República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0811267-3 B1

(22) Data do Depósito: 23/05/2008

(45) Data de Concessão: 10/11/2020

(54) Título: VARIANTE DE FENILALANINA AMÔNIA-LIASE DE ANABAENA VARIABILIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO DITA VARIANTE E USO DA MESMA PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE FENILCETONÚRIA (PKU)

(51) Int.Cl.: A61K 38/01; C12N 9/88.

(30) Prioridade Unionista: 25/05/2007 US 11/807,227.

(73) Titular(es): BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC..

(72) Inventor(es): MICHEL C. VELLARD; PAUL A. FITZPATRICK; EMIL D. KAKKIS; DANIEL J. WENDT.

(86) Pedido PCT: PCT US2008006661 de 23/05/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/153776 de 18/12/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 16/11/2009

(57) Resumo: VARIANTE DE FENILALANINA AMÔNIA-LIASE DE ANABAENA VARIABILIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USOS DE UMA VARIANTE DE FENILALANINA AMÔNIA-LIASE DE ANABAENA VARIABILIS. A presente invenção é dirigida a fenilalanina amônia-liase (PAL), produzida por procariotes, em que esta PAL procariótica, em que a variante de PAL tem uma maior atividade de conversão de fenilalanina e/ou uma imunogenicidade reduzida, como comparado com uma PAL de tipo selvagem. A invenção assim provê composições de PAL bacteriana e fragmentos biologicamente ativos, mutantes, variantes e análogos das mesmas, assim como métodos para a produção, purificação e uso de tais composições para fins terapêuticos e industriais.

“VARIANTE DE FENILALANINA AMÔNIA-LIASE DE *ANABAENA VARIABILIS*, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO DITA VARIANTE E USO DA MESMA PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE FENILCETONÚRIA (PKU)”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido é uma continuação em parte do Pedido norte-americano US 11/807.227, depositado em 25 de maio de 2007, que é aqui incorporado como referência em sua totalidade.

CAMPO TÉCNICA DA INVENÇÃO

[002] São aqui fornecidas fenilalaninas amônia-liase procarióticas (FAL) e suas composições, e a otimização de tais composições para intensificar a atividade e estabilidade catalítica da FAL enquanto reduz a imunogenicidade e/ou a sensibilidade proteolítica da FAL. Também aqui fornecido é o uso dessas composições ótimas da FAL para fins terapêuticos e industriais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] A FAL é uma enzima não mammalia amplamente distribuída nas 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)], alguns fungos [Rao et al., Can. J. Biochem. 4512: 1863-1872 (1967); Abell et al., Methods Enzymol. 142: 242-253 (1987)] e bactérias (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)) e pode ser recombinantemente produzida em Escherichia coli.

[004] Uma lista representativa das FALs inclui: Q9ATN7 *Agastache rugosa*; 093967 *Amanita muscaria* (Mosca agárica); P35510, P45724, P45725, Q9SS45, Q8RWP4 *Arabidopsis thaliana* (Agrião orelha de camundongo); Q6ST23 *Bambusa oldhamii* (Bambu de madeira gigante); Q42609 *Bromheadia finlaysoniana* (Orquídea);

P45726 *Camellia sinensis* (Chá); Q9MAX1 *Catharanthus roseus* (pervinca rósea) (pervinca de Madagáscar); Q9SMK9 *Cicer arietinum* (Chickpea); Q9XFX5, Q9XFX6 *Citrus Clementina* x *Citrus reticulate*; Q42667 *Citrus limon* (Limão); Q8H6V9, Q8H6W0 *Coffea canephora* (Robusta coffee); Q852S1 *Daucus carota* (Cenoura); O23924) *Digitalis lanata* (Foxglove); O23865) *Daucus carota* (Cenoura); P27991 *Glycine max* (Feijão soja); O04058) *Helianthus annuus* (Girassol comum); P14166 (Q42858) *Ipomoea batatas* (Batata doce); Q8GZR8, Q8W2E4 *Lactuca sativa* (Alface de jardim); 049835, 049836 *Lithospermum erythrorhizon*; P35511, P26600 *Lycopersicon esculentum* (Tomate); P35512 *Malus doméstica* (Maçã) (Malus sylvestris); Q94C45, Q94F89 *Manihot esculenta* (Mandioca); P27990 *Medicago sativa* (Alfafa); P25872, P35513, P45733 *Nicotiana tabacum* (tabaco comum); Q6T1C9 *Quercus suber* (sobro); P14717, P53443, Q7M1Q5, Q84VE0, Q84VE0 *Oryza sativa* (Arroz); P45727 *Persea americana* (Abacate); Q9AXI5 *Pharbitis nil* (Violeta) (ipoméia japonesa); P52777 *Pinus taeda* (Pinheiro); Q01861, Q04593 *Pisum sativum* (ervilha do jardim); P24481, P45728, P45729 *Petroselinum crispum* (salsa) (*Petroselinum hortense*); Q84LI2 cultivar *Phalaenopsis* x *Doritaenopsis hybrid*; P07218, P19142, P19143 *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) (feijão francês); Q7XJC3, Q7XJC4 *Pinus pinaster* (pinheiro marítimo); Q6UD65 *Populus balsamifera* subsp. trichocarpa x *Populus deltoides*; P45731, Q43052, O24266 *Populus kitakamiensis* (Álamo tremedor); Q8H6V5, Q8H6V6 *Populus tremuloides* (choupo tremedor); P45730 *Populus trichocarpa* (choupo balsâmico do Oeste); 064963 *Prunus avium* (cereja); Q94EN0 *Rehmannia glutinosa;* P11544 *Rhodosporidium toruloides* (Levedura) (*Rhodotorula gracilis*); P10248 *Rhodotorula rubra* (Levedura) (*Rhodotorula mucilaginosa*); Q9M568, Q9M567 *Rubus idaeus* (framboesa); P31425, P31426 *Solanum tuberosum* (Batata); Q6SPE8 *Stellaria longipes* (murugem de pedúnculo longo); P45732 *Stylosanthes humilis* (estilo da cidade); P45734 *Trifolium subterraneum* (trevo subterrâneo); Q43210, Q43664 *Triticum aestivum* (Trigo); Q96V77 *Ustilago maydis* (fungo da fuligem); P45735 *Vitis*

vinifera (videira); e Q8VXG7 *Zea mays* (Maize).

[005] Numerosos estudos se focalizaram no uso da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5) para tratamento de substituição da enzima de fenilcetonúria (PKU) (Hoskins et al., Lancet 1 (8165): 392-394 (1980); Gilbert et al, Biochem. J. 199(3): 715-723 (1981); Hoskins, J. A. et al., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 35(2): 275-282 (1982); Sarkissian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(5): 2339-2344 (1999); Liu et al., Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 30(4): 243-257 (2002); Wieder, K. J., J Biol. Chem. 254(24): 12579-12587 (1979); Gamez et al., Mol. Ther. 11(6): 986-989 (2005); Ambrus et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 224(3): 598-602 (1983); Ambrus et al., Science 201(4358): 837-839 (1978); Kalghatgi, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 27(3): 551-561 (1980); Ambrus, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 37(l): 105-111 (1982); Gilbert et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 131(2): 557-563 (1985); Pedersen, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 20(3): 559-569 (1978); Marconi et al., Biochimie 62 (8-9): 575-580 (1980); Larue et al., Dev. Pharmacol. Ther. 9(2): 73-81 (1986); Ambrus, C. M. et al., Ann. Intern. Med. 106(4): 531-537 (1987); Bourget et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 10: 57-59 (1984); Bourget et al., FEBS Lett. 180(1): 5-8 (1985); Bourget et al., Biochim. Biophys. Acta 883(3): 432-438 (1986); Chang et al., Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 23(1): 1-21 (1995); Chang et al., Mol. Biotechnol. 17(3): 249-260 (2001); Patente U.S. nº 5.753.487).

[006] A PKU é um erro inato do metabolismo de aminoácido que resulta da atividade prejudicada da fenilalanina hidrolase hepática (PAH), a enzima responsável pelo metabolismo da fenilalanina. Indivíduos com as mutações de PAH que levam à PKU e à hiperfenilalaninemia (HPA) apresentam níveis elevados de fenilalanina, funcionamento neurofisiológico prejudicado e desenvolvimento cognitivo reduzido. Quanto aos indivíduos com PKU grave, existe o potencial para retardamento mental irreversível, a menos que os níveis de fenilalanina sejam mantidos em baixos níveis

com o uso de restrições dietéticas. A FAL converte a fenilalanina em amônia e ácido transcinâmico, um metabólito não nocivo, que é ainda metabolizado e excretado na urina como hipurato [Hoskins et al., (1980) ibid; Hoskins et al., Biomed Mass Spectrom 11(6): 296-300 (1984)].

[007] O tratamento corrente para PKU envolve a aderência do tempo de vida a uma dieta que seja baixa em aminoácido fenilalanina [Levy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(5): 1811-1813 (1999)]. Esta terapia dietética é difícil de se manter (Matalon et al., Genet. Med. 6(1): 27-32 (2004); Woolf, et al., Arch. Dis. Child. 33(167): 31-45 (1958); Kim, Mol Ther. 10(2): 220-224 (2004)) e nem sempre elimina efeitos neurológicos nocivos que possam ser causados por elevados níveis de fenilalanina (Sarkissian et al., Mol. Genet. Metab. 69: 188-194 (2000)). O controle dietético menos do que ideal durante a gravidez pode levar a defeitos de nascimento (Levy, (1999) ibid). Além disso, é muito difícil para pacientes PKU/HPA viverem uma vida normal enquanto estiverem seguindo a dieta restritiva, e a terapia dietética pode ser associada com deficiências de vários nutrientes, alguns dos quais sendo prejudiciais ao desenvolvimento cerebral (Levy, (1999) ibid). A maior parte dos produtos de dieta de fenilalanina tem propriedades organolépticas suficientemente insatisfatórias, de modo que a aceitação deste tratamento fica comprometida (Levy, (1999) ibid). Portanto, o desenvolvimento de um tratamento terapêutico deve substituir ou suplementar o tratamento dietético corrente e prevenir danos neurológicos infligidos sobre aqueles indivíduos com PKU, particularmente para aqueles indivíduos com formas mais severas da doença.

[008] Em 1999, Scriver e colaboradores relataram seus estudos iniciais sobre o uso da enzima FAL, do *Rhodosporidium toruloides* (Sarkissian et al., (1999) *ibid.*) para as aplicações de substituição da enzima de PKU. Os estudos dos modelos de PKU e HPA de camundongos demonstraram que a administração de FAL (via injeção i.p. ou via injeção oral, com o uso ou de FAL em uma combinação com o inibidor da

aprotinina protease ou por FAL recombinantemente expressa e presente dentro das células de *E. coli*) foi associada com níveis inferiores da fenilalanina do plasma do sangue. Além disso, nos estudos preliminares descrevendo o uso de FAL com PKU, os pacientes têm mostrado redução nos níveis de fenilalanina com o uso de FAL administrado em cápsulas de gelatina de revestimento entérico (Hoskins et al. (1980) *ibid.*) ou com o uso de um elemento de enzima extracorpória (Ambrus *et al.,* Ann. Intern. Med. 106(4): 531-537 (1987)). Estes estudos sugerem que, se a FAL for protegida contra a degradação proteolítica, as reduções significativas de Phe plasmática podem ser obtidas após administração oral.

[009] O uso de FAL para tratamento do câncer também foi sugerido com base na capacidade de limitar o suprimento de nutriente da fenilalanina às células do câncer e, por esse meio, inibir o crescimento neoplástico (Fritz et al., J. Biol. Chem. 251(15): 726 (1976); Roberts et al., Cancer Treat Rep. 60(3): 261-263 (1976); Shen et al., Cancer Res. 37(4): 1051-1056 (1977); Shen et al., Cancer Treat Rep. 63(6): 1063-1068 (1979); Wieder et al., J Biol. Chem. 254(24): 12579-12587 (1979)). Entretanto, a FAL peguilada intravenosamente injetada foi depurada rapidamente do sangue circulante após a 13ª injeção. Além disso, a redução mediada por FAL na fenilalanina impediu a proliferação da leucemia murina e do melanoma metastático (Abell et al., Cancer Res. 33: 2529-2532 (1973); Roberts et al., (1976) ibid; Shen et al., (1977) *ibidem*).

[0010] A FAL bacteriana da bactéria marinha *Streptomyces maritimus* pode servir como importante fonte do agente bacteriostático enterocina. A FAL de *S. maritimus*, EncP, catalisa a etapa inicial na síntese da enterocina, a qual é a conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico (Xiang et al., J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002)).

[0011] A FAL pode ser usada para a síntese industrial do éster metílico de L-fenilalanina (para produção do Aspertame) (D'Cunha *et al.,* Enzyme and Microbial

Technology 19(6): 421-427 (1996); Hamilton et al., Trends in Biotechnol. 3(3): 64-68 (1985)) e outros derivados substituídos da L-fenilalanina, que são usados como precursores farmacêuticos (Pedido de Patente U.S. nº 2002/0102712).

[0012] A FAL também pode ter aplicações agrícolas, em que ela participa no processo enzimático inicial levando aos fenilpropanóides que produzem ligninas, cumarinas e flavonóides nas plantas, nos fungos e nas bactérias. Consequentemente, a modulação da atividade da FAL pode influenciar vários fenômenos agrícolas, tais como o acastanhamento da fruta. Além disso, o esquema do medicamento com base na estrutura dos inibidores da FAL de sítio ativo, pode levar a herbicidas eficazes (Poppe *et al.,* (2003) *ibidem*)).

[0013] Não obstante a FAL potencialmente tenha várias aplicações industriais e terapêuticas, o seu uso pode ser limitado pela atividade específica reduzida e pela instabilidade proteolítica. Semelhante a outras proteínas terapêuticas, o uso da FAL como uma terapia enzimática é acompanhado por várias desvantagens tais como a imunogenicidade e a sensibilidade proteolítica. Além disso, um equilíbrio delicado é necessário entre a afinidade do substrato e a atividade enzimática para se obter e manter o controle dos níveis da fenilalanina plasmática dentro de uma faixa normal um tanto estreita nos distúrbios caracterizados pela hiperfenilalanemia. Assim sendo, um esforço concentrado para melhorar estes parâmetros não foi feito por causa da escassez do conhecimento estrutural e bioquímico com respeito a esta proteína.

[0014] Assim sendo, permanece a necessidade de moléculas de FAL com características cinéticas ótimas, incluindo a atividade catalítica potente e mais elevada meia-vida biológica, mais elevada estabilidade bioquímica e/ou imunogenicidade atenuada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0015] Várias FAL bacterianas já foram identificadas como parte da família de HAL/FAL, incluindo, porém não limitando a FAL de *Streptomyces maritimus*

(também conhecida como EncP, SEQ ID NO: 5, FIGURA 4), FAL/HAL de *Nostoc punctiforme* (Acesso ZP_00105927 de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, submetido em 1 de outubro de 2004, NCBI Microbial Genomes Annotation Project) (SEQ ID NO: 2, FIGURA 4), FAL/HAL de *Anabaena variabilis* (Gene ID 3679622, Ava_3988 fenilalanina/histidina amônia-liase (*Anabaena variabilis* ATCC 29413, 31 de março de 2006 (SEQ ID NO: 4, FIGURA 4)), a *Anacystis nidulans* procariota fotossintética (Lofflehardt, Z. Naturforsch 31(11-12): 693-699 (1976)), as bactérias Gram-negativa, bacteria da família Enterobacteriaceae, *Photorabdus luminescens* TT01 (Williams *et al.,* Microbiology 151: 2543-2550 (2005)), e *Streptomyces verticillatus* (Bezanson et al., Can. J. Microbiol. 16(3): 147-151 (1970)). Além disso, a atividade da FAL foi avaliada na *Streptomyces maritimus* (Xiang, L. *et al.,* J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002)). As cianobactérias, tais como a Anabena e a Nostocácea, têm sido estudadas em relação à sua produção de produtoso bioativos naturais que são gerados através das vias biossintéticas de policetídeo-peptídeo (Moore, B. S., Natural Products Reports 22(5): 580-593 (2005)); Becker *et al.,* Gene 325: 35-42 (2004); Hoffman *et al.,* Gene 311: 171-180 (2003)). A invenção baseia-se na descoberta de que a FAL procariótica ou bacteriana pode servir como um tratamento eficaz para PKU e outros distúrbios. A invenção considera as composições da FAL bacteriana e seus fragmentos, mutantes, variantes e seus análogos biologicamente ativos, com propriedades intensificadas, tais como a atividade catalítica mais potente, maior estabilidade bioquímica e, para aplicações terapêuticas, imunogenicidade atenuada e meia-vida biológica mais elevada. A presente invenção também provê métodos de produção e purificação da FAL bacteriana e seus fragmentos, mutantes, variantes e análogos biologicamente ativos do mesmo, e métodos de usar tais composições para fins terapêuticos e industriais.

[0016] Como aqui usado, “FAL bacteriana” e “FAL procariótica” são empregados intercambiavelmente para significar (1) FAL do tipo selvagem de

organismos procarióticos, incluindo, porém sem limitar, FAL da *Streptomyces maritimus* (também conhecida como EncP, Seq ID NO: 5, FIGURA 4), *Anacystis nidulans* (Lofflehardt, (1976) *ibid*], *Photorabdus luminescens* TT01 (Williams *et al.,* (2005) *ibid*), e *Streptomyces verticillatus* (Bezanson *et al.,* (1970) *ibid*); (2) fragmentos, mutantes, variantes e análogos de tais enzimas do tipo selvagem que retêm atividade catalítica semelhante (isto é, de pelo menos 50%) quanto à fenilalanina, e que, em algumas formas de realização, apresentam atividade catalítica aumentada e/ou meia-vida aumentada e/ou imunogenicidade reduzida, e (3) versões quimicamente modificadas de tais enzimas do tipo selvagem, fragmentos, mutantes, variantes e seus análogos que tenham sido ligados a outras porções químicasque proporcionem outros efeitos vantajosos, tais como a meia-vida intensificada. Por exemplo, quaisquer referências aos métodos de produzir ou de usar FAL procariótica, fragmentos, mutantes, variantes, análogos ou suas porções quimicamente modificadas, e composições de tal(is) enzima(s), para quaisquer fins terapêuticos ou industriais, pretendem referir-se a métodos de produzir, usar ou formular todos esses fragmentos, mutantes, variantes, análogos ou modificações químicas destes.

[0017] No primeiro aspecto, a presente invenção fornece FAL bacteriana e seus fragmentos, mutantes, variantes ou análogos biologicamente ativos. Uma forma de realização é uma FAL bacteriana de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO: 2) ou seus fragmentos, mutantes, variantes ou análogos biologicamente ativos. Outra forma de realização é uma FAL bacteriana de *Anabaena variabilis* (SEQ ID NO: 4) ou seus fragmentos, mutantes, variantes ou análogos biologicamente ativos. Em algumas formas de realização, as variantes conservam os resíduos de sítio ativo do tipo selvagem nas posições correspondentes à tríade de Ser 210 Ala-Ser-Gly (211-213) Asp214, Leu 215, Asn270, Val269, Leu266, Leu 134, His 137, Lis468, Glu496, Gln 500 em FAL das *Rhodosporidium toruloides* ou substituição(ões) conservativa(s) deste(s) resíduo(s) de sítio ativo, dos quais acredita-se que a tríade Ala-Ser-Gly em

211 a 213 seja o sítio de ligação para a fenilalanina.

[0018] Variantes desejáveis podem incluir proteínas nas quais um ou mais resíduos de cisteína tenham sido substituídos por outro resíduo de aminoácido (por exemplo, serina) para reduzir a agregação protéica que possa estar associada com a atividade enzimática reduzida, imunogenicidade aumentada e/ou outros efeitos desvantajosos in vivo.

[0019] As variantes desejáveis podem incluir as proteínas de fusão em que a enzima tenha sido fundida a outro polipeptídeo heterológo, tal como uma região constante nativa ou modificada de uma imunoglobulina ou um fragmento desta, que conserve ao epítopo selvagem, conhecido na técnica como aumento da meia-vida.

[0020] A invenção ainda considera versões quimicamente modificadas de tais polipeptídeos, os quais tenham sido ligados a um componente químico que proporcione outros efeitos vantajosos. Por exemplo, a ligação não específica ou específica do sítio (por exemplo, N-terminal) de polímeros solúveis em água ligados aos polipeptídeos, é conhecida no estado da técnica para melhorar a meia-vida, e a ligação dos componentes químicos pode também reduzir a imunogenicidade e melhorar a resistência à protease.

[0021] Tal FAL bacteriana é isolada e purificada de acordo com os métodos da presente invenção e se acha por este meio presente nas quantidades que possibilitam usar a enzima terapeuticamente. Em algumas formas de realização, um cDNA codificando para uma FAL bacteriana completa ou do tipo selvagem é usado. Entretanto, em outras formas de realização, um cDNA codificando para um fragmento ou seu mutante biologicamente ativo pode ser usado. Além disso, a presente invenção provê composições de FAL bacteriana otimizadas obtidas por abordagens da engenharia molecular com base na estrutura e/ou nas formas da FAL quimicamente modificada (por exemplo, peguilada). As formas de realização específicas consideram composições ótimas de FAL com atividade específica melhorada, estabilidade

intensificada, imunogenicidade reduzida e/ou sensibilidade proteolítica apropriada para uso terapêutico. Uma forma de realização é uma forma peguilada da FAL de *Nostoc punctiforme* com atividade específica melhorada. Outra forma de realização é uma forma peguilada da FAL de *Anabaena variabilis* com atividade específica melhorada.

[0022] Em várias formas de realização, a peguilação da variante de FAL é descrita com referência à relação de FAL:PEG ou PEG:FAL. Como aqui usada, e a menos que de outra forma indicado, a relação de “FAL:PEG” refere-se à relação dos resíduos de lisina na variante de FAL para as moléculas de PEG na reação de peguilação. De forma semelhante, como aqui usada, e a menos que de outra forma indicado, a relação de “PEG-FAL” refere-se à relação de moléculas de PEG para resíduos de lisina sobre a variante de FAL na reação de peguilação.

[0023] Em uma forma de realização, a invenção considera as variantes de FAL peguiladas com imunogenicidade reduzida. Outra forma de realização é uma forma peguilada da variante do FAL de *Nostoc punctiforme* (NpFAL) com imunogenicidade reduzida. Outra forma de realização é uma forma peguilada de FAL de *Anabaena variabilis* (AvFAL) com imunogenicidade reduzida. Formas de realização específicas consideram as variantes de NpFAL ou AvFAL em que a peguilação é obtida pela reação da variante de NpFAL ou de AvFAL com um polímero solúvel em água, por exemplo o polietileno glicol (PEG). Em algumas formas de realização, a peguilação é obtida pela reação das variantes de NpFAL ou AvFAL uma vez com PEG em uma relação de pelo menos 1:1, pelo menos 1:1,5, pelo menos 1:2, pelo menos 1:3 ou pelo menos 1:4 de FAL:PEG. Em uma forma de realização, a variante de FAL é uma variante de AvFAL, e a peguilação é obtida com o uso de uma relação de FAL:PEG de 1:3.

[0024] A invenção também considera re-peguilar as variantes de FAL peguiladas quanto à imunogenicidade reduzida. Em algumas formas de realização, a

peguilação é obtida pela reação das variantes de NpFAL ou AvFAL duas vezes ou mais, com PEG, cada peguilação em uma relação de pelo menos 1:1, pelo menos 1:1,5, pelo menos 1:2, pelo menos 1:3 ou pelo menos 1:4 de FAL:PEG. Em algumas formas de realização, a peguilação é obtida pela reação da variante de NpFAL ou de AvFAL duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes ou mais, com PEG, cada peguilação em uma relação de pelo menos 1:1, pelo menos 1:1,5, pelo menos 1:2, pelo menos 1:3 ou pelo menos 1:4 de FAL:PEG. Em uma forma de realização, a variante de FAL é uma variante de AvFAL, e a peguilação é obtida com o uso de uma relação de FAL:PEG de 1:3 tanto para a primeira quanto para a segunda reações de peguilação.

[0025] Em algumas formas de realização, os sítios biologicamente ativos da FAL do tipo selvagem de acordo com a invenção podem ser modificados como desejado para otimizar as características cinéticas da FAL. Em uma forma de realização, uma FAL modificada tem suficiente atividade para reduzir, porém também manter, os níveis de fenilalanina do plasma dentro de uma faixa ótima de cerca de 120 μM a cerca de 240 μM. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa tem um kcat de pelo menos cerca de 0,1 s-1 ou mais do que cerca de 0,5 s-1. Em algumas formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa tem um kcat de pelo menos cerca de 0,2 s-1 ou mais do que cerca de 1,0 s-1. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa tem um Km entre cerca de 10 μM a cerca de 1000 μM. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa tem um Km entre cerca de 100 μM a cerca de 1000 μM. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa apresenta atividade enzimática que é de cerca de duas vezes a cerca de 1000 vezes maior do que aquela do tipo selvagem. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa apresenta atividade ezimática que é de cerca de 10% a 100% mais elevada do que aquela do tipo selvagem. Tais proteínas de FAL modificada

biologicamente ativa podem ser formadas com o uso de métodos bem conhecidos no estado da técnica, tal como por mutagênese dirigida ao sítio. Em outras formas de realização, a invenção considera o uso de FAL bacteriana que metaboliza a fenilalanina (isto é, converte a fenilalanina em outra substância) na preparação de um medicamento para o tratamento de uma deficiência da atividade de PAH, nos mamíferos, em particular nos seres humanos, bem como uma composição farmacêutica contendo FAL bacteriana para uso no tratamento de uma deficiência na atividade da PAH. Em algumas formas de realização, a composição farmacêutica compreende FAL altamente purificada derivada das bactérias, ou um fragmento biologicamente ativo, mutante ou análogo, sozinha ou em combinação com um veículo farmaceuticamente adequado. Em algumas formas de realização, as preparações contêm FAL bacteriana com uma pureza mais elevada do que 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% ou 99,9%. Em outras formas de realização, a atividade específica relativa da FAL bacteriana de acordo com a presente invenção, é mais elevada do que cerca de 110% da atividade específica da FAL do tipo selvagem.

[0026] No segundo aspecto, a presente invenção retrata novos métodos de usar composições de FAL para fins terapêuticos e industriais. Em uma forma de realização, a invenção considera métodos de tratar de distúrbios causados, totalmente ou em parte, por uma deficiência na atividade de PAH mediante a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo FAL bacteriana, a um indivíduo em necessidade de tal tratamento. A deficiência na atividade de PAH pode ser observada, por exemplo, como níveis de atividade de 50% ou menos, 25% ou menos, ou 10% ou menos, ou 1% ou menos, em comparação com os níveis normais de atividade de PAH, e pode manifestar-se como níveis elevados de fenilalanina, por exemplo como na hiperfenilalanimia, na fenilcetonúria branda ou na fenilcetonúria severa clássica. Em algumas formas de

realização, a doença é a fenilcetonúria (PKU).

[0027] Nas formas de realização específicas, o indivíduo é aquele que tenha sido diagnosticado como tendo uma fenilalanina hidroxilase mutante (PHA). A PAH mutante pode compreender uma mutação no domínio catalítico de PAH. Tais mutações de exemplo incluem, porém, sem limitar, as mutações F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M, E390G, A395P, P407S e Y414C.

[0028] É também considerado um método de tratar de um indivíduo tendo concentração de fenilalanina do plasma acima do normal (por exemplo, mais do que 180 μM ou de 360 μM), o método compreendendo administrar ao indivíduo uma composição de FAL bacteriano em uma quantidade eficaz para produzir uma redução na concentração de fenilalanina plasmática do indivíduo. O indivíduo provavelmente terá uma concentração de fenilalanina plasmática mais elevada do que 180 μM para a administração da FAL bacteriana. Mais particularmente, o indivíduo tem uma concentração de fenilalanina plasmática entre 120 μM e 200 μM. Em outras formas de realização, o indivíduo tem uma concentração de fenilalanina plasmática entre 200 μM e 600 μM. Em ainda outras formas de realização, o indivíduo tem uma concentração de fenilalanina plasmática entre 600 μM e 1200 μM. Outra classe ainda de indivíduos a serem tratados inclui aqueles que têm uma concentração de fenilalanina plasmática irrestrita mais elevada do que 1200 μM.

[0029] Em formas de realização específicas, o indivíduo é uma criança, mais particularmente uma criança que tenha uma concentração de fenilalanina plasmática mais elevada do que 1200 μM. A invenção considera métodos de tratar de uma criança tendo penilcetonúria, os métodos compreendendo administrar uma composição de FAL bacteriana ao indivíduo em uma quantidade eficaz para produzir um decréscimo na concentração de fenilalanina plasmática da criança, em que tal criança tenha entre 0 e 3 anos de idade e tenha uma concentração de fenilalanina plasmática entre cerca

de 360 μM a cerca de 4800 μM. Antes da administração da FAL bacteriana, a criança tem uma concentração de fenilalanina de cerca de 1200 μM e a administração da FAL bacteriana reduz a concentração da fenilalanina plasmática a cerca de 1000 μM. Em outras formas de realização, antes da administração da FAL bacteriana, a criança tem uma concentração de fenilalanina de cerca de 800 μM e a administração da FAL reduz a concentração da fenilalanina plasmática a cerca de 600 μM. Em ainda outras formas de realização, antes da administração da FAL, a criança tem uma concentração de fenilalanina de cerca de 400 μM e a administração da FAL reduz a concentração da fenilalanina plasmática a cerca de 300 μM. Em algumas formas de realização, os métodos terapêuticos aqui considerados devem reduzir a concentração da fenilalanina plasmática da criança a uma faixa entre cerca de 120 μM a cerca de 360 μM ou a uma faixa entre cerca de 120 μM a cerca de 240 μM.

