

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 175**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/32** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A23L 33/195** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2016 E 16186895 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3290436**

54 Título: **Proteína sin fenilalanina para el tratamiento de PKU**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2020**

73 Titular/es:  
**METAX INSTITUT FÜR DIÄTETIK GMBH (100.0%)**  
**Am Strassbach 5**  
**61169 Friedberg (Hessen), DE**

72 Inventor/es:  
**HOFFMANN, BERNHARD;**  
**MÜCKE, YVONNE;**  
**RASCHE, STEFAN;**  
**JABLONKA, NATALIA y**  
**SCHILLBERG, STEFAN**

74 Agente/Representante:  
**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 742 175 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

Proteína sin fenilalanina para el tratamiento de PKU

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a una proteína dietética recombinante o una porción dietéticamente suficiente de la misma en la que dicha proteína no comprende fenilalanina para su uso en la dieta de pacientes afectados por fenilcetonuria.

10

**Antecedentes de la invención**

La fenilcetonuria (PKU) (OMIM 261600, ORPHA716) es un trastorno metabólico heredado con una incidencia de 1:10.000 en Europa. En la mayoría de los casos, este es un trastorno del metabolismo de los aminoácidos resultante de la ausencia o función deteriorada de la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa (PAH). Las deficiencias en PAH a su vez dan como resultado un exceso de fenilalanina (Phe) en el cerebro y plasma. La deficiencia en PAH se manifiesta finalmente como una carencia de tirosina, que es un precursor para los neurotransmisores. Junto con mutaciones que implican enzimas del metabolismo de la pterina, la PKU está asociada a hiperfenilalaninemia (HPA).

15

20

Esta enfermedad se diagnostica comúnmente en la mayoría de los países justo después del nacimiento durante los exámenes del recién nacido debido a niveles elevados de Phe en sangre. Si no se detecta ni se trata al principio de la vida, la PKU conduce a daño irreversible del sistema nervioso del lactante, retraso mental grave y escaso desarrollo cerebral. Las características distintas de las discapacidades intelectuales en pacientes no tratados incluyen complicaciones neurológicas, alteraciones neuropsicológicas así como déficits de la función ejecutiva. Se ha notificado que cuando se deja sin tratar un lactante padece pérdida de IQ dentro de los primeros cinco años de lactancia. Dependiendo de la edad al inicio del tratamiento, los niveles de Phe en sangre durante los diferentes periodos de edad y el cumplimiento de la terapia dietética, la PKU va acompañada invariablemente por al menos alguna pérdida de IQ. Una vez detectada, el estado se trata proporcionando al lactante, y después al niño, una dieta restringida en Phe. En adultos, los suplementos de proteína tomados de manera rutinaria por pacientes con PKU clásica están libres de Phe con la suposición de que esos adultos recibirán cantidades suficientes de Phe a través de la dieta restante, controlada bajo un régimen estricto, de modo que la dieta global sea una dieta baja en Phe. En particular, a las mujeres embarazadas que padecen el estado se les recomienda cumplir con un régimen dietético rígido limitado en Phe para evitar el riesgo de alteración del desarrollo del feto y malformaciones congénitas (síndrome de PKU materna).

25

30

35

En años más recientes se ha mostrado que los síntomas patológicos que se manifiestan por el estado de exceso de Phe, denominados colectivamente hiperfenilalaninemia (HPA), pueden dividirse en múltiples trastornos diferenciados, que se diagnostican según las concentraciones de Phe en plasma y la receptividad a un cofactor de PAH. A un nivel inicial, las HPA pueden dividirse en HPA provocada como resultado de una deficiencia en el cofactor 6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) debido a defectos enzimáticos en el metabolismo de biopterina (PKU maligna) y HPA resultante de una deficiencia en PAH. La última se subdivide aún más dando como resultado al menos cuatro subcategorías que dependen de la concentración de Phe en plasma en ausencia de dieta u otra intervención terapéutica (denominada en el presente documento "concentración de Phe en plasma no restringida") y la receptividad al cofactor BH4.

40

45

La homeostasis de Phe en plasma normal está fuertemente controlada dando como resultado una concentración de Phe en plasma de  $60 \mu\text{mol/l} \pm 15 \mu\text{mol/l}$ . La PKU clásica (ORPHA79254) es la forma más grave de la PKU y resulta de mutaciones nulas o graves en PAH, las cuales conducen a concentraciones de Phe en plasma no restringidas mayores de  $1200 \mu\text{mol/l}$  cuando se deja sin tratar. Los individuos con PKU clásica (o grave) deben tratarse con un régimen dietético estricto que se basa en una dieta muy baja en Phe para reducir sus concentraciones de Phe hasta un intervalo seguro. También se han caracterizado formas más leves de la PKU. Una forma menos grave de la PKU es una que se manifiesta en concentraciones de Phe en plasma no restringidas de 10-20 mg/dl ( $600-1200 \mu\text{mol/l}$ ) y se denomina generalmente "PKU leve" (ORPHA79253). Esta forma moderada de la PKU se maneja a través del uso de restricciones dietéticas moderadas, es decir, una dieta comparativamente baja en proteína sin la necesidad de suplementación con fórmulas de aminoácidos sin Phe. La HPA leve, también denominada benigna o HPA no PKU (ORPHA79651) se caracteriza por concentraciones de Phe en plasma no restringidas de entre  $180-600 \mu\text{mol/l}$ . Los individuos con HPA no PKU no se tratan de manera rutinaria puesto que se considera que tienen niveles de Phe en plasma que están dentro del intervalo "seguro". En la terapia dietética de la PKU, un intervalo inferior a  $<360 \mu\text{mol/l}$  es el objetivo, con un intervalo de hasta  $600 \mu\text{mol/l}$  considerado aceptable. Finalmente, la PKU/HPA sensible a BH4 (ORPHA293284) se caracteriza por concentraciones de Phe en plasma no restringidas  $>360 \mu\text{mol/l}$  que pueden reducirse notablemente o normalizarse después de una carga oral con tetrahidrobiopterina (BH4; diclorhidrato de sapropterina). Esta forma leve a moderada de PKU/HPA está provocada por mutaciones específicas en el gen de PAH que conducen a proteínas mutantes con actividad enzimática residual significativa. La suplementación de

50

55

60

65

BH4 como parte del manejo de la PKU/HPA permite que algunos pacientes relajen su régimen dietético restringido en Phe. Debe comprenderse que los términos “tratamiento de la PKU” o “paciente con PKU” tal como se usan en el presente documento pretenden referirse al tratamiento de y pacientes con las siguientes formas de HPA, por ejemplo, PKU clásica, PKU leve, HPA leve y PKU/HPA sensible a BH4.

5

En los comienzos de la terapia de dietética de la PKU al principio de la década de 1950, se les proporcionaba a los pacientes los aminoácidos esenciales (excepto Phe) por medio de hidrolizados de proteína. Por tanto, se hidrolizaba una proteína con niveles relativamente altos de aminoácidos esenciales, tal como caseína (una proteína comúnmente encontrada en la leche de mamíferos, que constituye hasta el 80% de las proteínas en la leche de vaca) o albúmina de suero bovino seguido por una etapa de filtración de los péptidos para eliminar tanta contaminación de Phe como fuera posible y/o combinación de aminoácidos libres en una mezcla que incluye una proteína hidrolizada. Hoy en día, se proporcionan a los pacientes mezclas normalmente equilibradas de aminoácidos cristalinos libres que comprenden aminoácidos esenciales (excepto Phe). Tales mezclas de aminoácidos pueden tener un sabor amargo, provocar una sensación arenosa en la boca y pueden considerarse inadecuadas o indeseables para ciertos usos. Como resultado, tales mezclas incluyen algunas veces aromas para enmascarar el sabor de los aminoácidos libres y/o proteína hidrolizada. En algunos casos, se encuentra que composiciones en las que se proporciona una proporción del contenido de aminoácidos por polipéptidos o proteínas tienen un mejor sabor que composiciones con una alta proporción de aminoácidos totales proporcionados como aminoácidos libres y/o ciertas proteínas hidrolizadas. La disponibilidad de tales composiciones ha sido limitada, sin embargo, debido a que las formulaciones nutricionales se han producido tradicionalmente a partir de proteína aislada de productos alimenticios naturales, tales como suero lácteo aislado de leche o proteína de soja aislada de la soja. Los perfiles de aminoácidos de esas proteínas no satisfacen necesariamente los requisitos de aminoácidos para un mamífero. Además, las proteínas de materia prima consisten normalmente en mezclas de proteínas y/o hidrolizados de proteína que pueden variar en su composición de proteína, conduciendo de este modo a impredecibilidad con respecto a su valor nutricional. Además, el número limitado de fuentes de tales proteínas con un alto valor biológico ha significado que únicamente ciertas combinaciones de aminoácidos están disponibles a gran escala para su ingestión en forma de proteína.

10

15

20

25

30

35

40

El glicomacropéptido (GMP), una proteína de suero lácteo natural producida durante la fabricación de queso, se ha usado en el tratamiento de la PKU. El GMP en su forma pura carece de los aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe; F), tirosina (Tyr; Y) y triptófano (Trp; W) así como arginina (Arg; R), histidina (His; H) y cisteína (Cys; C) pero es rico en los aminoácidos neutros grandes isoleucina (Ile; I) y treonina (Thr; T). Como proteína dietética disponible comercialmente, contiene cantidades mínimas de Phe. Sin embargo, usada como única fuente de proteína en alimentos médicos para el manejo dietético de la PKU, tiene que suplementarse con Trp, Arg, Leu, His y Tyr para satisfacer las necesidades de la ingesta requerida diariamente de esos aminoácidos esenciales o semiesenciales y para proporcionar una razón baja de Phe/Tyr adecuada (<1). Al ser esencial en pacientes con PKU, la Tyr mejora su comportamiento emocional dependiente de la disponibilidad para la síntesis de neurotransmisores.

45

50

55

La presente invención aborda los problemas anteriores proporcionando una proteína dietética que comprende todos los aminoácidos esenciales (excepto Phe) que tiene propiedades mejoradas, tales como un alto valor biológico o sabor neutro. Además, la proteína dietética puede proporcionarse como un producto nutritivo que puede formar parte de la dieta normal del paciente, como productos horneados, cereales o barras prensadas. De manera alternativa, la proteína dietética puede proporcionarse en una forma que es adecuada para la producción de un producto nutritivo por el paciente, tales como mezclas de horneado preparadas previamente o mezclas de sopa vegetal.

La presente invención por tanto tiene como objetivo mejorar la calidad de vida de pacientes con PKU, puesto que todos los pacientes con PKU deben adherirse a una dieta especial baja en Phe para el desarrollo óptimo del cerebro. La “dieta para la vida” se ha convertido en el estándar recomendado por la mayoría de los expertos. La dieta requiere restringir severamente o eliminar alimentos altos en Phe, tales como carne, pollo, pescado, huevos, nueces, queso, legumbres, leche y otros productos lácteos. Los alimentos con almidón, tales como patatas, pan, pasta y maíz, deben monitorizarse. El edulcorante aspartamo, presente en muchos alimentos dietéticos y refrescos, también debe evitarse, puesto que el aspartamo consiste en dos aminoácidos: fenilalanina y ácido aspártico.

