 mM y NaCl 140 mM a varios pH, 4-9. Los tampones ensayados: 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 un máximo de 30 días a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad in vitro. Se observó una pérdida total de la actividad de la enzima PAL a pH 4. Un intervalo de pH de 7 a 8 fue elegido para una evaluación adicional.

En un segundo estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto del pH y una variedad de excipientes sobre la estabilidad del mutante de cisteína doble AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. AvPAL\_C565SC503S pegilado

purificado se pre-formuló en Tris 10 mM y NaCl 140 mM a pH 7, 7,5 ó 8,0 en ausencia o en presencia de EDTA al 0,5%, EDTA al 0,5% más ácido ascórbico al 0,5% o EDTA al 0,5% más metionina 5 mM (Met). Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante un máximo de 60 días a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad in vitro. pH 7,0 y 7,5 aparecieron equivalentes en el mantenimiento de la actividad enzimática, el EDTA tuvo poco o ningún efecto sobre la actividad enzimática y los antioxidantes ácido ascórbico y metionina afectaron negativamente la actividad enzimática.

En el mismo estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto de la pegilación del mutante de cisteína doble de AvPAL AvPAL\_C565SC503S. La tasa de pérdida de la actividad enzimática fue similar entre AvPAL\_C565SC503S no pegilado y pegilado.

En un tercer estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto del sustrato de la enzima y del producto como excipiente en la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado a aproximadamente 12 mg/ml (0,2 mM) fue pre-formulado 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 del sitio activo), TCA 2 mM (producto a 10 moles por mol del sitio activo) o Tween 80 al 0,05% (un agente tensioactivo). Después de almacenar las formulaciones de la enzima durante diversos tiempos a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad semanal in vitro. Tanto Phe como t-CA aumentaron significativamente la estabilidad de la enzima, mientras que Tween no tuvo ningún efecto sobre la estabilidad de la enzima.

Un resumen de los estudios de estabilidad acelerada 1, 2 y 3 se muestra en la Figura 11.

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 AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado a aproximadamente 12 mg/ml (0,2 mM) fue pre-formulado 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 del sitio activo) o TCA 0,4 mM (producto a 2 moles por mol del sitio activo). Después de almacenar las formulaciones de la enzima durante diversos tiempos a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad semanal in vitro. Tanto Phe como t-CA a baja concentración fueron eficaces en la estabilización de la actividad enzimática.

En quinto estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto de un sustrato de enzima débil, tirosina (Tyr), como excipiente en la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado a aproximadamente 12 mg/ml (0,2 mM) fue pre-formulado en Tris 10 mM y NaCl 140 mM a pH 7,5 en ausencia o en presencia de Tyr 1 ó 5 mM (sustrato a 5 ó 25 moles por mol del sitio activo, respectivamente). Después de almacenar las formulaciones de la enzima durante diversos tiempos a 4°C, 25°C o 37°C, se midió la actividad semanal in vitro. Tyr tuvo un efecto mínimo, no dependiente de la dosis estabilizador sobre la actividad enzimática (Figura 12).

En un sexto estudio de estabilidad acelerada, se evaluó el efecto de agentes secuestrantes nucleófilos como excipiente en la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado a aproximadamente 20 mg/ml (0,33 mM) se pre-formuló en Tris 10 mM y NaCl 140 mM a pH 7,5 en ausencia o en presencia de 1 Phe (sustrato a 3 moles por mol del sitio activo), secuestrante nucleófilo 2 mM (ya sea ácido benzoico o piridoxamina a 6 moles por mol del sitio activo), o ambos Phe 1 mM y secuestrante nucleófilo 2 mM. Después de almacenar las formulaciones de la enzima durante diversos tiempos a 4°C o 37°C, se midió la actividad semanal in vitro. El ácido benzoico, pero no piridoxamina, fue eficaz en la estabilización de la actividad enzimática (Figura 13 A). No hubo ningún efecto aditivo de Phe y ácido benzoico, lo que sugiere un mecanismo de estabilización similar.

Los efectos estabilizadores de ácido benzoico y t-CA sugieren que funcionan 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 útil efectiva del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S en varias formulaciones. La vida útil se determinó como sigue: (1) determinar la velocidad de decaimiento de la actividad ( $k_{\text{descomposición}}$ ), a lo que siguió una cinética de primer orden, para cada condición de formulación; (2) representar el  $\ln(k_{\text{descomposición}})$  versus  $1/\text{Temperatura}$  (°K); (3) determinar la  $E_a$  ( $AG_{\text{descomposición}}$ ) requerida para la descomposición de la actividad para una condición formulación dada; (4) extrapolar la  $k_{\text{descomposición}}$  a 4°C utilizando la  $E_a$  calculada y la  $k_{\text{descomposición}}$  observada a una temperatura dada; y (5) determinar la vida útil ( $T_{90}$ ), que es el tiempo en el que la actividad enzimática específica se reduce a > 10% a 4°C.

La Tabla 4 muestra que Phe y t-CA aumentan en gran medida la vida útil prevista del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S.

Tabla 4: Predicción de la vida útil  $T_{90}$  (en semanas) del mutante de cisteína doble pegilado AvPAL\_C565SC503S 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 AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S es de 7 a 7,5. La presencia de antioxidantes da como resultado una pérdida drástica de la actividad enzimática. Tanto Phe como el ácido trans-cinámico (t-CA) aumentan la estabilidad de rAvPAL-PEG en un 50% o más en condiciones aceleradas (25°C y 37°C). Un exceso de 2 veces Phe o t-CA por sitio activo de rAvPAL-PEG es suficiente para estabilizar la actividad y concentraciones más altas no parecen tener ningún beneficio adicional. Un sustrato PAL más débil, la tirosina (Tyr), no parece estabilizar la actividad enzimática, mientras que el ácido benzoico estabiliza la actividad rAvPAL-PEG en un grado similar que su análogo estructural, Phe. Cuando se combina con Phe, no se observa estabilización de la actividad adicional con el ácido benzoico, lo que sugiere un mecanismo común para la estabilización de la actividad.

#### Ejemplo 12

Formulaciones liofilizadas de las formas pegiladas de las variantes de AvPAL (mutantes de cisteína)

Se realizaron estudios para investigar el efecto de varias formulaciones sólidas (por ejemplo, liofilizadas) en la actividad de una forma pegilada de una variante del polipéptido AvPAL (por ejemplo, con la sustitución de serina de los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565).

El mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se prepara como se describe en el Ejemplo 7.

El mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se formuló como sigue: (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 de la enzima PAL de cada una era de 1,7 a 1,8 U/mg. Después de la liofilización, las formulaciones se almacenaron durante un máximo de 26 a 4°C, y luego se volvieron a suspender en agua filtrada de forma estéril MilliQ reciente. Las actividades de la enzima PAL se determinaron como se describe en el Ejemplo 11. La Tabla 5 muestra que no parecía haber ninguna pérdida de actividad después de la liofilización, el almacenamiento o la resuspensión de las diversas formulaciones AvPAL\_C565SC503S.

Tabla 5: Actividad específica del mutante de cisteína doble pegilado AvPAL\_C565SC503S tras la formulación liofilizada (LF)

LF	Antes de LF	Después de LF	Después de LF + 5 días/4°C	Después de LF + 11 días/+4°C.	Después de LF + 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

Formulaciones de variantes de AvPAL PEGiladas

Se realizaron estudios para investigar el efecto de diversos excipientes, por ejemplo, estabilizantes y conservantes (es decir, agentes anti-microbianos), sobre la estabilidad acelerada de una forma pegilada de una variante de polipéptido AvPAL, por ejemplo, con las sustituciones de serina de los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565, AvPAL\_C565SC503S) en las formulaciones proporcionadas en este documento.

El mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se preparó como se describe en el Ejemplo 7.

La estabilidad acelerada de diferentes formulaciones de AvPAL\_C565SC503S pegilado se determinó usando un ensayo de actividad in vitro como se describe en el Ejemplo 11.

En un estudio preliminar de compatibilidad del conservante, el efecto de la presencia de un conservante, es decir, el agente anti-microbiano, en la actividad y se evaluó la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. El AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado fue formulado en tampón Tris 10 mM y NaCl 135 mM a pH 7,35. Conservantes probados: alcohol de bencilo (0,15%); m-cresol (0,3%); cloro-cresol (0,25%); y fenol (0,5%). Después de incubar las formulaciones de la enzima en ausencia de conservante o en presencia de alcohol bencílico, m-cresol, cloro-cresol o fenol durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizó una medición de la actividad inicial. Después de almacenar la enzima las formulaciones durante un máximo de 65 días a 4°C, se midió la actividad in vitro. La actividad de la enzima inicial no fue afectada por los conservantes, y la enzima fue compatible con cada uno de los conservantes ensayados, aunque se observó una disminución lenta de la actividad de m-cresol.

En un primer estudio de compatibilidad del conservante, el efecto de la presencia de un conservante, es decir, el agente antimicrobiano, en presencia o ausencia de un estabilizador, es decir, L-fenilalanina (Phe) o Gly, en la actividad y se evaluó la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. Se formuló AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado en tampón Tris 10 mM y NaCl 135 mM a pH 7,35. Conservantes probados: alcohol de bencilo (0,15%); m-cresol (0,3%); y fenol (0,5%). Estabilizadores probados: Phe (1 mM); y Gly (1 mM). Después de almacenar las formulaciones de la enzima en ausencia de cualquier conservante o estabilizador, o en presencia de uno de los conservantes, uno de los estabilizadores, o varias combinaciones de uno de los conservantes y uno de los estabilizadores durante hasta 18 semanas a 4°C, 25°C o 40°C, se midió la actividad in vitro. Todos los conservantes redujeron la actividad enzimática inicial en este estudio, y la combinación de fenol y Gly fue un potente inhibidor de la enzima. En todos los casos, las enzimas formuladas en presencia del conservante son menos estables que las de la presencia de Phe solo. En un estudio de seguimiento, se obtuvieron resultados similares utilizando 12 mg/ml (0,19 mM) de la enzima formulada en tampón Tris 50 mM, NaCl 135 mM a pH 7,3.

En un segundo estudio de compatibilidad del conservante, el efecto de diferentes concentraciones de tampón Tris, y el efecto de la presencia de un conservante, es decir, el agente antimicrobiano, en presencia o ausencia de un estabilizador, es decir, Phe o Gly, sobre la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S fueron evaluados. El AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado fue formulado en tampón Tris 10 mM, 25 mM o 50 mM y NaCl 135 mM a pH 7,3. Conservante probado: alcohol bencílico (1,5%). Estabilizadores probados: Phe (1 mM); y Gly (1 mM). Después de almacenar las formulaciones de la enzima en los diferentes tampones Tris solo, o en tampón Tris 50 mM en presencia de alcohol bencílico o Phe solo, o diversas combinaciones de alcohol bencílico, Phe y Gly, durante un máximo de 12 semanas a 4°C, 25°C o 40°C, se midió la actividad in vitro. Se disminuyó la actividad de la enzima a medida que aumentaba la concentración del tampón Tris. A la concentración ensayada, el alcohol bencílico era incompatible con la enzima. Las enzimas en todas las formulaciones ensayadas fueron menos estables que la enzima formulada en presencia de Phe solo.

En un tercer estudio de compatibilidad del conservante, se evaluó el efecto de la presencia de diversas combinaciones de conservante, es decir, el agente anti-microbiano, y uno o más estabilizadores, es decir, Phe y Gly, en la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. El AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado se formuló en tampón Tris 10 mM y NaCl 135 mM a pH 7,35. Conservantes probados: alcohol bencílico (1,5%); y m-cresol (0,3%). Estabilizadores probados: Phe (1 mM); y Gly (1 mM). Después de almacenar las formulaciones enzimáticas en Phe solo, o en varias combinaciones de Phe, Gly y ya sea alcohol bencílico o m-cresol, durante un máximo de 37 semanas a 4°C, 25°C o 40°C, se midió la actividad in vitro. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 14. Como se ha visto anteriormente, la presencia del conservante en las formulaciones redujo la actividad enzimática inicial, sin embargo, la pérdida de la actividad de la enzima fue solamente transitoria en la formulación de la enzima que contiene m-cresol, Phe y Gly a 4°C y 25°C. Esta formulación de la enzima se encontró que era lo más estrechamente próxima al efecto estabilizador observado en el Ejemplo 11 para Phe solo.

En un cuarto estudio comparativo del conservante, el efecto de diferentes concentraciones de Gly en presencia de un conservante, es decir, m-cresol, y un estabilizador, es decir, Phe, sobre la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se evaluó. Se formuló AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado en tampón Tris 10 mM, NaCl 135 mM, Phe 1 mM y 3,2 mg/ml (0,32%) a pH 7,2, en ausencia de Gly o en presencia de 1, 3, 5, 10 ó 20 mM de Gly. Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante un máximo de 12 semanas a 25°C o 40°C, se midió la actividad in vitro. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 15 A. La pérdida de actividad enzimática tras el almacenamiento a 25°C o 40°C, publicada como la actividad normalizada (% de la actividad enzimática antes del almacenamiento en las diversas formulaciones), se redujo en una manera dependiente de la dosis mediante la adición de Gly. La estabilidad mejorada de la actividad enzimática por Gly en las formulaciones que contienen conservantes se correlacionó bien con el mantenimiento del pico principal de AvPAL\_C565SC503S pegilado, según lo determinado por RP-HPLC.

En quinto estudio de comparabilidad del conservante, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de Gly en presencia de un estabilizador, es decir, Phe, pero en ausencia de un conservante sobre la estabilidad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. Se formuló AvPAL\_C565SC503S pegilado purificado en

tampón Tris 10 mM, NaCl 135 mM y Phe 1 mM a pH 7,2, en presencia de diversas concentraciones de Gly, que van desde 20 a 100 mM. Después de almacenar las formulaciones enzimáticas durante un máximo de 8 semanas a 40°C, se mide la actividad in vitro. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 15B. La pérdida de actividad enzimática tras el almacenamiento a 40°C se redujo de una manera dependiente de la dosis por la adición de Gly en las formulaciones AvPAL\_C565SC503S pegiladas que no contienen conservante.

Ejemplo 14

Efectos de variantes AvPAL (mutantes de cisteína) y sus formas pegiladas en ratones

El propósito de estos estudios fue determinar el efecto de la sustitución de la serina de los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565 en el polipéptido AvPAL en los niveles de Phe in vivo en ratones.

Las formas pegiladas del mutante de cisteína doble de AvPAL AvPAL\_C565SC503S se analizaron respecto a la actividad in vivo en ratones ENU2 homocigotos (también conocidos como BTBR<sup>enu2</sup>) básicamente como se describe en los Ejemplos 7 a 9 de la anterior solicitud de patente de los Estados Unidos número 11/451.999 en trámite junto a ésta presentada el 12 de junio de 2006. El ratón ENU2 es mutante homocigoto en el locus PAH lo que resulta en un animal con HPA grave. Los niveles de fenilalanina en plasma altos hacen que este animal sea el modelo adecuado para evaluar la capacidad de PAL para reducir el Phe en plasma.

En el primer estudio, el mutante de cisteína doble de AvPAL AvPAL\_C565SC503S se ensayó a diferentes dosis. Los ratones ENU2 (machos y hembras) se dividieron en 5 grupos de dosis: 4 grupos de ensayo (n = 4) y un grupo de vehículo (n = 2). A cada ratón se le dio 8 dosis de vehículo por vía subcutánea semanal, baja dosis de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado (0,25 UI), dosis media de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado (1,0 UI), dosis alta de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado (4,0 UI), o AvPAL pegilado tipo salvaje (4,0 UI). Se recogió plasma antes de la dosis y a las 48 horas post-dosis (hasta 57 días) y se analizó para los niveles de Phe. También se recogió suero previo a la dosis y a las 48 horas después de la dosis (hasta 57 días) para el análisis de los niveles de anticuerpos anti-AvPAL. Los ratones también se pesaron una vez por semana a partir de 2 días antes de la primera dosis (hasta 40 días).

Dos ratones murieron durante el estudio, un ratón tratado con vehículo y un ratón tratado con el mutante doble de cisteína de AvPAL pegilado a dosis baja. Como se muestra en la Figura 16, se observó una reducción dependiente de la dosis en los niveles de Phe en el plasma 48 horas después de cada inyección s.c. del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado. A dosis equivalentes, no hubo diferencia en los niveles plasmáticos de Phe entre los ratones tratados con AvPAL pegilado tipo salvaje o el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado. Como se muestra en la Figura 17, tampoco hubo diferencias significativas en los pesos corporales entre los ratones tratados con vehículo, AvPAL pegilado tipo salvaje, o el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado. Es probable que no se observaran diferencias significativas en el peso corporal debido a que se utilizaron ratones machos y hembras en el estudio.

Los títulos de anticuerpos anti-AvPAL en estos ratones se analizaron con un ensayo ELISA indirecto. En este ensayo, se recubrieron placas de microtitulación con AvPAL, se bloquearon, y luego se expusieron a sueros apropiadamente diluidos de cada muestra de sangre de ratón. AvPAL, que se une a la superficie de placas de microtitulación, se reconoció y unió por los anticuerpos específicos de AvPAL presentes en las muestras de suero. Los anticuerpos IgG anti-ratón de cabra marcados de forma detectable reconocieron los anticuerpos anti-AvPAL unidos. Las muestras de suero se diluyeron inicialmente 1:50, y se analizaron en comparación con el "punto de corte", que provenía del suero agrupado de ratón diluido 1:50. Las muestras con señal más baja que el punto de corte se indican como <50, o "Negativo". El resto de las muestras, consideradas "positivas", se diluyeron adicionalmente en titulación serie 1:3 a una dilución en la que la señal se redujo a menos del punto de corte. El factor de dilución más alto que dio una señal positiva (es decir, más alta que el punto de corte) se indicó como el título de la muestra. Durante esta serie de títulos, un cambio de 3 veces del título no puede reflejar una diferencia significativa del anticuerpo detectado porque la diferencia podría ser el resultado de un cambio mínimo de la señal a nivel del punto de corte.

Como se muestra en la Tabla 6, los títulos de anticuerpos anti-AvPAL fueron más bajos en los ratones tratados con el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado en comparación con los ratones tratados con una dosis equivalente (4,0 UI) de AvPAL pegilado tipo salvaje. Aunque no se observó una respuesta a la dosis clara, los ratones tratados con la dosis alta (4,0 UI) de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado tuvieron títulos de anticuerpos anti-AvPAL más altos que los ratones tratados con la dosis baja (0,25 UI) de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado.