[0030] Também aqui considerado é um método para tratamento de uma mulher grávida tendo hiperfenilalaninemia (HPA), o método compreendendo administrar ao indivíduo FAL bacteriana sozinha ou em combinação com uma dieta restrita a proteína, em que a administração da FAL bacteriana sozinha ou em combinação com a dieta restrita a proteína, é eficaz para reduzir a concentração da fenilalanina no plasma do indivíduo em comparação com a concentração na ausência da administração combinada. Em certas formas de realização, o indivíduo tem uma concentração de fenilalanina plasmática irrestrita de mais do que 180 μM, mas menos do que 600 μM. Em outras formas de realização, o indivíduo tem uma concentração de fenilalanina plasmática irrestrita de mais do que 500 μM, mas de menos do que 1200 μM. Em ainda outras formas de realização, o indivíduo tem uma concentração de fenilalanina plasmática irrestrita de mais do que 1200 μM. As indivíduos grávidas com uma concentração de fenilalanina plasmática mais elevada do que 1200 μM são particularmente candidatas atrativas para este tipo de terapia, como são indivíduos,mulheres na idade de gravidez e parto, que estejam considerando a

gravidez. Nessas formas de realização, em que a indivíduo tenha uma concentração de fenilalanina plasmática mais elevada do que 1200 μM, e o método ainda compreende administrar uma dieta restrita em proteína à indivíduo.

[0031] A invenção descreve métodos de tratar da fenilcetonúria (PKU) grave clássica em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma FAL bacteriana ou um seu fragmento, mutante, variante ou análogo biologicamente ativos em que a administração da FAL bacteriana seja eficaz para reduzir a concentração da fenilalanina no plasma do indivíduo, em comparação com a concentração na ausência da administração da FAL bacteriana. Um indivíduo selecionado para tratamento de acordo com os métodos da invenção terá uma concentração de Phe plasmática elevada, uma tal concentração podendo ser mais elevada do que 1800 μM na ausência da terapêutica. Outras formas de realização consideram um indivíduo que tenha uma concentração de fenilalanina plasmática mais elevada do que 1000 μM na ausência de um regime terapêutico. Em algumas formas de realização, os métodos de administração combinados da invenção reduzem a concentração de fenilalanina plasmática do indivíduo a menos do que 600 μM. Em uma forma de realização, ela é reduzida a menos do que 500 μM. Em outra forma de realização, a administração combinada reduz a concentração de fenilalanina plasmática do indivíduo até a faixa de cerca de 120 μM a cerca de 360 μM. Em outra forma de realização, a concentração de fenilalanina plasmática do indivíduo é reduzida até a faixa de cerca de 120 μM a cerca de 240 μM.

[0032] Certas formas de realização incluem a otimização da dosagem às necessidades do organismo a ser tratado, por exemplo mamíferos ou seres humanos, para melhorar eficazmente os sintomas da doença. A FAL pode ser administrada em uma dose diária única, em doses múltiplas em uma base diária, em uma dose semanal única ou doses múltiplas em uma base semanal. Em algumas formas de realização, a terapia da FAL não é contínua, mas, ao contrário, a FAL é administrada em uma

base diária até que a concentração de fenilalanina plasmática do indivíduo seja reduzida a menos do que 360 μM. Em algumas formas de realização, em que a concentração de fenilalanina plasmática do indivíduo seja monitorada em uma base diária e a FAL seja administrada quando um aumento de 10% na concentração de fenilalanina plasmática é observado. Em outras formas de realização, as doses são liberadas uma vez por semana. A invenção considera doses de pelo menos 0,001 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, e podem variar até 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg ou mais elevadas por semana. Em algumas formas de realização, a dose é de 1 mg/kg/semana, 0,1 mg/kg/semana, ou 0,01 mg/kg/semana.

[0033] Uma variedade de vias parenterais ou não parenterais, incluindo a oral, a transdérmica, a transmucosa, a intrapulmonar (incluindo a aerolisada), a intramuscular, a subcutânea ou a intravenosa, que liberam dosagens equivalentes, são consideradas. A administração por injeção de bolo ou infusão diretamente nas juntas ou no CSF é também especificamente considerada, tal como a intratecal, intracerebral, intraventricular, através da punção lombar, ou através da cisterna magna. Em algumas formas de realização, as doses são liberadas por via subcutânea ou oral.

[0034] Outros meios de aumentar a atividade da FAL nos indivíduos humanos são também considerados, incluindo a terapia de genes. A transferência de um gene da FAL é possível através de uma variedade de meios conhecidos no estado da técnica, incluinto vetores virais, recombinação homóloga, ou injeção direta do DNA. Dentro do escopo deste aspecto acham-se formas de realização retratando sequências de ácido nucleico codificando toda, ou parte, as FAL bacteriana ou um seu mutante ou análogos biologicamente ativos, que podem ser administrados in vivo nas células afetadas com deficiência de PAH.

[0035] Em outra forma de realização, a FAL pode ser administrada também em combinação com uma dieta limitada a proteínas. A dieta limitada a proteínas

administrada nos métodos deste relatório descritivo, é aquela que é uma dieta limitada à fenilalanina, em que o aporte do indivíduo é limitado a menos do que 600 mg por dia. Em outras formas de realização, a dieta limitada a proteínas é uma dieta limitada à fenilalanina, em que a fenilalanina total é limitada a menos do que 300 mg por dia. Em ainda outras formas de realização, a dieta limitada a proteínas é aquela suplementada com aminoácidos, tais como tirosina, valina, isolencina e leucina. É também considerada uma composição contendo FAL bacteriano e um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitáveis. A composição pode ainda compreender um suplemento médico de proteínas. Em outras formas de realização, a composição de FAL é parte de uma fórmula de crianças. Em ainda outras formas de realização, o suplemento protéico é isento de fenilalanina. O suplemento de proteínas pode ser enriquecido com L-tirosina, L-glutamina, L-carnitina, em uma concentração de 20 mg/100 g do suplemento, L-taurina em uma concentração de 40 mg/100 g de suplemento, e selênio. Ele pode ainda compreender as doses diárias de minerais recomendadas, por exemplo cálcio, fósforo e magnésio. O suplemento ainda pode compreender a dose diária recomendada de um ou mais aminoácidos selecionados do grupo consistindo em L-leucina, L-prolina, acetato de L-lisina, L-valina, L-isoleucina, L-arginina, L-alanina, glicina, monoidrato de L-arparagina, L-triptofano, L-serina, L-treonina, L-histidina, L-metionina, ácido L-glutâmico, e ácido L-aspártico. Além disso, o suplemento pode ser enriquecido com a dosagem diária recomendada de vitaminas A D e E. O suplemento pode compreender um conteúdo de gordura que forneça pelo menos 40% da energia do suplemento. Um tal suplemento pode ser fornecido na forma de um suplemento em pó ou na forma de uma barra protéica.

[0036] A invenção considera métodos de tratar várias formas de crescimento neoplástico e câncer, incluindo, porém, sem limitar, a leucemia linfoblástica, tumores mamários e melanomas.

[0037] A invenção considera métodos de usar FAL bacteriana para a

produção comercial da fenilalanina de amônia e transcinamato. A fenilalanina é usada no aspartame, um adoçante, e em outros produtos alimentares, incluindo bebidas, cereais, bolos, sobremesas, pratos de ovos e de queijos, gorduras, óleos, peixes e outros frutos do mar, carne e produtos da carne, leite e produtos lácteos, nozes, molhos e condimentos, sopas, açúcares, geléias e pastas, e legumes.

[0038] É ainda considerado que a FAL bacteriana pode ser usada para a produção de herbicidas e agentes antimicrobianos, incluindo a enterocina e a eritromicina.

[0039] Em um terceiro aspecto, a presente invenção caracteriza um método para produzir FAL procariótica ou um seu fragmento, mutante, variante ou análogo biologicamente ativos nas quantidades que permitam o uso da enzima terapeuticamente. A presente invenção considera a FAL produzida por bactérias, incluindo, porém, sem limitar, Streptomyces, Sorangium, Pseudomonas e cianobactérias tais como a Nostoc e Anabaena. Em algumas formas de realização, a FAL é produzida pelas espécies bacterianas *Streptomyces maritimus, S. verticillatus, Soragium cellulosum, Nostoc punctiforme, Nostoc tobacum, Anabaena variabilis e Pseudomonas putida*. Em outra forma de realização, a atividade da enzima de FAL procariótica é gerada com o uso de sequências de cDNA ou DNA que sejam derivadas de sequências algumas descritas como codificando para a atividade de HAL ou caracterizando um motivo de FAL-HAL, porém possuindo os resíduos chave de FAL que difiram da HAL.

[0040] Em uma forma de realização principal, o método compreende a etapa de transformar cDNA ou DNA codificando para toda, ou uma parte, de uma FAL procariótica ou um seu fragmento, mutante, variante ou análogo biologicamente ativos em uma célula adequada para a sua expressão.

[0041] Em algumas formas de realização, um vetor de expressão é usado para transferir o DNA para uma célula adequada ou linhagem celular para sua

expressão. Em uma forma de realização, o cDNA é transformado em *E. coli* e a FAL bacteriana recombinante é superexpressa como proteína de fusão. Em uma outra forma de realização, o método de produzir FAL procariótica compreende as etapas de: (a) cultivar células transformadas com um cDNA codificando todos ou um dentre variante, fragmento ou mutante biologicamente ativos da FAL procariótica em um meio de cultivo adequado a uma densidade apropriada para produzir uma cultura semente, (b) introduzir as células transformadas em um biorreator, (c) suprir um meio de cultivo adequado ao biorreator, e (d) separar as células transfectadas dos meios contendo a enzima.

[0042] Em uma forma de realização, a FAL recombinante é superexpressa como uma proteína de fusão maracada com octa-histidila no N-terminal em um vetor tal como BL21(DE3)/pLyseS de *E. coli* (Invitrogen) com um promotor indutível tal como com IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo). Em outra forma de realização, a FAL recombinante é superexpressa em células BL21(DE3)/pLysS de *E. coli* sem uma marcação no N-terminal. Em outra forma de realização, o método de produzir FAL procariótica compreende as etapas de: (1) cultivar uma cultura de semente para um biorreator/fermentador de um estoque de glicerol em frascos de agitação; (2) introduzir tal cultura de semente em um biorreator controlado na forma de realização de batelada alimentada; (3) cultivar referida cultura em meio suplementado de glicose, pH (7,8, > 20% de oxigênio dissolvido, agitação até 1200 rpm, 30°C até alcançar uma densidade celular de OD600 de 70 a 100 (~22 a 25 horas); (4) induzir referida cultura com 0,4 mM de IPTG; (5) cultivar referida cultura em uma temperatura reduzida de 22 a 26°C até que a mudança de atividade seja < 0,1 IU/ml (aproximadamente 40 a 48 horas e uma OD600 tipicamente de 200); e (5) colher as bactérias por centrifugação contínua. Em uma forma de realização, o meio de cultura celular é tipicamente definido e composto de proteína de extrato de levedura, peptona-triptona, glicose, glicerol, casaminoácidos, sais de traço e sais de tamponamento de fosfato.

[0043] Em um quarto aspecto, a presente invenção caracteriza um método para purificar FAL bacteriana ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativos. De acordo com uma primeira forma de realização, a massa celular transformada é cultivada e rompida, resultando na enzima recombinante bruta. Os materiais exógenos são normalmente separados da massa bruta para impedir a incrustação das colunas. A purificação cromatográfica é conduzida com o uso de uma ou várias resinas cromatográficas. Subsequentemente, a proteína purificada é formulada em um tampão projetado para prover atividade estável através de um período de tempo prolongado. Em outra forma de realização, o método para purificar a FAL bacteriana compreende as etapas de: (a) lise da bactéria contendo FAL recombinante; (b) tratamento do lisado com calor para inativar os vírus; (c) clarificação deste lisado com o uso de uma segunda etapa de centrifugação contínua e/ou filtração profunda; (d) passagem do lisado clarificado através de uma etapa de filtração em carvão vegetal; (e) passagem do filtrado em (d) através de uma etapa de filtração final (como com um filtro de 0,2 μm de Sartorius Sartopore); (f) passagem do filtrado final através de uma resina de cromatografia de interação hidrofóbica, tal como uma cromatografia de interação hidrofóbica de butila; (g) passagem do eluato em (f) através de uma resina de cromatografia aniônica, tal como uma coluna de troca de íons Q; (h) recuperação do produto final mediante troca de tampões com filtração de fluxo tangencial; e (i) esterilização do produto final. Os técnicos no assunto facilmente observarão que uma ou mais das etapas de cromatografia podem ser omitidas ou substituídas, ou que a ordem das etapas de cromatografia pode ser mudada dentro do escopo da presente invenção. Finalmente, etapas de esterilização apropriadas podem ser realizadas conforme desejável.

[0044] Em um quinto aspecto, a presente invenção considera os ensaios de triagem para identificar a FAL bacteriana que pode impedir, melhorar ou tratar de níveis intensificados da fenilalanina mediante o contato de uma célula contendo níveis

elevados de fenilalanina com a FAL bacteriana, e determinar se a FAL bacteriana reduz tais níveis elevados de fenilalanina. Esses ensaios de triagem podem também incluir as etapas de criar variantes que incluam substituições conservativas ou não conservativas nos sítios ativos, por exemplo Gly 142, a tríade Thr-Ser-Gly (143-145), Asp 146. Leu 147, Asn 196, Ile 195, Leu 192, Leu 76, Asn 79, Met 400, Thr 428, Gln 432 em EncP de *Streptomyces maritimus* que são equivalentes aos resíduos Ser 210, tríade Ala-Ser-Gly (211-213), Asp 214, Leu 215, Asn 270, Val 269, Leu 266, Leu 134, His 137, Lys 468, Glu 496, Gln 500 na FAL de *Rhodosporidium toruloides*, em regiões adjacentes aos sítios ativos, ou na totalidade da sequência de polipeptídeos, seguidos pelos testes das variantes quanto à atividade in vitro de conversão da fenilalanina. Em certas formas de realização, o método é um ensaio de produção elevada. Em uma forma de realização, os genomas completos das espécies bacterianas são sequenciados e examinados quanto à presença de homólogos de FAL com o uso de uma abordagem de bioinformática. Em ainda outra forma de realização, a atividade catalítica da FAL do produto protéico de tais homólogos é confirmada, tal como mediante testes da capacidade de converter a fenilalanina em transcinamato in vitro.

[0045] Em um sexto aspecto, a invenção fornece métodos de usar as composições de FAL bacteriana para o diagnóstico de doenças, incluindo, porém, sem limitar, os distúrbios causados totalmente, ou em parte, por uma deficiência na atividade de PAH. Em uma forma de realização, a FAL bacteriana é usada para medir os níveis de fenilalanina nas amostras de sangue. Em uma outra forma de realização, a invenção inclui um kit de diagnóstico compreendendo FAL bacteriana para uso em monitorar as amostras de sangue de indivíduos com elevados níveis de fenilalanina.

[0046] Outros aspectos e vantagens da invenção se tornarão evidentes da seguinte descrição detalhada. Deve ficar entendido, entretanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indicando formas de realização específicas da invenção, são dados por meio de ilustração apenas, tendo em vista

que várias mudanças e modificações dentro do espírito e escopo da invenção se tornarão evidentes àqueles habilitados na técnica, a partir desta descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0047] FIGURA 1. Figura 1A: Sequência de genes da FAL de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO: 1); Figura 1B: Sequência de proteínas da FAL de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO: 2).

[0048] FIGURA 2. Figura 2A: Sequência de genes da FAL *de Anabaena variabilis* (SEQ ID NO: 3); FIGURA 2B: Sequência de proteínas da FAL de *Anabaena variabilis* (SEQ ID NO: 4).

[0049] FIGURA 3. Árvore do relacionamento das amônia liases de aminoácidos aromáticos dos procariotas e dos eucariotas. As sequências foram recuperadas do GenBank (números de acesso dados entre parênteses) e alinhadas com Clustal X (1.83) com o uso do Método *Neighbor Joining*.

[0050] FIGURA 4: Alinhamento das sequências cianobacterianas protéicas da FAL de *N. punctiforme* (SEQ ID NO: 2) e FAL de *A. variabilis* (SEQ ID NO: 4) com FAL EncP (SEQ ID NO: 5) e HAL de *P. putida* (SEQ ID NO: 6). Os resíduos de sítio ativo, que correspondem à atividade de FAL ou de HAL, são realçados.

[0051] FIGURA 5: Efeito do (A) NpFAL não peguilado (1,0 IU/ml) e (B) NpFAL peguilado 1:3 FAL:PEG (Nippon Oil and Fat, NOF Corporation) (1,0 IU/ml) sobre os níveis de fenilalanina (μM) através de um período de 12 dias.

[0052] FIGURA 6: Efeito do (A) AvFAL não peguilado (1,0 IU/ml) e (B) AvFAL peguilado 1:3 FAL:PEG (Nippon Oil and Fat, NOF Corporation) (1,0 IU/ml) sobre os níveis de fenilalanina (μM) através de um período de 12 dias.

[0053] FIGURA 7: Efeito do NpFAL peguilado 1:3 FAL:PEG (Nippon Oil and Fat, NOF Corporation) (1,0 IU/ml) sobre os níveis de fenilalanina (μM) em um estudo da tolerância crônica de 90 dias.

[0054] FIGURA 8: FIGURA 8A: Sequência de proteínas de fenilalanina

amônia-liase (FAL) de *Anabaena variabilis* com uma substituição de cisteína em serina na posição 64 (AvFAL_C64S, SEQ ID NO: 7); FIGURA 8B: Sequência de proteínas da FAL de *Anabaena variabilis* com uma substituição de cisteína em serina na posição 318 (AvFAL_C318S, SEQ ID NO: 8); FIGURA 8C: Sequência de proteínas da FAL de *Anabaena variabilis* com uma substituição de cisteína em serina na posição 503 (AvFAL_C503S, SEQ ID NO: 9); FIGURA 8D: Sequência de proteínas da FAL de *Anabaena variabilis* com uma substituição de cisteína em serina na posição 565 (AvFAL_C565S, SEQ ID NO: 10); FIGURA 8E: Sequência de proteínas da FAL de *Anabaena variabilis* com substituições de cisteína em serina nas posições 503 e 565 (AvFAL_C565SC503S, SEQ ID NO: 11). As substituições de cisteína para serina acham-se salientadas em negrito.

[0055] FIGURA 9. FIGURA 9A: Efeito das substituições da cisteína pela serina na posição 565, ou em ambas as posições 565 e 503 da AvFAL não peguilada sobre a atividade da enzima específica da FAL in vitro após a incubação por várias extensões do tempo em 37 °C. FIGURA 9B: Efeito das substituições da cisteína por serina na posição 565 ou em ambas as posições 565 e 503 da AvFAL peguilada sobre a atividade da enzima específica de FAL in vitro após a incubação por várias extensões do tempo em 37 °C.

[0056] FIGURA 10. FIGURA 10A: Efeito das substituições da cisteína por serina em AvFAL sobre a formação dos agregados protéicos na solução, como analisado pela eletroforese em gel sob condições desnaturantes (painel da esquerda) ou condições nativas (painel da direita). FIGURA 10B: Efeito das substituições da cisteína por serina em AvFAL sobre a formação dos agregados protéicos na solução, como analisado por SEC-HPLC.

[0057] FIGURA 11. Efeito das substituições da cisteína por serina nas posições 565 e 503 (Mutante dbl) em AvFAL sobre a peguilação específica do sítio em várias concentrações de PEG.

[0058] FIGURA 12. Efeito do tratamento da AvFAL com 0,05% de Tween80 ou 10 mM de EDTA sobre a formação dos agregados protéicos em solução, como analisado por SEC-HPLC.

[0059] FIGURA 13. FIGURA 13A: Efeito do tratamento da AvFAL por ditiotreitol (DTT) sobre a formação de agregados protéicos em solução, como analisado por SEC-HPLC. FIGURA 13B: Efeito do tratamento da AvFAL por DTT e N-etilmaleimida (NEM) sobre a formação de agregados protéicos em solução, como analisado por SEC-HPLC.

[0060] FIGURA 14. Efeito das substituições da cisteína por serina nas posições 565 e 503 (AvFAL_C565SC503S) em AvFAL peguilado sobre os níveis da fenilalanina (Phe) in vivo em camundongos ENU2 dosados com 0,25 IU (painel superior), 1,0 IU (painel central) ou 4,0 IU (painel inferior) de enzima, em comparação com os camundongos ENU2 dosados com veículo ou 4,0 IU de AvFAL peguilado do tipo selvagem.

[0061] FIGURA 15. Efeito das substituições da cisteína por serina nas posições 565 e 503 (AvFAL_C565SC503S) em AvFAL peguilado, sobre os pesos corporais de camundongos ENU2 dosados com 0,25 IU, 1,0 IU ou 4,0 IU de enzima, em comparação com camundongos ENU2 dosados com veículo ou 4,0 IU de AvFAL peguilada do tipo selvagem.

[0062] FIGURA 16. Efeito das substituições de cisteína por serina nas posições 565 e 503 (AvFAL C503S/565S) en AvFAL peguilada sobre os níveis da fenilalanina (Phe) in vivo em camundongos ENU2 dosados com 4 IU de enzima nas várias relações de AvFAL:PEG: 1:1,6 (painel superior), 1:2,4 (painel central) ou 1:3 (painel inferior), em comparação com os camundongos ENU2 dosados com veículo ou 4,0 IU de AvFAL peguilado do tipo selvagem em uma relação de AvFAL:PEG de 1:3.

[0063] FIGURA 17. Efeito das substituições da cisteína por serina nas

posições 565 e 503 (AvFAL_C565SC503S) em AvFAL peguilada sobre os pesos corporais de camundongos ENU2 dosados com 4IU de enzima em várias relações de AvFAL:PEG: 1:1,6, 1:2,4 ou 1:3, em comparação com os camundongos ENU2 dosados com veículo ou 4,0 IU de AvFAL peguilado do tipo selvagem, em uma relação de AvFAL:PEG de 1:3.

[0064] FIGURA 18. Efeito da repeguilação de AvFAL_C565SC503S peguilado sobre a atividade específica de AvFAL in vitro. (Em cima) Recuperação da atividade específica de rAvFAL-PEG, primeiramente peguilado em uma relação de FAL:PEG de 1:3 (resíduos de lisina 2 mM: PEG 6 mM, círculos cheios), depois, repeguilação sob uma variedade de relações de FAL:PEG e concentrações de resíduos de lisina e moléculas de PEG como indicado. (Inferiormente) Recuperação da atividade específica de rAvFAL-PEG, primeiro peguilada em uma relação de FAL:PEG de 1:1 (resíduos de lisina 2 mM:PEG 2 mM, quadrados cheios), ou 1:3 de resíduos de lisina 2 mM:PEG 6 mM, círculos cheios), depois, repeguilação sob uma variedade de relações de FAL:PEG e concentrações de resíduos de lisina e moléculas de PEG, como indicado.

[0065] FIGURA 19. FIGURA 19A: Efeito do crescimento da relação de FAL:PEG na reação de repeguilação sobre a peguilação global de rAVFAL-PEG, primeiro peguilada em uma relação de FAL:PEG de 1:3 (resíduos de lisina 2 mM: PEG 6 mM), como determinado pela análise de Eletroforese em Gel Capilar (CGE). FIGURA 19B: Efeito do crescimento da relação de FAL:PEG na primeira reação de repeguilação sobre a peguilação global de rAVFAL-PEG, em que a reação de repeguilação é realizada em uma relação de FAL:PEG fixa de 1:3 (resíduos de lisina 2 mM:PEG 6 mM), determinado pela análise de CGE.

[0066] FIGURA 20. Efeito da repeguilação de AvFAL_C565SC503S, primeiro peguilada em uma relação de FAL:PEG de 1:3 (resíduos de lisina 2 mM:PEG 6 mM), sobre o percentual de peguilação dos resíduos de lisina específicos em AvFAL após

a repeguilação sob uma variedade de relações de FAL:PEG e concentrações de resíduos de lisina e moléculas de PEG, como indicado. O resíduo de lisina na posição 2 (K2) é 100% peguilado sob todas as condições testadas (não mostrado).

[0067] FIGURA 21. Efeito da repeguilação de AvFAL_C565SC503S, primeiro peguilada em uma relação de FAL:PEG de 1:3 (resíduos de lisina 2 mM:PEG 6 mM), e repeguilada na mesma relação de FAL:PEG e concentração dos resíduos de lisina e moléculas de PEG, sobre os níveis de fenilalanina (Phe) plasmática in vivo, em camundongos ENU2 dosados de forma subcutânea como indicado na Tabela 14.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0068] Não obstante a FAL seja uma enzima de plantas superiores ubíquas que catalisa a desaminação não oxidativa da fenilalanina em ácido cinâmico na etapa perpetrada aos metabólitos fenilpropanóides (Hahlbrock et al., Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 40: 347-369 (1989)), a FAL tem sido encontrada apenas em umas poucas bactérias em que ela é envolvida na biossíntese de benzoil-CoA em "*S. maritimus*" (Xiang *et al.,* J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002)) e em *Sorangium cellulosum* (Hill et al. Chem. Commun. 1358-1359 (2003)), e na biossíntese da cinamamida em *Streptomyces verticillatus* (Bezanson et al., Can. J. Microbiol. 16: 147-151 (1970)). O agente bacteriostático, a enterocina, é um produto natural da bactéria marinha "*Streptomyces maritimus*", cuja biossíntese envolve várias aspectos não usuais (Hertweck *et al*., Chem. Biol. 11: 461-468 (2004); Piel *et al.,* Chem. Biol. 7: 943-955 (2000); Piel *et al.,* J. Am. Chem. Soc. 122: 5415-5416 (2000); Xiang *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 15609-15614 (2004)). Entre estes acha-se a formação da benzoil-coenzima A (CoA) unitária iniciadora da policetídeo sintase (PKS) rara (Moore *et al*., Nat. Prod. Rep. 19: 70-99 (2002)). A reação bioquímica inicial envolve a conversão da L-fenilalanina de aminoácidos no ácido transcinâmico pela nova EncP de fenilalanina amônia-liase bacteriana (FAL, EC 4.3.1.5) (Xiang *et al*., J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002)). A ativação do ácido cinâmico a seu tioéster de CoA,

seguida por uma única série de beta-oxidação produz benzoil-CoA (Hertweck *et al*., Chem Bio Chem 2: 784-786 (2001); Hertweck *et al.,* Tetrahedron 56: 9115-9120 (2000); Xiang *et al*., J. Bacteriol. 185: 399-404 (2003)), que prepara PKS da enterocina tipo II para extensão da cadeia com sete moléculas de malonil-CoA.

[0069] O primeiro gene codificando a FAL procariótica (enc-P) (SEQ ID NO: 5) foi caracterizado e sua inativação resultou na extinção do novo ácido cinâmico e da síntese da enterocina em "*S. maritimus*" (Kalaitzis, *et al.,* J. Am. Chem. Soc. 125: 9290-9291 (2003); Xiang *et al.,* J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002)). A biossíntese da enterocina pode ser restaurada nos mutantes inativados pela encP através da suplementação com os ácidos cinâmico e benzóico, bem como da complementação com encP transportado pelo plasmídeo. Além disso, a expressão heteróloga do gene de encP, sob o controle do promotor ermE* na *Streptomyces coelicolor* levou à produção do ácido cinâmico nas culturas fermentadas (Xiang *et al*., J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002)). O gene encP codifica uma proteína de 522 aminoácidos que é consideravelmente menor do que as FALs eucarióticas em quase 200 resíduos de aminoácidos. Embora os homólogos de sequências às FALs das plantas, tais como da *Petroselinum crispum* (Rother *et al*., Eur. J. Biochem. 269: 3065-3075 (2002)) (CAA57056, 30% idêntica e 48% semelhante), ela ainda compartilha homologia mais elevada às histidina amônia-liases bacteriana (HALs, EC 4.3.1.3) tal como da *Pseudomonas putida* (Schwede *et al.,* Biochemistry 27: 5355-5361 (1999)) (A35251, 36% idêntica e 54% similar, SEQ ID NO: 6, FIGURA 4) e à tirosina amônia-liase (TAL) de *Rhodobacter capsulatus* (Kyndt *et al*., FEBS Lett. 512: 240-244 (2002)) (FIGURA 3). A homologia inclui o resíduo de serina de sítio ativo conservada na posição 143 da família de fenilalanina/histidina/tirosina das amônia-liases que é o provável precursor do resíduo da desidroalanina modificada no grupo prostético da 4-metilidenoimidazol-5-ona (MIO) (Langer *et al*., Adv. Prot. Chem. 58: 175-188 (2001); Poppe, Curr. Opin. Chem. Biol. 5: 512-524 (2001); Schwede et al., Biochemistry 27: 5355-5361 (1999)).