60

65

Los lactantes todavía pueden amamantarse para proporcionar todos los beneficios de la leche materna, pero la cantidad también debe monitorizarse y se requerirá suplementación para nutrientes ausentes. Se usan fórmulas suplementarias para lactantes en estos pacientes para proporcionar los aminoácidos y otros nutrientes necesarios que de lo contrario estarían ausentes en una dieta baja en fenilalanina. A medida que el niño crece, estas pueden reemplazarse con comprimidos, fórmulas y alimentos formulados especialmente. Puesto que la Phe es necesaria para la síntesis de muchas proteínas, se requiere para un crecimiento apropiado, pero los niveles deben controlarse estrictamente en pacientes con PKU. Además, la tirosina, que normalmente se deriva de la fenilalanina, debe suplementarse en la dieta de pacientes con PKU.

La administración oral de tetrahidrobiopterina (o BH4) (un cofactor para la oxidación de la fenilalanina) puede reducir los niveles en sangre de Phe en ciertos pacientes. Una preparación en forma de comprimido del compuesto diclorhidrato de sapropterina (Kuvan<sup>®</sup>), que es una forma de la tetrahidrobiopterina, se encuentra disponible comercialmente. Kuvan<sup>®</sup> es el primer fármaco que puede ayudar a los pacientes con PKU sensible a

5 BH4 (ORPHA293284, dependiendo del entorno clínico definido entre los médicos como aproximadamente el 25-50% de la población con PKU) a reducir los niveles de Phe hasta los intervalos recomendados. Trabajando estrechamente con un dietista, algunos pacientes con PKU que responden a Kuvan<sup>®</sup> pueden ser capaces de aumentar la cantidad de proteína natural que pueden comer. Sin embargo, los pacientes requerirán aún una dieta restringida en Phe.

10 En teoría, podrían diseñarse y producirse secuencias polipeptídicas sintéticas que comprendan una mezcla deseada de aminoácidos en un entorno de laboratorio. Este enfoque puede dar lugar a diversos problemas, sin embargo, y por tanto no siempre es aplicable. En primer lugar, los expertos son conscientes de que obtener altos niveles de producción de tales secuencias sintéticas puede resultar un gran reto. En segundo lugar, incluso si

15 una proteína sintética se sintetizara, su idoneidad para su uso en un producto nutritivo sería incierta. Por ejemplo, un polipéptido que no se produce de manera natural de este tipo podría ser un alérgeno o una toxina. Por tanto, se prefieren proteínas naturales.

También se ha propuesto el reemplazo de los residuos de Phe en proteínas naturales seguido por la producción recombinante de esas proteínas en la patente estadounidense n.º 6.495.344, que se refiere a ovoalbúmina y caseína, dos proteínas muy abundantes en huevos y leche, respectivamente y la patente estadounidense n.º 6.004.930, que da a conocer gamma zeínas, una clase de proteínas presentes en el maíz. Sin embargo, el reemplazo de Phe en proteínas naturales no siempre es posible y puede cambiar la estructura de la proteína de modo que la proteína ya no se exprese.

20 El documento WO 2013/148332 se refiere a secuencias polipeptídicas nutritivas que se producen de manera natural compuestas por combinaciones de aminoácidos que no contienen Phe o bajas en Phe, algunas de las cuales se secretan. El documento WO 2014/081884 se refiere a formulaciones de tales polipéptidos nutritivos aislados, por ejemplo para propósitos nutricionales. El documento WO 2016/046234 se refiere a un método para preparar una proteína sin Phe o proteína baja en Phe recombinante.

### Sumario de la invención

35 Un objetivo de la invención es proporcionar una proteína dietética sin Phe recombinante con un alto valor biológico para su uso en composiciones dietéticas para pacientes con acumulación de fenilalanina en el cuerpo para proporcionar todos los demás aminoácidos esenciales en un equilibrio dietéticamente suficiente.

40 En un aspecto, la invención se refiere a una proteína dietética recombinante que comprende una secuencia polipeptídica que es al menos el 70% idéntica a la SEQ ID NO 2. En una realización, la proteína dietética recombinante comprende una secuencia polipeptídica que es al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98% idéntica a la SEQ ID NO 2. En una realización incluso más preferida, la proteína dietética recombinante comprende una secuencia polipeptídica que es el 100% idéntica a la SEQ ID NO 2. La proteína dietética recombinante puede ser una porción dietéticamente suficiente de la

45 secuencia de SEQ ID NO 2 que es con preferencia creciente al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% idéntica a la SEQ ID NO 2.

50 En otra realización, la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma comprende una o más secuencias de proteína adicionales que son marcadores o etiquetas de purificación. En una realización preferida, la secuencia de proteína adicional comprende la SEQ ID NO 3.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a un microorganismo recombinante que comprende el vector que codifica para la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma. En una realización, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Actinomycetes*, *Caulobacter*, *Pichia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium botulinum*, *Flavobacterium heparinum*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha*, *Neurospora crassa*, *Arxula adenivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*. En una realización preferida, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus* o *Pseudomonas*. En una realización más preferida, el

60 microorganismo es *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas fluorescens*.

65

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de producción de la proteína dietética o porción dietéticamente suficiente de la misma, comprendiendo el método cultivar el microorganismo recombinante que porta el vector que codifica para la proteína recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma en condiciones adecuadas para la producción. La proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma puede purificarse. En una realización, la purificación se realiza con la ayuda de una etiqueta de purificación. Se prefiere que la proteína recombinante purificada o porción dietéticamente suficiente de la misma comprenda no más de 1 g de Phe por 100 g de proteína, preferiblemente no más de 0,45 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,35 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,25 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,15 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,13 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína y lo más preferido no más de 0,10 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición dietética que comprende la proteína dietética o porción dietéticamente suficiente de la misma. En una realización la composición dietética consiste en la proteína dietética o una porción dietéticamente suficiente de la misma. En otra realización la proteína dietética o una porción dietéticamente suficiente de la misma se combina con excipientes adicionales. En una realización preferida, la composición dietética contiene no más de 0,2 g de Phe por 100 g de proteína, preferiblemente no más de 0,1 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,05 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,04 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,03 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína y lo más preferido no más de 0,02 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína.

La proteína dietética o porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética es para su uso como alimento para propósitos médicos especiales; se hace referencia a las directrices de la EU 2009/39/EG ("Diätahmenrichtlinie") y 1999/21/EG ("diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke") así como a la regulación EU de la EU 609/2013 ("Food for special groups"; "Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder, Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke und Tagesrationen für gewichtskontrollierende Ernährung"), que entró en vigor el 20 de julio de 2016. En particular, la proteína dietética o porción dietéticamente suficiente de la misma o dicha composición dietética puede ser para su uso en el manejo de un trastorno caracterizado por la acumulación de fenilalanina en el cuerpo, tal como hiperfenilalaninemia (HPA), preferiblemente fenilcetonuria (PKU). Por tanto, en otro aspecto, la proteína dietética o porción dietéticamente suficiente de la misma o dicha composición dietética es para su uso como medicamento. En una realización preferida, la proteína dietética o porción dietéticamente suficiente de la misma es para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por la acumulación fenilalanina en el cuerpo. En una realización más preferida, el trastorno es HPA, más preferiblemente PKU.

## Figuras

La figura 1 muestra la progresión del peso de ratones con PKU tratados con dieta para ratón estándar (grupo 1, sin tratamiento), la dieta de proteína GSP105 sin Phe (grupo 2) o la dieta de aminoácidos sin Phe (grupo 3, tratamiento convencional) durante 28 días de alimentación. El eje x marca los días del periodo de alimentación, el eje y marca el peso de los animales en gramos.

La figura 2 representa gráficamente las concentraciones medias de Phe en el plasma sanguíneo de los tres grupos de ratones diferentes durante 28 días de alimentación. El eje x marca los días del periodo de alimentación, el eje y marca el nivel de L-Phe en micromoles por litro de plasma sanguíneo.

La figura 3 muestra un ratón a modo de ejemplo de cada grupo de dieta con cambios más o menos parciales, expresados de manera diferencial, en la hipopigmentación del pelaje de ratones después de 28 días de alimentación.

La figura 4 muestra la razón de fenilalanina con respecto a tirosina en la sangre de los tres grupos de ratones diferentes durante 28 días de alimentación. El eje x marca los días del periodo de alimentación, el eje y marca la fenilalanina/tirosina en la sangre.

La figura 5 muestra las concentraciones medias de Phe y Tyr en el cerebro de ratones silvestres (WT) y ratones con PKU tratados con dieta de ratón convencional, la dieta de proteína GSP105 sin Phe o la dieta de aminoácidos sin Phe.

La figura 6 muestra las relaciones medias de Phe/Tyr en el cerebro de ratones WT y ratones con PKU tratados con dieta de ratón convencional, la dieta de proteína GSP105 sin Phe o la dieta de aminoácidos sin Phe.

## Descripción detallada

Tal como se usa en el presente documento, "recombinante" se refiere a una biomolécula, por ejemplo, un gen o