Tabla 6: Títulos de IgG anti-AvPAL

Proteína AvPAL pegilada	Muestra	Previo	D8	D15	D22	D29
AvPAL_C565SC503S (0,25 UI)	S 2 03	<50	50	<50	50	50
	S 2 04	<50	50	50	50	450

ES 2 690 542 T3

Proteína AvPAL pegilada	Muestra	Previo	D8	D15	D22	D29
	S 2 05	<50	<50	<50	<50	<50
	S 2 06	<50	<50	50	50	50
AvPAL_C565SC503S (1,0 UI)	S 3 07	<50	<50	<50	<50	<50
	S 3 08	<50	<50	<50	<50	<50
	S 3 09	<50	<50	<50	<50	50
	S 3 10	<50	<50	<50	<50	<50
AvPAL_C565SC503S (4,0 UI)	S 4 11	<50	<50	<50	50	50
	S 4 12	<50	<50	50	50	50
	S 4 13	50	50	50	450	150
	S 4 14	<50	<50	<50	<50	<50
WT AvPAL (4,0 UI)	S 5 15	<50	<50	150	150	450
	S 5 16	<50	50	150	150	450
	S 5 17	<50	<50	150	4050	12150
	S 5 18	<50	50	150	450	150

Proteína AvPAL pegilada	Muestra	Previo	D36	D43	D50	D57
AvPAL_C565SC503S (0,25 UI)	S 2 03	<50	<50	150	150	<50
	S 2 04	<50	>1350	>1350	>1350	4050
	S 2 05	<50	N/A*	N/A	N/A	N/A
	S 2 06	<50	<50	50	50	<50
AvPAL_C565SC503S (1,0 UI)	S 3 07	<50	50	150	>1350	150
	S 3 08	<50	<50	<50	<50	<50
	S 3 09	<50	450	>1350	>1350	450
	S 3 10	<50	<50	50	50	<50
AvPAL_C565SC503S (4,0 UI)	S 4 11	<50	50	150	50	50
	S 4 12	<50	150	150	150	50
	S 4 13	50	450	450	450	150
	S 4 14	<50	150	150	150	150
WT AvPAL (4,0 UI)	S 5 15	<50	450	1350	1350	150
	S 5 16	<50	150	450	450	150
	S 5 17	<50	4050	4050	4050	450
	S 5 18	<50	50	50	50	<50

\* No hay muestras/datos no disponibles

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

En el segundo estudio, el mutante de cisteína doble de AvPAL AvPAL\_C565SC503S se puso a prueba en diferentes proporciones de pegilación. Los ratones ENU2 machos se dividieron en 5 grupos de dosis: 4 grupos de ensayo (n = 4) y un grupo de vehículo (n = 2). A cada ratón se le dio 8 dosis por vía subcutánea semanal de vehículo, baja dosis de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado (4 UI y relación 1:1,6 de AvPAL:PEG), dosis media de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado (4 UI y relación 1:2,4 de AvPAL:PEG), dosis alta de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado (4 UI y relación 1:3 de AvPAL:PEG), o AvPAL pegilado tipo salvaje (4 UI y relación 1:3 de AvPAL:PEG). El plasma se recogió antes de la dosis y a los 4 días después de la dosis (el día 61) y se analizaron para los niveles de Phe. También se recogió suero antes de la dosis a los 4 días después de la dosis (hasta 57 días) para el análisis de los niveles de anticuerpos anti-AvPAL. Los ratones también se pesaron una vez por semana a partir de 2 días antes de la primera dosis (el día 40).

Un ratón tratado con vehículo murió durante el estudio. Como se muestra en la Figura 18, se observó una reducción dependiente de la relación PEG en los niveles de Phe en el plasma 4 días después de cada inyección s.c. del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado. A relaciones de PEG equivalentes, no hubo diferencia en los niveles plasmáticos de Phe entre los ratones tratados con AvPAL pegilado tipo salvaje o el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado. Como se muestra en la figura 19, los pesos corporales de los ratones tratados con AvPAL pegilado tipo salvaje o el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado fueron significativamente mayores que los ratones tratados con vehículo.

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

Como se muestra en la Tabla 7, los títulos de anticuerpos anti-AvPAL fueron más bajos en los ratones tratados con el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado en comparación con los ratones tratados con una dosis equivalente de AvPAL pegilado tipo salvaje que tiene la misma proporción (1:3) de AvPAL frente a PEG. Se observó una respuesta a la dosis inversa entre los títulos de anticuerpos anti-AvPAL y la relación de AvPAL frente a PEG, de acuerdo con la expectativa de que la pegilación de proteínas, tales como AvPAL, se asocia con una menor inmunogenicidad in vivo.

Tabla 7: Títulos de IgG anti-AvPAL

Proteína AvPAL PEGilada	Muestra	Previo	D15	D28	D43	D64
WT AvPAL (PEG 1:3 NOF)	S 1 01	<50	450	12150	4050	>1350
	S 1 06	<50	450	450	450	4050
	S 1 10	<50	50	50	150	450
	S 1 17	<50	150	450	450	1350
AvPAL_C565SC503S (PEG 1:1,6)	S 2 02	50	450	12150	1350	1350
	S 2 07	<50	1350	12150	12150	36450
	S 2 11	<50	450	1350	12150	12150
	S 2 18	50	150	36450	26,57M	>36450
AvPAL_C565SC503S (PEG 1:2,4)	S 3 03	<50	50	150	450	4050
	S 3 08	<50	50	50	50	450
	S 3 12	<50	50	150	450	4050
	S 3 13	<50	50	450	1350	4050
AvPAL_C565SC503S (PEG 1:3)	S 4 04	<50	50	50	450	450
	S 4 09	50	50	50	150	450
	S 4 14	<50	<50	50	450	1350
	S 4 16	<50	<50	150	50	450
Vehículo	S 5 05	<50	<50	<50	<50	N/A*
	S 5 15	<50	<50	<50	<50	<50

\* N/A: sin muestra de suero para este punto de tiempo

5 Los resultados anteriores muestran que el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S tiene una actividad de la enzima PAL in vivo que es comparable a la AvPAL pegilada tipo salvaje. Debido a que AvPAL no pegilada de tipo salvaje no tenía actividad de la enzima PAL detectable in vivo (véase el Ejemplo 8 en la solicitud de patente de Estados Unidos Número 11/451.999 presentada el 12 de junio de 2006), se concluye que las variantes AvPAL, incluyendo el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado, AvPAL\_C565SC503S, y el AvPAL pegilado tipo salvaje tienen mayor actividad de conversión de fenilalanina que la de AvPAL tipo salvaje.

10 Los resultados anteriores muestran también que la variante AvPAL pegilada, que tiene menor agregación de proteínas in vitro debido a sustituciones de cisteína con serina en ambas posiciones 503 y 565, tiene menor inmunogenicidad en comparación con el AvPAL pegilado tipo salvaje. Debido a que la propia pegilación está asociada con una menor inmunogenicidad, se concluye que las variantes AvPAL tienen menor inmunogenicidad en comparación con la del AvPAL de tipo salvaje in vivo.

#### Ejemplo 15

15 Toxicidad/Estudios farmacocinéticos de las formas pegiladas de las variantes AvPAL (Mutantes de cisteína) en macacos cangrejeros y ratas

Se realizaron estudios de toxicidad y farmacocinéticos para determinar el efecto de la administración de una dosis única de una forma pegilada de una variante del polipéptido AvPAL (por ejemplo, con la sustitución de serina de los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565) en macacos cangrejeros y en ratas.

20 El mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se preparó como se describe en el Ejemplo 7.

#### Estudio de toxicidad de macacos cangrejeros/farmacocinético

25 Este estudio utilizó 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 inyección subcutánea única del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S en solución a 4, 12 y 60 mg/kg, respectivamente. Las muestras de plasma se recogieron 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, por lo que se terminó la porción del Grupo 4 de este estudio.

30 La Figura 20A muestra la concentración del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S en el plasma en diversos momentos después de una única inyección subcutánea a 4 y 12 mg/kg. Los datos muestran la eliminación monofásica del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S. Un modelo de compartimento individual con absorción de primer orden parece describir el perfil en plasma del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S después de una única inyección subcutánea.

35 La Figura 20B muestra las concentraciones de Phe y el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S en el plasma en diversos momentos después de una única inyección subcutánea a 4 mg/kg. A esta dosis, la concentración de Phe en plasma se redujo por debajo del límite de cuantificación en el ensayo de GC/MS a las 24 horas, y la caída de plasma Phe se mantuvo durante 10 días.

#### Estudio de toxicidad/farmacocinético en rata

40 Este estudio utilizó ocho (8) grupos de ratas, con 3 machos y 3 hembras en los grupos de placebo, y 6 hombres y 6 mujeres en los grupos de prueba. Los grupos 1 y 5 recibieron inyecciones por vía intravenosa y subcutánea única de placebo. Los grupos 2, 3 y 4 recibieron inyecciones intravenosas únicas del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S a 1, 5 y 25 mg/kg, respectivamente. Los Grupos 6, 7 y 8 recibieron inyecciones subcutáneas únicas del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S a 10, 25 y 250 mg/kg, respectivamente. Las muestras de sangre se recogieron de las ratas antes de la dosis, y a varios momentos después de la dosis, de 1 a 360 horas. En cada tiempo de recogida, se recogió sangre de 3 ratas en cada grupo. No se observó toxicidad en las ratas en este estudio.

45 La Figura 21A muestra la concentración del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S en el plasma en diversos momentos después de una única inyección intravenosa a 1, 5 y 25 mg/kg. Los datos muestran la eliminación monofásica del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S del plasma después de una sola inyección intravenosa.

50 La Figura 21B muestra la concentración del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S en el plasma en diversos momentos después de una única inyección subcutánea a 10, 25 y 250 mg/kg. Un modelo de compartimento individual con absorción de primer orden parece describir el perfil en plasma del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S después de una única inyección subcutánea.

La Tabla 8 muestra los parámetros farmacocinéticos del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S después de una única inyección intravenosa o subcutánea.

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos del mutante de cisteína doble pegilado AvPAL\_C565SC503S después de una única dosis intravenosa o subcutánea

Vía de administración	Dosis (mg/kg)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng-h/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> * (h)	F (%)
Intravenosa	1	657131	12600	4,5	27,9	—
	5	3579327	87667	2	39,1	—
	25	10860907	202238	9,0	30,4	—
Subcutánea	10	1304016	16674	18,0	46,9	19,7
	25	2290754	29260	42,0	21,0	12,5 <sup>#</sup>
	250	37254683	225200	72,0	62,8	34,0

5 \*Para la vía de administración subcutánea, el t<sub>1/2</sub> terminal es más largo que por vía intravenosa; esto puede ser debido a una menor tasa de absorción de los tejidos subcutáneos que la velocidad de eliminación (de modo que el t<sub>1/2</sub> observado es en realidad de absorción).

#La biodisponibilidad a partir de datos de AUC intravenosa a 25 mg/kg es 21,5%.

10 No parece haber ninguna diferencia de género en este estudio farmacocinético. AUC<sub>inf</sub> y C<sub>max</sub> eran aproximadamente proporcionales a la dosis, tanto para las vías de administración intravenosa y subcutánea.

Estudios de toxicidad de dosis múltiple en ratas y macacos cangrejeros

La seguridad del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S fue evaluada en estudios de toxicidad de dosis repetidas en ratas y monos macacos cangrejeros.

15 Las ratas administradas hasta con 25 mg/kg del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S dos veces por semana, por vía subcutánea durante 28 días no mostraron toxicidad.

20 Los macacos cangrejeros administrados con dosis de hasta 1 mg/kg del mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S dos veces por semana, por vía subcutánea durante 28 días no mostraron una toxicidad significativa. Se observó una disminución dependiente de la dosis en los niveles plasmáticos de Phe después de la primera dosis; sin embargo, después de la séptima dosis, los niveles plasmáticos de Phe volvieron a la línea base en todos los grupos de dosis, lo que indica una respuesta de anticuerpos posible hacia la enzima administrada. Se observaron mínimos títulos de IgG anti-AvPAL\_C565SC503S en la mayoría de los animales tratados con 1 mg/kg en el día 28. No se observaron títulos de IgM en ningún animal en el estudio en el día 28.

Ejemplo 16

Formulaciones de PAL procariotas ejemplares

25 El siguiente ejemplo proporciona una guía sobre los parámetros que se utilizarán para formular composiciones que comprenden PAL procariota o fragmentos biológicamente activos, el mutante, las variantes o los análogos de los mismos, que son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por niveles elevados de fenilalanina, por ejemplo, HPA, incluyendo PKU, y otros trastornos, incluyendo el cáncer. Los parámetros que se utilizarán para formular composiciones PAL procariotas incluyen, pero no se limitan a, agentes tampón para  
30 mantener el pH, agentes de ajuste de isotonicidad, ausencia o presencia de estabilizadores, y ausencia o presencia de otros excipientes, vehículos, diluyentes y similares.

35 En el Ejemplo 11, el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se formuló a una concentración de aproximadamente 12 a 20 mg/ml (aproximadamente 0,2- 0,33 mM). Una variante PAL procariota se formula a una concentración que varía de aproximadamente 1 a 50 mg/ml (de aproximadamente 0,016 a 0,8 mM), tal como de aproximadamente 5 a 20 mg/ml (de aproximadamente 0,08-0,33 mM), o de aproximadamente 5 a 15 mg/ml (de aproximadamente 0,08 a 0,25 mM). Una formulación ejemplar de las composiciones PAL procariotas proporcionadas en este documento tiene una concentración de la enzima PAL de aproximadamente 10 +/- 5 mg/ml (aproximadamente de 0,16 +/- 0,08 mM).

40 En el Ejemplo 11, el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S fue formulado en Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM a pH 7,0, 7,5 y 8,0. Un agente tampón ejemplar es Tris-HCl, o su equivalente, con una concentración que varía de 5 a 50 mM, tal como de 5 a 20 mM, o de 5 a 15 mM. Una formulación ejemplar de las

composiciones PAL procariotas proporcionadas en este documento tiene una concentración de tampón Tris-HCl de aproximadamente 10 +/- 5 mM.

5 Un pH de ejemplo de la composición farmacéutica es de aproximadamente pH 6,0 a 8,5, tal como de aproximadamente pH 7,0 a 8,0, o aproximadamente pH 7,0 a 7,6. Una formulación ejemplar de las composiciones PAL procariotas proporcionadas en este documento tiene un pH de aproximadamente pH 7,3 +/- 0,3.

Un agente de ajuste de isotonicidad ilustrativo es el NaCl, o su equivalente, con una concentración que varía de aproximadamente 100 a 200 mM, tal como de aproximadamente 130 a 170 mm, o de aproximadamente 130 a 150 mM. Una formulación ejemplar de las composiciones PAL procariotas proporcionadas en este documento tiene una concentración de NaCl de aproximadamente 140 +/- 10 mM.

10 Como se muestra en el Ejemplo 11, el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se estabilizó en presencia de Phe, y algunos de sus análogos estructurales, incluyendo, por ejemplo, t-CA y ácido benzoico; Tyr tenía un efecto estabilizador mínimo en la enzima PAL. Un estabilizador ejemplar es Phe, o análogo estructural de los mismos, con un intervalo para el estabilizador de aproximadamente 0,1 a 20 moles de estabilizador por mol de sitio activo de PAL procariota, tal como de aproximadamente 0,5 a 10 moles de estabilizador por mol de sitio activo de PAL procariota, o de aproximadamente 1 a 10 moles de estabilizador por mol del sitio activo de PAL procariota. Una formulación ejemplar de las composiciones PAL procariotas proporcionadas en este documento tiene una concentración de estabilizador de aproximadamente de 5 +/- 4 moles de estabilizador por mol de sitio activo de PAL procariota.

20 El mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S no se estabilizó significativamente a pH < 7 o pH > 7,6, o en presencia de EDTA, aminoguanidina o Tween 80; el ácido ascórbico antioxidante y la metionina desestabilizaron la enzima PAL (el Ejemplo 11 y los datos no se muestran). Sin embargo, las composiciones proporcionadas en este documento pueden incluir uno o más de estos ingredientes.

25 Las composiciones PAL procariotas se pueden preparar como formulaciones líquidas, pero también se pueden preparar como formulaciones sólidas (por ejemplo, liofilizadas). En tal caso, los excipientes, por ejemplo, agentes de carga, tales como manitol y/o sacarosa, se pueden añadir. En el Ejemplo 12, el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se formuló y se liofiliza en Tris-HCl 10 mM, 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 de sacarosa. Una formulación liofilizada del ejemplo comprende manitol a una concentración de aproximadamente 1 a 5% (p/v) o de 10 a 50 mg/ml, tal como de aproximadamente 2 a 4%, o de aproximadamente 2 a 3%. Otra formulación liofilizada comprende manitol y sacarosa, con una concentración de manitol de aproximadamente 1 a 5% (p/v) (o de 10 a 50 mg/ml), tal como de aproximadamente 1 a 3%, o de aproximadamente 1,5 a 2,5%; y una concentración de sacarosa de aproximadamente 0,1 a 2% (p/v) (o de 0,1 a 2 mg/ml), tal como de aproximadamente 0,2% a 1%, o de aproximadamente 0,3% a 0,7%. Sin embargo, otra formulación liofilizada de las composiciones PAL procariotas tiene una concentración de manitol de aproximadamente 2,5 +/- 0,5% de manitol o 2,0 +/- 0,5% de manitol más 0,5 +/- 0,2% de sacarosa.

En consecuencia, un ejemplo de formulación de las composiciones PAL procariotas proporcionadas en este documento se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Formulaciones ejemplares de variantes PAL procarióticas

Clase de ingrediente	Tipo de ingrediente	Intervalo de concentración
Variante PAL procariota	AvPAL_C565SC503S pegilado	10 +/- 5 mg/mL (0,16 +/- 0,08 mM)
Agente tampon	Tris-HCl	10 mM +/- 5 mM, y pH 7,3 +/- 0,3
Agente de ajuste de isotonicidad	NaCl	140 mM +/- 10 mM
Estabilizante	Phe, t-CA, o ácido benzoico	5 +/- 4 moles de estabilizante por mol de sitio activo de PAL
Otros excipientes, agentes de carga*	Mannitol +/- Sacarosa	2,5 +/- 0,5% (p/v) manitol; 2,0 +/- 0,5% (p/v) manitol + 0,5 +/- 0,2% (p/v) sacarosa

\*Para formulaciones de PAL procariotas liofilizadas

40 Ejemplo 17

Formulaciones ejemplares de variantes AvPAL PEGiladas

El siguiente ejemplo proporciona ejemplos de formulaciones de composiciones que comprenden una variante AvPAL pegilada, es decir, el mutante de cisteína doble AvPAL\_C565SC503S, que es útil para el tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por niveles elevados de fenilalanina, por ejemplo, HPA, incluyendo PKU y otros trastornos, incluyendo el cáncer. Los parámetros que se pueden utilizar para formular composiciones PAL procariotas incluyen, pero no se limitan a, agentes tampón para mantener el pH, agentes de ajuste de isotonicidad, la ausencia o presencia de estabilizadores, y la ausencia o presencia de otros excipientes, vehículos, diluyentes, y similares, por ejemplo, un conservante o un agente anti-microbiano. Se entiende que estas formulaciones son aplicables a otras variantes AvPAL pegiladas, tales como otros mutantes de cisteína AvPAL como se describe en el presente documento.

En el Ejemplo 13, el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se formuló a una concentración de aproximadamente 8-20 mg/ml (aproximadamente 0,13- 0,33 mM). Una variante AvPAL pegilada se formula a una concentración que varía de aproximadamente 1 a 50 mg/ml (de aproximadamente 0,016 a 0,8 mM), tal como de aproximadamente 5 a 20 mg/ml (de aproximadamente 0,08-0,33 mM), o de aproximadamente 5 a 15 mg/ml (de aproximadamente 0,08 a 0,25 mM). Una formulación de las composiciones de la variante AvPAL pegilada proporcionados en este documento tiene una concentración de enzima de aproximadamente 10 +/- 5 mg/ml (de aproximadamente 0,16 +/- 0,08 mM).

En el Ejemplo 13, el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S fue formulada en Tris-HCl 10 mM, NaCl 135 mM a pH 7,3. Un agente tampón ejemplar para las formulaciones proporcionadas en este documento es Tris-HCl, o su equivalente, con una concentración que varía de 5 a 50 mM, tal como de 5 a 20 mM, o de 5 a 15 mM. Una formulación de las composiciones de la variante AvPAL proporcionadas en este documento tiene una concentración de tampón Tris-HCl de aproximadamente 10 +/- 5 mM.

Un pH de ejemplo de la composición farmacéutica es de aproximadamente pH 6,0 a 8,0, tal como de aproximadamente pH 6,5 a 7,5, o de aproximadamente pH 7,0-7,6. Una formulación de las composiciones de la variante AvPAL proporcionadas en este documento tiene un pH de aproximadamente pH 7,3 +/- 0,3.