EncP compartilha a maior homologia de sequência com AdmH (AAO39102, 63% idêntica e 76% similar), uma fenilalanina aminomutase putativa envolvida na biossíntese da andrimid na *Pantoea agglomerans*, que é relacionada à tirosina aminomutase Sgc4 da *Streptomyces globisporus* (Christenson *et al*., J. Am. Chem. Soc. 125: 6062-6063 (2003); Christenson et al., Biochemistry 42: 12708-12718 (2003)). De forma notável, tendo em vista que encP tem homologia mais próxima de uma proteína humana (HAL), a encP pode ser potencialmente menos imunogênica. Igualmente, tendo em vista que elas são muito semelhantes, pode ser possível transformar a encP para parecer-se com a HAL humana, uma versão humanizada de encP.

[0070] HAL e FAL foram observadas por compartilharem em comum um mecanismo para a eliminação quimicamente difícil da amônia da histidina e da fenilalanina, respectivamente. Com ambas as enzimas, um grupo prostético supereletrofílico 5 metileno-3,5-diidroimidazol-4-ona (MIO) ativa os átomos de hidrogênio beta não acídico de seus substratos respectivos por um ataque do tipo Friedel-Crafts no anel aromático. O complexo sigma que é gerado impede a extração dos prótons do anel pela exclusão de quaisquer bases do acesso à bolsa de ligação da enzima. A formação de uma ligação dupla exocíclica é chave na eliminação da amônia, na rearomatização e na fragmentação. O grupo MIO prostético é regenerado e o produto urocanato ou cinamato é formado (Poppe *et al*., Angew. Chem. Int. Ed. 44: 3668-3688 (2005)).

[0071] Por causa da elevada homologia entre HAL e FAL, as regiões conservadas de HAL e de FAL são referidas como a região conservada de HAL/FAL. Esta alta homologia pode criar algumas ambiguidades nos bancos de dados como o NCBI sobre a atividade potencial das enzimas de uma proteína de “FAL-HAL”, conduzindo à rotulagem imperfeita, tal como com as sequências protéicas listadas no banco de dados do NCBI quanto à *Nostoc punctiforme* e à *Anabaena variabilis*.

Portanto, algumas enzimas de FAL podem ser enzimas de HAL imperfeitamente rotulados. Embora os sítios ativos de FALs e de HALs sejam muito semelhantes, eles são previstos diferirem em alguns resíduos chaves (Calabrese *et al*., Biochemistry 43(36): 11403-11416 (2004); Xiang *et al*., (2002) ibid; Williams *et al*., (2005) ibid). Particularmente na HAL, a metionina 382 e a glutamina 414 de *Pseudomonas putida* (SEQ ID NO: 6) são altamente conservadas em todas as HALs, mas são sempre substituídas em todas as FALs descritas até agora (eucarióticas ou procarióticas) por lisina e glutamina, respectivamente (FIGURA 4). Assim, pode-se dizer que todas as proteínas com uma região “FAL-HAL” e tendo os homólogos da lisina 382 e da glutamina 414, têm a assinatura de sequência de uma proteína com atividade de FAL. Esta assinatura de FAL descrita de forma relativamente recente (Williams *et al*., (2005) *ibid*) permite rotular apropriadamente algumas enzimas de HAL a FAL e pode ser usada para identificar algumas novas enzimas de FAL dos genes e banco de dados de proteínas já publicadas.

[0072] A presente invenção diz respeito a composições de tal FAL procariótico e seus fragmentos, mutantes e variantes biologicamente ativo e a seus usos para fins terapêuticos e industriais.

A. DEFINIÇÕES

[0073] A menos que de outra forma estabelecido, os seguintes termos usados neste pedido, incluindo o relatório descritivo e as reivindicações, têm as definições dadas abaixo. Deve-se observar que, como usadas no relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma” e “o” e “a” incluem referências no plural, a menos que o contexto claramente preceitue de outra maneira. A definição dos termos padrão da química pode ser encontrada nos trabalhos de referência, incluindo Carey e Sundberg, Advanced Organic Chemistry, 3ª Edição, Volumes A e B (Plenum Press, New York 1992). A prática da presente invenção empregará, a menos que de outra forma indicado, métodos convencionais da química

orgânica sintética, da espectroscopia de massa, métodos preparativos e analíticos da cromatografia, química protéica, bioquímica, técnicas de DNA recombinante e farmacologia, dentro do estado da técnica. Ver, por exemplo, T. E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 4ª Edição, 2004); Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edição, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick e N. Kaplan, editores, Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edição (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

[0074] Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes aqui citados,acima ou abaixo, são aqui incorporados como referência em sua totalidade.

[0075] As seguintes abreviaturas de aminoácidos são usadas na totalidade do texto:

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

[0076] “Polinucleotídeo” refere-se a um polímero composto de unidades de nucleotídeo. Os polinucleotídeos incluem ácidos nucleicos de ocorrência natural, tais como o ácido desoxirribonucleico (“DNA”) e o ácido ribonucleico (“RNA”), assim como os análogos de ácido nucleico. Os análogos de ácido nucleico incluem aqueles que

incluem bases de ocorrência não natural, nucleotídeos que se ajustam nas articulações com outros nucleotídeos diferentes da ligação de fosfodiéster de ocorrência natural ou que incluem bases articuladas através de ligações outras que não as ligações de fosfodiéster. Assim, os análogos de nucleotídeos incluem, por exemplo, e sem limitação, os fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, fosfonatos de metila quiral, ribonucleotídeos de 2-O-metila, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), e outros. Tais polinucleotídeos podem ser sintetizados, por exemplo, com o uso de um sintetizador automático de DNA. A expressão “ácido nucleico” tipicamente se refere a grandes polinucleotídeos. O termo “oligonucleotídeo” tipicamente refere-se a polinucleotídeos curtos, geralmente não maiores do que cerca de 50 nucleotídeos. Entender-se-á que, quando uma sequência de nucleotídeos é representada por uma sequência de DNA (isto é, A, T, G, C), está também inclui uma sequência de RNA (isto é, A, U, G, C), em que “U” substitui “T”.

[0077] “cDNA” refere-se a um DNA que seja complementar ou idêntico a um mRNA, ou na forma de filamento único ou de filamento duplo.

[0078] A notação convencional é usada neste relatório para descrever sequências de polinucleotídeos: a extremidade à esquerda de uma sequência de polinucleotídeos de filamento único é a extremidade 5’; a direção da esquerda de uma sequência de polinucleotídeos de filamento duplo é referida como a direção 5’. A direção da adição de 5’ para 3’ de nucleotídeos para os transcritos de RNA nascentes é referido como a direção da transcrição. O filamento de DNA tendo a mesma sequência como um mRNA é referido como o “filamento codificador”; as sequências sobre o filamento de DNA tendo a mesma sequência como um mRNA transcrito daquele DNA, e que são localizadas 5’ para a extremidade 5’ do transcrito de RNA são referidas como “sequências à montante (*upstream*)”; as sequências sobre o filamento de DNA tendo a mesma sequência como o RNA e que são 3’ para a

extremidade 3’ do transcrito de RNA codificador são referidas como “sequências à jusante (*downstream*)”.

[0079] “Complementar” refere-se à compatibilidade topológica ou combinação simultânea das superfícies de interação de dois polinucleotídeos. Assim, as duas moléculas podem ser descritas como complementares e, além disso, as características das superfícies de contato são complementares entre si. Um primeiro polinucleotídeo é complementar a um segundo polinucleotídeo se a sequência de nucleotídeos do primeiro polinucleotídeo for idêntica à sequência de nucleotídeos do parceiro de ligação do polinucleotídeo do segundo polinucleotídeo. Assim, o polinucleotídeo cuja sequência 5’-TATAC-3’ é complementar a um polinucleotídeo cuja sequência seja 5’-GTATA-3’.

[0080] Uma sequência de nucleotídeos é “substancialmente complementar” a uma sequência de nucleotídeos de referência se a sequência complementar à sequência de nucleotídeos sujeita é substancialmente idência à sequência de nucleotídeos de referência.

[0081] “Codificação” refere-se à propriedade inerente das sequências específicas de nucleotídeos em um polinucleotídeo, tal como um gene, um cDNA ou um mRNA, para servir como gabaritos para a síntese de outros polímeros e macromoléculas nos processos biológicos tendo ou uma sequência definida de nucleotídeos (isto é, rRNA, tRNA e mRNA) ou uma sequência definida de aminoácidos e as propriedades biológicas daí resultantes. Assim, um gene codifica uma proteína se a transcrição e a translação do mRNA produzidas por aquele gene produzir a proteína em uma célula ou outro sistema biológico. Tanto o filamento codificador, cuja sequência de nucleotídeos seja idêntica à sequência de mRNA e seja usualmente fornecida nas listagens de sequência, quanto o filamento não codificador, usados como o gabarito para a transcrição, de um gene ou cDNA, podem ser referidos como codificando a proteína ou outro produto daquele gene ou cDNA. A menos que de outra

forma especificado, uma “sequência de nucleotídeo codificando uma sequência de aminoácidos” inclui todas as sequências de nucleotídeos que sejam versões degeneradas umas das outras e que codifiquem a mesma sequência de aminoácidos. As sequências de nucleotídeos que codificam proteínas e RNA podem incluir íntrons.

[0082] “Polinucleotídeos recombinantes” refere-se a um polinucleotídeo que tem sequências que sejam não naturalmente ligadas entre si. Um polinucleotídeo recombinante amplificado ou montado pode ser incluído em um vetor adequado, e o vetor pode ser usado para transformar uma célula hospedeira adequada. Uma célula hospedeira que compreenda o polinucleotídeo recombinante é referida como uma “célula hospedeira recombinante”. O gene é então expresso na célula hospedeira recombinante para produzir, por exemplo, um “polipeptídeo recombinante”. Um polinucleotídeo recombinante pode servir a uma função não codificadora (por exemplo, promotor, origem de replicação, sítio de ligação a ribossoma, etc.) também.

[0083] “Sequência de controle da expressão” refere-se a uma sequência de nucleotídeos em um polinucleotídeo, que regule a expressão (transcrição e/ou translação) de uma sequência de nucleotídeos operativamente a ela ligada. “Operativamente ligada” refere-se a um relacionamento funcional entre duas partes em que a atividade de uma parte (por exemplo a capacidade de regular a transcrição) resulte em uma ação sobre a outra parte (por exemplo, transcrição da sequência). As sequências de controle da expressão podem incluir, por exemplo, e sem limitação, as sequências de promotores (por exemplo, indutíveis e constitutivas), intensificadores, terminadores da transcrição, um códon de partida (isto é, ATG), sinais de recombinação para os íntrons, e códons de parada.

[0084] “Vetor de expressão” refere-se a um vetor compreendendo um polinucleotídeo recombinante contendo sequências de controle da expressão operativamente ligadas a uma sequência de nucleotídeos a ser expressa. Um vetor de expressão compreende suficientes elementos de atuação cis para expressão;

outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou sistema de expressão *in vitro*. Os vetores de expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica, tais como os cosmídeos, plasmídeos (por exemplo, nus ou contidos nos lipossomas) e os vírus que incorporem o polinucleotídeo recombinante.

[0085] “Amplificação” refere-se a quaisquer meios pelos quais uma sequência de polinucleotídeos é copiada e, assim, expandida em um número maior de moléculas de polinucleotídeos, por exemplo por transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase, e reação em cadeia da ligase.

[0086] “Iniciador” refere-se a um polinucleotídeo que seja capaz de especificamente hibridizar a um gabarito de polinucleotídeo designado e prover um ponto de iniciação para a síntese de um polinucleotídeo complementar. Tal síntese ocorre quando o iniciador de polinucleotídeo seja colocado sob condições em que a síntese seja induzida, isto é, na presença de nucleotídeos, um gabarito de polinucleotídeo complementar, e um agente para a polimerização, tal como a DNA polimerase. Um iniciador é tipicamente de filamento único, mas pode ser de filamento duplo. Os iniciadores são tipicamente ácidos desoxirribonucleicos, mas uma ampla variedade de iniciadores sintéticos e de ocorrência natural é útil para muitas aplicações. Um iniciador é complementar ao gabarito para o qual ele seja designado para hibridizar para servir como um sítio para a iniciação da síntese, porém não necessita refletir a sequência exata do gabarito. Em um tal caso, a hibridização específica do iniciador para o gabarito depende da estringência das condições de hibridização. Os iniciadores podem ser rotulados, por exemplo, com componentes cromogênicos, radioativos ou fluorescentes, e usados como componentes detectáveis.

[0087] “Sonda”, quando se usa com referência a um polinucleotídeo, refere-se a um polinucleotídeo que seja capaz de especificamente hibridizar a uma sequência designada de outro polinucleotídeo. Uma sonda hibridiza especificamente

a um polinucleotídeo complementar alvo, mas não necessita refletir a sequência complementar exata do gabarito. Em um tal caso, a hibridização específica da sonda ao alvo depende da estringência das condições de hibridização. As sondas podem ser rotuladas, por exemplo, com componentes cromogênicos, radioativos ou fluorescentes, e usadas como componentes detectáveis.

[0088] Uma primeira sequência é uma “sequência anti-sentido” em relação a uma segunda sequência, se um polinucleotídeo cuja sequência seja a primeira sequência hibridizar especificamente a um polinucleotídeo cuja sequência seja a segunda sequência.

[0089] “Hibridizar especificamente a” ou “hibridicação específica” ou “seletivamente hibridiza a” refere-se à ligação, duplexação ou hibridização de uma molécula de ácido nucleico, preferivelmente a uma sequência particular de nucleotídeos, sob condições estringentes, quando essa sequência esteja presente em um DNA ou RNA de mistura complexa (por exemplo, celular total).

[0090] A expressão “condições estringentes” refere-se a condições sob as quais uma sonda hibridize preferivelmente a sua subsequência alvo, e em uma menor extensão, ou de forma alguma, outras sequências. “Hibridização estringente” e “condições de lavagem de hibridização estringente” no contexto das experiências de hibridização de ácido nucleico, experimentos tais como as hibridizações de Southern e de Northern, são dependentes das sequências, e são diferentes sob os parâmetros ambientais diferentes. Uma orientação extensiva à hibridização dos ácidos nucleicos é encontrada em Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I capítulo 2 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, New York. Geralmente, a hibridização altamente estringente e as condições de lavagem são selecionadas para serem de cerca de 5 °C menores do que o ponto de fusão térmica (Tm) para a sequência específica em uma intensidade iônica e pH definidos.

A Tm é a temperatura (sob intensidade iônica e pH definidos) em que 50% da sequência alvo hibridiza a uma sonda perfeitamente combinada. Condições muito estringentes são selecionadas para serem iguais à Tm para uma sonda particular.

[0091] Um exemplo de condições de hibridização estringentes para hibridização dos ácidos nucleicos complementares que tenham mais do que 100 resíduos complementares sobre um filtro em um*blot* Southern ou Northern blot, é de 50% de formalina com 1 mg de heparina em 42°C, com a hibridização sendo realizada durante a noite. Um exemplo de condições de lavagem altamente estringentes é NaCl 0,15 M em 72°C, por cerca de 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem altamente estringentes é uma lavagem de 0,2X SSC em 65°C por 15 minutos (ver Sambrook et al. (1989) ibid quanto a uma descrição do tampão de SSC). Frequentemente, uma lavagem de alta estringência é seguida por uma lavagem de baixa estringência para remover o sinal da sonda de fundo. Uma exemplo de lavagem de estringência média para um *duplex* de, por exemplo, mais do que 100 nucleotídeos, é de 1x SSC em 45°C por 15 minutos. Um exemplo de lavagem de baixa estringência para um *duplex* de, por exemplo, mais do que 100 nucleotídeos, é de 4 a 6x SSC em 40°C por 15 minutos. Em geral, um sinal para a relação de ruído de 2x (ou mais) do que aquele observado para uma sonda não relacionada no ensaio de hibridização específico, indica a detecção de uma hibridização específica.

[0092] “Polipeptídeo” refere-se a um polímero composto de resíduos de aminoácidos, relacionado a variantes estruturais de ocorrência natural, e a seus análogos sintéticos de ocorrência não natural, ligados através de ligações peptídicas, relacionados a variantes estruturais de ocorrência natural, e seus análogos sintéticos de ocorrência não natural. Os polipeptídeos sintéticos podem ser sintetizados, por exemplo, com o uso de um sintetizador automático de polipeptídeos. O termo “proteína” se refere tipicamente a grandes polipeptídeos. O termo “peptídeo” tipicamente se refere a polipeptídeos curtos.

[0093] A notação convencional é aqui usada para descrever as sequências de polipeptídeos: a extremidade da esquerda de uma sequência de polipeptídeos é um amino-terminal; a extremidade da direita de uma sequência de polipeptídeos é o término carboxila.

[0094] “Substituição conservativa” refere-se à substituição em um polipeptídeo de um aminoácido com um aminoácido funcionalmente similar. Os seguintes seis grupos contêm, cada um, aminoácidos que são substituições conservativas entre si:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
2) Ácido aspártico (D), Ácido Glutâmico (E);
3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
4) Arginina (R), Lisina (K);
5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); e
6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W).
7) Os aminoácidos também podem ser agrupados como segue:
8) hidrofóbicos: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
9) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr;
10) ácidos: Asp, Glu;
11) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
12) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e
13) aromáticos: Trp,Tyr, Phe.

[0095] “Variante alélica” refere-se a qualquer dentre duas ou mais formas polimórficas de um gene ocupando o mesmo locusgenético. As variações alélicas surgem naturalmente através da mutação, e podem resultar em polimorfismo fenotípico dentro das populações. As mutações de genes podem ser omissas (nenhuma mudança no polipeptídeo codificado) ou podem codificar polipeptídeos tendo sequências de aminoácidos alteradas. “Variantes alélicas” também refere-se a

cDNAs derivados dos transcritos de mRNA de variantes alélicas, bem como as proteínas por eles codificadas.

[0096] Os termos “idêntico” ou “identidade” percentual, no contexto de duas ou mais sequências de polinucleotídeos ou de polipeptídeos, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que sejam as mesmas ou tenham um percentual especificado de nucleotídeos ou de resíduos de aminoácidos que sejam os mesmos, quando comparados e alinhados para uma correspondência máxima, medidos com o uso de um dos seguintes algoritmos de comparação de sequência ou por inspeção visual.

[0097] As expressões “substancialmente homólogo” ou “substancialmente idêntico” no contexto dos dois ácidos nucleicos ou polipeptídeos, referem-se geralmente a duas ou mais sequências ou subsequências que tenham pelo menos 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidade dos resíduos de nucleotídeos ou de aminoácidos, quando comparadas e alinhadas para uma correspondência máxima, medida com o uso de um dos seguintes algoritmos de comparação de sequências ou por inspeção visual. Em algumas formas de realização, a identidade substancial existe através de uma região da sequência que tenha pelo menos cerca de 50 resíduos de comprimento, através de uma região de pelo menos cerca de 100 resíduos, ou através de pelo menos cerca de 150 resíduos. Em outra forma de realização, as sequências são substancialmente idênticas através do comprimento inteiro de qualquer um, ou de ambos, os biopolímeros de comparação.

[0098] Para a comparação das sequências, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência, à qual as sequências de teste são comparadas. Quando do uso de um algoritmo de comparação de sequência, as sequências de teste e de referência são introduzidas em um computador, as coordenadas subsequentes são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa de algoritmos das sequências são designados. O algoritmo de comparação de sequência então calcula

o percentual de identidade da sequência para a(s) sequência(s) de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa designados.

[0099] O alinhamento ótimo das sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento da homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), pela pesquisa quanto ao método de similaridade de Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), pelas implementações compuratorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou por inspeção visual.

[00100] Um exemplo de um algoritmo útil é o PILEUP. O PILEUP cria um alinhamento de sequência múltiplo de um grupo de sequências relacionadas com o uso de um alinhamento de sequências múltiplas de um grupo de sequências relacionadas com o uso de alinhamento progressivos aos pares, para apresentar o relacionamento e o percentual da identidade de sequência. Ele também traça em gráfico uma árvore ou dendograma mostrando os relacionamentos dos agrupamentos usados para criar o alinhamento. O PILEUP usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351-360 (1987). O método usado é semelhante ao método descrito por Higgins e Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989). O programa pode alinhar até 300 sequências, cada uma de um comprimento máximo de 5.000 nucleotídeos ou aminoácidos. O procedimento de alinhamento múltiplo começa com o alinhamento aos pares das duas sequências mais semelhantes, produzindo um agrupamento de duas sequências alinhadas. Este agrupamento é então alinhado à sequência seguinte mais relacionada ou ao agrupamento de sequências alinhadas. Dois agrupamentos de sequências são alinhados por uma extensão simples do alinhamento aos pares de duas sequências individuais. O alinhamento final é obtido por uma série de alinhamentos progressivos

aos pares. O programa é desenvolvido pela designação de sequências específicas e suas coordenadas de aminoácidos ou nucleotídeos para as regiões de comparação de sequências, e pela designação dos parâmetros do programa. Por exemplo, uma sequência de referência pode ser comparada a outras sequências de teste para determinar o relacionamento do percentual de identidade de sequências com o uso dos seguintes parâmetros: peso do intervalo padrão (3,00), peso do comprimento do intervalo padrão (0,10), e intervalos de extremidades pesadas. Outro algoritmo que é útil para gerar alinhamentos múltiplos de sequências é o Clustal W (Thompson *et al*., Nucleic Acids Research 22: 4673-4680 (1994)).

[00101] Outro exemplo de algoritmo que é adequado para determinar o percentual da identidade de sequência e da similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, o qual é descrito em Altschul *et al*., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). O programa para realizar as análises do BLAST acha-se publicamente disponível através do National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo envolve primeiro identificar pares de sequências de elevada classificação (HSPs) mediante a identificação de palavras curtas de comprimento W na sequência de inquirição, a qual ou combina ou satisfaz alguma classificação T limite de valor positivo quando alinhada com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência de banco de dados. T é referida como o vizinho do limite de classificação da palavra (Altschul et al. (1990), acima). Estas comparações das palavras vizinhas atuam como sementes para se iniciar as pesquisas para encontrar HSPs mais longos contendo-as. As comparações das palavras são então estendidas em ambas as direções ao longo de cada sequência na medida em que a classificação cumulativa do alinhamento possa ser aumentada. As classificações cumulativas são calculadas com o uso, quanto às sequências de nucleotídeos, dos parâmetros M (classificação de recompensa para um par de resíduos de combinação; sempre > 0) e N (classificação de penalidade para resíduos mal combinados; sempre < 0). Quanto às sequências de aminoácidos, uma matriz de

classificação é usada para calcular a classificação cumulativa. As extensões das comparações das palavras em cada direção são interrompidas quando: a classificação cumulativa do alinhamento recua pela quantidade X de seu valor máximo obtido; a classificação cumulativa vai a zero ou abaixo, por causa do acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos de classificação negativa; ou a extremidade de qualquer sequência é alcançada. Os parâmetros W, T e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para as sequências de nucleotídeos) usa como padrões um comprimento da palavra (W) de 11, uma expectação (E) de 10, M=5, N=-4, e uma comparação de ambos os filamentos. Quanto às sequências de aminoácidos, o programa BLASTP usa como padrões um comprimento da palavra (W) de 3, uma expectação (E) de 10, e uma matriz de classificação de BLOSUM62 (ver Henikoff e Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

[00102] Além de calcular o percentual de identidade de sequência, o algoritmo de BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (ver, por exemplo, Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Uma medida da similaridade fornecida pelo algoritmo de BLAST é a probabilidade da menor soma (P(N)), a qual fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma combinação entre duas sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos deva ocorrer por acaso. Por exemplo, um ácido nucleico é considerado semelhante a uma sequência de referência se a probabilidade da menor soma em uma comparação do ácido nucleico de teste com o ácido nucleico de referência for de menos do que cerca de 0,1, menos do que cerca de 0,01, ou menos do que cerca de 0,001.

[00103] Uma outra indicação de que duas sequências de ácido nucleico ou de polipeptídeos são substancialmente idênticas é que o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucleico fica imunologicamente com reação cruzada com o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucleico, como descrito abaixo. Assim, um

polipeptídeo tipicamente é substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo quando os dois peptídeos diferem apenas por substituições conservativas. Outra indicação de que duas sequências de ácido nucleico sejam substancialmente idênticas, é que as duas moléculas se hibridizam entre si sob condições estringentes, como aqui descrito.

[00104] “Substancialmente puro” ou “isolado” significam uma espécie objeto é a espécie predominante presente (isto é, em uma base molar, mais abundante do que qualquer outra espécie macromolecular individual na composição), e uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a espécie objeto compreenda pelo menos cerca de 50% (em uma base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes. Geralmente, uma composição substancialmente pura significa que cerca de 80% a 90% ou mais das espécies moleculares presentes na composição são as espécies purificadas de interesse. A espécie objeto é purificada até à homogeneidade essencial (as espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição pelos métodos de detecção convencionais) se a composição consistir essencialmente de uma espécie macromolecular única. As espécies de solventes, moléculas pequenas (< 500 Daltons), estabilizadores (por exemplo BSA), e as espécies de íons elementares, não são consideradas espécies macromoleculares para os fins desta definição. Em algumas formas de realização, os compostos ou conjugados da invenção são substancialmente puros ou isolados. Em algumas formas de realização, os compostos ou conjugados da invenção são substancialmente puros ou isolados em relação aos materiais de partida macromoleculares usados na sua síntese. Em algumas formas de realização as composições farmacêuticas da invenção compreendem um conjugado substancialmente purificado ou isolado de um polipeptídeo de FAL e o agente ativo é misturado com um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

[00105] “Ocorrência natural”, como aplicado a um objeto, refere-se ao fato de

que o objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polinucleotídeos ou polipeptídeo que esteja presente em um organismo (incluindo vírus) que possa ser isolado de uma fonte na natureza e que não tenha sido intencionalmente modificado pelo homem no laboratório, é de ocorrência natural.

[00106] "Tipo selvagem" (wt) é um termo que se refere à forma genética natural de um organismo. Um tipo selvagem é distinto de uma forma mutante (um organismo com uma mutação genética).

[00107] Os termos "polipeptídeo" e "proteína" referem-se a um polímero de resíduos de aminoácidos e que não sejam limitados a um comprimento mínimo do produto. Assim, peptídeos, oligopeptídeos, dímeros, multímeros, e outros, acham-se incluídos dentro da definição. Tanto as proteínas de comprimento completo quanto os seus fragmentos são abrangidos pela definição. Os termos também incluem modificações após a expressão do polipeptídeo, por exemplo a glicosilação, a acetilação, a fosforilação etc. Além disso, para os fins da presente invenção, um "polipeptídeo" refere-se a uma proteína, que inclui modificações, tais como deleções, adições e substituições (geralmente conservativas por natureza), à sequência nativa, contanto que a proteína mantenha a atividade desejada. Estas modificações podem ser deliberadas, como através da mutagênese dirigida ao sítio, ou pode ser acidental, tal como através de mutações que se originam com hospedeiros que produzem as proteínas ou erros devidos à amplificação de PCR.

[00108] Como aqui usados, um "análogo" ou "derivado" é um composto, por exemplo um peptídeo, que tem mais do que cerca de 70% de similaridade de sequência, mas menos do que 100% de similaridade de sequência com um dado composto, por exemplo um peptídeo. Tais análogos ou derivados podem ser compreendidos de resíduos de aminoácidos de ocorrência não natural, incluindo, como exemplo, e não como limitação, a homoarginina, ornitina, penicilamina e norvalina, bem como resíduos de aminoácidos de ocorrência natural. Tais análogos

ou derivados podem ser compostos de um ou de uma pluralidade de resíduos de D-aminoácidos, e pode conter interligações não peptídicas entre dois ou mais resíduos de aminoácidos.

[00109] A expressão “quantidade eficaz” significa uma dosagem suficiente para produzir um resultado desejado sobre uma condição de saúde, patologia e doença de um indivíduo ou para o fim de diagnóstico. O resultado desejado pode compreender um melhoramento subjetivo ou objetivo no receptor da dosagem. “Quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se àquela quantidade de um agente eficaz para produzir o efeito benéfico pretendido sobre a saúde. Uma quantidade “eficaz” apropriada em qualquer caso individual pode ser determinada por um técnico no assunto com o uso da experimentação de rotina.

[00110] “Tratamento” refere-se a tratamento profilático ou a tratamento terapêutico ou a tratamento diagnóstico.

[00111] Um tratamento “profilático” é um tratamento administrado a um indivíduo que não apresenta sinais de uma doença ou apresente apenas sinais prematuros, com a finalidade de reduzir o risco de desenvolver a patologia. Os compostos ou conjugados da invenção podem ser dados como tratamento profilático para reduzir a probabilidade de desenvolver uma patologia ou para minimizar a gravidade da patologia, se desenvolvida.

[00112] Um tratamento “terapêutico” é um tratamento administrado a um indivíduo que apresente sinais ou sintomas de patologia, com a finalidade de reduzir ou eliminar aqueles sinais ou sintomas. Os sinais ou sintomas podem ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionais, subjetivos ou objetivos. Os compostos ou conjugados da invenção podem ser dados como tratamento terapêutico ou para diagnóstico.