- proteína, que (1) se ha retirado de su entorno en el que se produce de manera natural, (2) no está asociada con todo o una porción de un polinucleótido en el que el gen se encuentra de manera natural, (3) está operativamente unida a un polinucleótido con el que no está unida en la naturaleza y/o (4) no se produce en la naturaleza. El término “recombinante” puede usarse con referencia a aislados de ADN clonado, análogos  
5 polinucleotídicos sintetizados químicamente o análogos polinucleotídicos que se sintetizan biológicamente por sistemas heterólogos, así como proteínas y/o ARNm codificados por tales ácidos nucleicos. De este modo, por ejemplo, una proteína sintetizada por un microorganismo es recombinante si se sintetiza a partir de un ARNm sintetizado a partir de un gen recombinante presente en la célula.
- 10 El término “proteína dietética”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína adecuada para la ingestión humana. Las proteínas dietéticas que proporcionan todos los aminoácidos esenciales se denominan proteínas con un alto valor biológico. Una proteína sin Phe que proporciona todos los demás aminoácidos esenciales también se considera que es una proteína con un alto valor biológico. La caseína (una  
15 proteína comúnmente encontrada en la leche de mamíferos, que constituye hasta el 80% de las proteínas en la leche de vaca) y el suero lácteo (la proteína en el líquido que queda después de que la leche se haya cuajado y colado) son fuentes importantes de proteínas dietéticas con un alto valor biológico. La proteína dietética de la invención comprende todos los aminoácidos esenciales con la excepción de Phe. El término “porción dietéticamente suficiente de la misma” se refiere a una parte de la proteína dietética. La porción dietéticamente suficiente de la proteína dietética tiene menos aminoácidos que la proteína dietética de la invención pero todavía  
20 comprende todos los aminoácidos esenciales con la excepción de Phe.
- El término “dietéticamente suficiente”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia polipeptídica que comprende todos los aminoácidos esenciales excepto fenilalanina y es una proteína con un alto valor biológico.  
25
- El término “aminoácidos esenciales”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a histidina (His, H), arginina (Arg, R), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), treonina (Thr, T), triptófano (Trp, W) y valina (Val, V), que son aminoácidos necesarios para la salud y el crecimiento, pero que no puede sintetizar el cuerpo humano y deben obtenerse de los alimentos.  
30
- El término “microorganismo recombinante”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo que se ha modificado para portar una copia de un gen recombinante.
- Tal como se usa en el presente documento, una “composición dietética” es una composición adecuada para el consumo humano. La composición dietética puede comprender principalmente proteína. La composición dietética de la invención comprende la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma y tiene un bajo contenido en fenilalanina total.  
35
- El término “proteína que se produce de manera natural”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que se genera a partir de una secuencia inalterada por el hombre presente en un huésped natural. Por tanto, ni la secuencia de ADN que codifica para la proteína, ni la secuencia de aminoácidos de la propia proteína, se ha alterado con respecto a las secuencias encontradas en el huésped natural.  
40
- Para los propósitos de esta divulgación, un “producto nutritivo” es un producto adecuado para consumo humano que comprende la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietética suficiente de la misma o la composición dietética de la invención y contiene una cantidad deseable de aminoácidos esenciales. La cantidad deseable de aminoácidos esenciales requerida por un paciente al día depende de la edad del paciente y la dieta del paciente, es decir, el nivel de restricción de proteína y/o Phe. La cantidad diaria deseable puede determinarla el médico y/o un dietista por métodos conocidos en la técnica. Una cantidad típica se basa, por ejemplo, en 0,8 g de proteína por kg de peso corporal al día para adultos o 1,2 g de proteína por kg de peso corporal al día para niños. El propio producto nutritivo, es decir, antes de que se añada la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética de la invención, no contiene proteína ni componentes con bajo contenido en proteína.  
45  
50
- Tal como se usa en el presente documento, una “etiqueta de purificación” es cualquier polipéptido que tenga un par de unión que pueda usarse para detectar, aislar y/o purificar una segunda proteína o secuencia polipeptídica de interés fusionada a la etiqueta de purificación. Varios ejemplos se conocen bien en la técnica e incluyen una etiqueta de His-6, un epítipo de FLAG, un epítipo de c-myc, una Strep-TAGII, una de biotina, una glutatión 5-transferasa (GST), una proteína de unión de quitina (CBP), una proteína de unión de maltosa (MBP), una  
55 etiqueta de afinidad a metal o la Tag54 (Rasche *et al.*, The Open Biotechnology Journal 2011, 5:1-6) o modificaciones de las mismas.  
60
- La invención se refiere en un aspecto a una proteína dietética recombinante sin Phe con un alto valor biológico. El ejemplo 1 describe el proceso para identificar una proteína dietética de este tipo usada para la producción de la proteína dietética recombinante sin Phe de la invención que puede usarse para el manejo dietético de pacientes con acumulación de fenilalanina en el cuerpo. La “proteína de estrés general 16O (G16O\_BACSU)”  
65

(SEQ ID NO 1) (número de registro del banco de datos de proteínas UniprotKb n.º P80872) de *Bacillus subtilis* (cepa 168) se identificó como proteína candidata adecuada. El único residuo de Phe se reemplazó por el aminoácido estructuralmente similar triptófano (Trp) reemplazando el triplete de bases que codifica para Phe por un triplete de bases que codifica para triptófano al nivel de ADNc. Este reemplazo da como resultado una proteína dietética que no contiene Phe, sino en su lugar el aminoácido esencial Trp, proporcionando por tanto una proteína dietética que contiene todos los aminoácidos esenciales excepto Phe. La sustitución es por tanto ventajosa por dos motivos: en primer lugar se proporciona una proteína dietética sin Phe, en segundo lugar todos los demás aminoácidos esenciales están presentes en la proteína dietética y no se requiere suplementación. Esto es particularmente ventajoso, puesto que el Trp sabe muy amargo y añadir Trp libre a una composición dietética daría como resultado un sabor amargo. Además, se encontró sorprendentemente que la introducción del aminoácido de sabor amargo Trp no dio como resultado una proteína dietética con sabor amargo. De este modo, en una realización, la proteína dietética recombinante con un alto valor biológico que está libre de Phe y contiene todos los aminoácidos esenciales tiene una secuencia polipeptídica que es idéntica a la SEQ ID NO 2. Esa proteína dietética se denomina GSP105. En otra realización, la proteína dietética recombinante comprende una secuencia polipeptídica que es al menos el 70% idéntica a SEQ ID NO 2. Más preferiblemente, la proteína dietética recombinante comprende una secuencia polipeptídica que es al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98% idéntica, más preferiblemente al menos el 99% idéntica y lo más preferido al menos el 100% idéntica a la SEQ ID NO 2. Debe comprenderse que la identidad de secuencia ha de determinarse con respecto a la SEQ ID NO 2 a lo largo de toda su longitud. Por ejemplo, una proteína que comprende la secuencia de la SEQ ID NO 2 y que tiene en la parte C- y/o N-terminal de la proteína dietética aminoácidos adicionales se considera que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO 2, puesto que los aminoácidos C- y/o N-terminales pueden ignorarse para la comparación de secuencias.

La proteína dietética recombinante puede comprender una porción dietéticamente suficiente de la secuencia de la SEQ ID NO 2 que es con preferencia creciente al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% idéntica a la SEQ ID NO 2.

La proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma pueden comprender una o más secuencias de proteína adicionales que son marcadores o etiquetas de purificación. La secuencia de proteína adicional puede eliminarse opcionalmente por escisión. Si la proteína dietética o porción dietéticamente suficiente de la misma comprende más de una secuencia de proteína adicional, cada una, cualquier combinación o todas pueden ser eliminarse por escisión. Debe comprenderse que la secuencia de proteína adicional no introduce un residuo de Phe, o, en casos donde una secuencia de proteína adicional comprende un residuo de Phe, tal secuencia de proteína adicional se elimina por escisión. En una realización, la secuencia de proteína adicional comprende la SEQ ID NO 3. En una realización preferida, la secuencia de proteína adicional comprende una TAG54 modificada (Rasche *et al.*) en la que el residuo de Phe se reemplazó por otro aminoácido, preferiblemente un residuo de tirosina o alanina. De este modo, en una realización preferida particular, la secuencia de proteína adicional comprende la SEQ ID NO 4, la Tag54 modificada en la que el residuo del Phe se reemplazó por un residuo de alanina. En otra realización particularmente preferida, la secuencia de proteína adicional comprende la Tag54 modificada en la que el residuo de Phe se reemplazó por un residuo de tirosina (SEQ ID NO 5). Un reemplazo de este tipo tiene la ventaja de que el contenido de Tyr aumenta y la razón Phe/Tyr de la proteína dietética disminuye. En una realización preferida adicional, la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma comprende adicionalmente una etiqueta de His-6 C-terminal. En una realización particularmente preferida, la proteína dietética recombinante comprende una secuencia polipeptídica que es idéntica a SEQ ID NO 2 y comprende como secuencias de proteína adicionales una etiqueta de his-6 C-terminal y la SEQ ID NO 4, dando como resultado la proteína dietética recombinante etiquetada que tiene la secuencia dada a conocer en la SEQ ID NO 6 (= GSP105-6His-Tag54-p15). Las características de la proteína dietética recombinante etiquetada (SEQ ID NO 6) comparada con la proteína de estrés general 16O (GSP16O) de *B. subtilis* se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1: Comparación de la proteína GSP16O que se produce de manera natural y la proteína dietética recombinante etiquetada GSP105 (SEQ ID NO 6) producida en *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*

	GSP16O	GSP105-6His-Tag54-P15	
Origen	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Contenido de Phe [%]	0,6	0	0
Peso molecular [kDa]	19	21	21
Modificaciones	-	Phe → Trp etiqueta de His6, Tag54-P15	Phe → Trp etiqueta de His6, Tag54-P15
Propiedades especiales	secretada, estable al calor	secretada, estable al calor, sabor neutro	estable al calor, sabor neutro

- La etiqueta de His-6 y/o Tag54 modificada puede usarse para la purificación de la proteína dietética recombinante o una porción dietéticamente suficiente de la misma. Se encontró de manera sorprendente que la etiqueta Tag54-P15 mejora la expresión de la proteína en *B. subtilis*. Además, la secuencia de proteína adicional de la Tag54 modificada proporciona de manera ventajosa aminoácidos para la composición de aminoácidos total de la proteína dietética, mejorando de ese modo la composición de aminoácidos total de la proteína dietética recombinante. Todavía adicionalmente, la Tag54 modificada puede servir como epítipo de detección para la proteína de fusión.
- La proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma puede comprender además una cola de diseñador. Una "cola de diseñador" se refiere a un tramo corto de aminoácidos que puede añadirse al extremo C- o N-terminal de la proteína. La cola de diseñador contiene de 1 a 5 aminoácidos. En una realización, la proteína dietética comprende una secuencia polipeptídica que es al menos el 70% idéntica a la SEQ ID NO 2 y una cola de diseñador. Opcionalmente, la proteína dietética puede comprender además una o más secuencias de proteína adicionales, tales como una etiqueta de His-6 y/o una Tag54 modificada. En una realización preferida, la cola de diseñador está constituida por tirosina. En una realización particularmente preferida, la cola de diseñador tiene una tirosina, más preferiblemente dos tirosinas y los más preferido tres tirosinas. Por tanto, en una realización, la proteína dietética o una porción dietéticamente suficiente de la misma comprende una secuencia polipeptídica que es al menos el 70% idéntica a la SEQ ID NO 2, una cola de diseñador constituida por tirosina que comprende al menos un residuo de tirosina, una etiqueta de His-6 y una Tag54 modificada.
- En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma. En una realización, el vector es un plásmido. En una realización preferida, el plásmido es el plásmido de expresión inducible por IPTG pHT43 (MoBiTec) o el plásmido de expresión inducible por IPTG pDAB107209 (Dow; documento US 2008/0269070 A1).
- Una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma puede determinarla fácilmente un experto en la técnica usando métodos conocidos tales como traducción inversa. La traducción inversa es un método donde se usa una secuencia de proteína como entrada y después de usar una tabla de uso de codones, se obtiene una secuencia de ADN que representa la secuencia codificante no degenerada más probable. La secuencia de aminoácidos obtenida puede optimizarse utilizando algoritmos de optimización conocidos. Esto permite al experto obtener una secuencia de ácido nucleico optimizada para la expresión en un huésped específico. El experto también puede obtener ácidos nucleicos comercialmente proporcionando la secuencia de aminoácidos deseada y el organismo huésped en el que va a producirse la proteína. Una secuencia de ácido nucleico a modo de ejemplo para la producción de la proteína dietética recombinante que tiene la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO 6 en *B. subtilis* se muestra en la SEQ ID NO 7. Sin embargo, debe comprenderse que otras secuencias de ácido nucleico, tales como secuencias de ácido nucleico que tienen codones optimizados para células huésped específicas, pueden desviarse de la secuencia a modo de ejemplo al tiempo que produce todavía la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma. Incluso para que el mismo organismo la secuencia de ácido nucleico puede variar dependiendo del productor comercial y el algoritmo usado.
- En otro aspecto, la invención se refiere a un microorganismo recombinante que comprende el vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma. Por tanto, la invención se refiere a un microorganismo recombinante que expresa la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma. En una realización, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Actinomycetes*, *Caulobacter*, *Pichia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium botulinum*, *Flavobacterium heparinum*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha*, *Neurospora crassa*, *Arxula adenivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*. En una realización preferida, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus* o *Pseudomonas*. En una realización más preferida, el microorganismo es *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas fluorescens*.
- En otro aspecto, la invención se refiere a un método de producción de la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma, comprendiendo el método cultivar el microorganismo recombinante de la invención en condiciones adecuadas para la producción de la proteína dietética o porción dietéticamente suficiente de la misma por el microorganismo recombinante. En una realización, el método comprende cultivar el microorganismo recombinante, extraer la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma, purificar la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma y secar la proteína obtenida. En otra realización, el método