Un agente de isotonicidad de ajuste ilustrativo es el NaCl, o su equivalente, con una concentración que varía de aproximadamente 100 a 200 mM, tal como de aproximadamente 120 a 170 mm, o de aproximadamente 120 a 150 mM. Una formulación de las composiciones de la variante AvPAL proporcionada en este documento tiene una concentración de NaCl de aproximadamente 135 +/- 15 mM.

Como se muestra en el Ejemplo 13, el mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado AvPAL\_C565SC503S se estabilizó en presencia de una combinación de un conservante o un agente anti-microbiano, es decir, m-cresol, y dos estabilizadores, es decir, Phe y Gly. Un conservante ejemplar es m-cresol o un análogo estructural del mismo, con un intervalo para el conservante de aproximadamente 0,1% a 1% (p/v), tal como de aproximadamente 0,1% a 0,5% (p/v), o de aproximadamente 0,3 % a 0,5% (p/v). Una formulación de las composiciones de la variante AvPAL tiene una concentración de conservante de aproximadamente de 0,4% +/- 0,1% (p/v). Estabilizadores ejemplares son Phe o un análogo estructural del mismo y/o Gly o un análogo estructural del mismo, con un intervalo de Phe o del análogo estructural de aproximadamente 0,1 a 10 mM, tal como de aproximadamente 0,5 a 5 mM, o de aproximadamente 0,5 a 1,5 mM, y con un intervalo de Gly o del análogo estructural de aproximadamente 0,1 a 100 mM, tal como de aproximadamente 1,0 a 100 mM, de aproximadamente 1,0 a 20 mM, o de aproximadamente 20 a 100 mM. Una formulación de las composiciones de la variante AvPAL proporcionadas en este documento tiene una concentración de Phe de aproximadamente 1,0 +/- 0,5 mM y Gly de aproximadamente 50,5 +/- 49,5 mM. Otra formulación de las composiciones de la variante AvPAL proporcionadas en este documento tiene una concentración de Phe de aproximadamente 1,0 +/- 0,5 mM y Gly de aproximadamente 10,5 +/- 9,5 mM. Otra formulación de las composiciones de la variante AvPAL proporcionadas en este documento tiene una concentración de Phe de aproximadamente 1,0 +/- 0,5 mM y Gly de aproximadamente de 60 +/- 40 mM.

En consecuencia, un ejemplo de formulación de las composiciones de la variante AvPAL pegilada proporcionadas en este documento se muestra en la Tabla 10. Se debe entender que la presencia del conservante, es decir, m-cresol, es opcional en esta formulación ejemplar.

Tabla 10: Formulaciones ejemplares de mutantes de cisteína de AvPAL pegilados

Clase de ingrediente	Tipo de ingrediente	Intervalo de concentración
Variante AvPAL	AvPAL_C565SC503S pegilado	10 +/- 5 mg/mL (0,16 +/- 0,08 mM)
Agente tampon	Tris-HCl	10 mM +/- 5 mM, y pH 7,3 +/- 0,3
Agente de ajuste de isotonicidad	NaCl	135 mM +/- 15 mM
Conservante	m-Cresol	0,4% +/- 0,1% (w/v)

Clase de ingrediente	Tipo de ingrediente	Intervalo de concentración
Estabilizante	Phe	1 mM +/- 0,5 mM
Estabilizante	Glicina	50,5 mM +/- 49,5 mM

## Ejemplo 18

## Producción de variantes AvPAL con menor agregación

5 El control de la agregación es una preocupación en la producción y la formulación de terapias basadas en proteínas, en particular cuando la propia proteína es inmunogénica. Se desarrolló un proceso de producción que permitía la fabricación a gran escala de una variante de polipéptido de AvPAL pegilada (por ejemplo, con la sustitución de serina de los restos de cisteína en las posiciones 503 y 565) con agregación mínima. Como se usa en este documento, "agregación mínima" significa que la relación de la variante AvPAL agregada (es decir, la forma que se eluye de la SE-HPLC antes de la forma tetramérica) frente a la variante AvPAL no agregada (es decir, la forma tetramérica) es menor de 1%, tal como menos de 0,5%, menos de 0,2%, o menos de 0,1%.

10 Durante el desarrollo de un proceso de producción para la fabricación a gran escala de una variante de polipéptido de AvPAL pegilado, se encontró que la enzima era susceptible a la precipitación y a la agregación. Los precipitados se pueden eliminar por filtración, aunque pueden volver a formarse fácilmente. El uso apropiado de filtros y de algunos detergentes no iónicos puede resolver el problema de la precipitación. Se identificaron dos tipos de agregados solubles: agregados de 100 nm muy grande que son detectados por dispersión de luz dinámica y que pueden ser eliminados por filtración; y agregados más pequeños que son detectados por SE-HPLC y que no se pueden eliminar por filtración. Se tomaron las medidas adecuadas para reducir o minimizar la presencia de precipitados y agregados en el proceso de producción.

15 Un diagrama de flujo que representa un proceso de producción ilustrativo para la fabricación a gran escala del mutante de cisteína doble de AvPAL AvPAL\_C565SC503S se muestra en la Figura 22. Las flechas que apuntan hacia la izquierda indican los pasos de producción en los que se logró una reducción de la agregación del mutante de cisteína doble de AvPAL AvPAL\_C565SC503S, incluyendo, de arriba a abajo: (a) el orden de las etapas de cromatografía durante la purificación de la enzima; (b) la adición de un crioprotector antes de la congelación-descongelación de la enzima purificada; (c) el uso de diversos excipientes y etapas de filtración; y (d) la elección de condiciones de tampón y el uso de excipientes durante el proceso de pre-PEGilación de la enzima purificada. Cada uno de los pasos en un proceso de producción a modo de ejemplo para el mutante de cisteína doble de AvPAL AvPAL\_C565SC503S se resume a continuación.

20 Fermentación. Se descongeló un vial de semillas de células BLR(DE3)/pLysS (Novagen) que expresaban el polipéptido de la variante AvPAL AvPAL\_C565SC503S (véase el Ejemplo 7), se transfirió a un matraz de 2,8 litros que contenía aproximadamente 500 ml de medio de cultivo, y se incubó a 37°C con agitación hasta que se alcanzó una densidad celular de 2-4 OD<sub>600</sub>. El matraz de siembra se transfirió a un primer biorreactor (fermentador de 4L), y la fermentación se desarrolló a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad celular de 10 a 20 OD<sub>600</sub>. El cultivo del primer biorreactor (fermentación de 4L) se transfirió a un segundo biorreactor (fermentador de 100L), y la fermentación se desarrolló a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad celular de al menos 200 OD<sub>600</sub>. El caldo de cultivo se enfrió a 15°C, y las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación usando una centrífuga CEPA Z61 o una centrífuga de discos continua CSC-6 Westfalia. La pasta de células se congeló a -80°C. El proceso anterior puede ser ampliado para un tercer biorreactor (por ejemplo, un fermentador de producción de 500L o mayor).

25 Lisis celular. La pasta de células congeladas se descongeló y se resuspendió en un tampón a temperatura ambiente de Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0 para generar una suspensión celular con una densidad de aproximadamente 120 a 140 OD<sub>600</sub>. Las células fueron lisadas por homogeneización mediante dos pases a través de un homogeneizador Niro NS30006 a 700-800 Bar en el que la temperatura se controló por debajo de 30°C. Se controló la temperatura del lisado para asegurar que se mantenía por debajo de 50°C durante el proceso de homogeneización.

30 Etapa térmica. Después de la homogeneización, la temperatura del lisado celular se ajustó a 20°C, y el pH se ajustó a aproximadamente 8,0 por la adición de NaOH 1N. El lisado celular se calentó suavemente a 65°C, se mantuvo a 65°C durante 30 a 120 minutos, y después se enfrió a 15°C.

35 Centrifugación y filtración. El lisado celular calentado se clarificó por centrifugación usando una centrífuga CEPA Z61 o una centrífuga de discos continua Westfalia CSC-6. El sobrenadante que contiene el polipéptido de la variante AvPAL soluble se conservó, y el sedimento lisado insoluble se desechó. El lisado tratado térmicamente clarificado de la centrífuga Westfalia tenía suspendido partículas que contaminaron los filtros corriente abajo. Después de probar una variedad de filtros, un sistema de filtración adecuado para procesar 250 L del lisado aclarado tratado con calor fue identificado: caudal 150 LMH del lisado tratado con calor aclarado en serie a través de (a) filtro de profundidad

Cuno R55SP Zetacarbon de 1,3 m<sup>2</sup>, 0,5-1,0 µm, (b) filtro de profundidad basado en una sola capa de celulosa de 7,5 m<sup>2</sup> Pall KS50P, 0,4-0,8 µm, (c) filtro de profundidad basado en una sola capa de celulosa de 7,5 m<sup>2</sup> Pall EKMP, 0,2-0,5 µm, y (d) 6,6 m<sup>2</sup> filtro de grado esterilizante PES/PVDF de doble capa Pall EDF, 0,2 µm.

5 Cromatografía AIEX y cromatografía HIC. El polipéptido de la variante AvPAL AvPAL\_C565SC503S se purificó a partir del lisado tratado con calor aclarado por el paso secuencial a través de una columna de interacción hidrófoba (HIC) y una columna de intercambio de aniones (AIEX) como se describe en el Ejemplo 2, excepto que la resina de la columna AIEX se cambió de MacroPrep High Q a Toyopearl Giga Cap Q 650M (TPGQ, Tosoh Biosciences), y el orden de las columnas se invirtió de manera que la columna de TPGQ AIEX fue la primera y la columna HIC de Toyopearl Butyl 650M (TPB, Tosoh Biosciences) fue la segunda. Se debe apreciar que otras resinas de columna de AIEX y HIC se pueden utilizar, y que la columna HIC se puede sustituir por una cromatografía de exclusión por tamaños.

10 El lisado tratado con calor clarificado se diluyó 2X en Tris-HCl 25 mM, pH 7,8, y se cargó en una columna TPGQ AIEX equilibrada en Tris-HCl 25 mM, pH 7,8. La columna se lavó con Tris-HCl 25 mM, NaCl 130 mM, pH 7,8, y AvPAL\_C565SC503S se eluyó usando un gradiente de 130 a 1000 mM de NaCl en Tris-HCl 25 mM, pH 7,8. Las fracciones que contenían AvPAL\_C565SC503S se reunieron y se diluyeron 2 veces con Tris-HCl 25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 M, pH 6,5, y se cargaron en una columna HIC de TPB equilibrada en Tris-HCl 25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,64 M, pH 6,5. La columna se lavó con Tris-HCl 25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,58 M, pH 6,5, y la AvPAL\_C565SC503S se eluyó utilizando un gradiente de 0,58 M a 0 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en Tris-HCl 25 mM, pH 6,5. Se reunieron las fracciones que contenían AvPAL\_C565SC503S.

20 En esta etapa del proceso de producción, AvPAL\_C565SC503S purificado mostró un alto nivel de pureza, determinado por ELISA de proteína de la célula huésped anti-E. coli (ECP), por SDS-PAGE seguido por tinción de Coomassie, tinción de plata, transferencia Western anti-AvPAL y transferencia Western anti-ECP y mediante SE-HPLC. La inversión del orden de las columnas de manera que la columna HIC seguía a la columna AIEX, producía una reducción de la agregación del AvPAL\_C565SC503S purificado, como se determina por SE-HPLC. En tres pasadas, fueron detectados agregados de 0,07% +/- 0,03% (relación en porcentaje de la enzima agregada respecto a la no agregada (es decir, tetramérica)) en el AvPAL\_C565SC503S purificado después de la columna HIC, en comparación con 7,58% +/- 1,68% después de la columna AIEX.

30 AvPAL a granel (almacenamiento congelado). Después de la elución de la columna HIC, el AvPAL\_C565SC503S purificado típicamente se almacena congelado. Para la fabricación a gran escala, el AvPAL\_C565SC503S a granel purificado se congeló en nitrógeno líquido usando etapas de temperatura discretas, y después se almacenó a aproximadamente -30°C o a una temperatura inferior, por ejemplo, a aproximadamente -70°C o aproximadamente -80°C. Una congelación controlada dio lugar a una menor agregación de la enzima en comparación con la congelación no controlada. La adición de azúcares o polioles, incluyendo glicerol al 5%, 10%, 15%, sacarosa al 10%, sorbitol al 10%, al AvPAL\_C565SC503S a granel purificado antes de la congelación dio como resultado una menor agregación después de la descongelación. Debe apreciarse que la adición de uno o más azúcares o polioles, tales como, por ejemplo y sin limitación, glicerol, sacarosa, trehalosa, glicerina, sorbitol, manitol y similares, a varias concentraciones que van desde 5% a 20% (v/v para líquidos y p/v para polvos), al AvPAL\_C565SC503S a granel purificado antes de la congelación da lugar a una menor agregación tras la descongelación.

40 Se llevaron a cabo estudios a pequeña escala para determinar si el AvPAL\_C565SC503S a granel purificado podía concentrarse antes de la congelación, sin afectar negativamente a la integridad o a la actividad específica de la enzima, o a la cantidad de agregación.

45 Una preparación de AvPAL\_C565SC503S purificado en Tris-HCl 25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ~0,24 M, pH 6,5 se ajustó a una concentración final de glicerol al 10% (v/v), se dividió en alícuotas en botellas, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C. El AvPAL\_C565SC503S a granel congelado se descongeló en un baño de agua a 30°C, se filtró a través de un filtro de vacío de 0,2 µm PES y se concentró por ultrafiltración utilizando una membrana de Hydrosart de peso molecular de corte 30 kDa (Sartorius). Se concentró AvPAL\_C565SC503S por ultrafiltración. Se retiraron alícuotas cuando la enzima fue concentrada 2X, 4X, 8X y 16X, lo que resulta en concentraciones de enzima de 2,5 mg/ml hasta aproximadamente 35 mg/ml. Las muestras retiradas para su análisis se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm de Acrodisk Supor, congeladas a -80°C, almacenadas durante tres días, y se descongelaron en un baño de agua a 30°C. A juzgar por la recuperación de proteínas, la recuperación de la actividad específica, la integridad de la proteína y el nivel de agregación después de la congelación-descongelación, la concentración de AvPAL\_C565SC503S a granel no dio lugar a ningún efecto perjudicial sobre la enzima.

55 AvPAL a granel (descongelado). Para la fabricación a gran escala, se descongela el AvPAL\_C565SC503S congelado a granel purificado en etapas discretas controladas. Una descongelación controlada dio lugar a una menor agregación de la enzima en comparación con un deshielo no controlado.

Ultrafiltración/diafiltración. Una serie de etapas de filtración se llevaron a cabo con el fin de concentrar el AvPAL\_C565SC503S purificado a granel con la agregación mínima antes de la pegilación. El AvPAL\_C565SC503S descongelado purificado a granel se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio seguido de un filtro de nylon para eliminar los agregados grandes. El AvPAL\_C565SC503S a granel filtrado purificado se sometió a

5 ultrafiltración/diafiltración para concentrar la enzima a aproximadamente 75 mg/ml. El tampón de diafiltración original de fosfato de potasio (KPi) 200 mM, pH 8,5, pero fue cambiado a 50 mM de fosfato potásico (KPi), mM de ácido trans-cinámico 10 (t-CA), 5% de glicerol, pH 8,5. Se encontró que la reducción en la concentración de KPi y la adición de t-CA y glicerol dio como resultado la reducción de la agregación de proteínas como se detecta por SE-HPLC. Otros tampones, tales como carbonato y borato, y otras sales de fosfato, tales como fosfato de sodio (NaPi), se pueden utilizar, siempre que la concentración de tampón se mantiene tan baja como sea compatible con el proceso de pegilación posterior.

Después de la ultrafiltración/diafiltración, el AvPAL\_C565SC503S a granel purificado se volvió a filtrar a través de un filtro de fibra de vidrio seguido de un filtro de nylon.

10 El AvPAL\_C565SC503S ultrafiltrado/diafiltrado se ajustó a aproximadamente 60 mg/mL en KPi 200 mM, t-CA 8 mM, 4% de glicerol, 0,02% de polisorbato 80 (PS80), pH 8, y después se filtró a través de un filtro de PVDF. Se encontró que la adición de PS80 evitaba la formación de precipitados de proteínas. Se pueden utilizar otros detergentes no iónicos para prevenir la precipitación, tal como polisorbato 20 (PS20), Brij 35, y similares.

15 Adición de NHS-PEG. El AvPAL\_C565SC503S purificado fue pegilado básicamente como se describe en el Ejemplo 6, excepto que las concentraciones se ajustaron como consecuencia del aumento de la concentración de enzima anterior. La mezcla de reacción de pegilación final fue 15 mg/ml de AvPAL\_C565SC503S, PEG activado con NHS (NOF) de 20 kDa 13,1 mM, t-CA 1,5 mM y 0,005% de PS80. Después de 3 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó a una concentración de enzima de aproximadamente 2,3 mg/ml, y se inactivó por adición de un tampón Tris/NaCl.

20 Eliminación de PEG libre y formulación final. El PEG libre fue retirado del AvPAL\_C565SC503S pegilado por ultrafiltración/diafiltración básicamente como se describe en el Ejemplo 6 y después se formuló básicamente como se describe en los Ejemplos 11 y 13.

25 Principio activo a granel formulado de AvPAL\_C565SC503S pegilado (PEG-PAL FBDS) (congelado de almacenamiento). El AvPAL\_C565SC503S pegilado formulado se congeló y almacenó a -70°C. El producto farmacéutico formulado final tiene una concentración de enzima de 10 mg/ml con la agregación mínima.

#### Ejemplo 19

##### Evaluación clínica con composiciones de PAL procariotas

30 El siguiente ejemplo proporciona una guía de los parámetros que se utilizan para la evaluación clínica de las composiciones que comprenden PAL procariota o variantes biológicamente activas, mutantes y fragmentos de los mismos ("PAL procariota") en los métodos terapéuticos de los proporcionados en este documento. Como se discutió en otra parte, PAL procariota se puede utilizar en el tratamiento de HPA, PKU leve y PKU clásico. Los ensayos clínicos que se llevarán a cabo proporcionarán una evaluación de las dosis orales o subcutáneas de PAL procariota respecto a la seguridad, farmacocinética y la respuesta inicial de ambos criterios de valoración clínicos sustitutos y definidos. El ensayo se llevará a cabo durante un mínimo, pero no necesariamente limitado a 24 semanas para recoger suficiente información de seguridad para 100 pacientes evaluables. La dosis inicial para los ensayos variará de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg/kg/semana. En el caso de que esta dosis no produzca una reducción en los niveles de Phe en exceso en el plasma en un paciente, o produzca un beneficio clínico directo significativo, medido como la capacidad de aumentar la ingesta diaria oral de Phe sin aumentar los niveles plasmáticos de Phe, la dosis se puede aumentar cuando sea necesario y mantenerse por un período adicional de un mínimo, pero necesariamente limitado a 24 semanas para establecer la seguridad y para evaluar mejor la eficacia.

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

##### Métodos

50 Los pacientes que tienen niveles elevados de Phe en plasma se comparan con una línea de base de una historia clínica y un examen físico, pruebas neuropsicológica y cognitivas, un conjunto estándar de pruebas clínicas de laboratorio (CBC, Panel 20, CH50, UA), niveles de pterinas urinarias, niveles de dihidropteridina reductasa (DHPR) y un análisis de sangre en ayunas (plasmática) de aminoácidos en suero. Al paciente se le sigue de cerca con visitas semanales a la clínica. Los pacientes vuelven a la clínica para una evaluación completa una semana después de completar el período de tratamiento. Si se requiere un aumento de la dosis, los pacientes siguen el mismo horario indicado anteriormente. La seguridad será objeto de seguimiento durante todo el ensayo.