[00113] “Diagnóstico” significa identificar a presença ou a natureza de uma condição patológica. Os métodos de diagnóstico diferem em sua especificidade e

seletividade. Embora um método de diagnóstico particular possa não proporcionar um diagnóstico definitivo de uma condição, será suficiente se o método proporcionar uma indicação positiva que auxilie no diagnóstico.

[00114] "Composição farmacêutica" refere-se a uma composição adequada para uso farmacêutico em um indivíduo animal, incluindo seres humanos e mamíferos. Uma composição farmacêutica compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de um polipeptídeo de FAL e também compreende um veículo farmaceuticamente aceitável. Uma composição farmacêutica inclui uma composição contendo o(s) ingrediente(s) ativo(s), e o(s) ingrediente(s) inerte(s) que compõem o veículo, bem como qualquer produto que resulte, direta ou indiretamente, da combinação, complexação ou agregação de quaisquer dois ou mais dos ingredientes, ou da dissociação de um ou mais dos ingredientes, ou de outros tipos de reações ou interações de um ou mais dos ingredientes. Consequentemente, as composições farmacêuticas da presente invenção incluem qualquer composição produzida pela mistura de um composto ou conjugado da presente invenção, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00115] "Veículo farmaceuticamente aceitável" refere-se a qualquer um dos veículos, tampões e excipientes farmacêuticos padrão, tais como uma solução salina tamponada de fosfato, 5% de solução aquosa de dextrose, e emulsões, tais como uma emulsão de óleo/água ou de água/óleo, e vários tipos de agentes umectantes e/ou adjuvantes. Veículos e formulações farmacêuticas adequadas são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edição (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Os veículos farmacêuticos dependem do modo pretendido de administração do agente ativo. Modos típicos de administração incluem o enteral (por exemplo, oral) ou o parenteral (por exemplo, a injeção subcutânea, intramuscular, intravenosa ou intraperitoneal; ou a administração tópica, transdérmica ou transmucosa). Um "sal farmaceuticamente aceitável" é um sal que pode ser formulado em um composto ou

conjugado para uso farmacêutico, incluindo, por exemplo, os sais de metal (sódio, potássio, magnésio, cálcio etc.) e os sais de amônia ou aminas orgânicas.

[00116] Por “farmaceuticamente aceitável” ou “farmacologicamente aceitável” denota-se um material que não seja biologicamente ou de outra forma indesejável, isto é, o material pode ser administrado a um indivíduo sem causar quaisquer efeitos biológicos indesejáveis, ou pode interagir de uma maneira deletéria com qualquer dos componentes da composição em que ele esteja contido.

[00117] A expressão “forma de dosagem unitária”, como aqui usada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para indivíduos humanos e animais, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada do composto ou conjugado da presente invenção calculada em uma quantidade suficiente para produzir o efeito desejado, em associação com um diluente, carreador ou veículo farmaceuticamente aceitáveis. As especificações das novas formas de dosagem unitárias da presente invenção dependem do composto ou conjugado particulares empregados e do efeito a ser obtido, e da farmacodinâmica associada com cada composto ou conjugado no hospedeiro.

[00118] Por “pH fisiológico” ou um “pH na faixa fisiológica” denota-se um pH na faixa de aproximadamente 7,2 a 8,0, inclusive, mais tipicamente na faixa de aproximadamente 7,2 a 7,6, inclusive.

[00119] Como aqui usado, o termo “indivíduo” inclui mamíferos e não mamíferos. Exemplos de mamíferos incluídos, porém sem limitar, qualquer membro da classe de mamíferos: seres humanos, primatas não humanos tais como os chimpanzés, e outras espécies macacos; animais de fazenda tais como o gado, cavalos, carneiros, cabras, porcos; animais domésticos tais como coelhos, cães e gatos; animais de laboratório incluindo roedores, tais como ratos, camundongos e porquinhos-da-índia, e outros. Exemplos de não mamíferos incluem, porém, sem limitar, pássaros, peixes e outros. O termo não denota uma idade ou gênero

específicos.

[00120] Em várias formas de realização, a peguilação da variante de FAL é descrita com referência à relação de FAL:PEG ou DE PEG:FAL. Como aqui usado, e a menos que de outra forma indicado, a relação de “FAL:PEG” refere-se à relação dos resíduos de lisina a variante de FAL para as moléculas de PEG na reação de peguilação. De forma semelhante, como aqui usada, a menos que de outra forma indicado, a relação de “PEG:FAL” refere-se à relação das moléculas de PEG para os resíduos de lisina sobre a variante de FAL na reação de peguilação.

B. ENGENHARIA PROTÉICA COM BASE NA ESTRUTURA

[00121] Numerosos métodos são conhecidos quanto à engenharia protéica com o uso de otimização racional com base principalmente na informação estrutural da proteína (Brannigan *et al.,* Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3(12): 964-970 (2002); Marshall *et al*., Drug Discov. Today 8(5): 212-221 (2003)). A substituição sistemática dos aspectos estruturais pode levar a propriedades aprimoradas da proteína e/ou a uma nova configuração da especificidade do substrato. O recrutamento da função de um membro de uma família de genes em outro membro homólogo pode ser realizado pela introdução de um número limitado de substituições de aminoácidos na vizinhança imediata da ligação do substrato. Tais aprimoramentos na função protéica mediante a geração de variantes protéicas aprimoradas pode levar a proteínas úteis para aplicações industriais, agrícolas e terapêuticas (Bocanegra *et al.,* Biochemistry 32(11): 2737-2740 (1993); Failla et al., Fold Des. 1(1): 35-42 (1996); Hayes *et al.,* Proc Natl Acad Sci USA 99(25): 15926-15931 (2002); Voigt *et al.,* Nat. Struct. Biol. 9(7): 553-558 (2002); Malashkevich *et al*., Nat Struct Biol. 2(7): 548-553 (1995); Wells *et al.,* Proc Natl Acad Sci USA 84(15): 5167-5171 (1987); Wilks *et al.,* Science 242(4885): 1541-1544 (1988)).

C. A ESTRUTURA DE FAL

[00122] A estrutura tridimensional da FAL procariótica do tipo selvagem pode

ser determinada com o uso da cristalografia de raio-x. A proteína de FAL é um homotetrâmero, com cada monômero consistindo principalmente em hélices-alfa e subdivisível em quatro domínios – um domínio catalítico central, um domínio N-terminal, e um pequeno domínio C-terminal com similaridade à estrutura de histidina amônia-liase de *Pseudomonas putida* (HAL, Schwede *et al.,* Biochemistry 38(17): 5355-5361 (1999)) mais um domínio adicional introduzido na região C-terminal que ressalta das extremidades da molécula tetrâmera intacta. Os primeiros 25 resíduos N-terminais não são visíveis na estrutura quanto a todos os quatro monômeros no tetrâmero, e esta região é provavelmente desordenada. As regiões de alça entre os resíduos 109 a 123 e de 350 a 353 são desordenados para o monômero B, com as regiões 103 a 123 e 350 a 353 desordenadas quanto aos monômeros A, C e D no tetrâmero de FAL. Duas outras estruturas de raio-X de FAL de *Rhodosporidium toruloides* foram determinadas com o uso de transcinamato e a adição de íons NH4 durante o processo de cristalização, com resoluções de 2,1 Å (grupo espacial P3221) e 2,7 Å (grupo espacial P21; Calabrese *et al.,* Biochemistry 43(36): 11403-11416 (2004)). O pH inferior usado para a cristalização e a resolução inferior destas estruturas levou a distúrbio mais inerente nas estruturas (especialmente nas regiões N-terminais) e à incapacidade para não ambiguamente atribuir densidade eletrônica adicional presente no cofator MIO a um aduto NH2.

[00123] Existem várias estruturas relacionadas (com o uso de DALI, Holm *et al.,* J. Mol. Biol. 233: 123-138 (1993)) nesta família de enzimas tetraméricas que catalisam a eliminação de vários grupos dos ácidos carboxílicos, incluindo as amônia-liases (FAL, HAL e amônia-liase aspartato (AAL)), fumarase e arginossuccinato-liase (Schwede *et al*., Biochemistry 38(17): 5355-5361 (1999)). Além disso, a proteína da lente cristalina-δ do olho de aves tem uma dobra semelhante, mas é uma forma não enzimática desta família estrutural (Schwede *et al*., (1999) *ibid*).

[00124] As estruturas tridimensionais de raio-X de HAL de *P. putida* (Röther

et al., Eur. J. Biochem. 268: 6011-6019 (2001); Schwede *et al.,* Biochemistry 27: 5355-5361 (1999), e mais recentemente de FAL de *Rhodosporidium toruloides* (Calabrese *et al.,* Biochemistry 43: 11403-11416 (2004)), revelaram os resíduos de sítio ativo destas enzimas tetraméricas que são importantes para ligação do substrato, catálise e formação de MIO. Todos os resíduos de sítio ativo em HAL se acham presente em EncP, exceto quanto a H83 e E414, que são substituídas por resíduos de valina e de glutamina, respectivamente (Xiang, L. *et al.,* J. Biol. Chem. 277: 32505-3250924 (2002)). H83 em HAL é proposta para ligar e orientar o componente de imidazol da L-histidina no sítio ativo, e para estabilizar um intermediário catiônico ligado à enzima, enquanto o grupo carboxilato de E414 pode atuar como uma base na catálise.

[00125] A estrutura cristalina da proteína tridimensional de alta resolução, de FAL, pode ser usada nos métodos que envolvam a engenharia protéica para aprimorar as propriedades bioquímicas e biofísicas da FAL, e para aumentar a eficácia terapêutica da FAL, *in vivo*. Além disso, a estrutura provê informação em relação às quais as regiões da estrutura são as mais flexíveis (para remover e gerar uma forma de FAL mais compacta e estável), cujos resíduos são localizados perto do sítio ativo (para transformar de modo a intensificar a atividade e/ou minimizar o tamanho da proteína, bem como para prover informação para projetar o inibidor com base na estrutura), e cujas localizações superficiais se acham próximas aos sítios sensíveis imunogênicos (por exemplo, epítopos lineares identificados nos estudos de mapeamento) e/ou proteolíticos (a partir dos estudos de mapeamento da protease), levando em conta a introdução dos mutantes específicos do sítio para rompimento direto dos sítios problemas ou, alternativamente, para a peguilação superficial ou outra derivação química para proteger sítios sensíveis presentes na FAL nativa.

D. USOS DAS COORDENADAS ESTRUTURAIS DE FAL

[00126] A estrutura cristalina tridimensional de alta resolução da FAL pode ser usada nos métodos computadorizados para selecionar regiões da proteína para

mutação, modificação ou mutação combinada e modificação. Por exemplo, o programa GETAREA comercialmente disponível calcula a exposição superficial para os resíduos de aminoácidos com base nas coordenadas cristalográficas de raio-X.

[00127] A estrutura cristalina tridimensional de alta resolução pode ainda ser usada nos métodos in-sílico para projetar ligantes para o sítio ativo da enzima. Por exemplo, programas de software comercialmente disponíveis para acoplar e designar moléculas pequenas com base na estrutura, podem ser usados para designar inibidores da FAL (Billett *et al.,* Biochim Biophys Acta 524(1): 219-230 (1978); Janas *et al.,* Acta Biochim Pol. 32(2): 131-143 (1985); Zon *et al.*, Phytochemistry 59(1): 9-21 (2002); Alunni *et al.,* Arch Biochem Biophys. 412(2): 170-175 (2003)).

Engenharia de FAL com base na estrutura

[00128] A elucidação de uma estrutura tridimensional ou modelo estrutural confiáveis para uma macromolécula específica permite projeto racional para tornar-se um método produtivo para otimização da estrutura e/ou função específicas da referida macromolécula (Penning *et al.,* Chem Rev. 101(10): 3027-3046 (2001)). As abordagens de otimização incluem, porém sem limitar, a reconfiguração da especificidade da coenzima (Bocanegra *et al.,* Biochemistry 32(11): 2737-2740 (1993)), o aprimoramento das estabilidades protéicas (Malakauskas *et al.,* Nat Struct Biol. 5(6): 470-475 (1998); Jiang *et al.,* Protein Sci. 10(7): 1454-1465 (2001); Luo, Protein Sci. 11(5): 1218-1226 (2002); Filikov *et al.,* Protein Sci. 11(6): 1452-1461 (2002); O'Fagain, Enz Microb Technol. 33: 137-149 (2003); Cammett *et al*., J Mol Biol. 327(l): 285-297 (2003)], reconfiguração das especificidades do substrato (Hedstrom *et al.,* Science 255(5049): 1249- 1253 (1992); Failla *et al.,* Fold Des. 1(1): 35-42 (1996); Malashkevich *et al.,* Nat Struct Biol. 2(7): 548-553 (1995); Wilks *et al*., Biochemistry 31 (34): 7802-7806 (1992); Feil *et al*., Protein Eng. 10(3): 255-262 (1997); Whittle *et al.,* J Biol Chem. 276(24): 21500-21505 (2001)), alteração das especificidades de ligação ao ligante ou ao receptor (Cunningham *et al.,* Proc Natl Acad Sci USA 88(8): 3407-

3411 (1991); Reddy *et al.,* Nat Biotechnol. 14(13): 1696-1699 (1996); Doyle *et al.,* Curr Opin Chem Biol. 4(l): 60-63 (2000)), e reengenharia das atividades biológicas (Chen *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12): 5618-5622 (1993); Sarkar *et al.,* Nat Biotechnol. 20: 908-913 (2002); Blatt *et al.,* J Interferon Cytokine Res. 16(7): 489-499 (1996)).

[00129] A engenharia à base da estrutura pode ser usada para gerar variantes de FAL incluindo mutantes racionais tais como truncações, deleções, inserções, variantes de*splice*, mutações pontuais, substituições, quimeras, mutantes submetidos a reengenharia da alça, mutantes de troca da alça, mutantes de chapeamento superficial, bem como mutantes estocasticamente derivados (incluindo os mutantes derivados de evolução dirigida, sozinhos ou em combinação com mutantes racionalmente desenvolvidos). Além disso, as variantes de FAL podem ser produzidas comprendendo mutantes de FAL em que as mutações tenham sido introduzidas para a peguilação e/ou outras derivações químicas. Os mutantes de FAL para uso em tais métodos incluem qualquer variante de FAL tendo substancialmente a mesma atividade funcional *de R. toruloides* do tipo selvagem, incluindo variantes, fragmentos e derivados químicos da proteína de FAL precursora.

Otimização Protéica de Evolução Dirigida

[00130] Os métodos de evolução dirigida transformam aleatoriamente o(s) gene(s) de interesse para explorar mais completamente maiores regiões do espaço mutacional protéico. Existem numerosos métodos de evolução dirigida, incluindo a PCR propensa a erro e a mutagênese de inserção e deleção aleatórias (RID) para introduzir diversidade na totalidade de uma sequência de DNA, e métodos geradores da diversidade focalizada ou “dirigida”, tais como uma mutagênese de saturação do sítio e outros métodos de mutagênese com base em oligonucleotídeos (Brannigan *et al*., (2002) *ibidem*). Além disso, métodos recombinantes de sequências de DNA têm sido usados para combinar sítios vantajosos de mutação e simultaneamente remover

mutações deletérias, produzindo novas sequências de DNA (por exemplo, métodos de embaralhamento de DNA, StEP, RACHITT, ITCHY). Finalmente, as técnicas de evolução dirigida com base na estrutura têm sido usadas para reconfigurar proteínas para vantagem terapêutica (Métodos de engenharia combinatória com base na estrutura, SCOPE, e de automatização de configuração protéica, PDA). O método de SCOPE baseia-se em uma abordagem da engenharia protéica semi-racional que usa informação da estrutura protéica acoplada com técnicas de manipulação de DNA para configurar e criar bibliotecas de variantes protéicas de cruzamento múltiplo de genes não homólogos (O'Maille *et al.,* J. Mol. Biol. 321(4): 677-691 (2002)). Em PDA, uma pré-triagem computacional do espaço mutacional permite a inclusão de apenas mutações compatíveis com um duplicação protéica específica, assim reduzindo o número de variantes de sequências a um tamanho acessível à triagem experimental (Patente U.S. no 6.403.312; Dahiyat *et al.,* Proc Natl Acad Sci USA 94(19): 10172-10177 (1997); Dahiyat *et al.,* Protein Sci. 6(6): 1333-1337 (1997); Hayes *et al.,* Proc Natl Acad Sci USA 99(25): 15926-15931 (2002); Orencia *et al.,* Nature Struct Biol. 8: 238-242 (2001)).

[00131] Um grande número de exemplos existe, em que o uso da evolução dirigida (com acoplamento a uma seleção eficaz ou protocolo de triagem) tem levado à função catalítica e às propriedades biofísicas melhoradas (por exemplo, imunogenicidade reduzida, estabilidade aumentada), partindo-se de uma espécie de enzima inicial e transformando-se essa espécie para função alterada e/ou aprimorada (Vasserot *et al*., Drug Discovery Today 8(3): 118-126 (2003)). Por exemplo, os mutantes bem sucedidos têm sido obtidos com o uso da evolução dirigida e com outros métodos de mutagênese "aleatória" sobre várias diferentes proteínas (Triose-fosfato isomerase, Hermes *et al*., Proc Natl Acad Sci USA 87(2): 696-700 (1990); Beta-lactamase, Stemmer, W. P., Nature 370(6488): 389-391 (1994), Orencia, M. C. *et al.,* Nature Struct Biol 8: 238-242 (2001), Voigt, C. A. *et al.,* (2002) *ibidem*; para-nitrobenzil

esterase, Moore *et al.,* Nature Biotechnol. 14: 458-467 (1996); Galactosidase até fucosidase, Zhang *et al.,* Proc Natl Acad Sci USA 94(9): 4504-4509 (1997); Aspartato aminotransferase, Yano *et al*., Proc Natl Acad Sci USA 95(10): 5511-5515 (1998); Proteína fluorescente verde, Crameri *et al.,* Nat Biotechnol 14(3): 315-319 (1996); Peroxidase da raiz forte, Lin *et al*., Biotechnol Prog 15: 467-471 (1999); Citocromo P450, Joo *et al.,* Nature 399(6737): 670-673 (1999); Bifenil dioxigenase, Kumamaru *et al*., Nat Biotechnol 16(7): 663-666 (1998); Via da detoxificação do arsenato, Crameri *et al*., Nat Biotechnol 15(5): 436-438 (1997); Cefalosporinase, Crameri *et al*., Nature 391(6664): 288-291 (1998); várias proteínas, Shao *et al*., Curr Opin Struct Biol 6(4): 513-518 (1996), várias proteínas, Skandalis *et al.,* Chem Biol 4: 889-898 (1997); Subtilisina, Cunningham *et al.,* Protein Eng. 1(4): 319-325 (1987); Nitrilase, DeSantis *et al.,* J Am Chem Soc. 125(38): 11476-11477 (2003); Alfa-aspartil dipeptidase, Kong *et al*., Biochem Biophys Res Commun. 289(1): 137-142 (2001); Aspartato aminotransferase, Rothman *et al*., Protein Science 13(3): 763-772 (2004); L-aspartase, Wang *et al.,* Biochem Biophys Res Commun. 276(1): 346-349 (2000); e lactato desidrogenase, Wilks *et al.,* Biochemistry 31(34): 7802-7806 (1992).

[00132] Estes estudos têm demonstrado repetidamente a utilidade de se aplicar as técnicas de mutagênese “aleatória” ao desenvolvimento de variantes enzimáticas aprimoradas com estabilidade, atividade e resistência aumentada às vias degradantes. A análise estrutural dos clones de proteínas segregados leva à percepção sobre as mudanças moleculares que se acham envolvidas com as propriedades físicas e químicas aprimoradas que são obtidas (Orencia *et al.,* em Advances in Protein Chemistry: Evolutionary protein design, F. H. Arnold, Editor, Academic Press: San Diego, pp. 227-259 (2001)). As recompensas a serem obtidas com as técnicas de evolução dirigida são especialmente evidentes à luz da ocorrência repetida de mutações benéficas que envolvem os resíduos de sítios não ativos, com alguns sítios de mutação localizados através de 15 a 20 Å das regiões de sítios ativos

enzimáticos tendo efeitos benéficos (Oue *et al.,* J. Biol. Chem. 274(4): 2344-2349 (1999)). A evolução dirigida e outras técnicas de mutagênese aleatória, acoplada aos procedimentos de seleção e de triagem, podem ser usadas para desenvolver formas mais proteoliticamente estáveis e quimicamente robustas de FAL a serem usadas nas aplicações industriais ou, alternativamente, para a terapia de substituição de enzimas, por exemplo, para a PKU.

E. PALFAL MODIFICADA

[00133] Experimentos anteriores descreveram formas modificadas de FAL, tais como mutantes de FAL (Schuster *et al.,* FEBS Lett. 349(2): 252-254 (1994); Schuster *et al.,* Proc Natl Acad Sci USA 92(18): 8433-8437 (1995); Langer *et al.,* Biochemistry 36: 10867-10871 (1997); El-Batal *et al*., Acta Microbiol Pol. 49(1): 51-61 (2000); Röther *et al.,* Eur. J. Biochem. 269: 3065-3075 (2002)) e mutantes de HAL (Taylor *et al.,* J. Biol. Chem. 269(44): 27473- 27477 (1994); Baedeker *et al.,* Eur. J. Biochem. 269(6): 1790-1797 (2002)).

Otimização das Cinéticas de FAL – Mutantes Procarióticos com Atividade Catalítica Intensificada

[00134] Os sítios biologicamente ativos da FAL do tipo selvagem de acordo com a invenção podem ser modificados conforme se deseje, para otimizar as características cinéticas da FAL. Km, a concentração do substrato, que dá atividade meio-máxima, é intimamente associada com a eficácia terapêutica da FAL na manutenção dos níveis de Phe dentro de uma faixa aceitável, isto é, de 120 μM a 240 μM. Km é a afinidade da enzima pelo substrato. Mediante o controle da afinidade, pode-se limitar ou controlar a eficácia de qualquer enzima em relação ao substrato em diferentes concentrações. Por exemplo, se Km for de 1000 μM (*Rhodosporidium toruloides*), a atividade da enzima será reduzida em cerca de 12,5% nos níveis de Phe do sangue de 240 μM, e em cerca de 3% nos níveis de Phe do sangue de 60 μM. Se Km for de 240 μM, a atividade da enzima será reduzida em cerca de 50% nos níveis

de Phe do sangue de 240 μM, e em cerca de 12% nos níveis de Phe do sangue de 60 μM. Se Km for de 120 μM, a atividade da enzima será reduzida a cerca de 70% nos níveis de Phe do sangue de 240 μM e a cerca de 35% nos níveis de Phe do sangue de 60 μM. Otimamente, um objetivo terapêutico deve ter uma enzima com suficiente atividade para reduzir, mas também manter, Phe dentro da faixa ótima de cerca de 120 μM a cerca de 240 μM. Uma enzima com um Km elevado (isto é, de 1000 mM) perderá rapidamente a atividade quando os níveis de Phe caírem para dentro da faixa normal, e também requererá a administração não prática de doses altamente concentradas ou de grandes volumes. Por outro lado, uma enzima com um Km muito baixo pode exaurir rapidamente os níveis de Phe, o que pode ser fatal para as hiperfenilanemias mas pode ser útil no controle do câncer.

[00135] Em algumas formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa tem uma kcat de pelo menos cerca de 0,1 s-1 ou mais elevada do que cerca de 0,5 s-1. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa tem uma kcat de pelo menos cerca de 0,2 s-1 ou mais elevada do que cerca de 1,0 s-1. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa tem um Km entre cerca de 10 μM a cerca de 1000 μM. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa tem um Km entre cerca de 100 μM a cerca de 1000 μM. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa apresenta atividade enzimática que é de cerca de duas vezes a cerca de 100 vezes mais elevada do que aquela do tipo selvagem. Em outras formas de realização, a FAL modificada biologicamente ativa apresenta atividade enzimática que é de cerca de 10% a cerca de 100% mais elevada do que aquela do tipo selvagem. Tais proteínas de FAL modificadas biologicamente ativas podem ser formadas com o uso de métodos bem conhecidos no estado da técnica, tal como por mutagênese dirigida ao sítio.

[00136] Todos os resíduos de sítio ativo em HAL foram mostrados estarem presentes em EncP, exceto quanto a H83 e E414, os quais são substituídos por

resíduos de valina e de glutamina, respectivamente (Xiang, L. *et al*., J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002)). O papel do H83 em HAL na ligação e orientação do componente de imidazol da L-histidina no sítio ativo e na estabilização de um intermediário cariônico ligado à enzima, foi pesquisado (Xiang *et al.,* J. Bacteriology 187(12): 4286-4289 (2005); Xiang *et al*., J. Bacteriology 188(14): 5331 (2006)). Foi proposto que o grupo carboxilato de E414 poderia atuar como uma base nos catalisadores. No estudo, os mutantes EncP foram gerados por mutagênese dirigida ao sítio para avaliar-se a contribuição de V83 à formação do ácido cinâmico por EncP. A substituição da valina por histidina gerou um mutante, o V83H, que foi caracterizado por uma perda na atividade de FAL. A substituição da valina por alanina resultou em um mutante, V83A, que ficou mais ativo do que o V83A de EncP do tipo selvagem, teve uma afinidade levemente menor à L-fenilalanina com um KIm de 120 μM versus 23 μM para a enzima do tipo selvagem. Entretanto, em comparação com EncP do tipo selvagem, V83A teve um kcat mais elevado e ficou mais ativo do que a enzima do tipo selvagem.

Variantes Protéicas Específicas: Variantes Tendo Imunogenicidade Reduzida

[00137] Várias estratégias são correntemente usadas para reduzir a imunogenicidade protéica. Em algumas formas de realização, as modificações que são introduzidas para minimizar a resposta imune não destrói a estrutura, a função ou a estabilidade da macromolécula. Estratégias eficazes usadas incluem o aumento do conteúdo da sequência humana (quimeras e/ou outras abordagens de ‘humanização’), aprimorando as propriedades da solução, removendo epítopos de anticorpos, introduzindo derivação química (tal como a peguilação) e/ou identificando e removendo agretopos. Para uma terapêutica injetada, a imunorreatividade *in vivo* pode ser tratada pela realização do mapeamento do epítopo, seguido por mutagênese racional, para modificar e/ou de outra forma transformar estes sítios de imunogenicidade, isoladamente ou em combinação com peguilação específica do sítio

(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)) ou outros métodos de derivação química para reduzir a imunorreatividade protéica a um nível aceitável. A modificação das regiões protéicas superficiais antigênica reduz a imunogenicidade (Chirino *et al.,* Drug Discov. Today 9(2): 82-90 (2004)). Um método de aprimoramento envolve a construção de proteínas de tamanhos menores que conservam a atividade catalítica (por exemplo, um ensaio de absorbância é usado para medição da atividade). Um segundo método de aprimoramento, a engenharia protéica acoplada à triagem de ELISA, também pode ser usado para identificar mutantes com imunorreatividade reduzida. Outro método introduz as mutações pontuais para sítios de Lys superficiais adicionais para derivação da peguilação, um método mostrado para reduzir a imunogenicidade com a enzima de teste purina nucleosídeo fosforilase (Hershfield *et al.* (1991) *ibidem*). Uma via alternativa usa a mutação de resíduos localizados nas regiões do epítopo protéico para remover sítios imunogênicos (Yeung *et al.,* J Immunol. 172(11): 6658-6665 (2004)). Em uma abordagem que é análoga à humanização de anticorpos, as regiões da alça homóloga e/ou resíduos de anticorpos humanos são substituídas nas regiões de alça correspondentes de uma proteína homóloga.

[00138] A melhora das propriedades das soluções das proteínas pode aumentar a atividade enzimática específica e/ou reduzir a imunogenicidade. Uma propriedade da solução típica das proteínas recombinantes bacterianamente expressa é a formação de agregados protéicos devida, por exemplo, à formação de ligação dissulfeto intercadeias, às interações hidrofóbicas e/ou aos cátions divalentes (Chi *et al.,* Pharm Res 20(9): 1325-1336 (2003)). A agregação das proteínas recombinantemente expressas pode intensificar a resposta imune (Hermeling *et al*., Pharm Res 21(6): 897-903 (1994); Schllekens, Nephrol Dial Transplant 20 (suplemento 6): vi3-9 (2005)). Um método de aprimoramento envolve substituir os

resíduos de cisteína superficial por outros resíduos de aminoácidos (por exemplo, serina) para minimizar a possibilidade da formação das ligações dissulfeto intercadeias. Por exemplo, a substituição de dois resíduos de cisteína superficiais por resíduos de serina reduziu a agregação da corismate liase com efeitos secundários sobre a atividade da enzima (Holden *et al.,* Biochim Biophys Acta 1594(l): 160-167 (2002)).