comprende las etapas de cultivar el microorganismo recombinante, tal como *Bacillus*, recoger el sobrenadante, concentrar opcionalmente el sobrenadante, purificar la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma, intercambiar el tampón por agua y secar por congelación y/o pulverización y/o tambor y/o extrusión la proteína obtenida. El cultivo del microorganismo recombinante comprende preferiblemente el uso de cultivos iniciador y principal. La recogida y concentración del sobrenadante comprende preferiblemente diafiltración, más preferiblemente filtración por flujo cruzado usando fibras huecas que tienen tamaños de poro diferentes. Se prefiere que el sobrenadante después de la concentración se concentre al menos 10 veces. La purificación de la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma puede comprender cromatografía de afinidad por ion de metal inmovilizado (IMAC), usando preferiblemente iones de zinc y Sepharose quelante. Opcionalmente, la proteína purificada puede concentrarse después de intercambiar el tampón por agua. Por tanto, en una realización preferida, el método comprende las etapas de cultivar el microorganismo recombinante usando cultivos iniciador y principal, recoger el sobrenadante, concentrar el sobrenadante al menos 10 veces, purificar la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma, intercambiar el tampón por agua, concentrar opcionalmente la proteína purificada y secar por congelación y/o pulverización la proteína obtenida.

El método de producción de la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma da como resultado altos rendimientos de proteína, tal como al menos 100-500 mg/l en *B. subtilis* o al menos 2,4 g/l en *Pseudomonas fluorescens*. La proteína recombinante purificada o porción dietéticamente suficiente de la misma comprende no más de 1 g de Phe por 100 g de proteína, preferiblemente no más de 0,45 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,35 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,25 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,15 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,13 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína y de manera más preferida no más de 0,10 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína.

La proteína secada por congelación y/o pulverización y/o tambor y/o extrusión purificada puede almacenarse en un estado congelado, tal como a -20°C, en condiciones enfriadas, tal como a 4°C, o a temperatura ambiente. En una realización preferida, la proteína secada por congelación y/o pulverización y/o tambor y/o extrusión purificada es almacenada a -20°C.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición dietética que comprende la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma, o bien sola o bien opcionalmente con excipientes adicionales. En una realización, la composición dietética de la invención se suplementa con excipientes adicionales seleccionados del grupo que consiste en vitaminas esenciales, minerales y oligoelementos, sustancias de tipo vitamina (tales como, pero sin limitarse a taurina, mioinositol, colina y carnitina), lípidos (como, pero sin limitarse a, grasas, aceites, ácidos grasos, ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), triglicéridos, fosfolípidos, lecitina, ésteres de ácido graso o colesterol), hidratos de carbono (tales como, pero sin limitarse a, mono-/di-/oligo-/polisacáridos, almidón, glucanos, fructanos o pentosanos), nucleótidos, proteína, péptidos, aminoácidos (tales como tirosina) y productos de reacción de los mismos, ácidos, reguladores de la acidez, agentes anticompactación, agentes antiespumantes, antioxidantes, aglutinantes, tampones (tales como, pero sin limitarse a, citrato de sodio, carbonato de magnesio, bicarbonato de magnesio, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio), agentes de carga, emulsificantes, enzimas, agentes reafirmantes, aromas, potenciadores del aroma, agentes espumantes, agentes gelificantes (tales como, pero sin limitarse a, goma guar, xantana, alginato, carragenina, pectina), agentes de glaseado, humectantes, almidones modificados, conservantes, gas propelente, agentes leudantes, secuestrantes, estabilizadores, espesantes (tales como, pero sin limitarse a, almidón, celulosa), edulcorantes, colores para alimentos, hierbas, especias, extractos de plantas y fitoquímicos. En una realización preferida la composición dietética puede suplementarse con tirosina.

En una realización la composición dietética se prepara como un polvo, gránulos, comprimido, capsula, aglomerado, composición congelada, microgránulo, disolución, disolución macromolecular, hidrocoloide, sistema disperso complejo, suspensión, emulsión, líquido, espuma, gel, sol, sol sólido, espuma sólida, cristal, sólido amorfo, píldora, extrudido o pasta. La composición dietética puede almacenarse con o sin enfriamiento en una forma secada, secada por congelación, secada por pulverización, secada por tambor o secada por extrusión.

En una realización preferida, la composición dietética contiene no más de 0,2 g de Phe por 100 g de proteína, preferiblemente no más de 0,1 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,05 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,04 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferido no más de 0,03 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína y lo más preferido no más de 0,02 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína.

La proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética de la invención puede usarse en un producto nutritivo. El producto nutritivo puede seleccionarse de, pero no se limita a, el grupo que consistente en bebidas, sopas, barras prensadas, obleas, barquillos, pudines, alimentos similares a geles, alimentos similares a carne tales como los análogos de carne

que comprenden fibras no animales, análogos de salchicha, productos horneados, salsas, aderezos de ensalada, cereales, copos, mezclas de horneado, tales como mezclas de molletes, mezclas de barquillos o mezclas de creps, harinas, galletas, galletas crujientes, cremas, espumas, flanes, natillas, compotas, helados, sorbetes, pudines o parfaits, salsas para mojar, alimentos untables, jarabes, purés, gelatinas, jaleas, mantequillas, mermeladas, análogos de queso, análogos de queso crema, análogos de yogur, análogos de leche, patatas fritas y sólidos extrudidos. El producto nutritivo puede producirse y comercializarse comprendiendo la composición dietética de la invención o preparada individualmente por el paciente. Por ejemplo, pueden prepararse bebidas o sopas añadiendo la composición dietética a agua, zumo de frutas, leche de arroz o caldo vegetal. De manera ventajosa, la proteína dietética recombinante o porción dietéticamente suficiente de la misma tolera el tratamiento térmico sin cambios en su valor nutricional, consistencia o aroma. Por tanto, cuando se prepara un producto nutritivo, tal como por ejemplo, productos horneados, cereales, sopas o barras prensadas, la proteína dietética recombinante o una porción dietéticamente suficiente de la misma puede calentarse, hornearse, hervirse, freírse, freírse profundamente, saltearse, estofarse, cocida a fuego lento, asarse, cocerse al vapor, escalfarse, cocinarse a fuego lento, cocinarse a la parrilla, cocinarse sous-vide, homogeneizarse, esterilizarse, tindalizarse, tratarse a alta presión-baja temperatura, cocinarse al vacío, procesarse por congelación, pasteurizarse o extrudirse.

En una realización, el producto nutritivo contiene cantidades muy bajas de Phe. En una realización preferida, el producto nutritivo no contiene Phe. La cantidad de contaminante de Phe en la composición dietética de la invención que se añade al producto nutritivo puede variar dependiendo del producto nutritivo. En una realización, el producto nutritivo contiene no más de 0,2 g de Phe por 100 g de proteína, preferiblemente no más de 0,1 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,05 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferiblemente no más de 0,04 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína, más preferido no más de 0,03 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína y lo más preferido no más de 0,02 g de contaminante de Phe por 100 g de proteína.

En otro aspecto, la invención se refiere a la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética de la invención para su uso como medicamento y/o alimento para propósitos médicos especiales. La proteína dietética recombinante o una porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética puede estar en forma de un polvo, gránulos, comprimido, microgránulo, suspensión, emulsión, líquido, píldora, extrudido o pasta. La administración puede ser de tres a cinco veces al día. La dosificación puede ser por ejemplo de al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 g de proteína dietética. La administración puede ser con las comidas. La administración puede ser por vía oral o enteral. Preferiblemente, la administración es por vía oral. El medicamento puede administrarse a niños, adolescentes y adultos. En una realización preferida, la proteína dietética recombinante de la invención o porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética de la invención es para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por la acumulación de fenilalanina en el cuerpo. En una realización incluso más preferida, el trastorno es hiperfenilalaninemia o fenilcetonuria. En una realización preferida adicional, la proteína dietética recombinante o una porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética se usa en combinación con un medicamento para el manejo de la PKU o HPA, tales como BH4 o análogos de la misma.

La idoneidad de la proteína dietética recombinante de la invención para su uso en el manejo de la fenilcetonuria (PKU) se muestra en el ejemplo 3. El ejemplo 3 muestra los resultados de un estudio piloto en el cual ratones con PKU se tratan o bien con una dieta en la que su única fuente de aminoácidos es una mezcla de aminoácidos libres sin Phe pero con el 1,5% de Tyr (Harlan Teklad TD.97152; Seagraves and McBride, Mol Genet Metab 2012, 107(4):650-658) (denominada en el presente documento como "dieta de aminoácidos sin Phe") que se asemeja al estándar actual en alimentos médicos para pacientes con PKU, o con una dieta su única fuente de aminoácidos es la proteína dietética recombinante GSP105 suplementada con el 0,2% de Phe (denominada en el presente documento "dieta de proteína GSP105 sin Phe" o "dieta GSP105 sin Phe"). La suplementación de la dieta con Phe en el experimento se realizó debido a que los ratones no tenían de otro modo acceso a este aminoácido esencial. Los ratones alimentados con la dieta de proteína GSP105 sin Phe mostraron mantenimiento del peso o aumento del peso en oposición a los ratones alimentados con la dieta de aminoácidos sin Phe que mostraron pérdida de peso (figura 1). Esto puede explicarse por el hecho de que la proteína dietética recombinante es una fuente de proteína estructuralmente intacta. Aunque dentro del campo dietético existe un debate sobre si las proteínas y fragmentos de proteína permanecen disponibles para propósitos metabólicos en comparación con composiciones de aminoácidos libres, se cree que el conjunto de aminoácidos disponibles de una composición de aminoácidos cristalinos tiene que ser metabolizarse inmediatamente, puesto que el cuerpo no puede almacenarlos para uso metabólico futuro. Las proteínas y fragmentos de proteína, sin embargo, se digieren sucesivamente, lo que proporciona una liberación continua de aminoácidos libres disponibles para propósitos metabólicos durante un periodo de tiempo más prolongado. De este modo, usando la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética de la invención podrían proporcionarse aminoácidos durante un periodo más prolongado, dando como resultado por tanto un mantenimiento del peso o aumento del peso.