55 Diagnóstico y criterios de inclusión/exclusión

5 El paciente puede ser varón o mujer, con un diagnóstico documentado de HPA o PKU leve confirmado mediante pruebas genéticas y evidencia de niveles elevados de fenilalanina en la sangre. El estudio incluye pacientes de PKU o HPA que no siguen exactamente el control dietético. Las mujeres pacientes en edad fértil deben presentar una prueba de embarazo negativa ( $\beta$ -hCG de orina) justo antes de cada dosis y se debe aconsejar el uso de un método anticonceptivo médicamente aceptado durante todo el estudio. Si la paciente está embarazada o en periodo de lactancia será excluida de este estudio; si ha recibido un fármaco en investigación en los 30 días anteriores a la inclusión en el estudio; o tiene una condición médica, enfermedad intercurrente grave u otra circunstancia atenuante que pueda disminuir significativamente el cumplimiento del estudio.

#### Intervención dietética

10 Tras el período de asignación al azar inicial y de dos semanas de tratamiento, todos los participantes del estudio se someterán a asesoramiento dietético y seguirán una dieta estándar y/o una dieta restringida en Phe estándar complementada con alimentos médicos específicos de Phe durante un total de cuatro a seis semanas. Las dietas serán administradas en el hogar y se anotará la ingesta dietética en los registros diarios. Los análisis de la ingesta de nutrientes y alimentos médicos y el porcentaje de Ingesta Diaria Recomendada (IDR) se comparan entre los  
15 grupos de tratamiento.

#### Seguridad de PAL procariota

20 La terapia PAL procariótica será determinada que es segura si no hay reacciones agudas o crónicas frente a fármacos significativas durante el curso del estudio. La administración a largo plazo del fármaco será determinada que es segura si no se observan alteraciones significativas en los exámenes clínicos, de laboratorio clínicos u otros estudios adecuados.

#### Ejemplo 20

##### Evaluación clínica de una variante AvPAL pegilada

25 El mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado, AvPAL\_C565SC503S, será evaluado clínicamente en seres humanos. El objetivo de la evaluación clínica es determinar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética (PK) y eficacia en los pacientes de PKU. Los niveles de fenilalanina en sangre servirán como criterio de valoración clínica.

#### Fase 1

30 La Fase 1 es un estudio abierto, de aumento de dosis única de 35 pacientes de PKU con edades comprendidas entre los 16 y los 50 años. El objetivo principal es evaluar la seguridad y tolerabilidad de mutante de cisteína doble de AvPAL pegilado, AvPAL\_C565SC503S, y los objetivos secundarios son evaluar el PK de la enzima pegilada y la reducción de Phe. A siete cohortes de 5 sujetos se les administra secuencialmente dosis crecientes de 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 y 1 mg/kg de AvPAL\_C565SC503S pegilado. Los sujetos en cada cohorte reciben una dosis única y, a continuación, se hace un seguimiento durante un total de 6 semanas. Los criterios de inclusión es que los niveles de fenilalanina en la sangre en el cribado y el nivel medio de Phe en sangre durante los últimos 3 años sea > 600  $\mu$ M.

#### 35 Fase 2

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

- Parte 1 - administración de 16 semanas - 8 semanas, a continuación, dosis de optimización
- Parte 2 - Extensión de 40 semanas

40 La fase 2 es un estudio de optimización de la dosis abierto, de dos partes en 35 pacientes con fenilcetonuria. La Parte 1, llevada a cabo durante un período de 16 semanas de duración, implica la administración de dosis de AvPAL\_C565SC503S pegilado una vez por semana durante 8 semanas, seguido de un período de optimización de la dosis. La dosis de cada sujeto se ajusta para alcanzar concentraciones de Phe en sangre por debajo de 600  $\mu$ M. El objetivo principal es evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la administración múltiple del AvPAL\_C565SC503S pegilado y los objetivos secundarios son evaluar los efectos de la enzima pegilada a las concentraciones sanguíneas  
45 de fenilalanina, la respuesta inmune, por ejemplo, los títulos de anticuerpos anti-AvPAL y el PK en estado estacionario. En la parte 2, a los sujetos se les administra AvPAL\_C565SC503S pegilado durante 40 semanas, con dosis optimizada individualizada y frecuencia de administración.

#### Fase 3

50 Una vez que los estudios de fase 1 y 2 se han completado, otros estudios pueden incluir potencialmente un estudio a doble ciego en Fase 3 de seis meses en un mayor número de sujetos, con estudios adicionales en poblaciones especiales, tales como, por ejemplo y sin limitación pacientes sin PKU HPA, pacientes PKU que responde a BH4 y pacientes PHU que no responden a BH4.

La aplicación revela, entre otros, los siguientes elementos:

1. Una formulación que comprende:
  - (a) una variante de fenilalanina amoniaco-liasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) pegilada en la que los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID NO: 11), comprendiendo dicha variante AvPAL polietilenglicol; en la que la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1: 3, y
  - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende: (i) Tris-HCl, (ii) NaCl, (iii) L-fenilalanina (Phe) y (iv) glicina (Gly).
2. La formulación del punto 1, en donde la concentración de la variante AvPAL pegilada es de aproximadamente 5 a 15 mg/ml.
3. La formulación de los puntos 1 ó 2 en donde la concentración de Tris-HCl es de aproximadamente 5 a 15 mM.
4. La formulación de cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde la concentración de NaCl es de aproximadamente 120 a 150 mM.
5. La formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde la concentración de Phe es de aproximadamente 0,5 a 1,5 mM.
6. La formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde la concentración de Gly es de aproximadamente 1,0 a 100 mM, de aproximadamente 1,0 a 20 mM, o de 20 a 100 mM.
7. La formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde el pH de la formulación es de aproximadamente 6,5 a 7,5.
8. La formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde el pH de la formulación es de aproximadamente 7,0 a 7,6.
9. La formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 8, que comprende además m-cresol como conservante.
10. La formulación del punto 9, en donde la concentración de m-cresol es de aproximadamente 0,3% a 0,5% (p/v).
11. Una formulación que comprende:
  - (a) una variante AvPAL pegilada en la que los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID NO: 11), comprendiendo dicha variante AvPAL polietilenglicol; en la que la proporción de variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1:3, y
  - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende: (i) Tris-HCl, (ii) NaCl, (iii) Phe y (iv) Gly, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 7,3 +/- 0,3.
12. La formulación del punto 11, en donde la concentración de la variante AvPAL pegilada es de aproximadamente 10 +/- 5 mg/ml.
13. La formulación del punto 11 ó 12, en donde la concentración de Tris-HCl es de aproximadamente 10 +/- 5 mM.
14. La formulación de cualquiera de los puntos 11 a 13, en donde la concentración de NaCl es de aproximadamente 135 +/- 15 mM.
15. La formulación de uno cualquiera de los puntos 11 a 14, en donde la concentración de Phe es de aproximadamente 1,0 +/- 0,5 mM y la concentración de Gly es de aproximadamente 50,5 +/- 49,5 mM, aproximadamente 10,5 +/- 9,5 mM o aproximadamente 60 +/- 40 mM.
16. La formulación de uno cualquiera de los puntos 11 a 15, que comprende además m-cresol como conservante.
17. La formulación del punto 16, en donde la concentración de m-cresol es de aproximadamente 0,4% +/- 0,1% (p/v).
18. Una formulación que comprende:
  - (a) una variante AvPAL pegilada en la que los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID NO: 11), comprendiendo dicha variante AvPAL polietilenglicol; en la que la proporción de variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1: 3, y
  - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende: (i) aproximadamente 10 +/- 5 mM de Tris-HCl; (ii) aproximadamente 135 +/- 15 mM de NaCl; (iii) aproximadamente 1 +/- 0,5 mM de Phe; (iv) aproximadamente 50,5

+/- 49,5 mM, o aproximadamente 10,5 +/- 9,5 mM, o aproximadamente 60 +/- 40 mM de Gly; y (v) aproximadamente 0,4% +/- 0,1% (p/v) de m-cresol como conservante,

en el que la formulación tiene un pH de aproximadamente 7,3 +/- 0,3.

5 19. La formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 18, donde la vida útil ( $T_{90}$ ) de la variante AvPAL pegilada se incrementa entre 1,5 veces y 10 veces a una temperatura de entre 4°C y 42°C, en comparación con una formulación de la variante AvPAL pegilada correspondiente en ausencia de Phe.

20. La formulación del punto 19, donde la  $T_{90}$  de la variante AvPAL pegilada se incrementa entre 4 veces y 5 veces a 25°C, entre 2 y 3 veces a 37°C, entre 2 y 3 veces a 42°C, o una combinación de los mismos.

10 21. Un método para purificar una variante de fenilalanina amoniaco-liasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) pegilada con una agregación mínima que comprende:

(a) lisar células bacterianas que contienen la variante AvPAL por homogeneización para generar un lisado celular;

(b) calentar el lisado celular a 65°C durante 30 a 120 minutos;

(c) centrifugar el lisado celular calentado, en el que se retiene un sobrenadante que comprende la variante AvPAL;

(d) filtrar el sobrenadante para eliminar los precipitados;

15 (e) separar la variante AvPAL de las proteínas contaminantes mediante cromatografía secuencial sobre una columna de intercambio aniónico (AIEX) seguido de una columna de interacción hidrófoba (HIC), en donde el eluato de la columna HIC comprende la variante AvPAL;

(f) ultrafiltrar o ultrafiltrar/diafiltrar el eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL;

(g) pegar la variante AvPAL mezclando polietilenglicol con la variante AvPAL;

20 (h) eliminar el polietilenglicol libre de la variante AvPAL pegilada mediante ultrafiltración/diafiltración; y

(i) formular la variante AvPAL pegilada,

en la que los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID N°: 11), comprendiendo dicha variante AvPAL polietilenglicol.

22. El método del punto 21, en el que la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es aproximadamente 1:3.

25 23. El método del punto 21, en el que la columna AIEX es una columna Toyopearl Giga Cap Q 650M.

24. El método del punto 21, en el que la columna HIC es una columna Toyopearl Butyl 650M.

30 25. El método del punto 21, que comprende además congelar y descongelar el eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL obtenida en la etapa (e), en la que uno o más polioles o azúcares seleccionados del grupo que consiste en glicerol, sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol y sorbitol se agregan al eluato de la columna HIC antes de la congelación.

26. El método del punto 25, en el que el poliol es glicerol.

27. El método del punto 26, en el que la concentración de glicerol es 10% (v/v).

28. El método del punto 25, en el que el azúcar es sacarosa.

29. El método del punto 28, en el que la concentración de sacarosa es 10% (v/v).

35 30. El método del punto 25, en el que la congelación del eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL se realiza en etapas discretas de temperatura.

31. El método del punto 25, en el que el descongelamiento del eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL se realiza en etapas discretas de temperatura.

40 32. El método del punto 25, en el que la congelación y descongelación del eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL se realiza en etapas discretas de temperatura.

33. El método del punto 21, en el que un tampón de diafiltración en la etapa (f) comprende fosfato de potasio (KPi) y uno o más agentes que consisten en ácido transcinámico (t-CA) y glicerol.

34. El método del punto 33, en el que el tampón de diafiltración comprende 50 mM de KPi, 10 mM de t-CA, 5% de glicerol, pH 8,5.

35. El método del punto 21, en el que se añade un detergente no iónico al eluato ultrafiltrado o ultrafiltrado/diafiltrado de la columna HIC que comprende la variante AvPAL obtenida en la etapa (f).
36. El método del punto 35, en el que el detergente no iónico es polisorbato 80 (PS80).
37. El método del punto 36, en el que la concentración de PS80 es del 0,02%.
- 5 38. Un método para purificar una variante de fenilalanina amoniaco-liasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) con una agregación mínima que comprende:
- (a) lisar células bacterianas que expresan la variante AvPAL por homogeneización para generar un lisado celular;
- (b) calentar el lisado celular a 65°C durante 30 a 120 minutos;
- (c) centrifugar el lisado celular calentado, en el que se retiene un sobrenadante que comprende la variante AvPAL;
- 10 (d) filtrar el sobrenadante para eliminar los precipitados; y
- (e) separar la variante AvPAL de las proteínas contaminantes mediante cromatografía secuencial sobre una columna de intercambio aniónico (AIEX) seguido de una columna de interacción hidrófoba (HIC), donde el eluato de la columna HIC comprende la variante AvPAL,
- 15 en donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID NO: 11).
39. El método del punto 38, en el que la columna AIEX es una columna Toyopearl Giga Cap Q 650M.
40. El método del punto 38, en el que la columna HIC es una columna Toyopearl Butyl 650M.
41. Un método para tratar una enfermedad causada, en todo o en parte, por una deficiencia en fenilalanina hidroxilasa (HAP), que comprende administrar a un sujeto que tiene una deficiencia en HAP una cantidad efectiva de la formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 20 o una formulación que comprende la variante AvPAL pegilada purificada de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 21 a 37.
- 20 42. El método del punto 41, en el que la enfermedad se caracteriza por niveles elevados de fenilalanina.
43. El método del punto 41 ó 42, en el que dicho sujeto tiene aproximadamente 10% o menos de una actividad de PAH normal.
- 25 44. Un método para tratar un sujeto que tiene fenilcetonuria (PKU), que comprende administrar a dicho sujeto la formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 20 o una formulación que comprende la variante AvPAL pegilada purificada de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 21 a 37, en donde la administración de la variante AvPAL es eficaz para disminuir la concentración de fenilalanina en el plasma de dicho sujeto en comparación con dicha concentración en ausencia de dicha administración.
- 30 45. El método de uno cualquiera de los puntos 41 a 44, en el que dicho sujeto tiene una PAH mutante.
46. El método del punto 45, en el que dicha PAH mutante comprende una mutación en el dominio catalítico de PAH.
47. El método del punto 46, en el que dicha mutación comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M E390G, A395P, P407S y Y414C.
- 35 48. Un método para tratar a una mujer embarazada que tiene hiperfenilalaninemia (HPA), que comprende administrar a dicha mujer la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o una formulación que comprende la variante AvPAL pegilada purificada de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 21 a 37 en combinación con una dieta restringida en proteínas, en la que la administración combinada de la formulación y la dieta restringida en proteínas es eficaz para disminuir la concentración de fenilalanina en plasma de dicha hembra
- 40 en comparación con dicha concentración en ausencia de dicha administración combinada.
49. Un método para tratar concentraciones elevadas de fenilalanina en plasma, que comprende administrar a un sujeto que tiene fenilalanina plasmática elevada la formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 20 o una formulación que comprende la variante AvPAL pegilada purificada según uno cualquiera de los puntos 21 a 37 en una cantidad efectiva para producir una disminución en la concentración de fenilalanina en plasma de dicho sujeto.
- 45 50. Un método para tratar un bebé que tiene PKU, que comprende administrar a dicho bebé la formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 20 o una formulación que comprende la variante AvPAL pegilada purificada de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 21 a 37 en una cantidad efectiva para producir una disminución en la concentración de fenilalanina en plasma de dicho bebé, en el que dicho bebé tiene entre 0 y 3 años de edad, y en el

que la concentración de fenilalanina en plasma de dicho bebé está entre aproximadamente 360  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 4800  $\mu\text{M}$ .

- 5 51. Un método para disminuir la concentración de fenilalanina en plasma de un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de la formulación de cualquiera de los puntos 1 a 20 o una formulación que comprende la variante AvPAL pegilada purificada de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 21 a 37.
52. El método del punto 51, en el que la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto es superior a aproximadamente 200  $\mu\text{M}$  antes de la administración de la formulación.
53. El método del punto 51 ó 52, en el que la cantidad efectiva disminuye la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto en un 10% o más.
- 10 54. El método de uno cualquiera de los puntos 51 a 53, en el que el sujeto tiene una deficiencia en la actividad de PAH.
55. El método de uno cualquiera de los puntos 51 a 54, en el que el sujeto tiene una PAH mutante.
56. El método del punto 55, en el que la PAH mutante comprende una mutación en el dominio catalítico de PAH.
- 15 57. El método del punto 56, en el que dicha mutación comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M E390G, A395P, P407S y Y414C.
58. El método de uno cualquiera de los puntos 51 a 57, que comprende además administrar al sujeto una dieta restringida en proteínas.
59. El método de uno cualquiera de los puntos 51 a 58, en el que el sujeto tiene PKU.
- 20 60. El método del punto 59, en el que la PKU es una PKU clásica grave.
61. El método de uno cualquiera de los puntos 51 a 60, en el que el sujeto es una mujer embarazada.
62. El método del punto 61, que comprende además administrar a la mujer una dieta restringida en proteínas.
63. El método de uno cualquiera de los puntos 51 a 60, en el que el sujeto tiene entre 0 y 3 años de edad.
- 25 64. Un método para tratar un sujeto que tiene cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 20 o una formulación que comprende la variante AvPAL pegilada purificada de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 21 a 37.
65. El método del punto 64, en donde la cantidad efectiva disminuye la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del sujeto en un intervalo que va desde debajo del nivel de detección a entre 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\mu\text{M}$ .
- 30 66. El método del punto 64 ó 65, en el que el cáncer es un cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, mieloma, cáncer pediátrico o cáncer resistente.
67. El método del punto 64 ó 65, en el que el cáncer es un melanoma metastásico.
- 35 68. El método de uno cualquiera de los puntos 64 a 67, en el que la proliferación y/o supervivencia de las células derivadas del cáncer es sensible a la restricción o agotamiento de la fenilalanina.
69. El método de uno cualquiera de los puntos 64 a 68, que comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico contra el cáncer o un agente terapéutico contra el cáncer específico.
- 40 70. El método de cualquiera de los puntos 64 a 69, que comprende además administrar al sujeto una dieta restringida en proteínas.
71. El método de uno cualquiera de los puntos 64 a 70, en el que la cantidad efectiva disminuye la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del sujeto en un intervalo que va desde por debajo del nivel de detección a menos de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ .
- 45 72. El método de uno cualquiera de los puntos 64 a 71, en donde la cantidad efectiva disminuye la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del sujeto en un intervalo que va desde por debajo del nivel de detección a menos de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ .

73. Un método para disminuir la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma de un sujeto que tiene cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación de uno cualquiera de los puntos 1 a 20 o una formulación que comprende la variante AvPAL pegilada purificada según cualquiera de los puntos 21 a 37.
- 5 74. El método del punto 73, en el que la cantidad efectiva disminuye la concentración de fenilalanina en sangre, suero o plasma del sujeto en un intervalo que va desde por debajo del nivel de detección a entre 20  $\mu$ M y 60  $\mu$ M.
75. El método de uno cualquiera de los puntos 41 a 74, en el que el sujeto es un ser humano.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> BioMarin Pharmaceutical Inc.
- 5 <120> Composiciones de variantes de fenilalanina amoniaco-liasa procariotas y métodos de uso de sus composiciones
- <130> 103017PCEPT1
- 10 <140> Solicitud de la patente divisional basada en la EP 11740323.8  
<141> 02-03-2011
- <150> 61/301,478  
<151> 02-04-2010
- 15 <160> 33
- <170> PatentIn versión 3.4
- 20 <210> 1  
<211> 1710  
<212> ADN  
<213> Nostoc punctiforme
- <400> 1
- |               |            |            |             |            |             |      |
|---------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| atgaatataa    | catctctaca | acagaacata | acgcgttctt  | ggcaaatacc | tttcactaat  | 60   |
| agttcagatt    | caatcgtaac | tgtaggcgat | cgcaatctga  | caatcgacga | ggttgtaaat  | 120  |
| gttgctcgtc    | atggaacaca | ggtgcgctta | actgataatg  | cagatgtcat | tcgggggtgt  | 180  |
| caagcatcct    | gtgattacat | taacaatgca | gtcgaacacag | cacagccaat | ttacgggggtg | 240  |
| acatctggct    | ttggcgggat | ggcagatggt | gtcatctctc  | gcgaacaagc | agcggaaactt | 300  |
| cagactaatt    | taatttggtt | tctgaaatcc | ggcgcaggaa  | acaaattatc | gtagcagac   | 360  |
| gtgctgacag    | ctatgctcct | acgtgcaaat | tcacatttgt  | atggtgctgc | tggtatacga  | 420  |
| ctcgaactta    | ttcagcggat | tgaaactttc | ctcaacgctg  | gcgtgacacc | ccatgtctat  | 480  |
| gagtttggtc    | ctatcgggtc | tagcggcgat | ttggtgccat  | tatcctacat | tactggggca  | 540  |
| ctaactcggc    | tagatcctag | ctttacagtt | gacttcgacg  | gtaaagaaat | ggatgccggt  | 600  |
| acagccttgt    | ctcgtttggg | tttgccaaag | ttgcaattgc  | aaccgaaaga | aggtttagca  | 660  |
| atgatgaatg    | gcacctcagt | catgacaggt | attgcagcta  | actgtgtgta | cgatgcgaaa  | 720  |
| gttttgctcg    | ctctgacaat | gggtgtacac | gccttagcca  | tccaaggttt | atacggaacg  | 780  |
| aatcaatcct    | tccaccctgt | tattcatcag | tgcaagccac  | atcccggcca | actatggaca  | 840  |
| gcagatcaaa    | tgttttctct | gctgaaagat | tcactcttag  | ttcgtgaaga | ggtgatggt   | 900  |
| aaacacgaat    | accgtggtaa | agatctgata | caggatcggt  | attctctccg | ctgtctggca  | 960  |
| cagttcatag    | ggccaatcgt | tgatggggta | tcagagatta  | ccaagcaaat | cgaggtagaa  | 1020 |
| atgaactcag    | tcaccgataa | cccattgatt | gatgtcgaga  | accaagttag | ttatcacggc  | 1080 |
| 25 ggcaattttc | tcggacagta | tgtgggtgtg | acaatggatc  | gcctacgtta | ttacataggg  | 1140 |

ES 2 690 542 T3

ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac 1200  
 ggcttaccac cctcttttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt 1260  
 ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctgttgagct tctatggaaa ttccttagcc 1320  
 gatcgctttc ctaccacgc cgagcaatth aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt 1380  
 tccgcaaatt tgacacgtcg ttccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg 1440  
 atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaaaggtca ttatgatgca 1500  
 cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga 1560  
 aagccactaa cgtctgtgcy tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag 1620  
 catattgccc ggatttcagc tgatatacgt ggtggtggtt taattgtgca agcagttgag 1680  
 catatTTTTT cgagcttaaa gtcaacgtaa 1710

<210> 2

<211> 569

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

5

<400> 2

Met Asn Ile Thr Ser Leu Gln Gln Asn Ile Thr Arg Ser Trp Gln Ile 15  
 1 5 10  
 Pro Phe Thr Asn Ser Ser Asp Ser Ile Val Thr Val Gly Asp Arg Asn  
 20 25 30  
 Leu Thr Ile Asp Glu Val Val Asn Val Ala Arg His Gly Thr Gln Val  
 35 40 45  
 Arg Leu Thr Asp Asn Ala Asp Val Ile Arg Gly Val Gln Ala Ser Cys  
 50 55 60  
 Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Thr Ala Gln Pro Ile Tyr Gly Val  
 65 70 75 80  
 Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asp Val Val Ile Ser Arg Glu Gln  
 85 90 95  
 Ala Ala Glu Leu Gln Thr Asn Leu Ile Trp Phe Leu Lys Ser Gly Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Lys Leu Ser Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg  
 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

10

ES 2 690 542 T3

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  
 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

ES 2 690 542 T3

<210> 3  
 <211> 1704  
 <212> ADN  
 <213> Anabaena variabilis

5

<400> 3  
 atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga 60  
 aattcttctg ccaatgtaat tattgtaat cagaactca caatcaatga tgttgcaagg 120  
 gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggtatt 180  
 caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg 240  
 acatctgggt ttggcgggat ggccaatggt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc 300  
 caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc cttggcggat 360  
 gtgcgcgag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcatc tggcatcaga 420  
 ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgat 480  
 gagtttggtt caattgggtc aagtgtgat ttagtgccac tatcctacat tactggttca 540  
 ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gtaaagaat ggatgcgcca 600  
 acagctctac gtcaactgaa tttgtcacc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg 660  
 atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgctgcta cgatactcaa 720  
 attttaactg cgatcgctat gggcgttcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc 780  
 aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggtca attatgggca 840  
 gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gtttagatggt 900  
 aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcactccg atgccttccc 960  
 cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaat tgaaatcgaa 1020  
 atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga 1080  
 ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgctta ctatattggg 1140  
 ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat 1200  
 ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaaggt 1260  
 ctgcaaatat gcggttaactc aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc 1320  
 gatcgctttc ctaccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact 1380  
 tcagcgactc tagcccgcg ttctgtggat atcttcaga attatgtggc gatcgctctg 1440  
 atgtttggag tccaagctgt tgacctcgcg acatataaaa agactggtca ttacgatgca 1500  
 cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga 1560  
 caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag 1620  
 catattgccc ggatttctgc tgatatcgtt gctggtggtg tgattgtgca agcagttcaa 1680  
 gatattctac cctgcttgca ttaa 1704

10

<210> 4  
 <211> 567  
 <212> PRT  
 <213> Anabaena variabilis

15

<400> 4

ES 2 690 542 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg  
115 120 125

Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile  
130 135 140

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr  
145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr  
165 170 175

Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe  
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu  
195 200 205

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly  
210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln  
225 230 235 240

ES 2 690 542 T3

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  
 485 490 495

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

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

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

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

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His

565

- 5 <210> 5
- <211> 523
- <212> PRT
- <213> Streptomyces maritimus

- 10 <400> 5

ES 2 690 542 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ile Thr Pro Ala Asn Leu Asp Lys Leu Val Ala Val Leu Asn  
115 120 125

Ala Gly Ile Val Pro Cys Ile Pro Glu Lys Gly Ser Leu Gly Thr Ser  
130 135 140

Gly Asp Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ala Leu Val Cys Ala Gly Gln  
145 150 155 160

Trp Lys Ala Arg Tyr Asn Gly Gln Ile Met Pro Gly Arg Gln Ala Leu  
165 170 175

Ser Glu Ala Gly Val Glu Pro Met Glu Leu Ser Tyr Lys Asp Gly Leu  
180 185 190

Ala Leu Ile Asn Gly Thr Ser Gly Met Val Gly Leu Gly Thr Met Val  
195 200 205

Leu Gln Ala Ala Arg Arg Leu Val Asp Arg Tyr Leu Gln Val Ser Ala  
210 215 220

Leu Ser Val Glu Gly Leu Ala Gly Met Thr Lys Pro Phe Asp Pro Arg  
225 230 235 240

Val His Gly Val Lys Pro His Arg Gly Gln Arg Gln Val Ala Ser Arg  
245 250 255

Leu Trp Glu Gly Leu Ala Asp Ser His Leu Ala Val Asn Glu Leu Asp  
260 265 270

Thr Glu Gln Thr Leu Ala Gly Glu Met Gly Thr Val Ala Lys Ala Gly  
275 280 285

ES 2 690 542 T3

Ser Leu Ala Ile Glu Asp Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Thr Pro Gln Ile  
 290 295 300

Leu Gly Pro Val Val Asp Val Leu Asp Arg Ile Gly Ala Thr Leu Gln  
 305 310 315 320

Asp Glu Leu Asn Ser Ser Asn Asp Asn Pro Ile Val Leu Pro Glu Glu  
 325 330 335

Ala Glu Val Phe His Asn Gly His Phe His Gly Gln Tyr Val Ala Met  
 340 345 350

Ala Met Asp His Leu Asn Met Ala Leu Ala Thr Val Thr Asn Leu Ala  
 355 360 365

Asn Arg Arg Val Asp Arg Phe Leu Asp Lys Ser Asn Ser Asn Gly Leu  
 370 375 380

Pro Ala Phe Leu Cys Arg Glu Asp Pro Gly Leu Arg Leu Gly Leu Met  
 385 390 395 400

Gly Gly Gln Phe Met Thr Ala Ser Ile Thr Ala Glu Thr Arg Thr Leu  
 405 410 415

Thr Ile Pro Met Ser Val Gln Ser Leu Thr Ser Thr Ala Asp Phe Gln  
 420 425 430

Asp Ile Val Ser Phe Gly Phe Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Glu Val  
 435 440 445

Leu Thr Asn Ala Ala Tyr Val Val Ala Phe Glu Leu Leu Cys Ala Cys  
 450 455 460

Gln Ala Val Asp Ile Arg Gly Ala Asp Lys Leu Ser Ser Phe Thr Arg  
 465 470 475 480

Pro Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Lys Ile Val Pro Phe Phe Asp Arg Asp  
 485 490 495

Glu Thr Ile Thr Asp Tyr Val Glu Lys Leu Ala Ala Asp Leu Ile Ala  
 500 505 510

Gly Glu Pro Val Asp Ala Ala Val Ala Ala His  
 515 520

<210> 6

<211> 510

5 <212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 6

Met Thr Glu Leu Thr Leu Lys Pro Gly Thr Leu Thr Leu Ala Gln Leu  
 1 5 10 15

Arg Ala Ile His Ala Ala Pro Val Arg Leu Gln Leu Asp Ala Ser Ala  
 20 25 30

Ala Pro Ala Ile Asp Ala Ser Val Ala Cys Val Glu Gln Ile Ile Ala  
 35 40 45

Glu Asp Arg Thr Ala Tyr Gly Ile Asn Thr Gly Phe Gly Leu Leu Ala

10

ES 2 690 542 T3

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



ES 2 690 542 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 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  
 485 490 495

ES 2 690 542 T3

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

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

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

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

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His  
 565

<210> 8

<211> 567

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sustitución de cisteína a serina en la posición 318 en una PAL de Anabaena variabili

<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

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

ES 2 690 542 T3

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

5 <210> 9  
 <211> 567

ES 2 690 542 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <223> Sustitución de cisteína a serina en la posición 503 en una PAL de *Anabaena variabilis*

<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 80  
 Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln  
 85 90 95  
 Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg  
 115 120 125  
 Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile  
 130 135 140  
 Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr  
 145 150 155 160  
 Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr  
 165 170 175  
 Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe  
 180 185 190  
 Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu  
 195 200 205  
 Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly  
 210 215 220  
 Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln



ES 2 690 542 T3

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg  
 115 120 125

Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile  
 130 135 140

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr  
 145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr  
 165 170 175

Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe  
 180 185 190

Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu  
 195 200 205

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly  
 210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln  
 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

ES 2 690 542 T3

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  
 485 490 495

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

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

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

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

Asp Ile Leu Pro Ser Leu His  
 565

<210> 11

<211> 567

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 11

ES 2 690 542 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg  
115 120 125

Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile  
130 135 140

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr  
145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr  
165 170 175

Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe  
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu  
195 200 205

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly  
210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln  
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

ES 2 690 542 T3

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  
 485 490 495

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

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

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

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

Asp Ile Leu Pro Ser Leu His  
 565

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

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

10 <400> 12  
 cactgtcata tgaatataac atctctacaa cagaacat 38

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

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

# ES 2 690 542 T3

<400> 13  
 gacagtggcg gccgctcacg ttgactttaa gctcgaaaaa atatg      45

5    <210> 14  
      <211> 38  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial

10   <220>  
      <223> Cebador 1 de PAL de Anabaena variabilis (directo, fragmento N-terminal)

     <400> 14  
      cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag      38

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

20   <220>  
      <223> Cebador 2 de PAL de Anabaena variabilis (inverso, fragmento N-terminal)

     <400> 15  
      ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggg tatcaacatc aattagtgg      49

25   <210> 16  
      <211> 49  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial

30   <220>  
      <223> Cebador 3 de PAL de Anabaena variabilis (directo, fragmento C-terminal)

     <400> 16  
      ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc      49

35   <210> 17  
      <211> 41  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial

40   <220>  
      <223> Cebador 4 de PAL de Anabaena variabilis (inverso, fragmento C-terminal)

45   <400> 17  
      cactgtgcbg cgcctaatg caagcagggt aagatatctt g      41

     <210> 18  
      <211> 35  
 50   <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial

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

55   <400> 18  
      cactgtcata tgaagacact atctcaagca caaag      35

     <210> 19  
 60   <211> 36  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial

     <220>  
 65   <223> Cebador inverso de PAL de Anabaena variabilis

# ES 2 690 542 T3

<400> 19  
 cactgtctcg agatgcaagc aggtaagat atcttg            36

5    <210> 20  
      <211> 38  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial

10   <220>  
      <223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear el sitio 5' NheI y borrar el sitio NheI interno (directo, N-terminal)

15   <400> 20  
      cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag            38

     <210> 21  
      <211> 49  
      <212> ADN  
 20   <213> Secuencia Artificial

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

25   <400> 21  
      ggaaattcc tccatgatag ctggcttgg tcaacaatc aattagtgg            49

30   <210> 22  
      <211> 49  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial

     <220>  
 35   <223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear el sitio 5' NheI y borrar el sitio NheI interno (directo, fragmento C-terminal)

     <400> 22  
 40   ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaattcc            49

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

45   <220>  
      <223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear el sitio 5' NheI y borrar el sitio NheI interno (inverso, fragmento C-terminal)

50   <400> 23  
      acagtgccgg ccgctaatg caagcagggt aagatatctt g            41

     <210> 24  
      <211> 38  
 55   <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial

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

60   <400> 24  
      cactgtgaat tcatgaagac actatctcaa gcacaaag            38

     <210> 25  
 65   <211> 37  
      <212> ADN

# ES 2 690 542 T3

<213> Secuencia Artificial

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

5  
<400> 25  
cactgtcccg ggtaatgca agcagggtaa gatatct 37

10  
<210> 26  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15  
<220>  
<223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 503 (directo)

20  
<400> 26  
gtcattacga tgcacgcgcc tctctatcac ctgcaactga g 41

25  
<210> 27  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30  
<220>  
<223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 503 (inverso)

35  
<400> 27  
ctcagttgca ggtgatagag aggcgcgtgc atcgtaatga c 41

40  
<210> 28  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45  
<220>  
<223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 565 (directo)

50  
<400> 28  
cagtcaaga tatcttacc tccttgatt aacccgggct gc 42

55  
<210> 29  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

60  
<220>  
<223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 565 (inverso)

65  
<400> 29  
gcagcccggg ttaatgcaag gagggtaaga tatcttgaac tg 42

70  
<210> 30  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

75  
<220>  
<223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 64 (directo)

80  
<400> 30

# ES 2 690 542 T3

gcagggtatt caggcatctt ctgattacat taataatgct gttg 44

<210> 31  
<211> 44  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 64 (inverso)

<400> 31  
caacagcatt attaatgtaa tcagaagatg cctgaatacc ctgc 44

15 <210> 32  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Cebador de PAL de Anabaena variabilis para crear la sustitución de cisteína a serina en la posición 318 (directo)

<400> 32  
25 caagatcgtt actcactccg atcccctccc cagtatttgg ggc 43

<210> 33  
<211> 43  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia Artificial

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

35 <400> 33  
gccccaaata ctggggaagg gatcggagtg agtaacgatc ttg 43

40

## REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar una variante de fenilalanina amoniaco-liasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) con una agregación mínima que comprende:
- (a) lisar células bacterianas que contienen la variante AvPAL por homogeneización para generar un lisado celular;
- 5 (b) calentar el lisado celular a 65°C durante 30 a 120 minutos;
- (c) centrifugar el lisado celular calentado, en el que se retiene un sobrenadante que comprende la variante AvPAL;
- (d) filtrar el sobrenadante para eliminar los precipitados; y
- (e) separar la variante AvPAL de las proteínas contaminantes mediante cromatografía secuencial sobre una columna de intercambio aniónico (AIEX) seguido de una columna de interacción hidrófoba (HIC), donde el eluato de la
- 10 columna HIC comprende la variante AvPAL,
- en donde los residuos de cisteína en las posiciones 503 y 565 de dicha variante AvPAL han sido sustituidos por residuos de serina (SEQ ID NO: 11).
2. El método de la reivindicación 1, en el que el método es un método para purificar una variante de fenilalanina amoniaco-liasa de *Anabaena variabilis* (AvPAL) con agregación mínima y en el que el método comprende
- 15 adicionalmente:
- (f) ultrafiltrar o ultrafiltrar/diafiltrar el eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL;
- (g) pegilar la variante AvPAL mezclando polietilenglicol con la variante AvPAL;
- (h) eliminar el polietilenglicol libre de la variante de AvPAL pegilada mediante ultrafiltración/diafiltración; y
- (i) formular la variante de AvPAL pegilada, en la que dicha variante de AvPAL comprende polietilenglicol.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en el que la relación de la variante AvPAL y el polietilenglicol es de aproximadamente 1:3.
4. El método de la reivindicación 2 ó 3, que comprende además congelar y descongelar el eluato de la columna de HIC que comprende la variante AvPAL obtenida en la etapa (e), en donde uno o más polioles o azúcares seleccionados del grupo que consiste en glicerol, sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol y sorbitol se agregan al
- 25 eluato de la columna de HIC antes de la congelación.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el poliol es glicerol, preferiblemente en el que la concentración de glicerol es 10% (v/v).
6. El método de la reivindicación 4 ó 5, en donde el azúcar es sacarosa, preferiblemente en donde la concentración de sacarosa es 10% (v/v).
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la congelación o descongelación del eluato de la columna HIC que comprende la variante de AvPAL se realizan en etapas discretas de temperatura.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la congelación y descongelación del eluato de la columna HIC que comprende la variante AvPAL se realizan en etapas discretas de temperatura.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que un tampón de diafiltración en la etapa (f) comprende fosfato de potasio (KPi) y uno o más agentes que consisten en ácido transcinámico (t-CA) y glicerol, preferiblemente en el que el tampón de diafiltración comprende 50 mM de KPi, 10 mM de t-CA, 5% de glicerol, pH 8,5.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que se añade un detergente no iónico al eluato ultrafiltrado o ultrafiltrado/diafiltrado de la columna de HIC que comprende la variante de AvPAL obtenida en la etapa
- 40 (f).
11. El método de la reivindicación 10, en el que el detergente no iónico es polisorbato 80 (PS80), preferiblemente en el que la concentración de PS80 es del 0,02%.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la columna AIEX es una columna Toyopearl Giga Cap Q 650M.
- 45 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la columna HIC es una columna Toyopearl Butyl 650M.