[00139] A remoção dos sítios de processamento proteolítico terapêutico das proteínas também pode prover uma redução na imunogenicidade mediante a prevenção do processamento proteasômico, por esse meio prevenindo o corte e o processamento dentro dos fragmentos de peptídeos quanto ao antígeno apresentando ligação celular. Um fenômeno semelhante foi observado na alteração das regiões de flanqueio para os determinantes de MHC classe II, prevenindo a apresentação às células T auto-reativas (Maverakis *et al.,* Proc Natl Acad Sci, USA 100(9): 5342-5347 (2003)).

Mapeamento do Epítopo

[00140] Os epítopos terapêuticos protéicos podem ser calculados com o uso de vários algoritmos ou experimentalmente determinados com abordagens *in vitro* ou *in vivo*. Programas de computador tais como o *"Peptide Companion"* e o "*Protean*" no conjunto de programas do programa Lasergene da DNAStar, são comumente usados para estimar as regiões de epítopo superficial de uma proteína com base na composição química e na conformação de uma proteína. As regiões imunogênicas em uma sequência de proteínas são aquelas regiões de hidrofilicidade calculada mais elevada, com base em um índice de hidrofilicidade, e antigenicidade, com base na anfipaticidade e outros parâmetros de conformação das regiões calculadas das proteínas superficiais. Alternativamente, os agretopos em uma sequência de proteínas podem ser localizados com base nas predições modeladas por computador da ligação potencial de HLA (Robinson *et al.,* Nucleic Acids Res. 31(1): 311-314 (2003); De Groot

et al., Novartis Found. Symp. 254: 57-72 (2003)). Além disso, os epítopos podem ser identificados com o uso da bioquímica *in vitro* (Tangri *et al*., Curr. Med. Chem. 9(24): 2191-2199 (2002)) e métodos com base celular *in vitro* (Stickler *et al*., J Immunother. 23(6): 654-660 (2000); Stickler *et al*., J Immunol Methods 281(l-2): 95-108 (2003)). Quanto à engenharia protéica, a redução relativa na imunogenicidade pode ser monitorada com o uso de ensaios semelhantes ao ensaio com base celular *in vitro* de Stickler *et al.* (Toxicol Sci. 77(2): 280-289 (2004)).

[00141] A análise de Pepscan (mapeamento do epítopo) envolve o uso de uma biblioteca de peptídeos de sobreposição cobrindo as regiões de superfície da sequência de enzimas e sondando com anticorpos policlonais de coelho cultivados anti os peptídeos de superposição que cobrem a sequência inteira de proteínas de enzimas, e por esse meio orevelando os epítopos lineares presentes na enzima. Com base na estrutura tridimensional da enzima, os sítios experimentalmente identificados da antigenicidade são transformados ou por resíduos de regiões de epítopos aleatoriamente transformados para remover os sítios de reconhecimento de epítopos, ou com o uso de mutação específica do sítio para introduzir resíduos de Lys ou de Cys sobre a superfície próxima destes sítios de epítopos para prover localizações para peguilação para cobrir e proteger estes sítios contra o reconhecimento imunogênico. A triagem de ELISA destes mutantes enzimáticos potencialmente não imunogênicos (ou formas peguiladas destes mutantes enzimáticos) fornece a identificação *in vitro* de subconjuntos de mutantes enzimáticos que apresentam imunorreatividade reduzida.

Identificação e Mutação de Resíduos Superficiais

[00142] Os resíduos expostos de superfície nas regiões imunogênicas da enzima ou perto delas, podem ser identificados. Estas localizações serão um subconjunto do número total de localizações acessíveis a solvente presentes na proteína, dependente da proximidade à superfície, bem como à proximidade às

regiões de imunogenicidade/antigenicidade. A estrutura tridimensional da proteína, determinada com o uso de cristalografia de raio-X, NMR, ou modelagem de homologia, pode ser usada em programas de software comercialmente disponíveis para calcular a área superficial de macromolécula acessível a solvente. A emissão provida com o uso do programa GETAREA 1.1 (Fraczkiewicz *et al*., J. Comp. Chem. 19: 319-333 (1998)) dá uma estimativa confiável da acessibilidade superficial para FAL de *R. toruloides*. O GETAREA e o PARAREA e programas similares calculam a área superficial acessível ao solvente com o uso de métodos contínuos com uma abordagem paramétrica com base no teorema de Gauss-Bonnet. O PARAREA encontra pontos de interseção potenciais na trajetória de Gauss-Bonnet com o uso de todos os pares de átomos na lista vizinha de cada átomo, enquanto o GETAREA calcula mais eficientemente os vértices expostos a solvente com o uso dos meios-espaços de interseção definidos por planos de interseções de duas esferas.

[00143] Na FAL nativa, o GETAREA identificou doze resíduos de Lys expostos na superfície, distribuídos na totalidade da superfície da proteína de FAL tetramérica, bem como um resíduos de Cys (Cys140) superficial parcialmente exposto. Estas posições são diretamente disponíveis para a derivação de peguilação. Além disso, a estrutura tridimensional de FAL pode ser usada para identificar resíduos superficiais adicionais disponíveis para a mutagênese dirigida ao sítio. Estes sítios adicionais podem ser transformados com o uso das técnicas da engenharia protéica padrão para gerar mutantes de FAL mais favoráveis com imunogenicidade reduzida, resistência proteolítica aprimorada e/ou estabilidade/atividade aprimoradas.

[00144] As estratégias para mutação da proteína para prover mutantes protéicos com propriedades aprimoradas, tais como a imunogenicidade reduzida, são conhecidas no estado da técnica. Uma via popular transforma cada resíduo não alanina em um epítopo, para Ala, e transforma cada resíduo de alanina em um epítopo, para Gli. Outros métodos removem resíduos carregados e hidrofóbicos das

regiões do epítopo, ou por mutação ou por deleção. Estratégias de mutação adicionais introduzem mutações específicas do sítio, seguido por derivação química específica do sítio.

[00145] As truncações também podem ser usadas para a produção de aprimoramentos de proteínas. A análise de bioinformática de FAL relativa à histidina amônia-liase (HAL) sugeriu mutantes de truncação (resíduos 23-716 e 1-564). Além disso, a análise da estrutura de FAL 3-D provê uma região alternativa para a truncação, com base na ausência de uma região de domínio C-terminal na estrutura da proteína de HAL altamente homóloga. Os mutantes de deleção do domínio C-terminal, incluindo os mutantes em que a região de alça correspondente de HAL é fundida na sequência de FAL para substituir no lugar do domínio de C-terminal ressaltando a região da estrutura da FAL (calculada como tendo regiões do epítopo principais), forma variantes de FAL menores, mais robustas e previstas serem menos imunogênicas.

[00146] Em outro método, a engenharia protéica com o uso da mutagênese racional em combinação com a evolução dirigida, pode ser usada para se obter formas mutantes da FAL. Por exemplo a implementação da configuração racional junto com a configuração experimental e combinatória melhorou a atividade da compstatina (Morikis *et al.,* Biochem. Soc. Trans. 32(l): 28-32 (2004)). A combinação da mutagênese racional com a evolução dirigida tem-se mostrado benéfica (Bornscheuer *et al.,* Curr. Opin. Chem. Biol. 5(2): 137-143 (2001); Dwyer *et al.,* Science 304(5679): 1967-1971 (2004)).

[00147] As formas mutantes da FAL que apresentam atividade enzimática menor do que ótima, podem ser desenvolvidas quanto à atividade, com o uso do método de engenharia protéica de evolução molecular dirigida, em que uma etapa de mutagênese aleatória é seguida por um procedimento de seleção para mutantes que sejam ativos, produzindo um novo acúmulo de mutantes protéicos com apenas

aqueles clones que tenham atividade. Por exemplo, se uma FAL mutante específica (que tenhamos designado introduzir um resíduo de lisina superficial perto de uma região da estrutura contendo epítopo) for inativa, a realização da evolução dirigida sobre este mutante (transformando o mutante inativo e selecionando quanto aos transformantes com atividade) gera um novo aglomerado de mutantes contendo esta mutação benéfica (o site da lisina superficial) mais um subconjunto de mutações aleatórias adicionais localizadas na totalidade da estrutura que restaura a atividade a cada clone ativo. Além disso, a técnica de evolução dirigida da reprodução molecular que pode cruzar diferentes espécies da mesma proteína ou sequências semelhantes de diferentes proteínas (Crameri *et al*. Nature, 391: 288-291 (1998); Minshull *et al.,* Curr. Opin. Chem. Biol. 3(3): 284-290 (1999)) pode substituir a sequência de histidina amônia-liase humana para substituir algumas das regiões mais imunogênicas da FAL por uma sequência humana que não seja reconhecida pelo sistema imune.

[00148] As formas mutantes da FAL podem ser obtidas pela produção de variantes de proteínas híbridas com base nas abordagens semi-racionais, por esse meio levando em consideração um nível mais dirigida da configuração protéica relativa aos métodos puros com base na evolução dirigida, bem como levando-se em conta um nível mais aleatório da manipulação mutacional para aquelas regiões de uma estrutura de proteínas identificada com o uso de tais abordagens da engenharia protéica polarizadas. Por exemplo, o método de PDA gera bibliotecas pré-ensaiadas computacionalmente, de variantes de proteínas, levando em conta a otimização mais rápida das propriedades protéicas através de métodos puros aleatórios ou da engenharia protéica não polarizada (Patente U.S. nº 6.403.312; Dahiyat, Curr Opin Biotechnol. 10(4): 387-390 (1999); Filikov *et al.,* (2002) ibidem; Hayes *et al*., (2002) ibidem; Luo, P. *et al.,* (2002) ibidem). De forma semelhante, o método SCOPE constrói variantes de enzimas híbridas com base nos subdomínios “equivalentes” da estrutura, possibilitando a criação de bibliotecas de variantes protéicas de cruzamento múltiplo

iniciando dos genes não homólogos (O'Maille *et al.,* (2002) *ibidem*). De uma forma semelhante, o método desenvolvido por Voigt *et al*. constrói híbridos com base na aplicação de um algoritmo computacional que identifica fragmentos de proteínas, ou 'esquemas", que podem ser recombinados sem romper a integridade de uma estrutura tridimensional de proteínas (Voigt *et al*., (2002) *ibidem*). A análise computacional pode também identificar regiões de núcleo conservadas de posições estrutural e funcionalmente importantes em uma mistura de proteínas, com base em atribuições de elementos estruturais secundários (Mizuguchi *et al.,* Bioinformatics 16(12): 1111-1119 (2000)). Formas mutantes de FAL podem ser obtidas seguindo-se os procedimentos de quaisquer métodos do estado da técnica.

HAL como um Substituto de Enzima Alternativo

[00149] A estrutura de encP de *Streptomyces maritimus* foi modelada por homologia com base na estrutura de HAL de *P. putida*. Não obstante, menor do que a FAL, a estrutura de *S. maritimus* é mais semelhante à FAL humana, tornando a encP uma forma possivelmente menos imunogênica de uma amônia-liase para uso para a engenharia protéica de FAL. Um método alternativo para se obter variantes de FAL não imunogênicas envolve a mutação de encP de *S. maritimus* ou outra FAL procariótica para substituir sequências imunogênicas por sequências de histidina amônia-liase humana (HAL, Suchi *et al.,* Biochim. Biophys. Acta 1216 (2): 293-295 (1993)), com o uso de mutação seguida pela seleção quanto a encP ou outros mutantes procarióticos com atividade de FAL, para se obter uma encP "humanizada" ou outra proteína de FAL procariótica que possa ser ainda peguilada em seguida às etapas de mutação e seleção quanto à atividade.

Variantes de Proteínas Especificas: Variantes Que Têm Sensibilidade à Protease Reduzida

[00150] Várias estratégias são geralmente usadas para reduzir a suscetibilidade da protease protéica. Em algumas formas de realização, as

modificações introduzidas para minimizar a sensibilidade proteolítica não destrói a estrutura, a função ou a estabilidade da macromolécula. Estratégias eficazes incluem o fornecimento de uma enzima com uma espécie estabilizadora de sítio ativo, tal como um inibidor competitivo (Gilbert *et al.,* (1981) *ibidem*; Patentes U.S. nos 6.548.644, 6.451.986, 6.433.158, 6.461.849), modificando quimicamente os grupos amino em sítios suscetíveis de Lys e/ou Arg para bloquear os sítios de ligação à tripsina, transformando os resíduos de Tyr, Phe e/ou Trp sensíveis à quimotripsina, em aminoácidos neutros menores para abolir a suscetibilidade à clivagem, ligar ou acoplar FAL a outras macromoléculas protetoras (tais como os domínios de anticorpos Fc ou os componentes não tóxicos de neurotoxina de botulinum), e/ou introduzir os sítios de Lys ou Cys próximos aos sítios suscetíveis da protease para subsequente derivação química com PEG ou outros grupos quimicamente protetores e estabilizadores.

F. VARIANTES DE FAL QUIMICAMENTE MODIFICADAS

[00151] A modificação química das macromoléculas pode ser realizada de uma forma não específica (levando a misturas de espécies derivadas) ou de uma forma específica do sítio (com base na derivação dirigida à reatividade da macromolécula do tipo selvagem e/ou na modificação seletiva do sítio, com o uso de uma combinação de mutagênese dirigida ao sítio com a modificação química) ou, alternativamente, com o uso de métodos expressos de ligação de proteínas (Hofmann *et al.,* Curr Opin Biotechnol. 13(4): 297-303 (2002)). Em algumas formas de realização, a modificação química é usada para reduzir a imunogenicidade. A peguilação é um método demonstrado para reduzir a imunogenicidade das proteínas (Bhadra *et al.,* Pharmazie 57(I): 5-29 (2002)), mas a glicosilação e outros procedimentos de derivação química, com o uso da modificação com fosforilação, amidação, carboxilação, acetilação, metilação, criação de sais de adição de ácido, amidas, ésteres e derivados de N-acila, são também possíveis (Davis, Science 303: 480-482 (2004)).

Proteínas Peguiladas

[00152] Uma série de diferentes reações de peguilação sobre FAL, com o uso de uma faixa de relações de reagentes químicos para a proteína de FAL, fornecerá derivados de PEG-FAL para cada método de modificação. O grau de peguilação ótimo pode ser determinado com base na atividade residual obtida para cada espécie de FAL derivada com o uso do ensaio de absorbância em combinação com PAGE e a análise em gel nativo para se determinar a extensão da derivação de PEG. Após as faixas iniciais de modificação ótima terem sido determinadas, a análise cinética comparativa (com inclusão das determinações de Vmáx e Km, das constantes de ligação dos substratos, da estabilidade proteolítica, da dependência do pH da atividade, da dependência da temperatura da atividade) e a imunorreatividade das espécies ótimas de PEG-FAL, podem ser determinadas por ELISA, imunoprecipitação e *Western blot*. A engenharia protéica pode também ser usada para gerar o mutante de FAL mais favorável para a peguilação com o uso das condições ótimas de derivação; pela minimização do tamanho da proteína de FAL e apenas modificar as regiões mais antigênicas da superfície de FAL, o custo da modificação do PEG será reduzido, embora ao mesmo tempo se retenha a quantidade máxima de atividade enzimática e a quantidade mínima de imunogenicidade. De forma semelhante, a peguilação pode ser usada para prover derivados de enzimas.

[00153] Outras modificações químicas, tais como a fosforilação ou outra modificação química dos resíduos de Lys, Arg e Cys, podem ser usadas para mascarar as regiões imunogênicas e/ou as regiões sensíveis proteolíticas. Tais modificações químicas que incluem o método de adição de polímero de Bednarsaki e o método de reticulação de Altus Corporation para aprimorar a estabilidade de FAL, reduzir a imunogenicidade, e melhorar a resistência à protease, são exemplos representativos. Bednarsaki demonstrou que a adição de polímeros aprimora a estabilidade de temperatura da proteína (Wang *et al*., J. Am. Chem. Soc. 114(I): 378-

380 (1992)), e Altus Corporation observaram que a reticulação do glutaraldeído aprimora a estabilidade da enzima.

[00154] Para descobrir se a meia-vida terapêutica *in vivo* de uma proteína, tal como a FAL, deve beneficiar-se da peguilação, uma variedade de diferentes conjugados de PEG:FAL é sintetizada, caracterizada *in vitro* e testada *in vivo* quanto à redução de L-Phe. De modo a otimizar tanto os efeitos potenciais da peguilação quanto identificar os sítios preferidos da ligação de PEG, uma estratégia de configuração é empregada, em que o comprimento do polímero, a conformação e o grau de ligação do PEG são variados.

[00155] Os métodos para o preparo da FAL peguilada da presente invenção em geral compreendem as etapas de (a) reagir a FAL com polietileno glicol sob condições por meio das quais a FAL se torne ligada a um ou mais grupos de PEG, e (b) obter o(s) produto(s) da reação. Tendo em vista que os sítios específicos de modificação da FAL podem alterar significativamente a atividade intrínseca do conjugado, diferentes tipos e quantidades de PEG foram exploradas. A química usada para a peguilação da FAL foi a acilação das aminas primárias da FAL, com o uso do éster de NHS do metóxi-PEG (O-[(N-succinimidiloxicarbonil)-metil]-O'-metilpolietileno glicol). A acilação com metóxi-PEG-NHS ou metóxi-PEG-SPA resulta em uma ligação amida que elimina a carga da amina primária original.

[00156] Os presentes métodos fornecem uma mistura substancialmente homogênea de conjugado de polímero:proteína. "Substancialmente homogênea", como aqui usado, significa que apenas as moléculas do conjugado de polímero:proteína são observadas. O conjugado de polímero:proteína e o presente "substancialmente homogênea" tem atividade biológica e as presentes preparações de FAL peguiladas aqui fornecidas são aquelas que são homogêneas o bastante para apresentar as vantagens de uma preparação homogênea, por exemplo, facilidade na aplicação clínica na previsão de farmacocinética de porção para porção.

[00157] As moléculas poliméricas a serem consideradas para uso nas abordagens de peguilação aqui descritas podem ser selecionadas dentre os polímeros solúveis em água ou uma mistura destes. O polímero solúvel em água pode ser selecionado do grupo consistindo, por exemplo, de polietileno glicol, monometóxi-polietileno glicol, dextrano, poli-(N-vinil pirrolidona), homopolímeros de propileno glicol, um copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polióis polioxoetilados (por exemplo, glicerol), HPMA, Fleximer.TM., e álcool polivinílico, mono-alcóxi(C1-C10)-PEG, arilóxi-PEG, monometóxi de tresila PEG, PEG propionaldeído, carbonato de bis-succinimidila PEG, celulose, ou outros polímeros com base em carboidrato. O polímero selecionado deve ser solúvel em água de modo que a proteína à qual ele esteja ligado não se precipite em um ambiente aquoso, tal como um ambiente fisiológico. O polímero pode ser ramificado ou não ramificado. Em algumas formas de realização, para uso terapêutico da preparação do produto final, o polímero será farmaceuticamente aceitável.

[00158] Em algumas formas de realização, um polímero solúvel em água para uso neste relatório é o polietileno glicol, abreviado PEG. Como aqui usado, polietileno glicol é denotado incluindo qualquer das formas de PEG que tenha sido usada para derivar outras proteínas, tais como a mono-alcóxi C1-C10)-polietileno glicol ou arilóxi-polietileno glicol.

[00159] A proporção de moléculas de polietileno glicol para moléculas de proteína variará, como variará suas concentrações na mistura de reação. Em geral, a relação ótima (em termos de eficácia da reação no fato de não haver proteína ou polímero em excesso não reagidos) será determinada pelo peso molecular do polietileno glicol selecionado e sobre o número de grupos reativos disponíveis (tipicamente grupos amino ε) presentes. Com relação ao peso molecular, em geral, quanto mais elevado o peso molecular do polímero usado, menor o número de moléculas poliméricas que podem ser ligadas à proteína. De forma semelhante, a

ramificação do polímero deve ser levada em conta quando da otimização destes parâmetros. Em geral, quanto mais elevado o peso molecular (ou as ramificações), mais elevada a relação de polímero:proteína. A presente invenção leva em conta vários diferentes comprimentos poliméricos de PEG lineares, incluindo, mas sem limitar, 5 kDa e 20 kDa, conjugados de polímeros de PEG ramificados de ramos, incluindo, porém sem limitar, 10 kDa e 40 kDa. Em algumas formas de realização, para as reações de peguilação aqui consideradas, o peso molecular médio é de cerca de 2 kDa a cerca de 100 kDa (a expressão “cerca de” indicando $\pm$ 1 kDa). Em outras formas de realização, o peso molecular médio é de cerca de 5 kDa a cerca de 40 kDa. A relação de polímero solúvel em água para FAL variará geralmente de 1:1 para o monoPEG, 2:1 para o diPEG, etc.

[00160] Os Exemplos 6 a 8 descrevem os efeitos das formas peguiladas e não peguiladas do mutante de lisina R91K FAL de *Rhodosporidium toruloides*, a FAL produzida pela cianobactéria *Nostoc punctiforme* (NpFAL), e a FAL produzida pela cianobacteria *Anabaena variabilis* (AvFAL) sobre os níveis de fenilalanina no camundongo ENU2 ou $BTBR^{enu2}$ no decorrer de um período de 12 dias. Este modelo de animal é um mutante homozigoto no lócus do gene de fenilalanina hidroxilase (PAH) resultando em um animal com grave hiperfenilalanemia. Assim, os altos níveis de fenilalanina (Phe) plasmática tornam este animal o modelo apropriado para se avaliar a capacidade da fenilalanina amônia-liase (FAL) para reduzir a Phe do plasma. Os efeitos das formas peguiladas e não peguiladas do mutante de lisina R91K FAL e NpFAL sobre os níveis de fenilalanina neste modelo de animal PKU foram também avaliados através de um período de 90 dias. Os resultados mostraram que as formas peguiladas de NpFAL e AvFAL resultaram em redução mais elevada na fenilalanina no modelo de animal PKU em comparação com NpFAL e AvFAL não peguilados, respectivamente. Além disso, tais efeitos de NpFAL peguilado para reduzir os níveis elevados de fenilalanina foram mantidos no decorrer de um período de dez semanas.

Estes estudos mostram que a peguilação da FAL da cianobactéria, *Nostoc punctiforme* e *Anabaena variabilis*, é essencial em reduzir os níveis de fenilalanina nos camundongos afetados com PKU. As descobertas sugerem que uma variante peguilada da FAL bacteriana pode servir como um terapêutico eficaz no controle da PKU.

[00161] A invenção considera as variantes de FAL peguilada com imunogenicidade reduzida. Uma forma de realização é uma forma peguilada da variante de FAL de *Nostoc punctiforme* (NpFAL) com imunogenicidade reduzida. Outra forma de realização é uma forma peguilada da variante de FAL de *Anabaena variabilis* (AvFAL) com imunogenicidade reduzida. Formas de realização específicas levam em conta variantes de NpFAL ou de AvFAL em que a peguilação é obtida pela reação das variantes de NpFAL ou de AvFAL com polímero solúvel em água, por exemplo polietileno glicol (PEG). Em algumas formas de realização, a peguilação é obtida pela reação das variantes de NpFAL ou AvFAL uma vez com PEG em uma relação de pelo menos 1:1, pelo menos 1:1,5, pelo menos 1:2, pelo menos 1:3, ou pelo menos 1:4 de FAL:PEG. Em uma forma de realização, a variante de FAL é uma variante de AvFAL, e a peguilação é obtida com o uso de uma relação de FAL:PEG de 1:3. Os métodos para preparar as variantes de FAL peguiladas da presente invenção são descritos acima.

[00162] A invenção também leva em conta repeguilar as variantes de FAL peguiladas quanto à imunogenicidade reduzida. Em algumas formas de realização, a peguilação é obtida pela reação da variante de NpFAL ou de AvFAL duas vezes ou mais com PEG, cada peguilação em uma relação de pelo menos 1:1, pelo menos 1:1,5, pelo menos 1:2, pelo menos 1:3, ou pelo menos 1:4 de FAL:PEG. Em algumas formas de realização, a peguilação é obtida pela reação da variante de NpFAL ou de AvFAL duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, ou mais, com PEG, cada peguilação em uma relação de pelo menos 1:1, pelo menos 1:1,5, pelo menos 1:2,

pelo menos 1:3, ou pelo menos 1:4 de FAL:PEG. Em outra forma de realização, a variante de FAL é uma variante de AvFAL, e a peguilação é obtida com o uso de uma relação de FAL:PEG de 1:3 tanto para a primeira quanto para a segunda reações de peguilação.

[00163] Os métodos para preparar as variantes de FAL repeguiladas da presente invenção geralmente compreendem as etapas de (a) reagir uma variante de FAL com polietileno glicol sob condições por meio das quais a variante de FAL se torna ligada a um ou mais grupos de PEG, (b) obter o(s) produto(s) de reação, (c) reagir a variante de FAL peguilada com polietileno glicol sob condições por meio das quais a variante de FAL peguilada se torna ligada a um ou mais grupos de PEG nas posições não ocupadas pelo PEG das etapa (a), e (d) obter o(s) produto(s) de reação. Tendo em vista que os sítios específicos da modificação de FAL podem significativamente alterar a atividade intrínseca da variante de FAL, diferentes tipos e quantidades de PEG foram exploradas. A química usada para a peguilação de FAL foi a acilação das aminas primárias de FAL com o uso do éster NHS de metóxi-PEG (O-[(N-Succinimidiloxicarbonil)-metil]-O'-metilpoli-etileno glicol). A acilação com o metóxi-PEG-NHS ou o metóxi-PEG-SPA resulta em uma ligação amida que elimina a carga da amina primária original.

G. ENSAIOS DE SELEÇÃO E TRIAGEM

[00164] Para a produção e triagem das variantes ativas de FAL e HAL, a expressão inicial do clone mutante pode utilizar qualquer dos sistemas de expressão vetorial conhecidos, tais como o sistema de expressão vetorial His-tag, facilitando uma etapa de purificação de quelato de metal de alta produção para o isolamento da variante protéica. Um sistema de triagem de três séries pode ser usado para identificar variantes protéicas favoráveis. A identificação inicial do clone positivo pode usar a transformação e a seleção para o cultivo em uma cepa de *E. coli* auxotrófica de fenilalanina. Uma segunda série da triagem pode utilizar a medição da absorbância

OD290 (Hodgins, Biochem. Biophys. Res. Commun., 32: 246-253 (1968)) acessível ao processamento de alta produção. Finalmente, a triagem quanto à resistência à proteólise (com o uso de incubação na presença de coquetel de protease) ou, alternativamente, redução da imunogenicidade (com o uso de medições competitiva de ELISA), pode ser usada para identificar variantes protéicas favoráveis.

H. USOS E ADMINISTRAÇÃO TERAPÊUTICOS DAS PROTEÍNAS DE FAL OTIMIZADAS

VÁRIAS FORMAS DE HIPERFENILALANEMIA (HPA)

[00165] A presente invenção é dirigida ao tratamento de uma variedade de populações de indivíduos de HPA com métodos que compreendem o uso das composições de FAL, ou isoladas ou em combinação com outros regimes terapêuticos, para controlar HPA e/ou PKU. Em particular, considera-se que as composições de FAL possam ser usadas para tratar daquela população de indivíduos com concentrações de fenilalanina que sejam baixas o bastante de modo que a intervenção distética não seja normalmente usada (isto é, indivíduos com HPA branda), indivíduos com PKU moderada, indivíduos com PKU clássica ou severa, e quaisquer subpopulações destes. Tais indivíduos que são acessíveis ao tratamento com composições de FAL para melhorar os efeitos de HPA branda incluem mulheres grávidas e crianças com concentrações séricas de menos do que 200 μM. As várias populações de indivíduos, e suas diferentes necessidades terapêuticas, são examinadas em mais detalhes na presente seção.

[00166] Certas formas de realização da presente invenção são dirigidas são dirigidas para tratar da PKU severa clássica mediante a administração ao indivíduo de uma dieta restrita em proteína, em combinação com uma composição compreendendo a FAL ou uma sua variante, mutante ou fragmento biologicamente ativos, em que a administração combinada da dieta restrita à proteína e FAL é eficaz para reduzir a concentração da fenilalanina no plasma do referido indivíduo em comparação com a

concentração referida na ausência da referida administração combinada. Além disso, a invenção também considera o tratamento de uma mulher grávida que tenha HPA, mediante a administração à mulher de uma dieta restringida a proteína em combinação com a FAL ou um seu derivado biologicamente ativo, de tal forma que a administração combinada da dieta restringida a proteína com a FAL seja eficaz para reduzir a concentração da fenilalanina no plasma da mulher grávida, em comparação com uma tal concentração na ausência da referida administração combinada. Em formas de realização específicas, a terapia é considerada para um indivíduo que manifeste níveis de Phe mais elevados do que 420 μM.

[00167] Outras formas de realização da invenção vinculam a administração de uma composição de FAL a qualquer indivíduo que tenha HPA, caracterizada por uma concentração de Phe plasmática mais elevada do que 180 μM, antes da administração da FAL, em uma quantidade eficaz para produzir uma redução em uma tal concentração de Phe do plasma do indivíduo. Os métodos da invenção serão úteis no tratamento de uma criança tendo PKU caracterizada por uma concentração elevada de Phe entre mais do que 300 μM, com as composições de FAL descritas neste relatório descritivo. Por “criança”, o presente pedido refere-se a um indivíduo que tenha a idade entre 0 a cerca de 36 meses.