Sin querer restringirse a la teoría, la pérdida de peso en ratones alimentados con la dieta de aminoácidos sin Phe también podría derivarse de la ausencia de la cantidad de Phe mínima requerida en la dieta, puesto que es posible que los animales alcanzaran un metabolismo catabólico en el que la proteína endógena se metabolizó

para mantener los niveles de Phe requeridos en la sangre. Un fenómeno de este tipo también puede observarse en pacientes con PKU que padecen desnutrición, que metabolizan proteína endógena y a su vez padecen niveles elevados de Phe en sangre. La ausencia completa y absoluta de Phe en la dieta de pacientes con PKU no es deseable ni imposible, de este modo los pacientes con PKU obtienen la cantidad mínima del aminoácido esencial Phe con su alimento. Puede producirse desnutrición por otro lado en pacientes con PKU, puesto que la dieta estricta puede provocar la carencia de otros aminoácidos esenciales también. De este modo, usando la proteína dietética recombinante de la invención o una porción dietéticamente suficiente de la misma o la composición dietética de la invención podría prevenirse la desnutrición en pacientes con PKU.

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1 – Descubrimiento del gen candidato

15 Para identificar posibles proteínas candidatas que satisfagan los criterios requeridos para una proteína nutricional sin fenilalanina, se usó un algoritmo de búsqueda autodiseñado. Se obtuvieron las secuencias de proteínas de diversos géneros o especies de la base de datos de UniProt (<http://www.uniprot.org>) usando la característica de importación de CLC Main Workbench 6.6.1.

20 Se usaron proteínas provenientes de especies que son fuentes comunes de alimentos como vegetales (por ejemplo, patata), pero también que se originan de microorganismos (por ejemplo, levaduras) o animales (por ejemplo, bovinos). Se usó el nombre latino o común de la especie/género, dependiendo de qué nombre dio de como resultado un número más grande de aciertos, como cadena para la búsqueda. Todos los aciertos excepto las proteínas no caracterizadas se descargaron, dando como resultado un número total de 836.037 secuencias de diversas especies. Las siguientes cadenas de búsqueda se usaron para identificar los aciertos enumerados en la tabla 2.

30 Se usó la función “Crear Estadísticas de Secuencia” dentro de CLC con lotes de 5.000 a 10.000 secuencias para generar además listas de los aminoácidos presentes en cada uno de los 836.037 genes. Esas listas se importaron a Excel, donde la composición de aminoácidos se comparó con dos estándares nutricionales: el denominado principio de patata-huevo (Kartoffel-Ei Standard, KES), así como la composición de aminoácidos que el fabricante Milupa está usando en su producto PKU1, una composición de aminoácidos sin Phe usada para el tratamiento de pacientes con PKU.

35 Adicionalmente, se analizó el número total de Phe en la secuencia de aminoácidos, así como el número total de aminoácidos. Todos los factores analizados se clasificaron según los parámetros en la tabla 3.

Tabla 2: Secuencias ordenadas de caracteres de búsqueda para la selección de genes y el número de aciertos correspondientes

Cadena de búsqueda	Aciertos	Cadena de búsqueda	Aciertos	Cadena de búsqueda	Aciertos
<i>Lactobacillus</i>	259251	<i>Porphyra</i>	1214	Mango	241
<i>Bifidobacterium</i>	80262	<i>Gadus</i>	1084	<i>Merluccius</i>	231
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73620	<i>Psetta</i>	979	<i>Clupea</i>	221
<i>Oryza</i>	67411	<i>Musca</i>	898	<i>Lophius</i>	163
Maíz	63309	Fresa	739	<i>Echinochloa</i>	154
<i>Bacillus subtilis</i>	47456	<i>Secale</i>	721	<i>Equisetum arvense</i>	146
<i>Panicum</i>	40273	Zanahoria	668	<i>Urchloa</i>	145
<i>Setaria</i>	39691	<i>Spinacia oleracea</i>	624	Trigo + almacenamiento	112
<i>Solanum lycopersicon</i>	37921	Garbanzo	584	<i>Digitaria</i>	101
Sorgo	34201	<i>Thunnus</i>	551	<i>Hypericum perforatum</i>	84
Cebada	26663	<i>Latuca sativa</i>	500	<i>Achillea millefolium</i>	81
Salmo	14939	<i>Linum usitatissimum</i>	499	Sardina	76
<i>Triticum</i>	8766	Salvia	472	<i>Pollachius</i>	60
<i>Bos taurus</i>	7498	Cucurbita	401	<i>Plantago lanceolata</i>	57
<i>Citrus</i>	5694	Cucurbita	395	<i>Verbascum</i>	45
<i>Sus scrofa</i>	4905	<i>Pennisetrum</i>	374	Timo	44
<i>Sebastes</i>	2980	<i>Crataegus</i>	289	<i>Viscum album</i>	44

Patata	2548	<i>Eragrostis</i>	288	<i>Urtica dioica</i>	42
<i>Ipomoea</i>	1635	<i>Eleusine</i>	288	<i>Matricaria</i>	40
<i>Cyprinus</i>	1559	<i>Coix</i>	274	<i>Rosmarinus officinalis</i>	24
<i>Essox</i>	1509	<i>Papalum</i>	245	<i>Tussilago farfara</i>	18

Los aciertos por encima de una puntuación total de 20 (suma de las puntuaciones para el contenido de Phe, peso molecular y desviación de KES y PKU1 de una sola proteína) se clasificaron manualmente en cuanto al estado de la secuencia (completa o parcial), existencia de proteínas (evidencia a nivel de proteína, predicha, inferida a partir de la homología), función de la proteína y potencial alergénico (<http://www.allergenonline.org>, ventana deslizable de 80 meros). Las proteínas con una secuencia completa, evidencia a nivel de proteína y ausencia de potencial alergénico se preseleccionaron y analizaron adicionalmente con respecto a su función molecular. Todas las proteínas que tienen una actividad de unión a ADN/ARN conocida o predicha, así como proteínas tóxicas, se rechazaron de la lista de posibles candidatos.

Entre las candidatas restantes se identificó la “proteína de estrés general 16O (G16O\_BACSU)” de *Bacillus subtilis* (cepa 168) como proteína adecuada candidata.

Basándose en la secuencia de proteína publicada en UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), se diseñó un gen sintético usando la función de traducción inversa de CLC Main Workbench.

Tabla 3: Evaluación de proteínas candidatas

Contenido en fenilalanina		Peso molecular		Desviación en la composición de aminoácidos con relación a PKU1 y KES (sin F,Q,N)	
Número total de Phe	Puntuación	AS	Puntuación	Desviación	Puntuación
> 10	-10	> 500	0	> 80	-2
< 10	1	< 500	1	< 80	0
< 6	2	< 200	2	< 60	2
< 3	4	< 80	0	< 40	5
< 2	8	< 50	-100	< 30	10
< 1	10				

\* La desviación se calcula como el valor absoluto añadido entre cada aminoácido en la secuencia de proteína analizada en comparación con la composición de referencia de KES y PKU1 (en porcentaje).

Se añadieron dos secuencias de etiqueta de epítipo (Tag54-P15, etiqueta de His6) al extremo 3' de la secuencia que codifica para la proteína de estrés general (GSP) para permitir la detección, cuantificación y purificación de proteínas específicas dando resultado la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO 7. Adicionalmente, se añadieron los sitios de enzimas de restricción BamHI y AatII al extremo de 5' y 3' permitiendo la clonación del constructo génico en un vector de expresión.

La secuencia génica se diseñó como GSP105 y se optimizó con respecto al uso de codones y estabilidad del ARN para la expresión en *Bacillus subtilis* y posteriormente la sintetizó GenScript (EE.UU.).

### Ejemplo 2 – Producción en *B. subtilis*

El gen sintético GSP105 que tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO 7 se insertó en el vector de expresión de *Bacillus subtilis* pHT43 (MoBiTec, Göttingen, Alemania), que permite la secreción de la proteína recombinante en el medio de cultivo, y se introdujo en la cepa de *B. subtilis* deficiente en proteasa WB800N (MoBiTec), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Después de la transformación, se seleccionaron clones positivos sobre placas de selección con antibiótico; la presencia del vector de expresión se confirmó adicionalmente por PCR, extracción del plásmido y secuenciación de ADN posterior. Se generaron cultivos madre en glicerol y se almacenaron a -80°C.

Se preparó un cultivo iniciador de *B. subtilis* recombinante GSP105 inoculando 1 l de medio TB (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania), suplementado con cloranfenicol (Carl Roth) y neomicina (Carl Roth) a las concentraciones finales de 5 µg/ml cada uno, con 1 ml de disolución madre de *B. subtilis* GSP105. Se hizo crecer el cultivo durante 24 h a 28°C y 160 rpm en “Matraces de Ultra Rendimiento” de 2,5 l (Thomson Instrument Company, California, EE.UU.).

Para la expresión de proteína recombinante, se inoculó el medio TB suplementado con cloranfenicol y neomicina con el cultivo iniciador a una razón de 1:20 (v/v). Para inducir la expresión de la proteína objetivo, se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,5  $\mu$ M. Se hizo crecer el cultivo durante 20 h a 37°C y 160 rpm.

5 Después del cultivo, se retiraron las células por centrifugación, seguido por filtración estéril usando un módulo de filtración de fibras huecas de 0,22  $\mu$ m (N02-E20U-05-N, Spectrum Labs, Los Angeles, EE.UU.) a 2,5 l/min con una presión transmembrana de hasta 1,6 bares. Para reducir el volumen de proceso, el sobrenadante de cultivo clarificado se concentró 10 veces usando un módulo de fibra hueca de 10 kDa (N02-E010-05-N, Spectrum Lab) a 2,5 l/min hasta una presión transmembrana de 1,6 bares.

10 Se purificó GSP105 del sobrenadante de cultivo concentrado por medio de IMAC usando 500 ml de Sepharose quelante (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) empaquetada en una columna XK 50/40 y cargada con iones de Zn según las instrucciones de los fabricantes. Se cargó el sobrenadante sobre la columna con 76 cm/h; posteriormente la columna se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de PBS a 92 cm/h. La proteína unida se eluyó de la columna con 5 CV de PBS, pH 8,0, imidazol 250 mM a 92 cm/h. Se reunieron las fracciones de elución de IMAC y el tampón se intercambió por agua sin sal usando un módulo de fibras huecas de 10 kDa (S02-E010-05N, Spectrum Labs) a 900 ml/min con una presión transmembrana de hasta 1,6 bares. Para garantizar un intercambio de tampón eficiente, el volumen de muestra se reemplazó siete veces. La proteína purificada y vuelta a tamponar se almacenó a -20°C y posteriormente se secó por congelación y pulverización.

20 La concentración de GSP105 se determinó por medio de ELISA de competición (Piotrkowski *et al.*, PLoS ONE, 2012, 7(9):e45803), la integridad y pureza de la proteína se confirmaron por SDS-Gel e inmunotransferencia (Rasche *et al.*).