Secuencia del gen de PAL de *Nostoc punctiforme*

1 atgaataaa catctctaca acagaacata acggttctt ggcaataacc tticactaat  
 61 agttcagatt caatcgtaac tgtaggcat cgaatciga caatcgacga gttgtataat  
 121 gttgctcgtc atggaacaca ggtgcctta acigataatg cagatgcat tcgggggtt  
 181 caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtgaaacag cacagccaat ttacgggggtg  
 241 acatctggct ttggcggtat ggcagatggt gtcatctctc gcgaacaagc agcggaaactt  
 301 cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgcaggaa acaattatc gttagcagac  
 361 gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacattigt atggtcgctc tggatatacga  
 421 ctggaactta ttcagcggat tgaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat  
 481 gagtttggct ctatcgggtc tagcggcgtat ttggtgccat tatcctacat tactggggca  
 541 ctaatcggtc tagatcctag ctttacagtt gaectcgacg gtaagaaaat ggatgccgtt  
 601 acagccttgt gcaectcagt ttgccaagg ttgcaatgc aaccgaaaga aggtttagca  
 661 atgatgaatg gcaectcagt catgacaggt atgacagcta actgtgtga cgatgcgaaa  
 721 gttttgctcg ctctgacaat ggggtiacac gccttagcca tccaaggttt atacggaacg  
 781 aatcaatctt tccaccggtt tattcatcag tgaagccac atcccggta actatggaca  
 841 gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcacttttag ttctgaaaga gttggatggt  
 901 aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca  
 961 cagttcatag ggccaatcgt tgatgggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa

FIG.1A

Secuencia del gen de PAL de *Nostoc punctiforme*

```

1021 atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgctgaga accaagttag ttatcacggc
1081 ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg
1141 ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctgcceaga gtttagcaac
1201 ggcttaccac cctcttttagt tggtaaatagc gatcgcaaaag ttaataatggg actcaaaaggt
1261 ttgcaaatca gtgaaactc gattatgcca ctgttgagct tctatggaaa tccctagccc
1321 gatcgctttc ctaccacgc cgagcaattt aatcaaaaata ttaacagcca aggctatatt
1381 tccgcaaat ttacacgtcg tcccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcgttg
1441 atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaagggtca ttatgatgca
1501 cgtacatgcc tctcaccxaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga
1561 aagccactaa cgtctgtgcg tceatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag
1621 catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtggtggtt taattgtgca agcagttgag
1681 catatttttt cgagcttaaa gtcaacgtaa
    
```

FIG. 1A-1

**Secuencia de proteina de PAL de Nostoc punctiforme**

MWITSLQQNITRSWQIPIFTNSSDSIVTVGDRNLTIDEVVNVARH  
 GTQVRLTDNADVIRGVQASCDYINNAVETAQPIYGVTSFGFGMADWISREQAAELQT  
 NLIMFLKSGAGNKLSLADVRAAMLLRANSHLYGASGIRLELIQRITETFLNAGVTIPHY  
 EFGSIGASGDLVPLSYITGALIGLDPSTVDFDGKEMDAVTALSRGLPKLQLQPKEG  
 LAMNGTSMGTIAANCYDAKVLALLTMGVHALAIQGLYGTNQSFFPFIHQCKPHPG  
 QLWTADQMFSLKDOSSLVREELDGKHEYRGKDLIQDRYSLRCLAQFIGPIVDGVSEIT  
 KQIEVEMNSVTDNPLIDVENQVSYHGGNFGQYVGVTMDRLYRYIGLLAKHIDVQIAL  
 LVSPEFSNGLPPSLVGNDRKVNMGKGLQISGNSIMPLL SFYGNSLADRFPPTHAEQF  
 NQINISQGYISANLTRRSVDIFQNYMAIALMFGVQAVDLRTYKMKGHYDARTCLSPNT  
 VQLYTAVCEVVGKPLTSVRPYIIMDNEOCLDEHIA RISADIAGGGLIVOAVEHIFSSL  
 KST

**FIG. 1 B**

Secuencia del gen de PAL de *Anabaena variabilis*

```

1   atgaagacac  tatctcaagc  acaaagcaaa  accctcatctc  aacaattttc  ttttactgga
61  aattcttctg  ccaatgtaat  tattgtaaat  cagaactca   ccaatcaatga  tgttgcaagg
121 gtagcgcgta  atggcacctt  agtgtcttta  accaataaca  ctgatatttt  gcagggtatt
181 caggcatctt  gtgattacat  taataatgct  gttgaatctg  gggaaaccaat  ttatggagtg
241 acatctgggt  ttggcgggat  ggccaatggt  gccatatccc  gtgaacaagc  atcigaactc
301 caaaccaact  tagtttgggt  cctgaaaaaa  ggtgcagggg  acaaatfacc  ctggcgggat
361 gtgcgcgag  ctatgctctt  gcgtgcaaac  tctcatatgc  gcggtgcatac  tggcatcaga
421 ttagaactta  tcaagcgtat  ggagattttc  cttaacgctg  gtgtcacacc  atatgtgtat
481 gagtttgggt  caattggtgc  aagtgtgtat  ttatgcccac  tatcctacat  tacttggtca
541 ctgataggct  tagatccccg  tttaagggt  gacttcaacg  gtaaagaaat  ggatgcgcca
601 acagctctac  gtcaactgaa  ttgtcacacc  ttgacattgt  tgccgaagga  aggcttggcg
661 atgatgaacg  gcacttcagt  catgacaggt  attgcagcaa  actgcttcta  cgatactcaa
721 attttaactg  cgatcgctat  gggcgttcac  gctctagata  tccaagcttt  aaacggaacc
781 aatcaatcat  tccatccatt  tatccataat  tccaaccac  atcctggtca  attatgggca
841 gcagatcaga  tgatttcttt  gttagccaat  tcccagttag  ttcgtgatga  gttagatggt
901 aaacacgatt  atcgtgatca  cgagttgatt  caagatcgtt  actcactccg  atgccttccc
961 cagtatttgg  ggccaatcgt  tgatggaatt  tcccagattg  ccaaaacaat  tgaaatcgaa

```

FIG.2A

Secuencia del gen de PAL de *Anabaena variabilis*

```

1021 atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga
1081 ggaatattcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgta ctatattggg
1141 ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat
1201 ggaactaccac catctttatt aggcaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaaagg
1261 ctgcaaatat gcgtaactc aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc
1321 gatcgcttc ctaccatgc agaacaatit aatcagaaca tcaacagtca aggatacact
1381 tcagcgactc tagcccgcg tictgtgat atctccaga attatggc gatcgctctg
1441 atgtttggag tccaagctgt tgacctcgc acatataaaa agactggtca ttacgatgca
1501 cgcgacctgc taccacctg aactgagcg ttatattcag cagtccgca cgtagttgga
1561 caaaaaccaa ctccagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag
1621 catattgcc ggatttctgc tgatatcgt gctgggtggtg tgatttgca agcagttcaa
1681 gatattctac cctgcttgca ttaa

```

FIG.2A-1

Secuencia de proteína de PAL de Anabaena variabilis

1 mktlsqaqsk tssqqfsftg nssanviign qkltindvar varngtlvsl tnntdilggi  
 61 qascdyinna vesgepiygv tsfggmanv aisreqasel qtnlwvflkt gagnkplad  
 121 vraamllran shmgasgir lelikrmeif lnagvtpyvy efgsigasgd lvpfsyitgs  
 181 ligldpsfkv dfrngkemdap talrqnlisp ltlpkegla mmngtsvmtg iaancvydtq  
 241 iltaiangvh aldiqalngt nqsfhpfihn skphpgqlwa adqmisl lan sqlvrdeldg  
 301 khdyrdheli qdryslrcip qylgptvdgi sqtakqete insvtónpli dvdnqasyng  
 361 gnflgqvvgm gmchiryvig llakhldvqi allaspefsn glppslngnr erkvmnglkg  
 421 lqicgnsimp lltfygnsia drfpthaeqf nqninsqgyt satlarrsvd ifqnyvaial  
 481 mfgvqvdlr tykktghyda racispater lysavrhvvg qkptsdirpyi wndneqglde  
 541 hiarisadia aggvivqavq dilpchl

FIG.2B

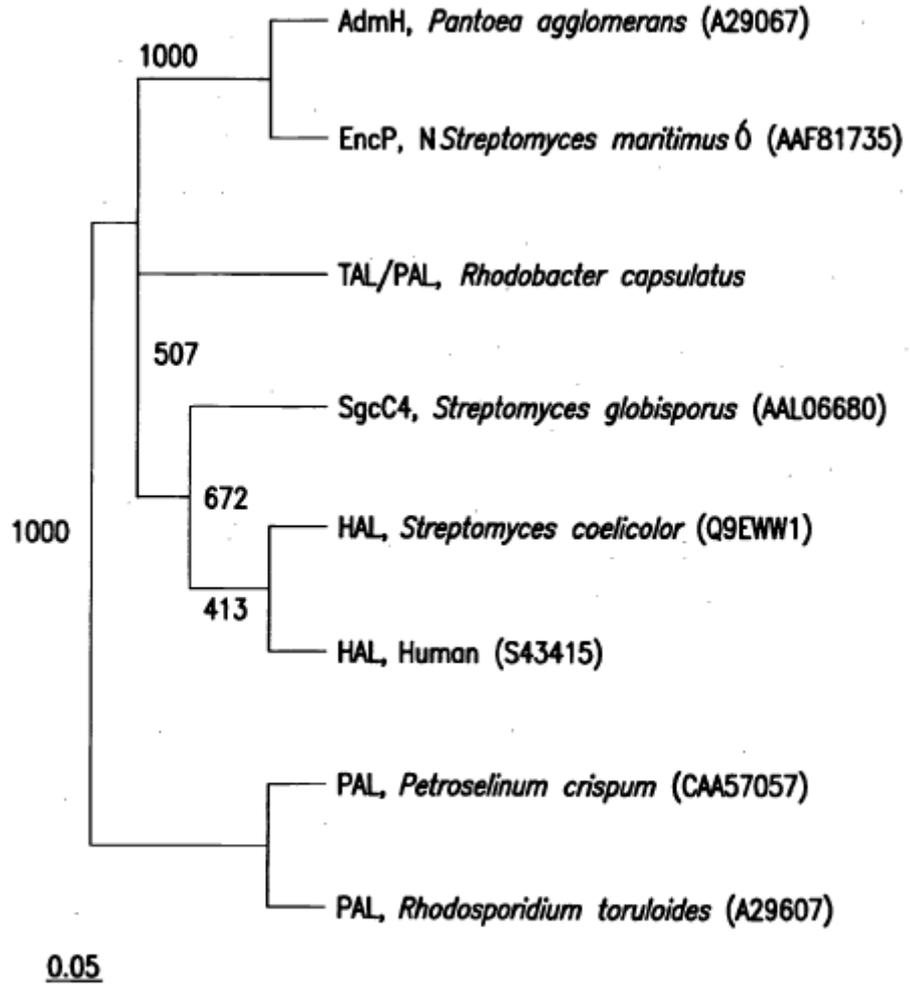


FIG.3

Alineamiento de secuencias de proteína cianobacterianas de PAL de *N. punctiforme* (SEQ ID NO: 4) y de *A. variabilis* (SEQ ID NO: 2) con PAL de *EncP* y *HAL* de *P. putida* (SEQ ID NO: 6). Los restos de sitios activos que corresponden a la actividad de PAL o HAL están en **negrita** y subrayados.

Avar03005300	MKTL <b>SQAQSK</b>	TSSQ <b>QFSFTG</b>	NSSAN <b>VIIGN</b>	QKLT <b>INDVAR</b>	VAR <b>NGTLVSL</b>
Npun02008223	MN <b>ITSLQONI</b>	TR <b>SWQIPFTN</b>	SSDS <b>IVTVGD</b>	RNLT <b>IDEVVN</b>	VAR <b>HGTQVRL</b>
EncP	.....	.....	.. <b>MTFV</b> IELD	MN <b>VTL</b> DQLED	AAR <b>QRT</b> PVEL
PputidaHAL	.....	.....	.. <b>MTEL</b> TKP	GT <b>LTLA</b> QLRA	IHA <b>APVRL</b> QL
Avar03005300	TN <b>WTDILQGI</b>	QASCDY <b>INNA</b>	VESGE <b>PIYGV</b>	TSGFG <b>GMANV</b>	AISRE <b>QASEL</b>
Npun02008223	TD <b>NADVIRGV</b>	QASCDY <b>INNA</b>	VETA <b>QPIYGV</b>	TSGFG <b>GMADV</b>	VISRE <b>QAAEL</b>
EncP	S.. <b>APVRSRV</b>	RASRD <b>LVKFK</b>	VQDER <b>VIYGV</b>	NTSM <b>GGFVDH</b>	LVP <b>YSQARQL</b>
PputidaHAL	D.. <b>ASAAPAI</b>	DASVAC <b>VEQI</b>	IAED <b>RTAYGI</b>	NTGF <b>GLLAST</b>	RIASH <b>DLENI</b>
Avar03005300	Q <b>TNLVWF</b> LKT	GAG <b>NKLPLAD</b>	VRA <b>AMLL</b> RA <b>N</b>	SH <b>MRGAS</b> GIR	LE <b>L</b> IKR <b>MEIF</b>
Npun02008223	Q <b>TNLVWF</b> LKS	GAG <b>NKLSLAD</b>	VRA <b>AMLL</b> RA <b>N</b>	SH <b>LYGAS</b> GIR	LE <b>L</b> IQ <b>RIETF</b>
EncP	Q <b>ENLINA</b> VAT	N <b>V</b> GAYL <b>DDTT</b>	ART <b>IMLSR</b> IV	SL <b>ARGNSA</b> IT	PAN <b>L</b> DK <b>LVA</b> V
PputidaHAL	Q <b>RSVL</b> SHAA	G <b>I</b> GAPL <b>DDDL</b>	VRL <b>IMV</b> LK <b>IN</b>	S <b>L</b> SRG <b>FSGIR</b>	RK <b>V</b> ID <b>ALIA</b> L

FIG. 4

Avar03005300	LNAGVTPYVY	EFGSIGASGD	LVPLSYITGS	LIGLDPFSKV	DFNGKEMDAP
Npun02008223	LNAGVTPHYV	EFGSIGASGD	LVPLSYITGA	LIGLDPFSFTV	DFDGKEMDAV
EncP	LNAGIVPCIP	EKGSIGTSGD	LGPLAATLV	CAGQW...KA	RYNGQIMPGR
PputidaHAL	VNAEVYPHIP	LKGSVGSASGD	LAPLATMSLV	LLGEG...KA	RYKQWILSAT
Avar03005300	TALRQLNSP	LTLPKKEGLA	MNMGTSVMTG	IAANCYDITQ	ILTAIANGVH
Npun02008223	TALSRLGLPK	LQLPKKEGLA	MNMGTSVMTG	IAANCYDIAK	VLLALTMGVH
EncP	QALSEAGVEP	MELSYKDGLA	LINGTSGWVG	LGTMYLQAAR	RLYDRYLQVS
PputidaHAL	EALAVAGLEP	LTLAAKEGLA	LLNGTQASTA	YALRGLFYAE	DLYAAAIAAG
Avar03005300	ALDIQALNGT	NQSFHPTIHV	SKPHPGQLWA	ADQMISLLAN	SQLVRELDLG
Npun02008223	ALAIQGLYGT	NQSFHPTIHQ	CKPHPGQLWT	ADQMFSLIKD	SSLVREELDG
EncP	ALSVEGLAGM	TKPFDPRVHG	VKPHRGRQV	ASRLWEGLAD	SHLAVNELDT
PputidaHAL	GLSVEAVLGS	RSPFDARIEH	ARGRGRQIDT	AACFRLLGDD	SSEVS.....

FIG.4-1

Avar03005300	.....K	HOYRDHEL IQ	DRYSLRCLPQ	YLGPIVDGIS	QIAKQIEIEI
Npun02008223	.....K	HEYRGKDL IQ	DRYSLRCLAQ	FIGPIVDGVS	EITKQIEIVEM
EncP	EOTLAGEMGT	VAKAGSLAIE	DAYSIRCTPQ	ILGPWVDVLD	RIGATLQDEL
PputidaHAL	.....	LSHKNCCKVQ	DPYSLRCQPQ	VMGACLTQLR	QAAEVLGIEA
Avar03005300	NSVTDNPLID	VDNQASYHGG	NFLGQYVGMG	MDHLRYYYIGL	LAKHLDVQIA
Npun02008223	NSVTDNPLID	VENQVSYHGG	NFLGQYVGVV	MDRLRYYYIGL	LAKHIDVQIA
EncP	NSSNDNP IVL	PEEAEVFHNG	HFHGQYVAMA	MDHLNMLAT	VTNLANRRVD
PputidaHAL	NAVSDNPLVF	AAEGDVISGG	NFHAEPYAMA	ADNLALATAE	IGSLSERRIS
Avar03005300	LLASPEFSNG	LPPSLLGNRE	RKYVMGLKGL	QICGNSIMPL	LTIFYGNSIAD
Npun02008223	LLVSPEFSNG	LPPSLVGNSD	RKYVMGLKGL	QISGNSIMPL	LSFYGNSLAD
EncP	RFLDKSNSNG	LPAFLCREDP	.GLRLGLMGG	QFMTASITAE	TRTLTIPMSV
PputidaHAL	LMMDKHMS.Q	LPPFLVENG.	.GVNSGFMTA	QVTAALASE	NKALSHPHSV
Avar03005300	RFPTHAEQFN	QNINSQGYTS	ATLARRSVDI	FQNYVAIALM	FGVQAVDLRT
Npun02008223	RFPTHAEQFN	QNINSQGYIS	ANLTRRSVDI	FQNYMAIALM	FGVQAVDLRT
EncP	QSLTSTADF.	QDIVSFGFVA	ARRAREVLTN	AAYVWAFELL	CACQAVDIRG
PputidaHAL	DSLPTSANQ.	EDHVSMAFPA	GKRLWEMAEN	TRGVPAIEWL	GACQGLDLRK

FIG.4-2

Avar03005300	YKKTGHYDAR	ACLSPATERL	YSAVRHWGQ	KPTSDRPIW	NDNEQGLDEH
Npun02008223	YKMKGHYDAR	TCLSPNTVQL	YTAVCEWVK	PLTSVRPIW	NDNEQCLDEH
EncP	ADKL.....	...SSFTRPL	YERTRKIVP.	.....F	FDRDEITIDY
PputidaHAL	GLKT.....	...SAKLEKA	RQALRSEVA.	.....H	YDRDRFFAPD
Avar03005300	IARISADIAA	GGVIVQAVQD	ILPCLH..		
Npun02008223	IARISADIAG	GGLIVQAVEH	IFSSLKST		
EncP	VEKLAADLIA	GEPVDAVAAA	H.....		
PputidaHAL	IEKAVELLAK	GSLTGLLPAG	VLPSL...		