Características da PKU Clássica Severa e Métodos de Seu Tratamento

[00168] A PKU severa manifesta-se em uma concentração de Phe do plasma mais elevada do que 1200 μM, e pode ser observada ser tão elevada quanto 4800 μM. Os indivíduos que tenham este distúrbio devem ser tratados com uma dieta livre de Phe de modo a reduzir suas concentrações de Phe do plasma a um nível que seja clinicamente aceitável (tipicamente, de menos do que 600 μM ou menos do que 300 μM). Estes indivíduos são capazes apenas de tolerar um máximo entre 250 a 350 mg de Phe dietético por dia (Spaapen *et al*., Mol. Genet Metab. 78: 93-99 (2003)). Como tal, estes indivíduos são iniciados em uma dieta de fórmula restrita à Phe entre 7 a 10

dias após o nascimento, e são submetidos a esta restrição dietética pelo restante de seu período de vida. Qualquer alívio das restrições dietéticas rigorosas a que estes indivíduos estejam submetidos deve ser benéfico.

[00169] Os testes usados para o diagnóstico dos indivíduos com Phe clássico são descritos em mais detalhes abaixo. Estes testes têm revelado que os indivíduos com PKU clássica severa precisam de uma dieta baixa em fenilalanina (Lucke *et al.,* Pediatr. Neurol. 28: 228-230 (2003)). Assim sendo, considera-se que os métodos da invenção vincularão a determinação de que o indivíduo esteja sofrendo de PKU clássico mediante a monitoração da concentração de Phe do plasma do indivíduo. O indivíduo é então tratado pela administração das composições de FAL procariótica isoladas ou em um regime combinado de uma dieta baixa em proteínas e FAL, de tal modo que se produza pelo menos um decréscimo de 25% nas concentrações de Phe do plasma do indivíduo. Em algumas formas de realização, o método produzirá um decréscimo de 30% na concentração de Phe do plasma. Em outras formas de realização, o método produzirá um decréscimo de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais na concentração de Phe do plasma do indivíduo (por exemplo, quando um indivíduo com PKU clássica severa tenha uma concentração de Phe de 4800 μM, um decréscimo de 90% na concentração de Phe produzirá uma concentração de Phe do plasma de 480 μM, uma concentração que é suficientemente baixa para requerer pouca restrição dietética). Naturalmente, deve ficar entendido que os métodos de tratamento da presente invenção (quer para tratar da PKU clássica severa, quer para qualquer outra HPA aqui descrita) devem tentar reduzir as concentrações de Phe do plasma do indivíduo a níveis tão próximos de uma faixa de cerca de 120 μM a cerca de 360 μM ± 15 μM quanto possível, ou a uma faixa ótima de cerca de 120 μM a cerca de 240 μM.

[00170] Em algumas formas de realização, as concentrações de Phe do plasma do indivíduo de PKU clássica em tratamento é reduzida de qualquer

quantidade irrestrita de concentração de Phe do plasma que seja mais elevada do que 1000 μM para qualquer nível de Phe do plasma que seja de menos do que 600 μM. Naturalmente, mesmo que o tratamento combinado com FAL e a dieta restringida a proteína produza um menor decréscimo na concentração de Phe do plasma, por exemplo a um nível entre 800 μM a cerca de 1200 μM, isto será observado como um resultado clinicamente útil da terapia, tendo em vista que os indivíduos que têm uma concentração de Phe do plasma nesta faixa podem controlar a doença simplesmente restringindo a quantidade de proteína na dieta, contrariamente ao fato de comer uma fórmula restringida em Phe, por esse meio resultando em um aprimoramento marcante na qualidade de vida do indivíduo, bem como levando a maior aquiescência do indivíduo em relação à restrição dietética.

[00171] Qualquer aumento na quantidade dos níveis de Phe dietético que possa ser tolerado pelo indivíduo, como um resultado do tratamento, será considerado como sendo um resultado terapeuticamente eficaz. Por exemplo, considera-se que, como um resultado da administração da terapia de FAL, o indivíduo será capaz de aumentar sua ingestão de Phe dietético de 250 a 350 mg/dia para 350 a 400 mg/dia (isto é, o fenótipo de tolerância do Phe do indivíduo é alterado daquele de um indivíduo de PKU clássico para um indivíduo de PKU moderado). Naturalmente, deve ser desejável que a intervenção terapêutica aplicada neste relatório descritivo possa permitir que o indivíduo aumente sua ingestão de Phe dietético de 250 a 350 mg/dia para 400 a 600 mg/dia (isto é, o fenótipo de tolerância de Phe do indivíduo seja alterado daquele de um indivíduo de PKU clássico para um indivíduo de PKU brando) ou, em alguns casos, permitir que o indivíduo tenha uma ingestão de mais do que 600 mg de Phe/dia (isto é, ingestão dietética normal).

Características dos Indivíduos de PKU Não Responsivos a BH4 e Métodos de Seu Tratamento

[00172] Um segundo grupo de indivíduos que podem ser tratados com os

métodos da presente invenção são aqueles indivíduos que tenham sido determinados como tendo concentrações elevadas de Phe do plasma, isto é, qualquer concentração que seja mais elevada do que 200 μM, mas que tenham sido diagnosticados como sendo não responsivos à terapia de BH4 (como determinado pelo teste de carga de BH4 descrito abaixo). Tais indivíduos podem incluir aqueles indivíduos que tenham PKU branda (isto é, concentrações de Phe do plasma de até 600 μM), indivíduos que tenham PKU moderada (isto é, concentrações de Phe do plasma entre 600 μM a cerca de 1200 μM), bem como indivíduos que tenham PKU clássica severa (isto é, concentrações de Phe do plasma que sejam mais elevadas do que 1200 μM).

[00173] Os pacientes que são não responsivos à terapia de BH4 recebem FAL em combinação com uma quantidade reduzida de proteína em sua dieta, de modo a reduzir as concentrações de Phe do plasma. Os métodos da presente invenção são tais que a administração de FAL produz um decréscimo mais elevado nas concentrações de Phe do plasma do indivíduo em comparação com o decréscimo que é produzido com o mesmo protocolo dietético administrado na ausência da terapia de FAL. As restrições dietéticas podem ser uma dieta que restrinja a ingestão de Phe mediante o fornecimento de uma fórmula médica sintética de proteínas que tenha uma quantidade reduzida de Phe ou, alternativamente, a restrição dietética pode ser aquela que simplesmente requeira que o indivíduo limite sua ingestão total de proteínas, mas, apesar disso, permita que o indivíduo coma gêneros alimentícios em quantidades limitadas.

[00174] Os resultados terapêuticos examinados quanto aos indivíduos de PKU clássico são incorporados na presente seção como referência. Os resultados terapêuticos quanto aos indivíduos com PKU moderado (isto é, indivíduos que tenham uma concentração de Phe do plasma irrestrita de 600 μM a 1200 μM) incluem pelo menos uma redução de 25% nas concentrações de Phe do plasma do indivíduo. Em algumas formas de realização, o método produzirá uma redução de 30% na

concentração de Phe do plasma. Em outras formas de realização, o método produzirá um decréscimo de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais na concentração de Phe do plasma do indivíduo (por exemplo, quando um indivíduo com PKU clássica moderada tenha uma concentração de Phe de 1000 μM, uma redução de 90% na concentração de Phe produzirá uma concentração de Phe do plasma de 100 μM, uma concentração que seja suficientemente baixa para requerer pouca ou nenhuma restrição dietética).

[00175] Em algumas formas de realização, as concentrações de Phe do plasma do indivíduo de PKU moderada em tratamento, são reduzidas de qualquer quantidade de concentração de Phe do plasma irrestrita que se situe entre 600 μM a 1200 μM para qualquer nível de Phe do plasma que seja menor do que 300 μM. Em uma forma de realização, o tratamento com FAL (ou sozinho ou em combinação com uma restrição dietética) produz uma redução na concentração de Phe do plasma, por exemplo a um nível entre 200 μM a cerca de 400 μM, o que será observado como um resultado clinicamente útil da terapia, tendo em vista que os indivíduos que tenham uma concentração de Phe do plasma nesta faixa poderão controlar a doença simplesmente restringindo a quantidade de proteína da dieta, ao invés de comer uma fórmula restringida na Phe. De fato, em muitos estudos, preceitua-se que tais indivíduos possam mesmo comer uma dieta normal.

[00176] Qualquer aumento na quantidade dos níveis de Phe dietético que possa ser tolerado pelo indivíduo como um resultado do tratamento, será considerado como sendo um resultado terapeuticamente eficaz. Por exemplo, considera-se que, como um resultado da administração da terapia de FAL (ou sozinha ou em combinação com outra intervenção terapêutica), o indivíduo seja capaz de aumentar sua ingestão de Phe dietético de 350 a 400 mg/dia para 400 a 600 mg/dia (isto é, o fenótipo de tolerância da Phe do indivíduo é alterado daquele de um indivíduo de PKU moderado para um indivíduo de PKU brando). Naturalmente, deve ser desejável que

a intervenção terapêutica aqui preceituada deva permitir que o indivíduo aumente sua ingestão da Phe dietética de 350 a 400 mg/dia para ter uma ingestão de mais do que 600 mg de Phe/dia (isto é, ingestão dietética normal).

[00177] Mesmo que o indivíduo em tratamento seja um indivíduo que expresse apenas PKU branda (isto é, tenha uma permissão dietética de 400 a 600 mg de ingestão de Phe/dia), ele se beneficiará das terapias à base de FAL da presente invenção, tendo em vista ser desejável produzir uma concentração de Phe do plasma normalizada que fique tão próxima de 360 μM ± 15 μM quanto possível. Para tais indivíduos, um resultado terapêutico vantajoso incluirá pelo menos uma redução de 25% nas concentrações de Phe do plasma do indivíduo. Em uma forma de realização, o método produzirá uma redução de 30% na concentração de Phe do plasma. Em outra forma de realização, o método produzirá uma redução de 40%, 50%, 60% ou mais na concentração de Phe do plasma do indivíduo (por exemplo, quando um indivíduo com PKU branda tenha uma concentração de Phe de 600 μM, uma redução de 60% na concentração de Phe produzirá uma concentração de Phe do plasma de 360 μM (isto é, uma concentração normal aceitável de Phe do plasma).

[00178] Em algumas formas de realização, as concentrações de Phe do plasma do indivíduo de PKU brando em tratamento são reduzidas de qualquer quantidade de concentração de Phe do plasma não restrita que se situe entre 400 μM e 600 μM para qualquer nível de Phe do plasma que seja menor do que 100 μM. Naturalmente, mesmo que o tratamento com FAL (ou sozinho ou em combinação com uma restrição dietética) produza uma redução menor na concentração de Phe do plasma, por exemplo, até um nível entre 200 μM a cerca de 400 μM, isto será visto como um resultado clinicamente útil da terapia.

[00179] Qualquer acréscimo na quantidade dos níveis de Phe dietético que possa ser tolerado pelo indivíduo como um resultado do tratamento, será considerado como sendo um resultado terapeuticamente eficaz. Por exemplo, considera-se que,

como um resultado da administração da terapia de FAL (ou sozinha ou em combinação com outra intervenção terapêutica), o indivíduo será capaz de aumentar sua ingestão da Phe dietética de 400 a 600 mg/dia (isto é, o fenótipo de tolerância da Phe do indivíduo é alterado daquele de um indivíduo de PKU branda para um indivíduo de HPA branda), para possibilitar que o indivíduo tenha uma ingestão de mais do que 600 mg de Phe/dia (isto é, ingestão dietética normal).

[00180] Além disso, mesmo que o indivíduo seja um que manifeste apenas os sintomas de HPA não de PKU, isto é, tenha uma elevada concentração de Phe do plasma de até 600 μM, mas tenha sido de outra forma deixado comer uma dieta de proteína normal, ele se beneficiará da terapia de FAL da invenção, porque foi demonstrado que as concentrações elevadas de Phe possuem efeitos significativos sobre o QI de tais indivíduos. Além disso, como examinado abaixo, a intervenção terapêutica da FAL de indivíduos com necessidades especiais, por exemplo mulheres grávidas e crianças, é particularmente importante, mesmo que os níveis de Phe do plasma desse indivíduo estejam dentro do nível de “segurança” observado de menos do que 200 μM.

PKU Materno e Métodos de Seu Tratamento

[00181] O controle metabólico dos níveis de Phe do plasma em mulheres de PKU que estejam planejando a concepção, e naquelas que estejam grávidas, é importante, por causa das sérias consequências para o feto exposto, mesmo moderadamente, a níveis elevados de Phe dentro do útero, não obstante o estado da PAH do feto. O controle terapêutico da concentração de Phe do plasma é especialmente importante no primeiro trimestre de gravidez, quando a dificuldade de se obter controle adequado resulta em distúrbios que incluem a microcefalia, a deficiência mental e a doença cardíaca congênita.

[00182] Por exemplo, o NIH Consensus Statement (volume 17 nº 3, outubro de 2000), sobre a fenilcetonúria, relatou que a exposição de um feto aos níveis de Phe

materno de 3 a 10 mg/dl, produzia uma incidência de 24% de microcefalia, enquanto aqueles expostos a mais do que 20 mg/dl (isto é, mais do que 1200 μM) tinham uma incidência de 73% de microcefalia. Da mesma forma, a doença cardíaca congênita foi observada em mais de 10% das crianças expostas aos níveis de Phe materno que eram mais elevados do que 20 mg/dl. De forma importante, foi observado que os níveis de Phe mais elevados do que 6 mg/dl reduzem significativamente o QI da criança. Assim, é imperativo garantir que a concentração de Phe do plasma das mulheres com todas as formas de fenilcetonúria, mesmo aquelas que manifestem a HPA mais branda, deva ser firmemente controlada a fim de evitar o risco da síndrome materna da PKU. Entretanto, os níveis alvos aceitáveis para as concentrações de Phe do plasma das mulheres de PKU, que tenham sido usados nas clínicas dos Estados Unidos, variaram entre 10 mg/dl e 15 mg/dl, os quais são muito mais elevados do que os níveis de 2 a 6 mg/dl recomendados para as mulheres grávidas, ou os níveis de 1 a 4 mg/dl que são usados nas clínicas britânicas e alemãs para reduzir os riscos de desenvolver a síndrome da PKU maternal.

[00183] Outra consideração importante para as mulheres grávidas, é sua ingestão global de proteínas. Durante a gravidez, é importante que as mulheres comam suficiente proteína, tendo em vista ter sido sugerido que uma dieta baixa em proteína durante a gravidez resultará em desenvolvimento renal retardado e subsequente redução no número de néfrons e, potencialmente, leva à hipertensão na maioridade. (D'Agostino, N. Engl. J. Med. 348(17) 1723-1724, (2003)). A tabela a seguir fornece diretrizes exemplares para a ingestão recomendada total de proteínas dietéticas para vários indivíduos.

TABELA 1:DIRETRIZES DOS ESTADOS UNIDOS PARA ÀS EXIGÊNCIAS DE PROTEÍNAS DIETÉTICAS

	Idade	Ingestão Recomendada Total de Proteína (g)
Lactentes	6 meses ou menos	13

	6 meses a 1 ano	14
	1 a 3 anos	16
Crianças	4 a 6 anos	24
	7 a 10 anos	28
Sexo Masculino	11 a 14 anos	45
	15 a 18 anos	59
	19 a 24	58
	25 a 50	63
	acima de 51	63
Sexo Feminino	11 a 14 anos	46
	15 a 18 anos	44
	19 a 24	46
	25 a 50	50
	acima de 51	50
Grávidas		60
Em amamentação		65

[00184] Como pode ser observado das diretrizes exemplares acima, nos Estados Unidos a ingestão de proteínas recomendada para mulheres na idade de gravidez (por exemplo, menos do que 51) é de cerca de 44 a 50 g/dia, enquanto para as mulheres grávidas recomenda-se uma ingestão de cerca de 60 g/dia. No Canadá e no Reino Unido, a ingestão protéica recomendada para mulheres grávidas é da ordem de cerca de 70 g/dia e 52 g/dia. Assim, a necessidade de se garantir que os níveis de concentração de Phe do plasma das mulheres grávidas sejam rigorosamente controlados é ainda complicado pelo fato de que este grupo de indivíduos de PKU requer mais proteína do que as mulheres de PKU não grávidas de idade comparável.

[00185] Em vista do acima, é considerado que as terapias de FAL da presente invenção sejam particularmente úteis em mulheres grávidas. Considera-se que uma mulher que sofra de qualquer forma de HPA, que esteja grávida ou esteja

considerando uma gravidez, seja colocada em um curso de terapia de FAL para garantir que seus níveis de concentração de Phe do plasma sejam mantidos tão próximos de 180 μM a cerca de 360 μM, quando possível. Um tal curso de terapia deve permitir que a mulher aumente seu nível de ingestão protéica normal.

[00186] A discussão dos níveis de concentrações de Phe do plasma e os graus aos quais tais concentrações de Phe devam ser reduzidos aqui examinados mais acima, são incorporados na presente seção para mulheres grávidas.

Controle da PKU em Lactentes e Métodos de Seu Tratamento

[00187] Como aqui completamente examinado, foi determinado que uma elevação na concentração de Phe do plasma em Lactentes (idades zero a 3 anos) resulta em queda significativa no QI da criança. Entretanto, como foi examinado em outra parte neste relatório descritivo, os indivíduos que tenham elevadas concentrações de Phe do plasma de qualquer forma até 400 μM não recebem normalmente qualquer intervenção dietética. Assim, lactentes na idade de zero a 3 anos sofrem de significativos efeitos deletérios das presentes terapias. O presente pedido considera o tratamento de qualquer lactente tendo uma concentração de Phe do plasma irrestrita que seja maior do que 360 μM ± 15 μM, com uma composição terapêutica que compreenda FAL, de modo a produzir uma redução benéfica da concentração de Phe do plasma desse indivíduo.

[00188] Em algumas formas de realização, o lactente tem a idade entre zero e 3 anos e tem uma concentração de Phe do plasma irrestrita de cerca de 1200 μM antes da administração da FAL, e referida administração reduz a concentração de Phe do plasma. Em uma forma de realização, a concentração de Phe do plasma é reduzida de mais do que 1800 a cerca de 1500 μM, a cerca de 1200 μM, a cerca de 1100 μM, a cerca de 1000 μM, a cerca de 900 μM, a cerca de 800 μM, a cerca de 700 μM, a cerca de 600 μM, a cerca de 550 μM, a cerca de 500 μM, a cerca de 450 μM, a cerca de 400 μm, a cerca de 350 μm, a cerca de 300 μM, a cerca de 275 μM, a cerca de

250 μM, após a administração. Em outras formas de realização, o lactente tem a idade entre zero e 3 anos, e tem uma concentração de Phe do plasma irrestrita de mais do que 1200 μM, e esta concentração de Phe do plasma é reduzida a cerca de 800 μM, a cerca de 500 μM, ou a cerca de 360 μM, após a administração da FAL, ou sozinha ou em combinação com a dieta. Um técnico no assunto deve entender que a invenção considera o tratamento de lactentes com concentrações de Phe do plasma irrestritas de mais do que 360 μM com FAL para produzir reduções em tais concentrações de Phe do plasma. O exame das reduções terapêuticas das concentrações de Phe do plasma acima é incorporado neste relatório descritivo como referência. Além disso, qualquer redução acima de 10% da concentração de Phe do plasma irrestrita inicial será considerada uma resposta terapêutica para os regimes terapêuticos para os lactentes. Deve ficar entendido que as terapias de FAL podem ser combinadas com restrições dietéticas para efetuar a redução terapêutica nas concentrações de Phe do plasma em tais lactentes.

[00189] A Tabela 2 fornece uma lista de várias condições de doenças em que a administração de quantidades terapeuticamente eficazes de FAL deva ser benéfica. As vias de administração padrão parenteral, oral ou outras e a dosagem podem ser determinadas com o uso de métodos padrão.

TABELA 2:CONDIÇÕES DE DOENÇAS EXEMPLARES ACESSÍVEIS À TERAPIA DE PROTEÍNAS DE FAL

Fenilcetonúria
Hiperfenilalanemia
Tirosinemia
Câncer

2. COMPOSIÇÕES PARA USO NO TRATAMENTO

[00190] A presente invenção considera a intervenção terapêutica de PKU/HPA. Tal intervenção baseia-se inicialmente no uso de FAL, a qual pode ser usada isoladamente ou em combinação com restrições dietéticas. Além disso, a FAL

e/ou as restrições dietéticas podem ainda ser combinadas com outras composições terapêuticas que são designadas, por exemplo, para combater outras manifestações da PKU, tais como, por exemplo, os grandes aminoácidos neutros para prevenir o acúmulo de Phe no cérebro (ver Koch *et al.,* Mol. Genet. Metabol. 79: 110-113 (2003)) ou suplementação da tirosina. A presente seção fornece um exame das composições que podem ser usadas nos tratamentos aqui considerados.

Composições de FAL

[00191] Em geral, a presente invenção considera composições farmacêuticas contendo quantidades eficazes de proteína ou produtos derivados, da invenção, com diluentes, estabilizadores, conservantes, solubilizantes, emulsificantes, adjuvantes e/ou veículos farmaceuticamente aceitáveis. Tais composições incluem diluentes de vários teores de tampão (por exemplo, Tris-HCl, fosfato), pH e intensidade iônica; aditivos tais como detergentes e agentes de solubilização (por exemplo, Polissorbato 20, Polissorbato 80), antioxidantes (por exemplo o ácido ascórbico, o metabissulfito de sódio), conservantes (por exemplo, Timerosal, álcool benzílico) e substâncias de volume (por exemplo, lactose, manitol); ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edição (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) páginas 1435-1712, que é aqui incorporada como referência. Uma quantidade eficaz de ingrediente ativo é uma quantidade terapêutica, profilática ou diagnosticamente eficaz, que pode ser facilmente determinada por um técnico no assunto, levando em consideração fatores tais como o peso corporal, a idade e o objetivo terapêutico.

[00192] As composições de PEG-FAL da presente invenção podem também incluir um agente de tamponamento para manter o pH da solução dentro de uma faixa desejada. Agentes de exemplo incluem o acetato de sódio, o fosfato de sódio e o citrato de sódio. As misturas destes agentes de tamponamento também podem ser usadas. A quantidade de agente de tamponamento útil na composição depende

amplamente do tampão específico usado e do pH da solução. Por exemplo, o acetato é um tampão mais eficaz em pH 5 do que em pH 6, de modo que menos acetato pode ser usado em uma solução em pH 5 do que em pH 6. Em uma forma de realização, a faixa de pH para as composições da presente invenção é de pH 3,0 a 7,5.

[00193] As composições da presente invenção podem ainda incluir um agente de ajuste da isotonicidade para tornar a solução isotônica e mais compatível para injeção. Um exemplo é o cloreto de sódio dentro de uma faixa de concentração de 0 a150 mM.

[00194] Como aqui usada, e quando da consideração dos conjugados de PEG-FAL, a expressão “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade que dá uma redução na L-fenilalanina sérica a qual proporciona benefícios a um indivíduo. A quantidade variará de um indivíduo para outro, e dependerá de vários fatores, incluindo a condição física geral do indivíduo. A quantidade de FAL usada para terapia dá uma proporção aceitável de redução da L-fenilalanina do soro e mantém este valor em um nível benéfico (usualmente de pelo menos cerca de 30% e, tipicamente, em uma faixa de 10% a 50%). Uma quantidade terapeuticamente eficaz das presentes composições pode ser facilmente determinada por um técnico no assunto, com o uso de materiais e procedimentos publicamente disponíveis.

[00195] A invenção leva em conta a administração de conjugados de PEG:FAL menos frequentemente do que a FAL nativa. A frequência da dosagem variará na dependência da condição que esteja sendo tratada, mas em geral será de cerca de uma vez por semana. Fica entendido que as frequências de dosagem realmente usadas podem variar de certa forma das frequências aqui apresentadas, por causa das variações nas respostas pelos diferentes indivíduos aos conjugados de PEG-FAL; a expressão “cerca de” intenta refletir tais variações.

[00196] A presente invenção pode, assim, ser usada para reduzir os níveis de L-fenilalanina do soro. Mais comumente, os níveis de L-fenilalanina do soro são

aumentados por causa da hiperfenilalaninemia. Entre as condições tratáveis pela presente invenção se inclui a hiperfenilalaninemia associada com a fenilcetonúria. Também tratáveis são as condições que podem levar aos níveis aumentados da L-tirosina do soro, tal como encontrados na tirosinemia. Além disso, numerosas condições relacionadas ao câncer, quando a depleção dos níveis de L-fenilalanina do soro e/ou da L-tirosina do soro deva ser benéfica, podem também ser tratadas com os conjugados de PEG:FAL da invenção.

[00197] Em uma forma de realização, os conjugados de PEG-FAL preparados de acordo com a presente invenção são administrados por injeção intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular. Entretanto, deve ficar claro para um técnico no assunto, que outras vias de liberação podem também ser eficazmente utilizadas com o uso das composições da presente invenção.

[00198] Os métodos aqui descritos usam composições farmacêuticas contendo as moléculas acima descritas, juntamente com um ou mais excipientes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos e/ou profiláticos. Tais excipientes incluem líquidos tais como água, solução salina, glicerol, polietileno glicol, ácido hialurônico, etanol, ciclodextrinas, ciclodextrinas modificadas (isto é, ciclodextrinas de éter sulfobutílico), etc. Excipientes adequados para formulações não líquidas são também conhecidos por um técnico no assunto.

[00199] Os sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser usados nas composições da presente invenção, e incluem, por exemplo, os sais de ácido mineral, tais como os cloridretos, bromidretos, fosfatos, sulfatos e outros; e os sais de ácidos orgânicos tais como os acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos e outros. Um exame completo dos excipientes e sais farmaceuticamente aceitáveis acha-se disponível em Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª Edição (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

[00200] Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como os agentes umectantes e emulsificantes, substâncias de tamponamento biológico, tensoativos, e outras, podem estar presentes em tais veículos. Um tampão biológico pode ser virtualmente qualquer solução que seja farmacologicamente aceitável e que forneça a formulação com o pH desejado, isto é, um pH na faixa fisiologicamente aceitável. Exemplos de soluções tampão incluem a solução salina, a solução salina tamponada de fosfato, a solução salina tamponada de Tris, a solução salina tamponada de Hank, e outras.

[00201] Dependendo da forma de realização pretendida de administração, as composições farmacêuticas podem estar nas formas de dosagem sólidas, semi-sólidas ou líquidas, tais como, por exemplo, tabletes, supositórios, pílulas, cápsulas, pós, líquidos, suspensões, cremes, unguentos, loções ou coisa parecida, e, em algumas formas de realização, na forma de dosagem unitária adequada para administração única de uma dosagem precisa. As composições incluirão uma quantidade eficaz do medicamento selecionado, em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável e, além disso, pode incluir outros agentes farmacêuticos, adjuvantes, diluentes, tampões etc.

[00202] Em geral, os compostos ou conjugados desta invenção serão administrados como formulações farmacêuticas, incluindo aquelas adequadas para administração oral (incluindo a bucal e a sublingual), retal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal ou parenteral (incluindo a intramuscular, intra-arterial, intratecal, subcutânea e intravenosa) ou em uma forma adequada para administração por inalação ou insuflação. Uma maneira de administração exemplar é a intravenosa com o uso de um regime de dosagem diária conveniente, o qual possa ser ajustado de acordo com o grau da doença.

[00203] Quanto às composições sólidas, os veículos sólidos não tóxicos convencionais incluem, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido,

estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, sacarose, carbonato de magnésio, e outros. As composições líquidas farmaceuticamente administráveis podem, por exemplo, ser preparadas por dissolução, dispersão etc. de um composto ou conjugado ativos como aqui descrito, e adjuvantes farmacêuticos opcionais em um excipiente, tais como, por exemplo, água, solução salina, dextrose aquosa, glicerol, etanol e outros, para pôr esse meio formarem uma solução ou suspensão. Se desejável, a composição farmacêutica a ser administrada pode também conter quantidades secundárias de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como os agentes umectantes ou emulsificantes, os agentes de tamponamento do pH, os agentes de tonificação, e outros, por exemplo o acetato de sódio, o monolaurato de sorbitano, o acetato sódico de trietanolamina, o oleato de trietanolamina, etc. Métodos reais de preparar tais formas de dosagem são conhecidos, ou serão evidentes, para um técnico no assunto; para exemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, citado acima.

[00204] Para a administração oral, a composição geralmente toma a forma de um tablete, cápsula ou cápsula de softgel, ou pode ser uma solução aquosa ou não aquosa, solução, suspensão ou xarope. Os tabletes e as cápsulas são algumas das formas de administração oral. Os tabletes e as cápsulas para uso oral incluirão em geral um ou mais veículos comumente usados, tais como lactose e amido de milho. Agentes lubrificantes, tais como o estearato de magnésio, são também tipicamente acrescentados. Quando as suspensões líquidas são usadas, o agente ativo pode ser combinado com agentes emulsificantes e de suspensão. Se desejável, agentes aromatizantes, corantes e/ou edulcorantes podem ser adicionados também. Outros componentes opcionais para incorporação aqui em uma formulação oral incluem, porém, sem limitar, conservantes, agentes de suspensão, agentes espessantes, e outros.