### 25 Ejemplo 3 – Estudio de alimentación de ratones (estudio piloto)

#### *Diseño del estudio:*

30 Seis ratones adultos, macho, homocigotos con PKU (Pah<sup>enu2/2</sup>; Shedlovsky *et al.*, Genetics 1993, 134:1205; <http://www.pahdb.mcgill.ca/?Topic=Information&Section=Mouse&Page=1>) se separaron en 3 grupos de 2 ratones cada uno. Los animales pertenecientes al mismo grupo compartieron una jaula. Los grupos se alimentaron con las dietas enumeradas en la tabla 4. Las diferencias principales entre las dietas fueron el componente de proteína y el contenido de Phe, tal como se expone en la tabla 5. Antes del estudio de alimentación, los ratones con PKU se alimentaron con dietas de ratón convencionales. El estudio de alimentación se prolongó durante un periodo de 28 días, durante el cual a los animales se les proporcionó alimento y agua a voluntad.

Tabla 4: Grupos de animales y dietas de animales (N=6)

Grupo de animales	Dieta	Número de animales
1	Dieta de ratón convencional	2
2	Dieta de proteína GSP105 sin Phe	2
3	Dieta de aminoácidos sin Phe	2

40 Tabla 5: Dietas de animales

Dieta	% de proteína	Contenido de Phe
Dieta de ratón convencional	18,5 (proteína en bruto)	Proteína en bruto (caseína)
Dieta de proteína GSP105 sin Phe	18,5 (GSP105)	GSP105, Phe suplementada a 2 g/kg
Dieta de aminoácidos sin Phe (Harlan Teklad, TD.97152)	15,4 (aminoácidos libres)	Reemplazada con el 1,5% de tirosina

45 La “dieta de proteína GSP105 sin Phe” o “dieta GSP105 sin Phe” se refiere a una dieta en la que la única fuente de aminoácidos es la proteína recombinante dietética GSP105 suplementada con el 0,2% de Phe. La dieta de proteína GSP105 sin Phe no estaba totalmente libre de Phe. La fracción de proteína GSP105 purificada contenía una pequeña cantidad de contaminación probablemente resultante de medios traza o metabolitos secundarios que contribuyeron a 0,45 gramos de Phe por 100 g de proteína total. La proteína GSP105 estaba por sí misma completamente libre de Phe. La contaminación de Phe menor no supuso ningún problema para los ratones con PKU. Además, puesto que la Phe es un aminoácido esencial y no estaban disponibles fuentes nutritivas alternativas para los animales, se añadió Phe cristalina a la dieta de proteína GSP105 sin Phe hasta una concentración final de Phe de aproximadamente el 0,2%.

50 La “dieta de aminoácidos sin Phe” se refiere a una dieta en la que la única fuente de aminoácidos es una mezcla de aminoácidos libres sin Phe pero con el 1,5% de Tyr que se asemeja al estándar actual en alimentos médicos

para pacientes con PKU. La dieta de aminoácidos sin Phe estaba totalmente libre de Phe, mientras que el contenido de tirosina se aumentó hasta el 1,5%.

En la "dieta de ratón convencional", la única fuente de proteína era la caseína.

5

En los días 0, 1, 7, 14, 21 y 28, se muestrearon 5-10 µl de sangre de la vena de la cola de los animales después de que hubieran ayunado durante 4 horas. El contenido de Phe y tirosina en plasma sanguíneo se determinó por análisis de EM/EM.

10

Los días 0, 1, 2, 4 y 7, los ratones se pesaron y se verificó su salud general.

Los días 14, 21 y 28, los ratones se pesaron únicamente. El día 28, todos los animales se sacrificaron por eutanasia con CO<sub>2</sub>. Se recogieron el hígado, los riñones, el cerebro y el corazón de cada animal y se congelaron en nitrógeno líquido para ensayos adicionales.

15

*Resultados:*

*Peso corporal*

20

La alimentación con la dieta de ratón convencional dio como resultado en principio el mantenimiento del peso (figura 1, líneas continuas con cuadrados). Cuando se alimentaron con la dieta de proteína GSP105 sin Phe, los ratones con PKU aumentaron de peso (figura 1, líneas de puntos con círculos), mientras que los ratones alimentados con la dieta de aminoácidos sin Phe demostraron una ligera pérdida de peso (figura 1, líneas discontinuas con triángulos). Aunque el tamaño pequeño del grupo no permitió el análisis estadístico, la tendencia observada apoya a GSP105 como un componente de proteína adecuado para el mantenimiento del peso y/o aumento del peso. El aumento de peso observado puede deberse al hecho de que es una proteína dietética con un valor biológico mayor que la caseína.

25

*Reducción de los niveles de Phe en sangre.*

30

Los ratones con PKU en la dieta de ratón convencionales conservaron un nivel de Phe promedio elevado en la sangre (figura 2, línea continua con cuadrados). La dieta de aminoácidos sin Phe dio como resultado una disminución drástica de los niveles medios de Phe en la sangre (<360 micromoles por litro, el intervalo fisiológico al que se aspiraba para tratamiento de la PKU) (figura 2, línea discontinua con triángulos). Los niveles medios de Phe en sangre de los animales en la dieta de proteína GSP105 sin Phe también disminuyeron claramente, aproximándose a <360 micromoles por litro después de 28 días (figura 2, línea de puntos con círculos). Estos resultados indican que la proteína dietética recombinante dada a conocer es adecuada para el manejo dietético de la PKU.

35

40

Los ratones con PKU no tratados con el antecedente genético C57BL/6 tienen pelaje marrón en oposición al pelaje negro observado en los ratones silvestres del mismo antecedente, un fenómeno denominado hipopigmentación. Los niveles elevados de Phe en sangre inhiben la enzima tirosinasa, que altera la síntesis del pigmento melanina. Los niveles disminuidos de Phe en sangre de los ratones alimentados con dietas sin o bajas en Phe dieron como resultado una reversión no totalmente completa pero parcial de la hipopigmentación sobre todo el cuerpo en los animales (figura 3). La figura 3 muestra un ratón a modo de ejemplo de cada grupo de dieta con cambios más o menos parciales, expresados de manera diferencial, en la hipopigmentación del pelaje de ratones después de 28 días de alimentación. Cada ratón se muestra de manera dorsal y ventral. Los ratones alimentados con la dieta de proteína GSP105 sin Phe mostraron un color casi completamente negro sobre el lado ventral. Las flechas blancas y negras indican la reversión más fuerte de la hipopigmentación alcanzada después del período de alimentación. Se supone una reversión completa del color del pelaje de marrón a negro en el caso de dietas sin o bajas en Phe con un periodo de alimentación prolongado.

45

50

*Razones de Phe/Tyr en plasma sanguíneo*

55

La dieta de aminoácidos sin Phe dio como resultado la razón de Phe/Tyr más baja en el plasma sanguíneo de ratones con PKU (figura 4, líneas discontinuas con triángulos), seguida por la dieta de proteína GSP105 sin Phe (figura 4, líneas de puntos con círculos). Los ratones con PKU con la dieta de ratón convencional se representan en la figura 4 como líneas continuas con cuadrados como referencia. La razón Phe/Tyr para la dieta de proteína GSP105 sin Phe podría mejorarse reduciendo la cantidad de contaminante de Phe de la proteína dietética recombinante purificada GSP105 y/o por suplementación de tirosina cristalina, tal como se usa en la dieta de aminoácidos sin Phe, o adición de una cola de diseñador que contiene tirosina.

60

Ejemplo 4 - Medición de las concentraciones de Phe y Tyr en el cerebro de ratones con PKU del ejemplo 3

65

*Métodos:*

*Preparación de tejido de cerebro de ratón.*

Se usaron los cerebros de los animales del ejemplo 3. Se descongelaron sobre hielo cerebros de ratón congelados completos y se lisaron en tampón de homogeneización (10 µl/mg de tejido) que contenía Tris-HCl 50 mm, pH 7,5, KCl 0,1 m, EDTA 1 mm, ditiotreitól 1 mm, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,2 mm, leupeptina 1 µm y pepstatina 1 µm, y se homogeneizaron usando un instrumento Quiagen TissueLyser II a 4°C. Después de la centrifugación a 13.000 g y 4°C durante 30 min, los sobrenadantes se mantuvieron congelados a -80°C.

*Medición de proteínas*

Las concentraciones de proteína en el tejido homogeneizado se determinaron por el método espectrofotométrico descrito por Bradford, usando γ-globulina como calibrador

*Preparación y derivatización de muestras*

Se prepararon muestras según el manual del kit Phenomenex EZ:faast™, con las siguientes modificaciones: antes de la extracción y derivación de aminoácidos, se añadieron 20 µl de cada disolución de patrón interno que contenía 100 µmol/l de Phe-d5 y 20 µmol/l de Tyr-d4 (en 50 mmol/l de HCl) a 40 µl de lisado de muestra. Usando el reactivo del equipo, se derivatizaron los aminoácidos con cloroformiato de propilo dando como resultado la adición de un formiato de propilo al resto amina y un grupo propilo en el extremo carboxílico de los aminoácidos, respectivamente. El grupo hidroxilo de Tyr también se derivatiza mediante la adición de un grupo formiato de propilo.

*Instrumentación*

Para la separación por RP (fase inversa)-HPLC de los aminoácidos, se usó una columna de 250×2 mm C18 (Phenomenex EZ:faast™). Los aminoácidos derivatizados se separaron usando el siguiente programa: (i) flujo isocrático del 75% de disolvente B durante 6 min; (ii) gradiente lineal del 75% al 95% (v/v) de disolvente B en 9 min; (iii) gradiente lineal del 95% al 100% de disolvente B en 0,1 min; (iv) flujo isocrático del 100% de disolvente B durante 3 min; (v) gradiente lineal del 100% al 75% de disolvente B en 0,1 min; (vi) flujo isocrático del 75% de disolvente B durante 2 min. Los disolventes A y B fueron formiato de amonio 10 mmol/l en H<sub>2</sub>O y formiato de amonio 10 nmol/l en metanol, respectivamente. La velocidad de flujo fue de 150 µl/min y el volumen de inyección fue de 10 µl. Se usaron un sistema de CL-ESI-EMEM SCIEX API 2000 de PerkinElmer equipado con inyector automático serie 200 de PerkinElmer y dos microbombas serie 200 de PerkinElmer para el análisis de CL-ESI-EMEM. Los aminoácidos se adquirieron usando el modo de ion positivo de modo de reacción múltiple (MRM), con las siguientes transiciones: 294→206 (Phe), 299→211 (Phe-d5), 302→214 (Phe-d8), 396→308 (Tyr) y 400→312 (Tyr-d4). El tiempo de residencia fue de 500 ms. Los espectros de masas se adquirieron en el intervalo de tiempo de 6 a 20 min.

**Resultados:***Reducción del nivel de Phe en el cerebro*

La figura 5 muestra las concentraciones medias de Phe y Tyr en el cerebro de ratones silvestres (WT), ratones con PKU tratados con la dieta de ratón convencional, la dieta de proteína GSP105 sin Phe o la dieta de aminoácidos sin Phe.