FIG.4-3

Secuencia de proteína de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

A. AvPAL\_C64S (SEQ ID NO:7)  
 MKTLSQAQSKTSSQSFSTGNSSANVTIGNQKLTINDVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASSDYINNA  
 VESGEPIYGVTSFGGMAWVAISREQASELQTNLWFLKGTAGWKLPLADVRAAMILLRANSHMRGASGIR  
 LELIKRMEIFL MAGVTPYYVEFGSIGASGDLVPLSYITGSL IGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLS  
 LTLKPKEGLAMMGTSMVTGIAANCVYDTQILTAJAMGVHALDIQALNGTNSFHPFIHNSKPHPGQLWA  
 ADQMTSLLANSQLYRDELDGKHDRHELIIQDRYSRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIINSVTDNPLI  
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMHLRYTYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMGLKG  
 LQICGNSIMPLLTFYGNSTADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLR  
 TYKKTGHYDARAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPHYIWNDEQGLDEHIARISADJAAGGVIQAVQ  
 DILPCLH

FIG.5A

**Secuencia de proteína de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)**

**B. AvPAL\_C318S (SEQ ID NO:8)**  
MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVANGTLVSLTNNTDILGGIQASCDYINNA  
VESGEPYGVTSGGFGGANVAISREQASELQTNLVMFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRAMSHMRGASGIR  
LELTKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGIGASGDLVPLSYITGSLTGLDPSFKYDFNGKEMDAPTALRQLNLS  
LTLLPKEGLAMMGTSVMTGIAANCYVDQILTAJAMGVHALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWA  
ADQMISLLANSQLVRELDGKHDRDHELIDRYSLSRLPYLGPVVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI  
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMHLRYIIGLLAKHLDVQIALASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMGLKG  
LQICGNSIMPLLTFYGNSTADRFPTHAEQFNQINISQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR  
TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHWGQKPTSDRPLYIWNDEQGLDEHTARI SADTAAGGVTVQAVQ  
DILPCLH

**FIG.5B**

Secuencia de proteína de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

C. AvPAL\_C503S (SEQ ID NO:9)  
 MKTLSQAQSKTSSQSFSTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARGTLVSLTNNTDILQGIQASCOYINNA  
 VESGEPTYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVMFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR  
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSAGSDLVPLSYITGSLIGLDPFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLS  
 LTLLPKEGLMMNGTSVMTGIAANCYVDQILTAIANGVHALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWA  
 ADQMISSLANSQVROELDGKHDRDHELIDQRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIETINSVTDNPLI  
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMHLYRYIGLLAKHLDVQIALASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMGLKG  
 LQICGNSIMPLLTfyGNSIADRFPTHAEQFNQMINSQGYTSATLARRSVDFIQNYVAIALMFGVQAVDLR  
 TYKKTGHYDARASLSPATERLYSAVRHVGGKPTSDRPHYIWDNEQGLDEHTARISADTAAGGVIVQAVQ  
 DILPCLH

FIG.5C

Secuencia de proteína de variantes AvPAL (mutantes de cisteína)

D. AvPAL\_C565S (SEQ ID NO:10)  
 MKTLSQAQSKTSSQSFSTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCOYINNA  
 VESGEPIYGVTSFGGGMANVAISREQASELQTNLVMFLKTGAGNKLPLADYRAAMLLRANSHMRGASGIR  
 LELTKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPFKYDFNGKEMDAPTALRQLNLSP  
 LTLPKGLAMNGTSVMTGIAANCYYDTQILTATAMGVHALDIQALNGTNQSFHPTHNSKPHPGQLWA  
 ADQMTSLLANSQVRDELGGKHDRDHELIDRYSRLRCLPQYLGPIVGGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI  
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGDHLRYIIGLLAKHLDVQIALASPEFSNGLPPSLLGNRERKYNMGLKG  
 LQICGNSIMPLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQINISQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR  
 TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVGGQKPTSDRPTYIWNDEQGLDEHTIARIASDIAAGGVIVQAVQ  
 DILP\$LH

FIG.5D

Secuencia de proteina de variantes AvPAL (mutantes de cisteina)

E. AvPAL\_C565SC503S (SEQ ID NO:11)  
 MKTL<sup>S</sup>QAQSKTSSQ<sup>F</sup>SFTGNSANW<sup>I</sup>IGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCOYINNA  
 VESGEPYGV<sup>T</sup>SGFGGMANVATISREQASELQTNLVMFLKTGAGNKLPLADYRAAML<sup>L</sup>RANSHMRGASGIR  
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGISAGD<sup>L</sup>LVPLSYITGSLIGLDP<sup>S</sup>FKYDFNGKEMDAPTALRQLNLS<sup>P</sup>  
 LTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCYVD<sup>T</sup>QILTAIANGVHALDIQALNGTNQSFH<sup>P</sup>FIHNSKPHPGQLWA  
 ADQMISLLANSQLVRDEL<sup>G</sup>KHYRDHELIDRYS<sup>L</sup>RCLPQYLGPIVDG<sup>I</sup>ISQIAKQIEIEINSVTDNPL<sup>I</sup>  
 DVDNQASYHGGN<sup>F</sup>LGGYVGMGM<sup>D</sup>HLRY<sup>I</sup>IGLLAKHL<sup>D</sup>VQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERK<sup>V</sup>NMGL<sup>K</sup>G  
 LQICGNSIM<sup>P</sup>LLTFYGN<sup>S</sup>IADRFPT<sup>H</sup>AEQFNQ<sup>I</sup>NSQGY<sup>T</sup>SATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAV<sup>D</sup>LR  
 TYKKTGHYDARA<sup>S</sup>LSPATERLYSAVRHWGQK<sup>P</sup>TSORPYIWN<sup>D</sup>NEQGLDEHTARISADTAAGGVT<sup>V</sup>QAV<sup>Q</sup>  
 DILLP<sup>S</sup>LH

FIG.5E

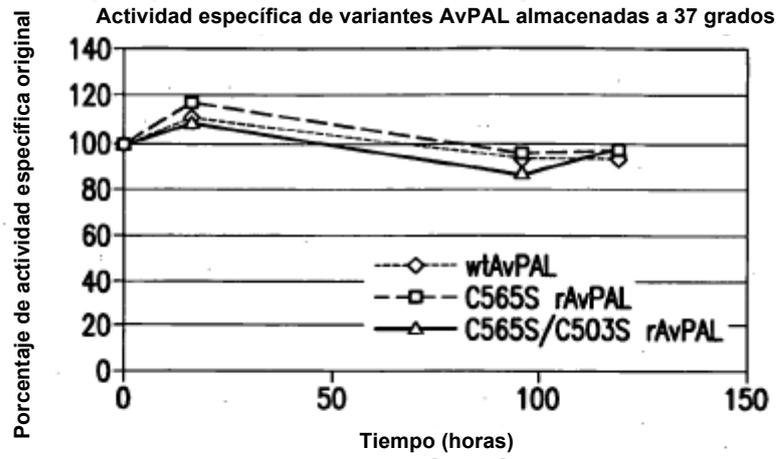


FIG.6A

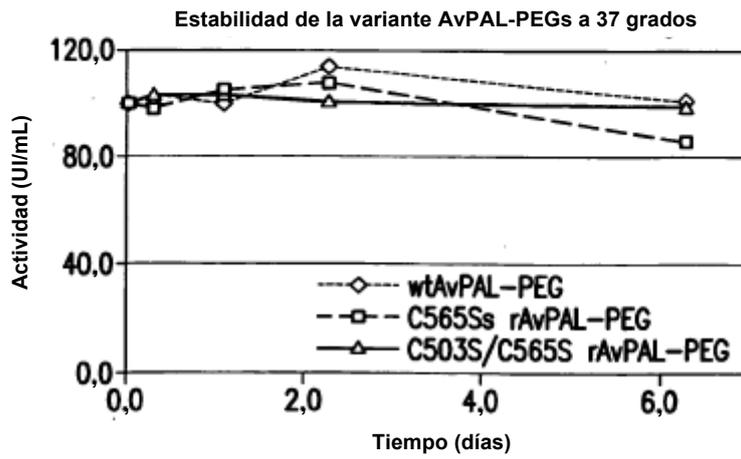
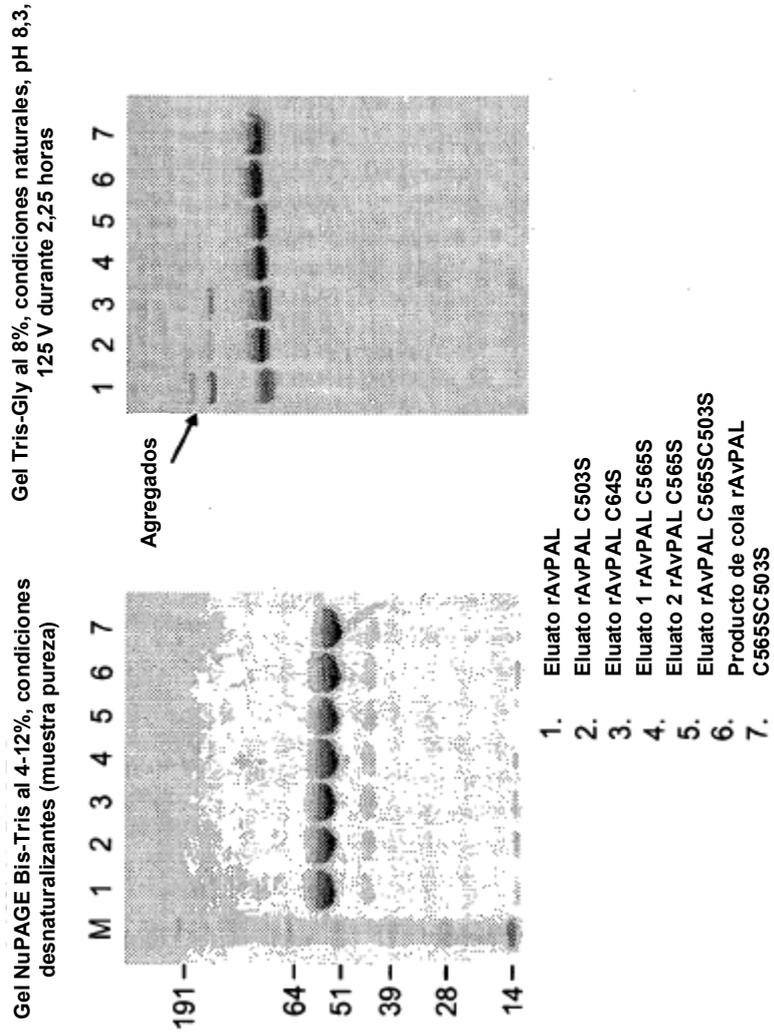


FIG.6B



**FIG.7A**

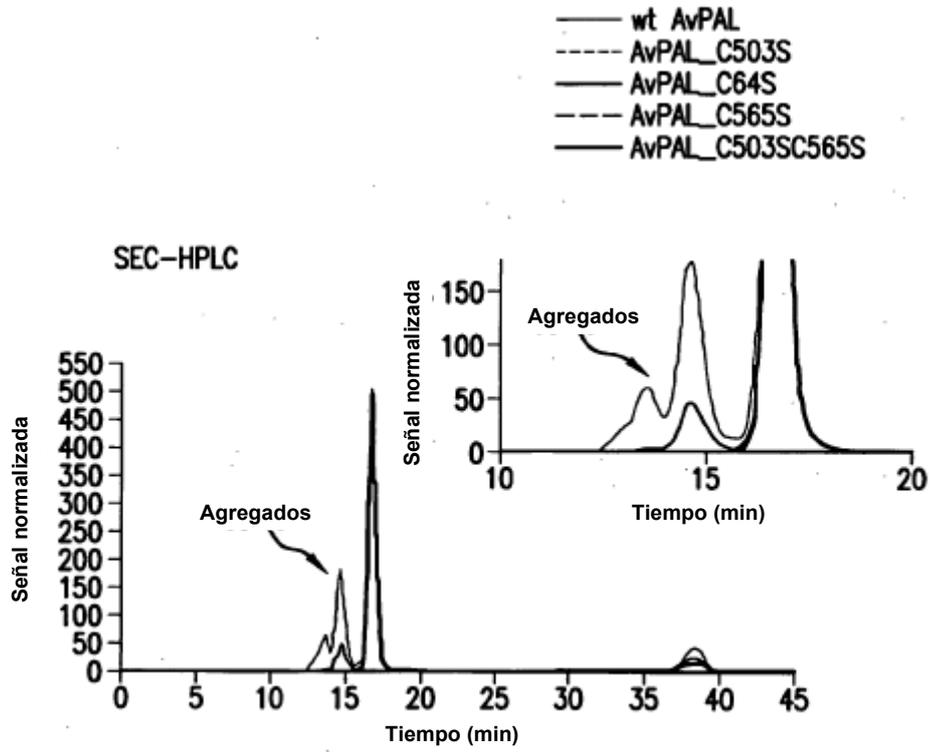


FIG.7B

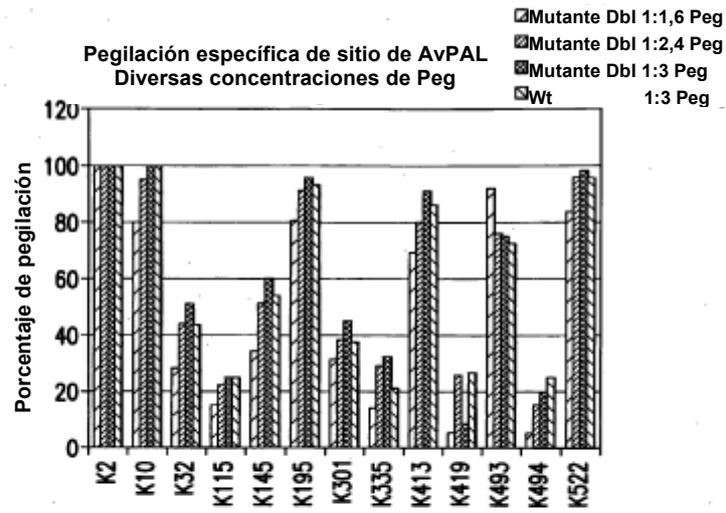


FIG. 8

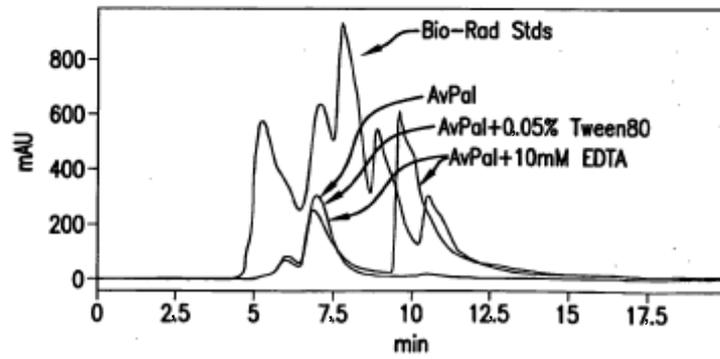


FIG. 9

AvPAL reducido con DTT después desalado en  
tampón de formulación

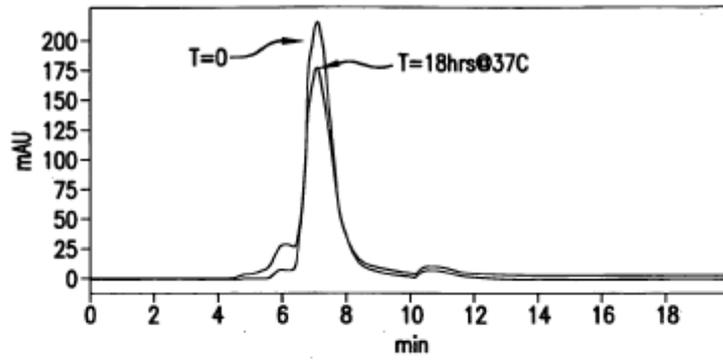


FIG. 10A

AvPAL reducido con DTT, cisteínas de superficie modificadas  
con NEM, después desalado en tampón de formulación

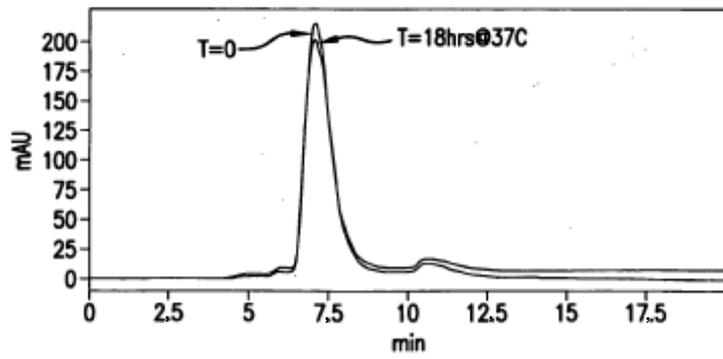


FIG. 10B

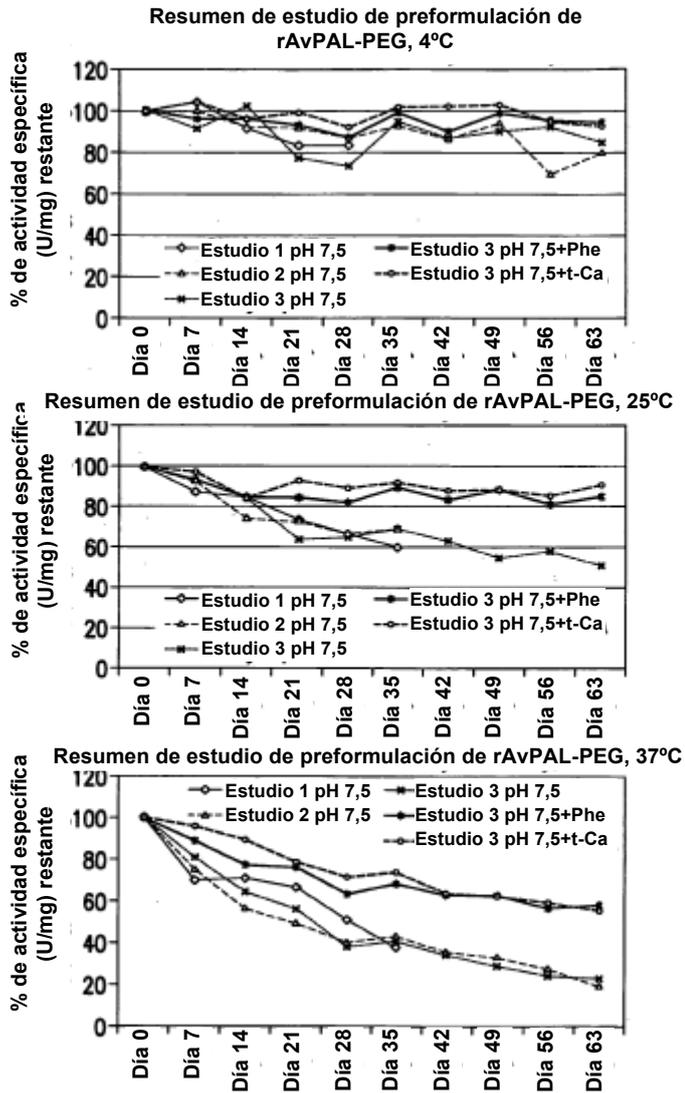


FIG. 11

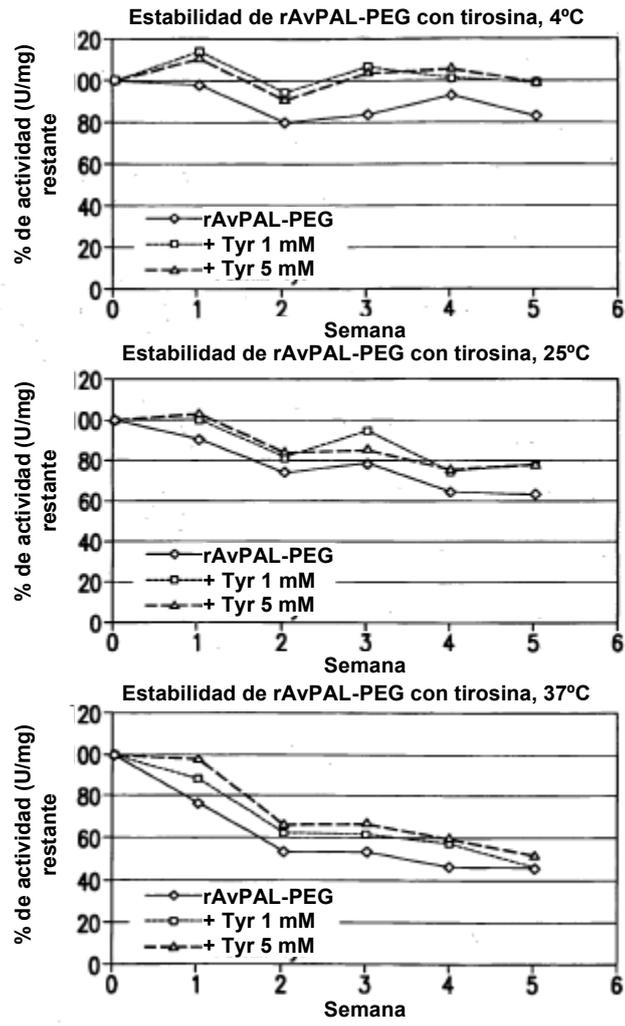
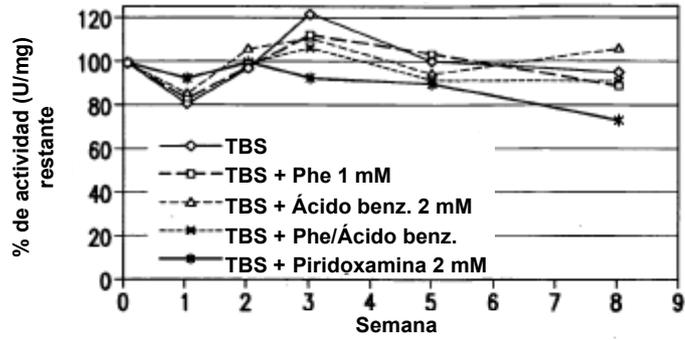