[00205] As formulações parenterais podem ser preparadas nas formas convencionais, ou como soluções ou como suspensões líquidas, nas formas sólidas

adequadas para a solubilização ou a suspensão em líquido antes da injeção, ou como emulsões. Em uma forma de realização, as suspensões injetáveis estéreis são formuladas de acordo com técnicas conhecidas na prática, com o uso de veículos adequados, agentes dispersantes ou umectantes, e agentes de suspensão. A formulação injetável estéril pode também ser uma solução ou uma suspensão injetáveis em um diluente ou solvente não tóxico parenteralmente aceitável. Entre os veículos e os solventes aceitáveis que podem ser empregados, acham-se a água, a solução de Ringer e a solução de cloreto de sódio isotônica. Além disso, os óleos fixos, os ésteres graxos ou os polióis estéreis são convencionalmente empregados como solventes ou como meio de suspensão. Além disso, a administração parenteral pode envolver o uso de um sistema de liberação lenta ou de liberação prolongada, de tal modo que um nível constante de dosagem possa ser mantido.

[00206] Os conjugados de PEG-FAL identificados descritos acima podem ser administrados a um indivíduo nas doses terapeuticamente eficazes para tratar ou melhorar a doença cardiovascular. A toxicidade e a eficácia terapêutica de tais conjugados podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão nas culturas celulares ou em animais experimentais, tais como, por exemplo, pela determinação da LD_{50} (a dose letal para 50% da população) e da ED_{50} (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A relação das doses entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expresso como a relação LD_{50}/ED_{50}. Os conjugados que apresentem grandes índices terapêuticos são empregados em algumas formas de realização.

[00207] Os dados obtidos a partir dos ensaios de cultura celular e dos estudos de animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso nos seres humanos. Em algumas formas de realização, a dosagem se situa dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED_{50} com pouca ou mínima toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta faixa, dependendo da forma de

dosagem empregada e da via de administração utilizada. A dose terapeuticamente eficaz pode ser determinada dos ensaios de cultura celular, e dos modelos de animais.

Proteína Dietética

[00208] Além de se administrar FAL e análogos relacionados a indivíduos de HPA/PKU, considera-se que a proteína dietética dos indivíduos também possa ser restringida ou modificada. Os técnicos no assunto são cientes das várias fórmulas protéicas comercialmente disponíveis pra uso no tratamento da PKU. Tais fórmulas incluem MAXIMAID, PHENEX 1, PHENEX 2 (Ross Laboratories, Liverpool, Reino Unido), LOFENALAC, PHENYL-FREE (Mead-Johnson) e outros.

[00209] Os técnicos no assunto podem usar as fórmulas de proteínas em referência, as quais são geralmente livres de concentrações de Phe. As fórmulas de proteínas com frequência são suplementadas com aminoácidos, que são deficientes nos indivíduos de PKU. Tais aminoácidos incluem, por exemplo, a L-tirosina e a L-glutamina. Foi sugerido que pode ser desejável suplementar a dieta de indivíduos de PKU com valina, isoleucina e leucina (ver a Patente U.S. nº 4.252.822). Em determinadas manifestações clínicas, os efeitos tóxicos da PKU são causados pela Phe bloqueando a absorção cerebral de outros aminoácidos tais como a tirosina e o triptofano. Tem sido observado que suplementando-se a dieta de um indivíduo de PKU com um excesso de tais aminoácidos grandes neutros, bloqueia-se a absorção da Phe dentro do cérebro e reduz os níveis de Phe no cérebro. Assim sendo, considera-se que, quanto aos métodos da presente invenção, o regime dietético pode ainda ser suplementado com composições que compreendam um ou mais destes aminoácidos (Koch *et al.,* Mol. Genet. Metabol. 79: 110-113 (2003)).

[00210] Além disso, como se sabe, a L-carnitina e a taurina, que são normalmente encontradas no leite humano, e outros gêneros alimentícios de origem animal, também devem ser fornecidos em adição à restrição protéica. Em certas formas de realização, a L-carnitina pode ser fornecida como 20 mg/100 g de

suplemento de proteínas, e a taurina pode ser fornecida como 40 mg/100 g de suplemento protéico de modo a ajudar no suprimento de quantidades destes fatores normalmente encontrados no leite humano e em alimentos de origem animal.

[00211] Além disso, os técnicos no assunto são encaminhados a *2000 National Academy of Sciences-National Research Council Dietary Reference Intakes* quanto a uma listagem adicional de outros componentes, tais como vitaminas e minerais essenciais que devem ser fornecidos ao indivíduo para garantir que outros suplementos estejam sendo fornecidos, a despeito da restrição de proteínas dietéticas.

[00212] Com referência ao discutido acima com respeito às quantidades totais de proteínas e às concentrações de Phe do plasma desejáveis, um técnico no assunto será capaz de determinar a quantidade de restrição de proteínas dietéticas que seja necessária e, assim, de ajustar a dieta do indivíduo, de acordo. Tomando como exemplo um menino de cerca de 11 a 14 anos de idade, esse indivíduo deve receber 45 g de proteína/dia. Na eventualidade de que o indivíduo seja um que tenha PKU clássica grave, sua concentração de Phe do plasma irrestrita será provavelmente de mais do que 1200 μM, e a maioria, se não toda, a fonte de proteínas dietéticas para esse indivíduo, é provável que seja de um suplemento protéico em pó, que pode reduzir suas concentrações de Phe plasmático a menos do que 600 μM. Pela administração de FAL a esse indivíduo, um resultado terapêutico deve ser aquele que produza uma maior redução nas suas concentrações de Phe do plasma ou, alternativamente, o resultado terapêutico será aquele em que as concentrações de Phe do plasma do indivíduo sejam reduzidas a um grau semelhante, mas esse indivíduo será capaz de tolerar a proteína de uma dieta normal, ao invés de uma fórmula dietética.

[00213] De forma semelhante, para um menino de cerca de 11 a 14 anos de idade que tenha PKU moderada, pode ser possível usar os métodos da presente

invenção para dar-lhe os 45 g de proteína/dia distribuídos através de uma ingestão normal de proteínas, ao invés de uma fórmula restrita. A determinação de serem os métodos da invenção eficazes vincula a determinação das concentrações do Phe do plasma do indivíduo em uma base regular para garantir que as concentrações de Phe do plasma permaneçam abaixo de pelo menos 400 μM. Os testes para se determinar tais concentrações são descritos abaixo. Em algumas formas de realização, as concentrações de menos do que cerca de 360 μM são obtidas.

3. IDENTIFICAÇÃO E MONITORAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE INDIVÍDUOS

[00214] Como aqui totalmente examinado, será necessário, em várias formas de realização da presente invenção, determinar se um dado indivíduo é responsivo à terapia de FAL, e determinar as concentrações da fenilalanina do indivíduo, tanto inicialmente para identificar a classe do indivíduo de PKU que esteja sendo tratado, quanto durante um regime terapêutico em seguimento, para se monitorar a eficácia do regime. Como exemplos, tais métodos são aqui descritos mais abaixo.

Teste de Carga de BH4

[00215] O teste de carga de BH4 permite a discriminação entre os indivíduos que tenham HPA, por causa de um déficit em BH4 ou através de uma deficiência em PAH.

[00216] O teste de carga mais simples de BH4 é aquele em que o BH4 exógeno é administrado e os efeitos da administração na redução das concentrações de Phe plasmática são determinados. A carga intravenosa de 2 mg/kg de BH4 que foi inicialmente proposta por Danks *et al.,* Lancet 1: 1236 (1976) como BH4 de pureza mais elevada, tornou-se disponível e tornou possível realizar o teste com o uso de uma administração oral de BH4 nas quantidades de cerca de 2,5 mg/kg de peso corporal. Enfim, uma abordagem padronizada foi proposta por Niederwieser *et al.,* em

que um única dose oral de 7,5 mg/kg de BH4 é administrada (Niederwieser *et al*., Eur. J. Pediatr. 138: 441 (1982)), não obstante alguns laboratórios façam ainda uso de mais do que 20 mg de BH4/kg de peso corporal.

[00217] De modo a que o simples teste de carga de BH4 produza resultados confiáveis, os níveis de Phe do sangue do indivíduo necessita estar mais elevado do que 400 μM. Portanto, é com frequência costumeiro que o indivíduo seja removido da dieta de PKU por 2 dias antes de se realizar o teste de carga. Um kit de teste de BH4 acha-se disponível e é distribuído pelos Dr. Schircks Laboratories (Jona, Suíça). Este kit recomenda uma dosagem de 20 mg de BH4/kg de peso corporal cerca de 30 minutos após a ingestão de uma alimentação normal.

Determinação das Concentrações de Phe

[00218] Existem numerosos métodos para se determinar a presença de Phe no sangue (Shaw *et al*., Analytical Methods in Phenylketonuria-Clinical Biochemistry, em Bickett *et al.* Editores, Phenylketonuria e Some Other Inborn Errors of Amino Acid Metabolism, Stuttgart, Georg Thiem Verlag, 47-56 (1971)). Tipicamente, as concentrações de fenilalanina e de tirosina são determinadas do soro de um indivíduo com o uso de um ensaio fluorométrico. Este ensaio confia na formação de substância fluorescente quando a fenilalanina é aquecida com ninidrina na presença de leucilalanina (McCaman *et al*., J. Lab. Clin. Med. 59: 885-890 (1962)).

[00219] O método mais popular para se determinar as concentrações de Phe é o teste de Guthrie em que discos são perfurados de papel de filtro que tenha sido saturado com uma amostra de sangue do indivíduo. Os discos uniformes são incubados em uma bandeja de ágar que tenha sido semeada com o *Bacillus subtilis* e contenha um inibidor específico do desenvolvimento do *Bacillus subtilis*. Quando a fenilalanina se transfere dos discos uniformes para o ágar, a Phe inverte a inibição do desenvolvimento bacteriano, por esse meio produzindo uma área de crescimento bacteriano que pode ser correlacionada com a concentração da fenilalanina mediante

a comparação com ensaios semelhantes realizados com o uso de discos que contêm quantidades conhecidas de Phe.

[00220] Outros métodos de quantidicar a concentração de Phe inclui a HPLC, a espectrometria de massa, a cromatografia de camada fina, e outros. Tais métodos podem ser usados para se determinar a concentração de Phe do plasma de um indivíduo antes da terapia, e para monitorar a concentração de Phe durante o regime terapêutico para se determinar a sua eficácia.

[00221] Considera-se que os níveis de Phe plasmática dos indivíduos serão monitorados em intervalos convenientes (por exemplo, diariamente, dia sim, dia não, ou semanalmente) no decurso total do tempo do regime terapêutico. Mediante a monitoração dos níveis de Phe do plasma com tal regularidade, o clínico será capaz de avaliar a eficácia do tratamento e de ajustar às exigências de FAL e/ou de proteína dietética conformemente.

4. TERAPIA DE COMBINAÇÃO

[00222] Certos métodos da invenção envolvem o uso combinado da FAL e da restrição de proteínas dietéticas para efetuar um resultado terapêutico nos indivíduos com várias formas de HPA. Para se obter o resultado terapêutico apropriado nas terapias de combinação consideradas neste relatório descritivo, deve-se administrar em geral ao indivíduo a composição de FAL e a restrição dietética em uma quantidade combinada eficaz para produzir o resultado terapêutico desejado (isto é, uma redução da concentração de Phe do plasma e/ou a capacidade de se tolerar maiores quantidades de ingestão de Phe/proteína sem produzir um aumento concomitante nas concentrações de Phe do plasma). Este processo pode envolver a administração da composição de FAL e a composição terapêutica de proteína dietética ao mesmo tempo. Isto pode ser obtido pela administração de uma composição única ou uma formulação farmacológica de proteínas que inclua todas as exigências de proteínas dietéticas e também inclua a FAL dentro da referida

formulação protéica. Alternativamente, a proteína dietética (suplemento ou alimento protéico normal) é tomada quase no mesmo tempo de uma formulação farmacológica (tablete, injeção ou bebida) da FAL. A FAL também pode ser formulada em uma barra de proteínas ou outros gêneros alimentícios tais como bolinhos de chocolate, panquecas, bolos, adequados para ingestão.

[00223] Em outras alternativas, o tratamento de FAL pode preceder ou seguir a terapia de proteína dietética por intervalos que variem de minutos a horas. Nas formas de realização em que a proteína e as composições de FAL sejam administradas separadamente, deve-se em geral garantir que um período significativa de tempo não se tenha expirado entre os períodos de cada liberação, de tal modo que a FAL seja ainda capaz de exercer um efeito vantajoso sobre o indivíduo. Em tais casos, considera-se que se deva administrar a FAL dentro de cerca de 2 a 6 horas (antes ou após) da ingestão de proteína dietética, com um período de retardo de apenas cerca de 1 hora em algumas formas de realização. Em certas formas de realização, é considerado que a terapia de FAL seja uma terapia contínua em que uma dose diária da FAL é administrada ao indivíduo indefinidamente. Em outras situações, por exemplo em mulheres grávidas que tenham apenas as formas mais brandas de PKU e de HPA, pode ser que a terapia de FAL seja apenas continuada por tanto tempo quanto a mulher esteja grávida e/ou no período de amamentação.

[00224] Além disso, além das terapias com base unicamente na liberação da FAL e da regulação da proteína dietética, os métodos da presente invenção também consideram a terapia de combinação com uma terceira composição que especificamente objetive um ou mais dos sintomas de HPA. Por exemplo, é conhecido o fato de que o déficit na tirosina causado por HPA resulte em uma deficiência nos neurotransmissores dopamina e serotonina. Assim sendo, no contexto da presente invenção, é considerado o fato de que os métodos com base na FAL e na proteína dietética possam ser ainda combinados com a administração dos neurotransmissores

L-dopa, carbidopa e 5-hidroxitriptofano para corrigir as deficiências que resultem das quantidades reduzidas da tirosina na dieta.

[00225] Como a administração da FAL não deve gerar tirosina (ao contrário da administração de PAH), tal tratamento resultará ainda na tirosina como sendo um aminoácido essencial para tais indivíduos. Portanto, a suplementação dietética com tirosina pode ser desejável para indivíduos que estejam recebendo FAL em combinação com a terapia de BH4.

I. TRIAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS HOMÓLOGOS DE FAL

[00226] Outro aspecto da invenção é um ensaio de triagem para identificar a FAL bacteriana que possa prevenir, melhorar ou reduzir os níveis intensificados de fenilalanina, mediante o contato de uma célula contendo elevados níveis de fenilalanina com a FAL bacteriana e determinando-se se a FAL reduz tais níveis elevados de fenilalanina. Em certas formas de realização, o método é um ensaio de rendimento elevado. Em uma forma de realização, os genomas completos das espécies bacterianas são sequenciados e examinados quanto à presença de homólogos de FAL com o uso de uma abordagem de bioinformática. Em outra forma de realização, os genes com homologia a encP são identificados e a análise de BLAST da sequência de proteínas relacionada é conduzida para se determinar o percentual de identidade. Os alinhamentos de sequências primárias de tais proteínas são avaliados quanto à presença de resíduos conservados essenciais para a atividade de FAL. A posição 83 (HAL de *P. putida*) de todas as enzimas de HAL é uma histidina, enquanto ela é um aminoácido alifático, por exemplo leucina ou valina nas enzimas com atividade de FAL. A análise na posição 83 elucidará se as enzimas denotadas HAL podem ter sido mal rotuladas e podem realmente apresentar atividade de FAL. Por exemplo, a posição 413 é uma glutamina (Q) na maioria das enzimas de HAL e é seguida na posição 414 por um ácido glutâmico (E) em todas as enzimas de HAL. Por comparação, a posição 414 é uma glutamina (Q) seguida na posição 415 por um ácido

aspártico (D) ou uma asparagina (N) na maior parte das enzimas de FAL identificadas até aqui. As enzimas de HAL denotadas representativas que são determinadas por este método de bioinformática como sendo o mais provavelmente mal rotuladas como enzimas de FAL procarióticas, incluem as enzimas de HAL de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (ZP 00005404), de *Rubrobacter xylanophilus* DSM9941 (ZP 00188602), de *Photorhhabdus luminescens* subespécie LaumondiiTT01 (NP 930421), de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (AA051415).

[00227] Em uma outra forma de realização, a atividade catalítica de FAL do produto protéico de tais homólogos é confirmada. Em outra forma de realização, os genomas dos homólogos de FAL são amplificados por PCR e clonados em pHIS8 ou um vetor semelhante. As proteínas putativas de FAL são heterologamente expressas em *E. coli* como proteínas rotuladas de His, purificadas e ensaiadas quanto à atividade de FAL. Os ensaios quanto à atividade de FAL podem incluir, porém sem limitar, a capacidade de converter a fenilalanina em cinamato *in vitro*, a incapacidade de converter tirosina em p-cumarato *in vitro*, ensaios para teste quanto à atividade de HAL e ensaios para caracterizar as cinéticas das enzimas.

J. PRODUÇÃO DE FAL PROCARIÓTICA

[00228] Outro aspecto da invenção é um método de produzir FAL procariótica. Em uma forma de realização, a FAL recombinante é superexpressa como um uma proteína de fusão N-terminal rotulada de octa-histidil em um vetor, por exemplo *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Invitrogen) com um promotor indutível tal como IPTG (isopropil-beta-D-tiofalactopiranosídeo). Em outra forma de realização, a FAL recombinante é superexpressa em células de *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS sem um rótulo N-terminal. A cultura de sementes para um biorreator/fermentador é cultivada a partir de um estoque de glicerol em frascos de agitação. Tal cultura de sementes é então usada para reforçar dentro de um biorreator controlado no modo de batelada alimentada. A glicose é suplementada e o pH é controlado com base (NH4OH) e a

agitação é até 1200 rpm. A alimentação de O_2 mantém o oxigênio dissolvido até mais do que 20%. As células são cultivadas em uma temperatura de 30°C até alcançar uma OD_{600} de 70 a 100 (~22 a 25 horas) e depois induzidas com IPTG 0,4 mM. A temperatura é reduzida até 22 a 26°C e cultivada até que a mudança da atividade seja < 0,1 IU/ml (aproximadamente 40 a 48 horas e uma OD_{600} tipicamente de 200). Os meio de cultura celular é tipicamente definido e composto de proteína de extrato de levedura, peptona-triptona, glicose, glicerol, casaminoácidos, sais de traço e sais de tamponamento de fosfato. O produto de FAL recombinante é produzido intracelularmente e não secretado. As bactérias são colhidas por centrifugação contínua (Alfa-Laval, Carr, Ceba ou equivalente).

K. PURIFICAÇÃO DA FAL PROCARIÓTICA

[00229] Um outro aspecto da presente invenção caracteriza um método para purificar a FAL bacteriana ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo. De acordo com uma primeira forma de realização, uma massa celular transformada é cultivada e rompida deixando a enzima recombinante bruta. Os materiais exógenos são normalmente separados da massa bruta para prevenir incrustação das colunas. A purificação cromatográfica é conduzida com o uso de uma ou de várias resinas cromatográficas. Subsequentemente, a proteína purificada é formulada em um tampão destinado a prover atividade estável através de um período de tempo prolongado. Em outra forma de realização, o método para purificar a FAL bacteriana compreende: (a) lise das bactérias contendo FAL recombinante com o uso de um homogeneizador de pressão (porém potencialmente por outros meios físicos tais como a lise de contas de vidro); (b) tratamento pelo calor; (c) clarificação deste lisado com o uso de uma segunda etapa de centrifugação contínua e/ou filtração de profundidade (conforme com Cuono Zeta Plus ou Maximizer, Pall Filtron, ou Millipore Millistak ou filtros Opticao); (d) passagem através de uma etapa de filtração de carvão vegetal (como com Millipore Millistak 40AC); (e) passagem através de uma etapa final

de filtração (conforme com um filtro Sartorious Sartopore de 0,2 μm); (f) passagem através de uma cromatografia de interação hidrofóbica de butila (conforme na Toyopearl Butyl 650M da Tosoh Biosciences); (g) passagem através de uma coluna de troca de íons Q (como em uma Macroprep High Q da BioRad); e (h) recuperação do produto final mediante troca de tampão com filtração de fluxo tangencial (como com Sartorious Hydrosart ou membrana de PES 100 kDa). Os técnicos no assunto facilmente observarão que uma ou mais das etapas de cromatografia podem ser omitidas ou substituídas, ou que a ordem das etapas de cromatografia pode ser mudada dentro do escopo da presente invenção. Finalmente, as etapas apropriadas de esterilização podem ser realizadas conforme desejável.

[00230] Tendo até agora descrito a invenção de uma maneira geral, referida invenção pode ser mais facilmente entendida através da seguinte referência aos exemplos a seguir. Os exemplos são oferecidos para ilustrar os objetivos apenas, e não intentam limitar o escopo da presente invenção, sob qualquer hipótese. Esforços foram feitos para garantir precisão com respeito aos números usados (por exemplo, quantidades, temperaturas etc.), mas algum erro experimental e divergências devem, naturalmente, ser levados em consideração.

EXEMPLO 1

Clonagem da FAL de *Nostoc punctiforme* e de *Anabaena variabilis*

Manipulações de DNA

[00231] O DNA genômico de *N. punctiforme* foi comprado da ATCC (29133D) e o gene de FAL (ZP_00105927) foi amplificado por PCR dos iniciadores

5’CACTGTCATATGAATATAACATCTCTACAACAGAACAT-3’ (SEQ ID NO: 12) e 5’-

GACAGTGGCGGCCGCTCACGTTGACTTTAAGCTCGAAAAAATATG-3’ (SEQ ID NO: 13). O produto da PCR resultante foi digerido com NdeI e NotI e o fragmento de 1,7 kb foi ligado em pET-28a(+) e pET-30a(+) (Novagen) para N-His

rotulado e não rotulado, respectivamente.

[00232] As células de *A. variabilis* foram compradas da ATCC (29413). O DNA genômico foi extraído (Qiagen) e o gene de FAL (YP_324488) foi amplificado por SOE-PCR para remover um sítio NheI. O iniciador 1 (5'-CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO: 14, e o iniciador 2 (5'-

GGAAATTTCCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO: 15) foram usados para amplificar os nucleotídeos 1 a 1190, e o iniciador 3 (5'-

CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3' (SEQ ID NO: 16) e o iniciador 4 (5'-

CACTGTGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO: 17) foram usados para amplificar os nucleotídeos 1142 a 1771. Estes dois produtos da PCR foram combinados para amplificar o gene de comprimento completo com os iniciadores 1 e 4. O produto da PCR resultante foi digerido com NheI, embotado com Klenow (NEB), depois digerido com NotI. O fragmento de 1,7 kb foi ligado em pEt-28a(+) e em pET-30a(+) (Novagen).

Cepas Bacterianas e Condições de Cultura

[00233] Células de *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) foram transformadas com pGro7 (TaKaRa) e células competentes BL21(DE3)pGro7 foram preparadas pelo Método de Inoue (Sambrook e Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edição (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001)). Estas células foram transformadas com pET-28-NpFAL e cultivadas em 25 ml de LB com 50 mg/litro de canamicina e 20 mg/litro de cloranfenicol durante a noite em 37 °C. Vinte mililitros desta cultura foram semeados em 1 litro de meio LB com canamicina, cloranfenicol e 500 mg/litro de L-arabinose, e cultivados em 37°C. Em uma OD_{600} de 0,6, a cultura foi esfriada sobre gelo. Após 5 minutos, a cultura foi induzida com IPTG

0,3 mM e cultivada por 16 horas em 20°C. As células foram colhidas por centrifugação.

[00234] Células BL21(DE3)pLysS (Stratagene) foram transformadas com AvFAL e cultivadas de forma idêntica às NpFAL sem a indução da arabinose.

EXEMPLO 2

Purificação de NpFAL e AvFAL

[00235] As culturas foram centrifugadas em uma centrífuga de topo de bancada em 5.000 g por 20 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* celulares foram tipicamente congelados em -70°C antes de processamento adicional. Após o descongelamento, os *pellets* celulares foram colocados em suspensão em aproximadamente 80 unidades de densidade óptica (600 nm) em TBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH de 7,8). As células foram lisadas por duas passagens através de um homogeneizador de pressão APV em 12.000 a 14.000 psi (82.800 a 96.600 kPa). O lisado bruto foi então tratado pelo calor em 55°C por 2 horas. O lisado foi centrifugado em 10.000 g por 30 minutos e o sobrenadante foi retido e filtrado com um filtro de vácuo de 0,2 μm (Corning).

[00236] A FAL foi purificada do lisado clarificado pela passagem sequencialmente através de uma coluna de butila 650M (Tosoh BioSciences) e uma coluna MacroPrep High Q (BioRad). O produto eluído apresentou um alto nível de pureza tanto por SDS PAGE quanto por HPLC de fase reversa.

EXEMPLO 3

GERAÇÃO DE VARIANTES PEGUILADAS DE FAL

Peguilação de Proteínas

[00237] A Peguilação usa modificações dos métodos da literatura (Hershfield *et al.,* (1991) *ibidem*; Patente U.S. nº 6.057.292; Lu *et al.,* Biochemistry 40(44): 13288-13301 (2001); Nektar Therapeutics, catálogo 2003). Os PEGs ativados incluem tanto os succinatos de succinimidila de PEG (mPEG-SPA, Peso Molecular de 5 kDa ou Peso Molecular de 20 kDa) quanto as hidrossuccinimidas de PEG ramificadas (éster

$mPEG_2$-NHS, Peso Molecular de 10 kDa ou Peso molecular de 40 kDa), as quais acham-se tanto capeadas sobre uma extremidade com um grupo metóxi quanto disponível da *Nektar Therapeutics*; a determinação experimental das proteínas peguiladas ótimas é normalmente necessária (Veronese, F. M. *et al.,* J. Bioactive Compatible Polymers 12: 196-207 (1997)). As condições de peguilação ótimas são determinadas com o uso de relações diferentes de FAL:PEG (levando em conta a relação molar da proteína junto com o número de lisinas por monômero protéico), pHs diferentes, diferentes tampões, várias temperaturas e tempos de incubação. Altas relações de derivação de proteína de FAL:PEG são necessárias, uma vez que a FAL nativa tem um grande número de lisinas (29 e 18 por monômero de *Rhodosporidium toruloides* (Rt) e *Anabaena variabilis* (Av), respectivamente) a FAL não modificada apresenta imunorreatividade após a injeção repetida em camundongos, e tendo em vista que a FAL desnuda (tipo selvagem) é rapidamente inativada após exposição às proteases. As reações de peguilação são interrompidas por congelamento em -20°C, e as amostras serão analisadas por SDS-PAGE, espectroscopia de massa MALDI-TOF, avaliação da atividade, sensibilidade proteolítica e imunorreatividade.

[00238] Antes da atividade, proteólise e avaliação imune, e de modo a remover o PEG não reagido em excesso, as reações são dializadas em relação ao pH 8,5, tampão de fosfato de potássio 0,05 M durante a note em 4°C com agitação, com o uso de Tube-O-Dialyzers (GenoTechnology). Após a concentração de proteína ter sido determinada com o uso do kit de ensaio de proteína NI Geno Technology), as medições da atividade da FAL serão realizadas sobre amostras de FAL não derivadas e derivadas de PEG com o uso de condições de reação padrão, como foi anteriormente descrito. Em seguida à caracterização in vitro, os testes in vivo serão conduzidos com a maior parte de candidatos terapêuticos peguilados promissores com o uso do modelo de camundongos de PKU.

Caracterização

[00239] A concentração de proteínas é determinada com o uso do coeficiente de extinção de FAL (0,5 e 0,83 mg $ml^{-1}cm^{-1}$ para RtFAL e AvFAL, respectivamente) em 280 nm para amostras de proteínas não modificadas, e para amostras de proteínas peguiladas a concentração é calculada com o uso do Ensaio de Proteínas NI (*GenoTechnology*), o qual inclui o processamento das amostras para remover os contaminantes não protéicos que possam interferir com a determinação precisa da concentração de proteínas.

[00240] Os produtos de PEG-FAL são caracterizados com MALDI-TOF MS para determinar o número de moléculas de PEG ligadas a cada monômero de FAL, assim como caracterizados com o uso da avaliação da atividade e SDS-PAGE e análise de gel nativo, para garantir a retenção da atividade, a derivação completa, e nenhuma perda de formação de FAL tetramérico, respectivamente. Quanto as amostras de FAL e de PEG-FAL, a análise espectroscópica de massa MALDI-TOF requer o uso de uréia 0,5 M ou guanidina 0,025 M-HCl para aprimorar a dissociação de subunidade e a reprodutibilidade da detecção da espécie.

Ensaio da Atividade de FAL

[00241] O ensaio da atividade de FAL é conduzido com o uso de um espectrofotômetro de UV Cary (*Cary 50*) no modo de cinética. A atividade da FAL com o substrato de L-fenilalanina é ensaiada na temperatura ambiente (25°C) pela medição da produção de transcinamato monitorada pelo aumento da absorbância em 290 nm (Hodgins, (1968) *ibidem*). O coeficiente de extinção molar do ácido transcinâmico em 290 nm é de 10,2381 litros $M^{-1}cm^{-1}$. As misturas de reação contêm fenilalanina 22,5 mM em tampão de Tris 100 mM-HCl, pH de 8,5. Quanto às medições padrão, a concentração de enzima final é de 0,0035 mg/ml, porém, para os estudos cinéticos a concentração de enzima no ensaio é ajustada de modo que a inclinação em 290 nm por minuto se situe na faixa de 0,005 a 0,02. Os dados da atividade são expressos como atividade específica (μmol x $min^{-1}mg^{-1}$). Uma unidade de FAL é

definida como aquela quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácido transcinâmico por minuto na temperatura ambiente.