Las concentraciones medias de los aminoácidos fenilalanina y tirosina en el cerebro de ratones silvestres (WT) fueron aproximadamente las mismas (0,31 nmol de Phe/mg de proteína; 0,36 nmol de Tyr/mg de proteína) (figura 5) asemejándose a la situación en seres humanos sanos.

En cambio, la concentración media de Phe en el cerebro de ratones con PKU alimentados con la dieta de ratón convencional (grupo 1) mostró un aumento de 10 veces (3,82 nmol de Phe/mg de proteína) con una concentración media baja de Tyr de 0,18 nmol/mg de proteína, correspondiente a la situación de pacientes con PKU sin tratar.

La alimentación con la dieta de proteína GSP105 sin Phe (grupo 2) condujo a una reducción del 50% de la concentración media de Phe en el cerebro (1,78 nmol de Phe/mg de proteína) en comparación con la alimentación con la dieta de ratón convencional, mientras que la concentración media de Tyr se mantuvo baja (0,15 nmol/mg de proteína).

El nivel medio más bajo de Phe en el cerebro y el nivel medio más alto de Tyr en el cerebro se alcanzaron con la dieta de aminoácidos sin Phe en el grupo 3 (1,16 nmol de Phe/mg de proteína; 0,22 nmol/mg de proteína).

Los resultados de los análisis de las concentraciones de Phe y Tyr en el cerebro de ratones WT, al igual que las

de los ratones con PKU tratados y no tratados, coincidieron con los niveles de Phe en sangre y Tyr en sangre correspondientes en los diferentes grupos de alimentación de animales (figuras 2 y 4).

5 La disminución más fuerte de la concentración de Phe en el cerebro se obtuvo con la dieta de aminoácidos sin Phe. Teniendo en consideración que la influencia de una dieta baja en Phe sobre los niveles de Phe en el cerebro se retrasa y no es tan pronunciada como la influencia sobre la concentración de Phe en sangre, se supone una reducción adicional de Phe en el cerebro en el plazo de un período de alimentación prolongado con la dieta de proteína GSP105 sin Phe. Esta hipótesis se basa en la observación de que los niveles de Phe en sangre dentro de este grupo se aproximaron a las concentraciones de Phe en sangre de ratones alimentados con la dieta de aminoácidos sin Phe después de un período de alimentación de 28 días.

*Razón media de Phe/Tyr en el cerebro*

15 La figura 6 muestra la razón media de Phe/Tyr en el cerebro de ratones WT, ratones con PKU tratados con la dieta de ratón convencional, la dieta de proteína GSP105 sin Phe o la dieta de aminoácidos sin Phe.

20 La dieta de aminoácidos sin Phe dio como resultado la razón de Phe/Tyr más baja en el cerebro de ratones con PKU (figura 6, columna con el patrón de tablero de ajedrez), seguida por la dieta de proteína GSP105 sin Phe (figura 6, columna con tiras diagonales). Los ratones con PKU en la dieta de ratón convencional se describen en la figura 6 como la columna blanca con marco negro. La razón Phe/Tyr es significativamente mejor que para los ratones con PKU en la dieta convencional. La dieta de proteína GSP105 sin Phe podría mejorarse reduciendo la cantidad de contaminante de Phe de la proteína dietética recombinante purificada GSP105, y/o mediante la suplementación de tirosina cristalina, tal como se usa en la dieta de aminoácidos sin Phe, o la adición de una cola de diseñador que contiene tirosina.

25

**Lista de secuencias**

<110> MetaX Institut für Diätetik GmbH

30 <120> Proteína sin fenilalanina para el tratamiento de PKU

<130> M10927-EP/RN

35 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 168

40 <212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 1

ES 2 742 175 T3

Met Ala Leu Thr Lys Glu Gln Thr Gln His Leu Tyr His Lys Leu Leu  
1 5 10 15

Asp Met Gln Lys Glu Leu Ser Gly Glu Lys Lys Glu Thr Glu Ser Met  
20 25 30

Thr Glu Glu Val Gly Glu Leu Ser Asn Gly Val Asp Asn His Met Ala  
35 40 45

Asp His Gly Thr Leu Val Thr Asp Arg Met Thr Asp Gln Thr Val Lys  
50 55 60

Glu Ile Asp Arg Glu Leu Leu Glu Glu Val Asn Arg Ala Leu Gln Lys  
65 70 75 80

Met Lys Asp Gly Thr Tyr Gly Val Cys Glu Lys Thr Gly Gln Glu Ile  
85 90 95

Pro Tyr Glu Arg Leu Glu Ala Val Pro Tyr Ala Arg Met Thr Val Glu  
100 105 110

Ala Gln Ala Asp Val Glu Asp Asp Leu Glu Thr Asp Ala Pro Ser Tyr  
115 120 125

Glu Arg Glu Phe His Glu Gln Val Lys Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr  
130 135 140

Ile Asp Gln Lys Ser Ser Gln Thr Tyr Glu Ile Leu Asp Arg Glu Gln  
145 150 155 160

Asp Ser Lys Ala Ala Ala Ser Arg  
165

<210> 2

<211> 168

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GSP105

10

<400> 2

ES 2 742 175 T3

Met Ala Leu Thr Lys Glu Gln Thr Gln His Leu Tyr His Lys Leu Leu  
1 5 10 15

Asp Met Gln Lys Glu Leu Ser Gly Glu Lys Lys Glu Thr Glu Ser Met  
20 25 30

Thr Glu Glu Val Gly Glu Leu Ser Asn Gly Val Asp Asn His Met Ala  
35 40 45

Asp His Gly Thr Leu Val Thr Asp Arg Met Thr Asp Gln Thr Val Lys  
50 55 60

Glu Ile Asp Arg Glu Leu Leu Glu Glu Val Asn Arg Ala Leu Gln Lys  
65 70 75 80

Met Lys Asp Gly Thr Tyr Gly Val Cys Glu Lys Thr Gly Gln Glu Ile  
85 90 95

Pro Tyr Glu Arg Leu Glu Ala Val Pro Tyr Ala Arg Met Thr Val Glu  
100 105 110

Ala Gln Ala Asp Val Glu Asp Asp Leu Glu Thr Asp Ala Pro Ser Tyr  
115 120 125

Glu Arg Glu Trp His Glu Gln Val Lys Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr  
130 135 140

Ile Asp Gln Lys Ser Ser Gln Thr Tyr Glu Ile Leu Asp Arg Glu Gln  
145 150 155 160

Asp Ser Lys Ala Ala Ala Ser Arg  
165

<210> 3  
<211> 6  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> epítopo de Tag54

10 <400> 3  
Lys Asp Trp Glu His Leu  
1 5

15 <210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Tag54 con una sustitución de Phe --> Ala

<400> 4  
Lys His Ile Lys Asp Trp Glu His Leu Glu Glu Ala  
1 5 10

25 <210> 5  
<211> 12  
<212> PRT

ES 2 742 175 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tag54 con una sustitución de Phe --> Tyr

5

<400> 5  
 Lys His Ile Lys Asp Trp Glu His Leu Glu Glu Tyr  
 1 5 10

<210> 6

10 <211> 186  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> GSP105-6His-Tag54P15

<400> 6  
 Met Ala Leu Thr Lys Glu Gln Thr Gln His Leu Tyr His Lys Leu Leu  
 1 5 10 15

Asp Met Gln Lys Glu Leu Ser Gly Glu Lys Lys Glu Thr Glu Ser Met  
 20 25 30

Thr Glu Glu Val Gly Glu Leu Ser Asn Gly Val Asp Asn His Met Ala  
 35 40 45

Asp His Gly Thr Leu Val Thr Asp Arg Met Thr Asp Gln Thr Val Lys  
 50 55 60

Glu Ile Asp Arg Glu Leu Leu Glu Glu Val Asn Arg Ala Leu Gln Lys  
 65 70 75 80

Met Lys Asp Gly Thr Tyr Gly Val Cys Glu Lys Thr Gly Gln Glu Ile  
 85 90 95

Pro Tyr Glu Arg Leu Glu Ala Val Pro Tyr Ala Arg Met Thr Val Glu  
 100 105 110

Ala Gln Ala Asp Val Glu Asp Asp Leu Glu Thr Asp Ala Pro Ser Tyr  
 115 120 125

Glu Arg Glu Trp His Glu Gln Val Lys Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr  
 130 135 140

Ile Asp Gln Lys Ser Ser Gln Thr Tyr Glu Ile Leu Asp Arg Glu Gln  
 145 150 155 160

Asp Ser Lys Ala Ala Ala Ser Arg His His His His His Lys His  
 165 170 175

Ile Lys Asp Trp Glu His Leu Glu Glu Ala  
 180 185

20

<210> 7  
 <211> 558  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 742 175 T3

<223> G105-6His-Tag54-P15 (*B. subtilis*)

<400> 7

```
atggcactga caaaagaaca aacgcaacat ctgtatcata aactgcttga catgcaaaaa      60
gaactgagcg gagaaaagaa agaaacggaa tcaatgacag aagaagtcgg tgaattaagc      120
aatggcgtag ataaccatat ggccgatcat ggcacattgg ttacggatcg tatgacagac      180
caaacggtga aagaaattga tagagaactg cttgaagaag tcaatcgcgc attacaaaa      240
atgaaagatg gcacatatgg agtatgcgaa aaaacgggtc aggaaatccc gtatgaacgt      300
ttagaagcgg tcccttacgc tcggatgaca gttgaagccc aagcagatgt ggaagatgac      360
ttggaacggy acgcaccgtc ttatgaacgc gaatggcatg aacaggtgaa agatctgtcc      420
aacaagaaa caattgacca aaaatcaagc cagacgtacg aaatccttga tagagaacag      480
gactctaaag cggccgcttc tagacatcat catcatcatc ataaacatat caaagactgg      540
gaacatctgg aagaagcc                                     558
```

5

**REIVINDICACIONES**

1. Proteína dietética recombinante que comprende una secuencia polipeptídica que es al menos el 70% idéntica a la SEQ ID NO 2 o una porción dietéticamente suficiente de la misma, en la que la proteína no comprende fenilalanina.
2. Proteína dietética recombinante según la reivindicación 1, en la que la secuencia polipeptídica es al menos el 85%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% idéntica a la SEQ ID NO 2.
3. Proteína dietética recombinante según la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína comprende además una o más secuencias de proteína adicionales, en la que la secuencia de proteína adicional es una etiqueta o marcador de purificación.
4. Proteína dietética recombinante según la reivindicación 3, en la que la secuencia de proteína adicional es una etiqueta de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 3.
5. Vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína dietética recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Microorganismo recombinante que comprende el vector de la reivindicación 5.
7. Microorganismo recombinante según la reivindicación 6, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Actinomycetes*, *Caulobacter*, *Pichia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium botulinum*, *Flavobacterium heparinum*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha*, *Neurospora crassa*, *Arxula adenivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*.
8. Microorganismo recombinante según la reivindicación 7, en el que dicho microorganismo es de las especies *Bacillus* o *Pseudomonas*.
9. Microorganismo recombinante según la reivindicación 8, en el que dicho microorganismo es *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas fluorescens*.
10. Método de producción de la proteína dietética recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el método cultivar el microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en condiciones adecuadas para la producción de la proteína dietética por el microorganismo recombinante.
11. Composición dietética que comprende la proteína dietética recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y opcionalmente excipientes adicionales.
12. Proteína dietética según la reivindicación 11, que comprende no más de 0,1 g de fenilalanina por 100 g de proteína total.
13. Proteína dietética según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición de proteína dietética según la reivindicación 11, para su uso como medicamento y/o alimento para propósitos médicos especiales.
14. Proteína dietética según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición de proteína dietética según la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por acumulación de fenilalanina en el cuerpo.
15. Proteína dietética según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición de proteína dietética según la reivindicación 11 para el uso según la reivindicación 14, en la que dicho trastorno es hiperfenilalaninemia, preferiblemente fenilcetonuria.