FIG. 12

Ensayo de estabilidad acelerada  
de la preformulación rAvPAL-  
PEG, 4°C



Ensayo de estabilidad acelerada  
de la preformulación rAvPAL-  
PEG, 37°C

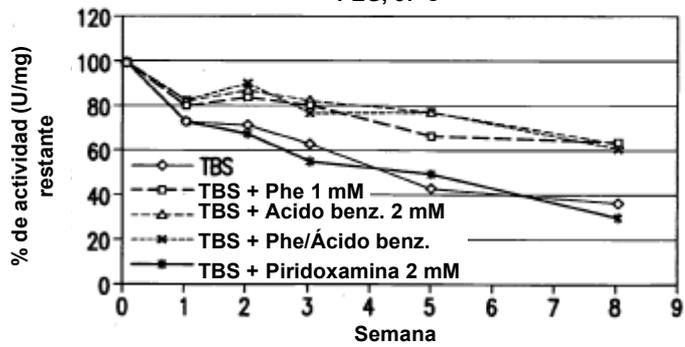


FIG. 13A

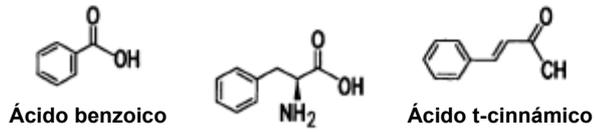


FIG. 13B

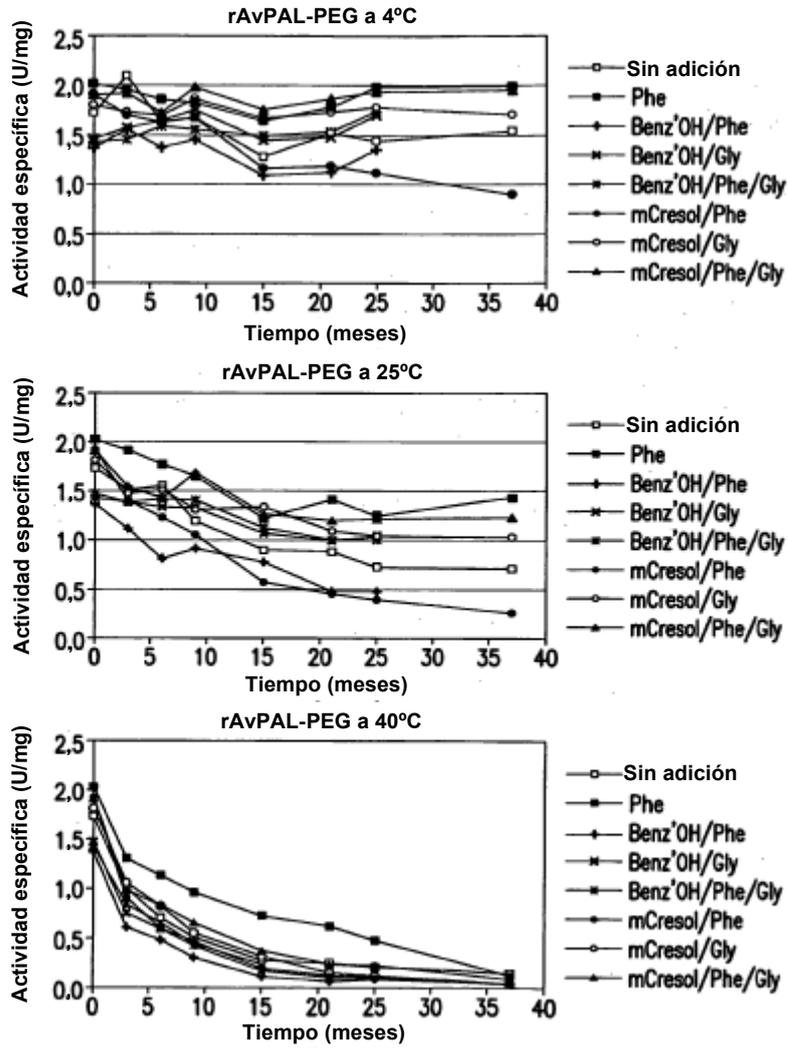


FIG. 14

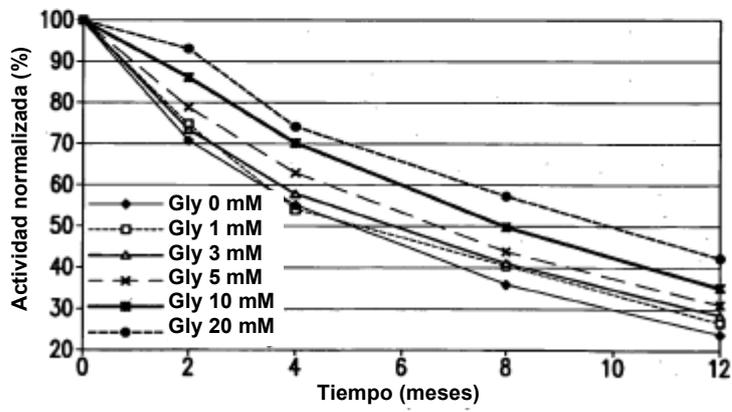
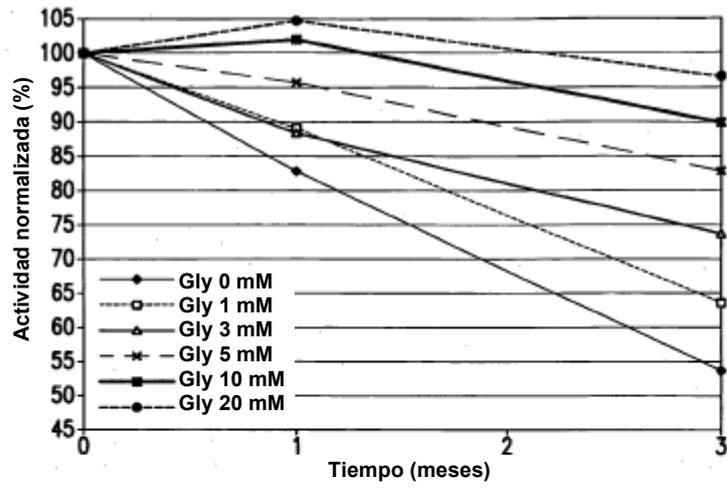


FIG. 15A

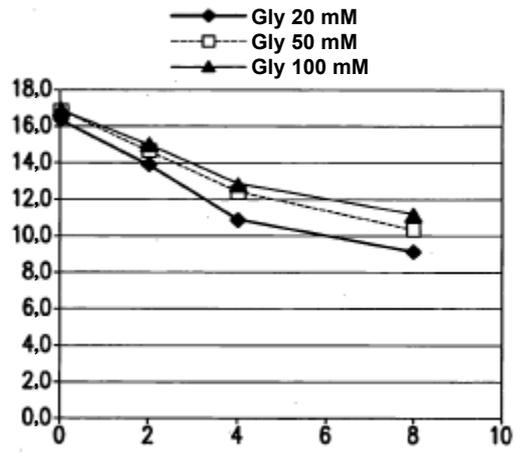


FIG.15B

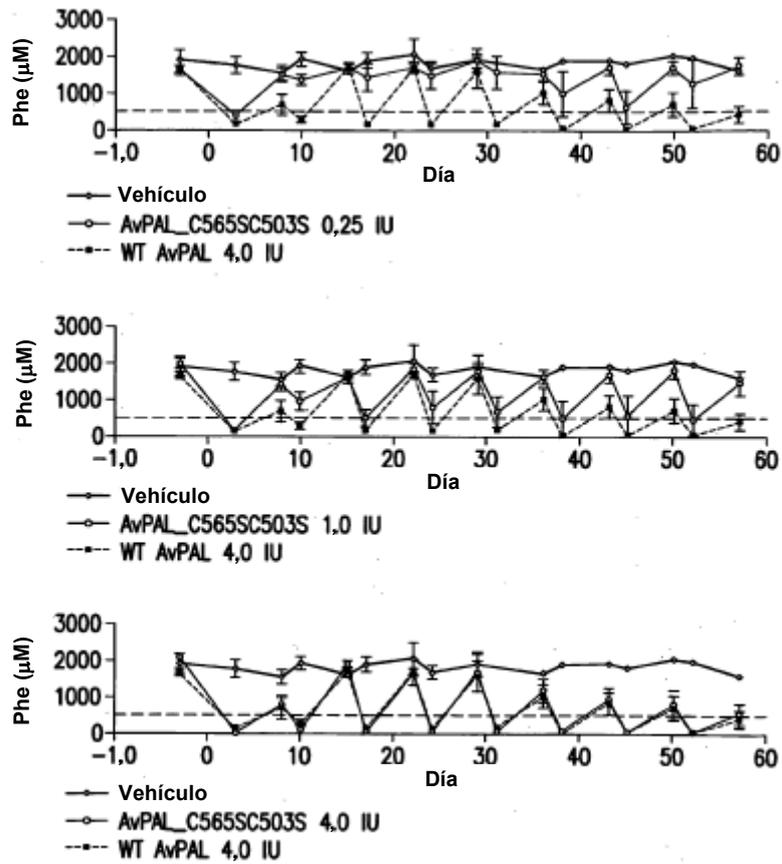


FIG.16

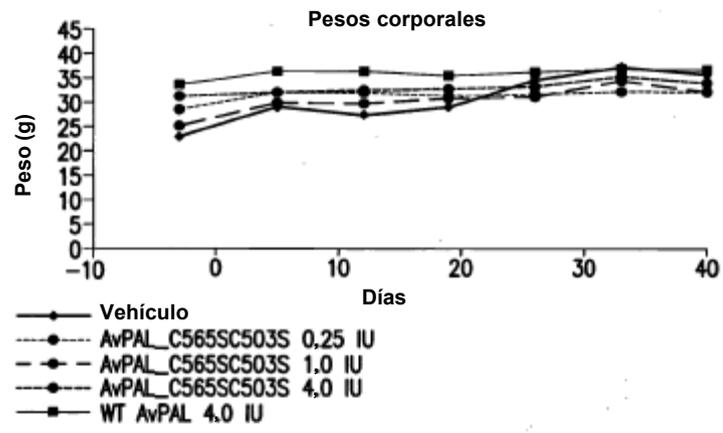


FIG.17

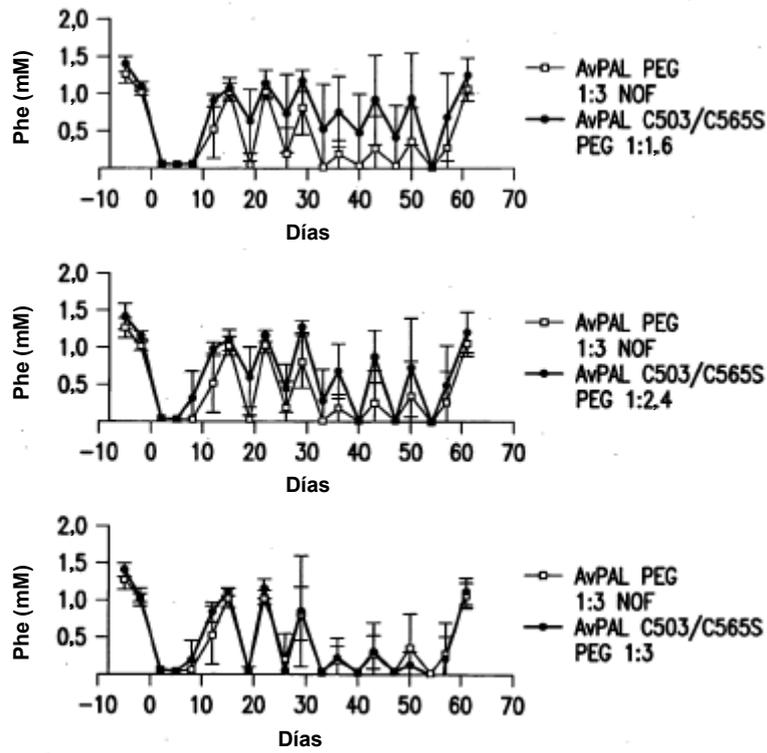


FIG. 18

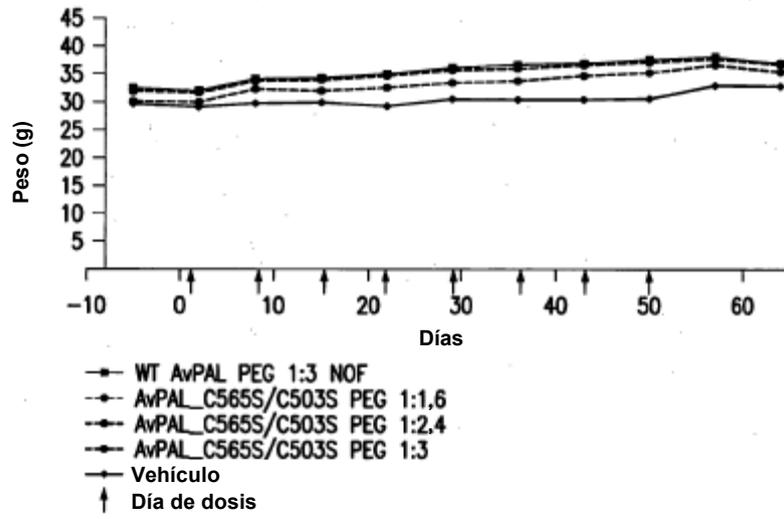


FIG.19

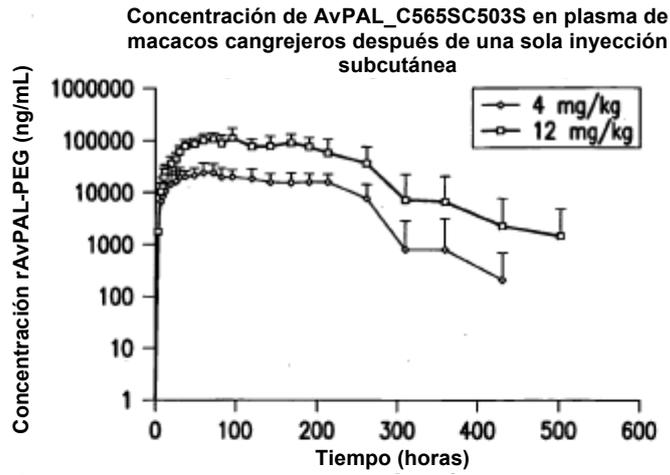


FIG. 20A

Concentración de Fenilalanina (Phe) y AvPAL\_C565SC503S en plasma de macacos cangrejeros después de una sola inyección subcutánea

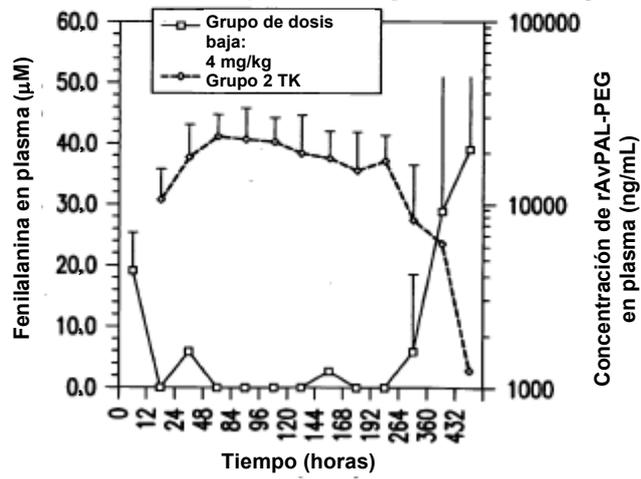
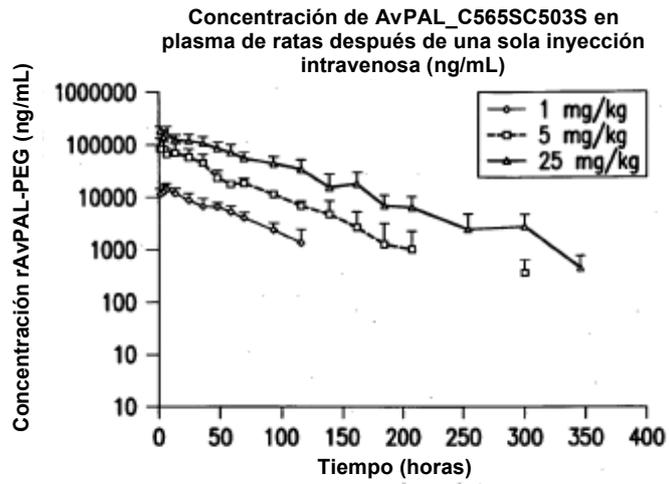
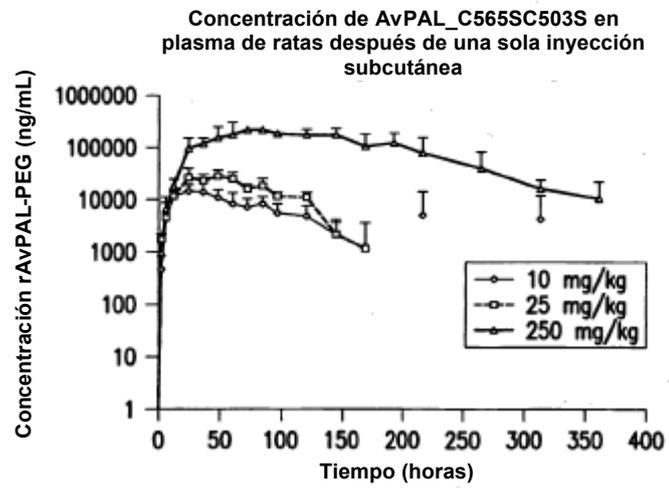


FIG. 20B



**FIG.21A**



**FIG.21B**

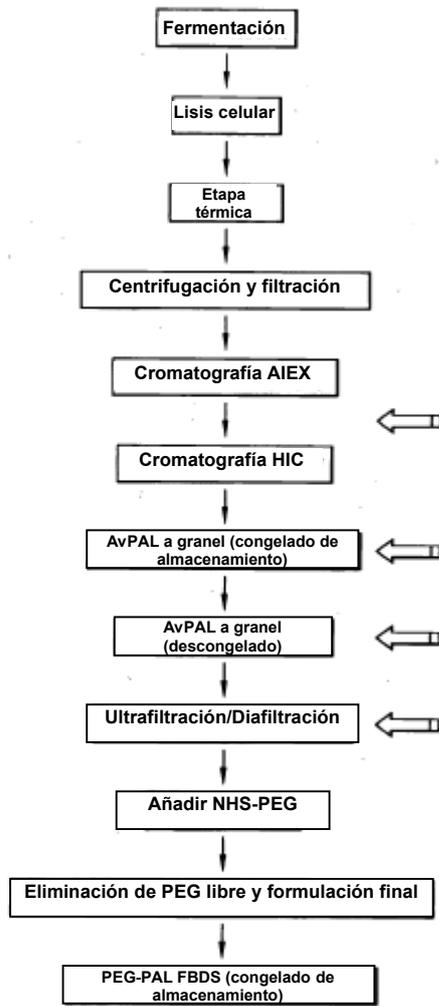


FIG.22