Figura 1

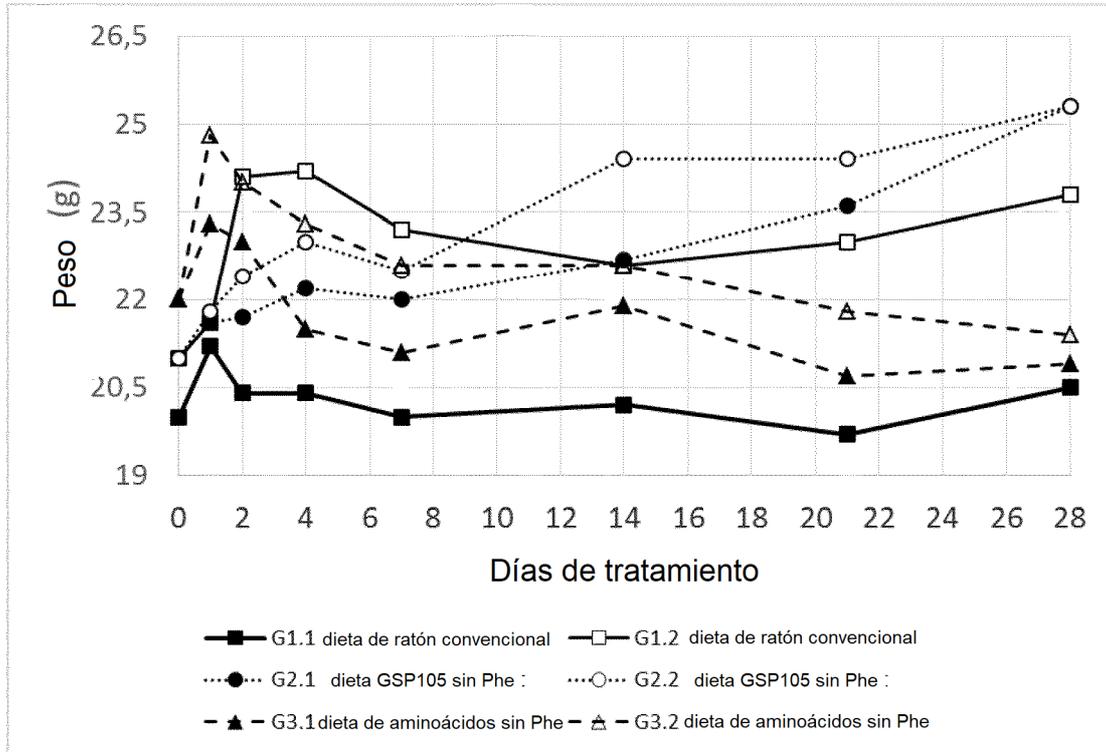


Figura 2

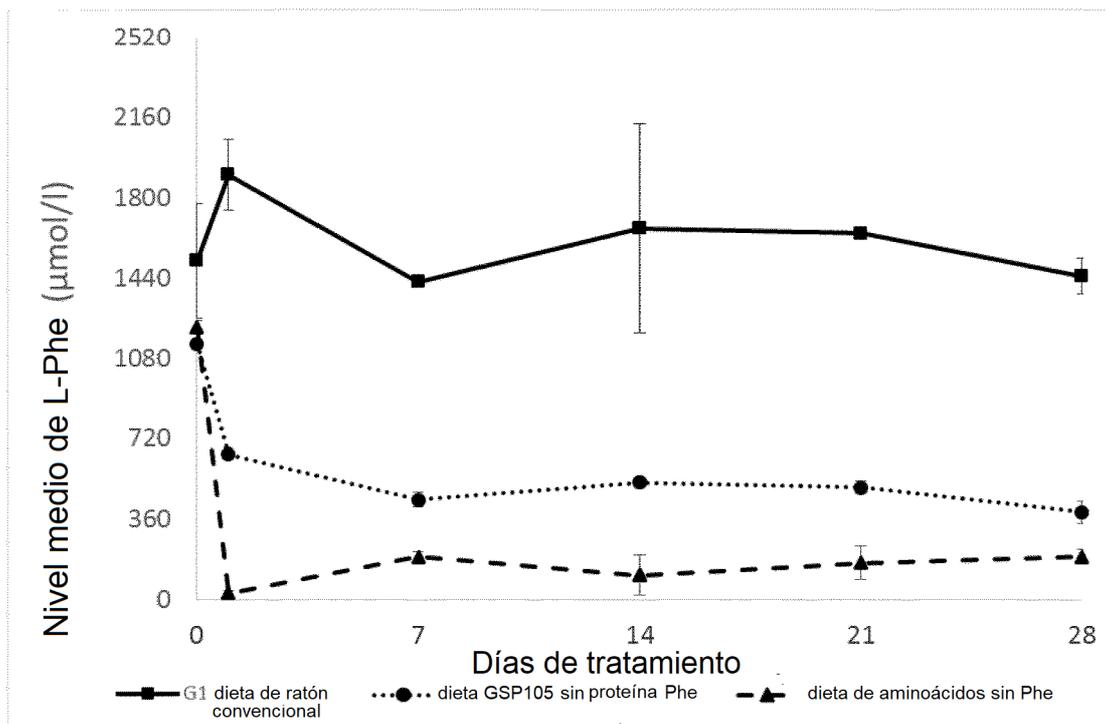


Figura 3



Figura 4

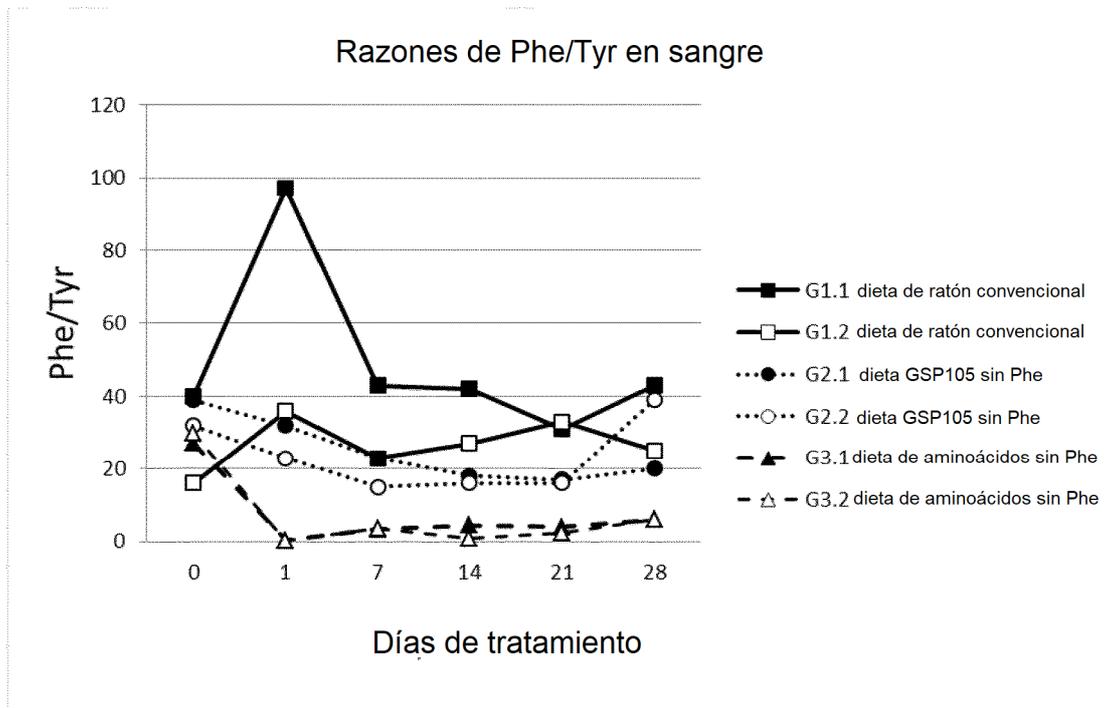


Figura 5

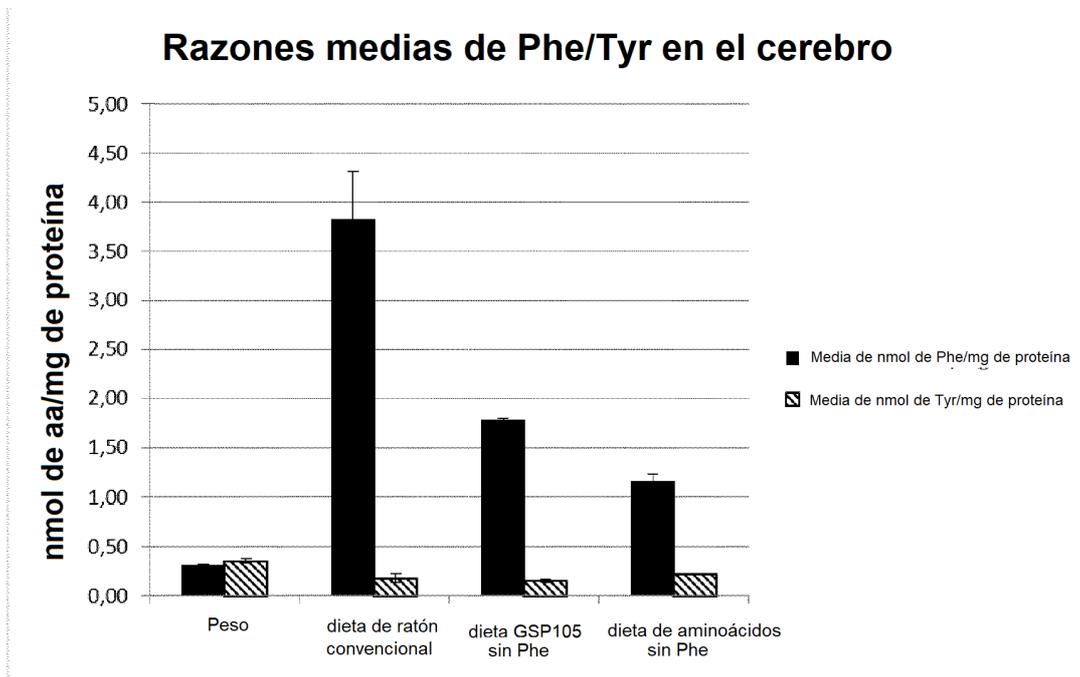


Figura 6