EXEMPLO 4

TESTE DA MEIA VIDA *IN VITRO* E IMUNOGENICIDADE

[00242] Após a caracterização bioquímica, os candidatos de PEG-FAL mais promissores são examinados quanto à imunorreatividade em relação aos anticorpos originados pelos camundongos de PKU que receberam a injeção com FAL nativo (não peguilado) com o uso de três técnicas diferentes e complementares (*Western blot*, ELISA e imunoprecipitação (IP)).

[00243] Quanto à análise de *Western blot*, anti-soro de FAL (de camundongos que receberam a injeção com FAL nativo) é usado em uma diluição de 1:10.000. Como um controle negativo, o soro do camundongos tratados com tampão também é usado na mesma diluição. O anticorpo secundário, IgG anti-camundongo de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Promega) é diluído a 1:5.000 e a cor é desenvolvida com o uso de *Western Blue* (Promega) de substrato de AP. O teste de ELISA é realizado com o uso de placas Nunc/Immuno Maxisorp (Nalge Nunc International) seguindo os procedimentos padrão com o uso de 1 mg/ml de FAL em PBS e bloqueando-se com PBS, 0,05% de Tween-20, 2% de BSA. Os anti-soros de camundongos (de camundongos expostos à FAL nativa) são diluídos a 1:10.000 em solução de bloqueio EB (PBS, 0,05% de Tween-20, 2% de BSA), e uma IgG anti-camundongo de cabra de HRP foi usada como anticorpo secundário com TMB usado para detecção em 450 nm.

[00244] A imunoprecipitação é usada para testar quanto à ligação do anticorpo de FAL. Amostras de proteína (FAL ou FAL peguilada) são incubadas em tampão de TTBS (solução salina tamponada de Tris com 0,1% de Tween) e a atividade de FAL é medida antes de se adicionar a amostra de anticorpo. Cada amostra é incubada com um excesso de 8 vezes de soro anti-FAL de controle positivo,

e uma reação de controle negativa em duplicata com o uso de soro de camundongo não imune. Após a incubação, a proteína G Sepharose 4 (50%, v/v) é adicionada em excesso, levando-se em conta a capacidade de ligação de IgG de camundongo das contas, e as amostras são incubadas novamente em 4°C durante a noite com rotação. Os sobrenadantes são recuperados por centrifugação e a atividade da FAL de cada amostra é ensaiada sobre os sobrenadantes. As gotas de *pellets* não são descartadas, de modo que outra análise por *Western blot* pôde ser realizada. Para confirmar se a ligação das gotas de anticorpo havia ocorrido, o *Western blot* é usado para detectar o antígeno de FAL sobre as gotas. As contas que tenham sido recuperadas por centrifugação após a etapa de ligação de FAL são lavadas por várias vezes com os tampões de TTBS e TBS. Em seguida a estas lavagens, tampão de carga de SDS-PAGE é adicionado às gotas e as amostras são aquecidas em 95°C por 5 minutos. As amostras são então analisadas por *Western blot* com o uso de anti-soro de FAL. As variantes de enzimas apresentando fraca ligação de anticorpos têm pouca FAL correspondente nas frações de contas pelotizadas, como detectado por *Western blot*, e apresentam atividades mais elevadas permanecendo no sobrenadante em comparação com a FAL não modificada nativa.

EXEMPLO 5

TESTE DA SENSIBILIDADE DA PROTEASE

[00245] Os estudos do mapeamento da protease sobre a FAL nativa de *R. toruloides* indicaram sítios primários de sensibilidade proteolítica. A remoção de tais sítios pode reduzir ou eliminar a sensibilidade proteolítica e contribuem para o desenvolvimento de um substituto da enzima de PKU eficaz. No entanto, a eliminação de tais sítios quanto à sensibilidade proteolítica pode resultar na redução ou na perda de atividade da enzima.

[00246] Após a engenharia de proteína ter criado mutantes de FAL melhorados (e PEG-FAL) que retenham a atividade, a triagem quanto à resistência da

protease com o uso de incubação com um coquetel de tripsina/quimotripsina protease, seguida pela monitoração para retenção da atividade (através da medição da OD_{290}) e clivagem reduzida da proteína (através da análise em gel de PAGE), leva em conta a identificação de mutantes com propriedades *in vitro* apropriadas a serem usados para testes *in vivo*.

[00247] A estabilidade proteolítica será avaliada com o uso de incubação com um coquetel de protease que aproxima o ambiente intestinal e contém 2,3 mM de tripsina, 3,5 mM de quimotripsina, 3,05 mM de carboxipeptidase A, e 3,65 mM de carboxipeptidase B. Os testes de proteólise envolverão incubações enzimáticas, acrescentando-se proteases às soluções de FAL, para se determinar o grau de sensibilidade à protease quanto às diferentes variantes protéicas que estejam sendo examinadas (proteína nativa ou mutante com ou sem peguilação ou outra modificação química), incluindo os decursos de tempo de retenção da atividade e de retenção da estabilidade após à exposição à protease. As experiências de mapeamento espectrométrico de massa SDS-PAGE e MALDI-TOF serão usadas para se determinar a localização de quaisquer sítios sensíveis à protease (Kriwacki, R. W. *et al.,* J. Biomol. Tech. 9(3): 5-15 (1980)). Estes resultados do mapeamento serão importantes para se determinar sítios primários de suscetibilidade da protease (tais como os dois sítios primários já identificados), de modo que todos os sítios principais possam ser removidos com o uso de proteção e/ou mutação da peguilação para remover e/ou proteger regiões suscetíveis da arquitetura de FAL.

EXEMPLO 6

GERAÇÃO DE NpFAL E AvFAL PEGUILADOS

[00248] Em geral, a peguilação tanto para NpFAL quanto para AvFAL envolve a mistura da proteína com SUNBRIGHT ME-200HS 20 kDa de PEG ativado com NHS (NOF).

[00249] Protocolo para peguilação, método padrão “HC” com o uso de 20

kDa de PEG linear ativado por NHS:

1. A proteína foi avaliada quanto à presença de endotoxina

[00250] Uma solução de proteína (0,1 ml) foi diluída em 0,9 ml de água MQ fresca e testada com um aparelho de Charles River manual (EndoPTS) para endotoxina no nível de sensibilidade de 0,5 EU/ml. Se a endotoxina era maior do que 0,5 EU/ml, então a endotoxina era reduzida inicialmente por filtração de *Mustang E*, seguida por resina de *Sterogene Etox*, e opcionalmente por outra purificação cromatográfica. A redução foi limitada, mas suficientemente útil pela passagem através de DEAE FF (Amersham) em pH de 7,8.

2. Concentração e troca de tampão da proteína:

[00251] A proteína foi concentrada a mais do que 25 mg/ml, porém a menos do que, ou igual a75 mg/ml, e o tampão foi trocado para KPO_4 50 mM, pH de 8,5. Se um filtro de rotação era usado para preparar esta concentração, o filtro era primeiramente testado quanto à endotoxina por rotação na velocidade e no tempo reduzidos (3000 rpm, 3 minutos) com tampão sozinho, depois testando-se o tampão retido quanto à endotoxina da mesma forma que a proteína na etapa 1. O registro/receita de batelada tampão para KPO4 50 mM, pH 8,5, consistiu de água (QS para 1 litro), fosfato de potássio dibásico (8,4913 g/litro de 48,75 mM), e fosfato de potássio monobásico (0,17011 g/litro de 1,25 mM). A solução foi filtrada através de um filtro de 0,1 μm e armazenada na temperatura ambiente. O produto concentrado foi lentamente filtrado (1 a 2 ml/minuto) através de um acrodisco de filtro *Mustang E.* Uma amostra diluída e branqueada com TBS estéril, pH 7,5, foi medida em A280 para se determinar a concentração de proteína. O coeficiente de extinção foi de 0,83 quanto a NpFAL e de 0,75 quanto a AvFAL.

3. Peguilação de NpFAL e AvFAL:

[00252] PEG normalmente armazenado em -80°C foi aquecido até a temperatura ambiente. Tampão de KPO4 foi adicionado ao PEG para recolocação em

suspensão mediante turbilhonamento em uma velocidade máxima, e o tubo de agitação firme na mão para se garantir que todos os grandes pedaços se achavam em suspensão. A proteína foi adicionada à solução de PEG em suspensão bem-feita dentro de um minuto de se ter primeiramente umedecido o PEG e misturado por inversão muito suave. O tubos envolvidos em folha de alumínio foram colocados sobre o eixo de um oscilador e oscilados muito suavemente na temperatura ambiente por 3 horas. Os tubos foram enchidos com TBS (pH de 7,5) e submetidos a filtração estéril. As suspensões foram ou formuladas imediatamente ou armazenadas em 4°C até que ficassem prontas para a formulação.

4. Formulação

[00253] O registro de receita/batelada de tampão da formulação consistiu em água (QS para 1 litro), Tris-Base (3,2 mM), Tria-HCl (16,8 mM) e cloreto de sódio; a solução de tampão foi filtrada através de um filtro de 0,2 μm e armazenada na temperatura ambiente. A solução de tampão foi submetida a filtração de fluxo tangencial com o uso de um Vivaflow 50 (porções menores) ou Vivaflow 200 (lotes maiores) com uma membrana de celulose regenerada 100 MWCO. A solução foi descarregada com água MQ, NaOH 0,1 N, e 200 ml de água novamente. A solução foi equilibrada com TBS, pH 7,5 em fluxo cruzado de 50 ml/minuto. O pH do permeado foi determinado para garantir um pH de 7,5.

[00254] A solução teve seu tampão trocado primeiramente por diluição com TBS por aproximadamente 3 vezes e retornando-se ao volume original em pelo menos quatro vezes. O fluxo cruzado foi tipicamente de 180 a 200 ml/minuto tanto para o Vivaflow 50 quanto para o 200.

[00255] O produto final foi filtrado através de *Mustang E*. A presença da endotoxina foi avaliada após a diluição de 0,1 ml com 1,9 ml de água fresca estéril. Se a endoxina fosse mais elevada do que 1 EU/ml, a redução era conduzida com o gel *Sterogene Etox*. A NpFAL ou a AvFAL peguiladas, formuladas e estéreis, foram

seladas em frascos e colocadas em -70°C até que ficassem prontas para os estudos in vivo.

EXEMPLO 7

EFEITO DA FAL DE *Nostoc punctiforme* (NpFAL) E SUA FORMA PEGUILADA EM CAMUNDONGOS AFETADOS COM A PKU

[00256] O objetivo deste estudo foi determinar os níveis de fenilalanina (Phe) do plasma, em seguida às administrações subcutâneas da NpFAL ou da NpFAL peguilada.

[00257] Os efeitos de (1) um mutante de lisina R91K FAL de *Rhodosporidium toruloides* e sua forma peguilada (1:3 PA:PEG) (PEG da Nippon Oil and Fat, NOF) em uma dose de 3,0 IU/ml; (2) NpFAL e sua forma peguilada (1:3 FAL:PEG NOF) em doses que variam de 0,6 IU/ml a 3,0 IU/ml; e (3) veículo, foram testados em camundongos ENU2 homozigotos (também conhecidos como camundongos $BTBR^{enu2}$). A R91K FAL foi anteriormente apresentada como tendo atividade aprimorada em relação à FAL de *R. toruloides* do tipo selvagem. A R91K acha-se localizada na abrangência helicoidal Asp86 a Leu101, próximo à superfície da proteína. Todas as solução tiveram menos do que 1,0 EU/ml de endotoxina e foram armazenadas em -75 a -80°C. O camundongo ENU2 ou $BTBR^{enu2}$ é mutante homozigoto no lócus do gene da fenilalanina hidroxilase (PAH) resultando em um animal com severa hiperfenilalanemia. Os níveis elevados da fenilalanina (Phe) do plasma tornam este animal o modelo apropriado para se avaliar a capacidade da fenilanalina amônia liase (FAL) para reduzir a Phe do plasma.

Esquema Experimental

TABELA 3:DESIGNAÇÕES DE GRUPOS E NÍVEIS DE DOSE

Grupo nº	N	Administrado	Nível de Dose (IU/camundongo)	Atividade do Artigo de Teste (IU/ml)	Volume da Dose (ml)

1	2	R91K	1,0	3,0	0,33
2	2	R91K 1:3 FAL:PEG NOF	1,0	3,0	0,33
3	5	npFAL	0,2	0,6	0,33
4	5	npFAL	0,4	1,2	0,33
5	5	npFAL	0,6	1,8	0,33
6	5	npFAL	1,0	3,0	0,33
7	5	npFAL 1:3 FAL:PEG NOF	0,2	0,46	0,43
8	5	npFAL 1:3 FAL:PEG NOF	0,4	0,92	0,43
9	5	npFAL 1:3 FAL:PEG NOF	0,6	1,38	0,43
10	5	npFAL 1:3 FAL:PEG NOF	1,0	2,30	0,43
11	2	Veículo	0,0	0,0	0,43

[00258] As soluções foram administradas através de *bolus* subcutâneo entre a ombro no primeiro dia, no abdômen direito no quarto dia, e no abdômen esquerdo no oitavo dia. As soluções foram administradas com o uso de uma agulha de calibre 25 e uma seringa de 3 cm^3, no espaço subcutâneo. Cada animal recebeu 0,2, 0,4, 0,6 ou 1,0 IU do artigo de teste nos volumes de dose descritos na tabela acima. Os animais foram levemente anestesiados mediante a inalação de halotano (1 a 3% mg/kg) e também contidos manualmente. A administração da dose foi realizada aproximadamente no mesmo horário em cada dia de administração da dose.

[00259] Os animais foram observados diariamente quanto à morbidez, à

mortalidade e à saúde geral. Em particular, o sítio da injeção foi observado quanto aos sinais de vermelhidão ou edema. Os Pesos Corporais foram avaliados e registrados nos terceiro, oitavo e décimo segundo dias, e usados como um parâmetro clínico, mas não usados para determinar o volume da dose. As coletas de sangue (P-plasma, S-soro) foram realizadas no Dia -3 (P, S), no Dia 2 (P), no Dia 4 Pré-dose (P), no Dia 5 (P), no Dia 8 Pré-dose (P, S), no Dia 9 (P, S), no Dia 12 (P), e no dia 23 (S). Aproximadamente 50 a 100 μl de sangue completo foram colhidos em cada ponto do tempo (para 25 a 50 μl de plasma ou soro). O sangue foi colhido da veia da cauda. O plasma ou o soro foram colhidos como indicado no programa acima. A veia da cauda foi perfurada e as gotículas de sangue foram colhidas com o uso de Tubos de Coleta de Sangue Capilar *RAM Scientific Green-Top* (nº 07 7250). Quanto à coleta do soro, as gotículas de sangue foram colhidas em um tubo sem nenhum aditivo. Os plasma/soro foram colhidos e transferidos para um tubo de armazenagem a ser guardado ou em -20°C (plasma) ou -80°C (soro).

Resultados

[00260] Os resultados quanto aos estudos de dosagem de curto prazo da NpFAL demonstram a eficácia das enzimas peguiladas em reduzir os níveis excessivos da fenilalanina. Notavelmente, a NpFAL não peguilada não reduziu os níveis de fenilalanina após qualquer injeção, mesmo antes que pudesse haver qualquer resposta imunogênica. Portanto, a peguilação é uma exigência absoluta para que a NpFAL seja um tratamento potencial para a PKU (Figura 5).

EXEMPLO 8

EFEITO DA FAL DE *Anabaena variabilis* (AvFAL) E SUA FORMA PEGUILADA EM CAMUNDONGOS AFETADOS PELA PKU

[00261] O objetivo deste estudo foi determinar os níveis de fenilalanina (Phe) do plasma em seguida às administrações subcutâneas da AvFAL ou da AvFAL peguilada.

[00262] Os efeitos de (1) um mutante de lisina R91K FAL de *Rhodosporidium toruloides* na sua forma peguilada (1:3 FAL:PEG) (PEG da Nippon Oil and Fat, NOF) em uma dose de 3,0 IU/ml; (2) AvFAL e sua forma peguilada (1:3 FAL:PEG NOF) nas doses de 0,6 IU/ml e 3,0 IU/ml; e (3) os veículos foram testados em camundongos ENU2 homozigotos (também conhecidos como (camundongos $BTBR^{enu2}$); A R91K FAL foi previamente apresentada como tendo atividade aprimorada em relação à FAL de *R. toruloides* do tipo selvagem. A R91K acha-se localizada na abrangência helicoidal Asp86 a Leu101, próximo à superfície da proteína. Todas as solução tiveram menos do que 1,0 EU/ml de endotoxina e foram armazenadas em -75 a -80°C. O camundongo ENU2 ou $BTBR^{enu2}$ é mutante homozigoto no lócus do gene da fenilalanina hidroxilase (PAH) resultando em um animal com severa hiperfenilalanemia. Os níveis elevados da fenilalanina (Phe) do plasma tornam este animal o modelo apropriado para se avaliar a capacidade da fenilanalina amônia-liase (FAL) para reduzir a Phe do plasma.

Esquema Experimental

TABELA 4: **DESIGNAÇÕES DE GRUPOS E NÍVEIS DE DOSE**

Grupo nº	N	Administrado	Nível de Dose (IU/camundongo)	Atividade do Artigo de Teste IU/ml)	Volume de dose (ml)	Via	Freqüência de dose
1	3	Veículo	0	0	0,33	SC	Dias 1, 4, 8
2	5	avFAL	0,2	0,6	0,33		
3	5	avFAL	1,0	3,0	0,33		
4	5	avFAL PEG	0,2	0,6	0,33		
5	6	avFAL PEG	1,0	3,0	0,33		
6	5	R91K PEG	1,0	3,0	0,33		

[00263] As soluções foram administradas através do bolus subcutâneo nas costas do animal nos primeiro, quarto e oitavo dias. As soluções foram administradas

com o uso de uma agulha de calibre 25 e seringa de 1 ou 3 cm^3 no espaço subcutâneo. Cada animal recebeu 0,2; 0,4; 0,6 ou 1,0 IU do artigo de teste nos volumes de dose descritos na tabela acima. Os animais foram levemente anestesiados mediante a inalação de halotano (1 a 3% mg/kg) e também contidos manualmente. A administração da dose foi realizada aproximadamente no mesmo horário em cada dia de administração da dose.

[00264] Os animais foram observados diariamente quanto à morbidez, à mortalidade e à saúde geral. Em particular, o sítio da injeção foi observado quanto aos sinais de vermelhidão ou edema. Os Pesos Corporais foram avaliados e registrados nos terceiro, oitavo e décimo segundo dias, e usados como um parâmetro clínico, mas não usados para determinar o volume da dose. As coletas de sangue (P-plasma, S-soro) foram realizadas no Dia -3 (P, S), no Dia 2 (P), no Dia 4 Pré-dose (P), no Dia 5 (P), no Dia 8 Pré-dose (P, S), no Dia 9 (P, S), no Dia 12 (P), e no dia 22 (S). Aproximadamente 50 a 100 μl de sangue completo foram colhidos em cada ponto do tempo (para 25 a 50 μl de plasma ou soro). O sangue foi colhido da veia da cauda. O plasma ou o soro foram colhidos como indicado no programa acima. A veia da cauda foi perfurada e as gotículas de sangue foram colhidas com o uso de Tubos de Coleta de Sangue Capilar *RAM Scientific Green-Top* (nº 07 7250). Quanto à coleta do soro, as gotículas de sangue foram colhidas em um tubo sem nenhum aditivo. Os plasma/soro foram colhidos e transferidos para um tubo de armazenagem a ser guardado ou em -20°C (plasma) ou -80°C (soro).

Resultados

[00265] Os resultados quanto aos estudos de dosagem de curto prazo da AvFAL demonstram a eficácia das enzimas peguiladas em reduzir os níveis excessivos de fenilalanina. Notavelmente, a AvFAL não peguilada não reduziu os níveis de fenilalanina após qualquer injeção, mesmo antes que pudesse haver qualquer resposta imunogênica. Portanto, a peguilação foi mostrada como sendo uma

exigência absoluta para que a AvFAL seja um tratamento potencial para a PKU (Figura 6).

EXEMPLO 9

ESTUDO DA TOLERÂNCIA CRÔNICA (90 DIAS) DA R91K FAL NÃO PEGUILADA E PEGUILADA E DA NpFAL PEGUILADA EM CAMUNDONGOS AFETADOS PELA PKU

[00266] O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros farmacodinâmicos e os efeitos de imunogenicidade da dosagem crônica (90 dias) com R91K FAL peguilada e não peguilada e da NpFAL peguilada em camundongos ENU/2, um modelo de doença de fenilcetonúria.

[00267] Duas bateladas de cada artigo de teste (R91K e sua forma peguilada R91KFAL:PEG 1:3, npFAL e sua forma peguilada npFAL:PEG 1:3 NOF, e veículo Tris-HCl) foram produzidas, uma usada para a primeira metade do estudo, e a outra para a segunda metade do estudo. As soluções de teste foram armazenadas em -70°C a -80°C. Um total de 55 (n = 3 a 7 por grupo de dose) camundongos ENU2 homozigotos (aka $BTBR^{enu2}$) foi usado, e sobre nenhuma circunstância foram usados animais não-*naive* (camundongos que anteriormente haviam recebido a injeção com FAL).

Esquema Experimental

TABELA 5: DESIGNAÇÕES DE GRUPOS E NÍVEIS DE DOSE

Grupo nº	Expressões de Grupo	Administrado	Número de Doses	N
1	Controle de Veículo, s.i.d.	Tris NaCl	90	3
2	b.i.w [a]	R91K	26	3
3	b.i.w. após a semana 3 [b]	R91K	22	3
4	Dose crescente, s.i.d	R91K	90	7
5	Dose decrescente, s.i.d.	R91K	90	7
6	b.i.w. [a]	R91K 1:3 NOF	26	6
7	b.i.w após a semana 3 [b]	R91K 1:3 NOF	22	6
8	Dose Crescente, s.i.d	R91K 1:3 NOF	90	7

9	Dose decrescente, s.i.d.	R91K 1:3 NOF	90	7
10	FAL bacteriana, s.i.w. [c]	npFAL 1:3 NOF	13	6

b.i.w.: duas vezes por semana s.i.d: uma vez por dia

s.i.w. : uma vez por semana

[a] Dose dia 1 e 4 em um programa de 7 dias (exemplo, todas as segundas-feiras e quinta-feiras)

[b] Os Grupos 3 e 7 serão dosados no dia 1 e 8, e o início no dia 22 seguirá o mesmo programa de 7 dias conforme os grupos 2 e 6.

[c] Dose de 1 dia em um programa de 7 dias (exemplo, a cada Segunda-feira).

TABELA 6: NÍVEIS DE DOSE

		Dias das Doses				
		1 - 14	15 - 28	29 - 42	43 - 56	57 - 90
Números dos Grupos	**Descrições do grupo**	**Nível de Doses em IU/camundongo/dia**				
1	Controle de Veículo	0	0	0	0	0
2, 3, 6 e 7	Dose estática, b.i.w.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4 e 8	Dose crescente, s.i.d.	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
5 e 9	Dose decrescente, s.i.d.	3,0	2,0	1,0	0,8	0,6
10	FAL bacteriana, s.i.w.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

[00268] A administração de dose foi realizada uma vez por dia para os grupos 1, 4, 5, 8 e 9. Os Grupos 2 e 6 (b.i.w.) foram dosados duas vezes por semana nos dias 1 e 4, por exemplo a cada segunda-feira e quinta-feira. Os Grupos 3 e 7 (b.i.w. após a semana 3) foram dosados nos dias 1 e 8 e depois, novamente no dia 22, após o que o programa comparou os grupos 2 e 6 (a cada segunda-feira e quinta-feira). O Grupo

10 foi dosado em uma vez por semana. As soluções de teste foram administradas por injeção subcutânea (bolus) com o uso de uma agulha de calibre 25 ou 26 e uma seringa de 1 cm^3 no espaço subcutâneo entre as escápulas. Cada animal recebeu um volume dose predeterminado calculado com o uso da atividade da solução de Teste (IU/ml) e do nível de dose (IU/camundongo). A administração da dose foi realizada aproximadamente no mesmo tempo do dia de administração de cada dose.

[00269] Os animais foram observados diariamente quanto à morbidez, à mortalidade e à saúde geral. Em particular, o sítio de injeção foi observado quanto aos sinais de vermelhidão ou de edema. Os Pesos Corporais foram medidos e registrados uma vez por semana (dias -3, 5, 12, ..., por exemplo a cada sexta-feira) e no término do estudo. Se houvesse uma morte ou término não programado por causa do estado moribundo, o peso corporal era registrado naquele momento. Aproximadamente 100 μl de sangue completo foram colhidos em cada ponto do tempo (para 25 μl de plasma e 25 μl de soro). O sangue foi colhido através de punção da veia da cauda dos animais conscientes. As gotículas de sangue para o plasma foram colhidas com o uso Tubos de Coleta de Sangue Capilar *RAM Scientific Green-Top* (nº 07 7250). Quanto à coleta do soro, as gotículas de sangue foram colhidas em um tubo sem nenhum aditivo. As amostras de sangue foram armazenadas sobre gelo úmido por não mais do que 2 horas antes da separação por centrifugação em plasma/soro e armazenadas em -70 a -80°C até a avaliação nos ensaios. O sangue foi coletado para plasma e soro para a determinação dos títulos tanto da fenilalanina quanto dos anticorpos nos seguintes dias: -3 (início do pré-estudo), 9, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 59, 66, 73, 80, 87 e 91. No dia 89, o sangue e o plasma foram também coletados dos animais dos Grupos 1, 5, 9 e 10. A cada semana os pontos do tempo únicos podem não fornecer uma vista precisa da resposta da Phe do sangue à dosagem. Pontos do tempo adicionais mostraram se, ou não, os níveis de Phe variavam entre as doses. A amostra do dia 9 foi de vital importância para a integridade do estudo, uma vez que ele marca o tempo quando o

efeito de PD foi perdido em todos os regimes de dosagem tentados até agora. Uma amostra de sangue final de 100 μl foi colhida.

Resultados

[00270] O estudo da dosagem de longo prazo mostrado na Figura 7 mostra a eficácia contínua após numerosas injeções semanais através de um período de dez semanas (com NpFAL-PEG).

EXEMPLO 10: GERAÇÃO DE VARIANTES DE AvFAL (MUTANTES DE CISTEÍNA)

[00271] As substituições de aminoácidos foram feitas no polipeptídeo de AvFAL para reduzir a agregação que ocorre nas proteínas recombinantes bacterianamente expressas. A agregação protéica pode reduzir a atividade da enzima e/ou aumentar a imunogenicidade *in vivo*. Uma tal forma de agregação ocorre como um resultado da formação de ligações dissulfeto entre cadeias. Para minimizar esta possibilidade, vários resíduos de cisteína de AvFAL, sozinhos ou em combinação, foram substituídos por resíduos de serina.

[00272] O polipeptídeo de AvFAL tem 6 resíduos de cisteína, nas posições 64, 235, 318, 424, 503 e 565 (SEQ ID NO: 4). Os seguintes mutantes de cisteína única de AvFAL foram gerados: AvFAL_C64S (SEQ ID NO: 7), AvFAL_C318S (SEQ ID NO: 8), AvFAL_C503S (SEQ ID NO: 9) e AvFAL_C565S (SEQ ID NO: 10). Um mutante de cisteína dupla de AvFAL, AvFAL_S565SC503S (SEQ ID NO: 11), foi também gerado. A Figura 8 mostra as sequências de aminoácidos destes mutantes de cisteína de AvFAL.

Clonagem

[00273] O gene de AvFAL foi amplificado do DNA genômico de *Anabaena variabilis* (ATCC 29413-U, Qiagen DNeasy Kit) com o iniciador dianteiro AvarFALfor (5'-CACTGTCATATGAAGACACTATCTCAAGC ACAAAG-3') (SEQ ID NO: 18) e iniciador inverso AvarFALrev (5'-

CACTGTCTCGAGATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO: 19). O produto resultante da PCR foi tratado com Taq e depois ligado em pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen). O plasmídeo resultante foi denominado 1p40.

[00274] Um sítio NheI 5' foi acrescentado e o sítio NheI interno foi removido por SOE-PCR. O fragmento de AvFAL de montante foi amplificado do 1p40 com o iniciador dianteiro N-Nhe-AvFAL (5'-CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO: 20) e o iniciador inverso Nhe-AvFALrev (5'-GGAAATTTCCTCC ATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO: 21), e o fragmento de AvFAL *downstream* foi amplificado de 1p40 com o iniciador dianteiro Nhe-AvFALfor (5'-CCACTAATTGATGTTGATAA CCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO: 22) e iniciador inverso AvFALrev-r (5'-ACAGTGGCGGCCGCTTAATGCAAG CAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO: 23). Em uma reação de PCR única, os dois produtos da PCR foram emparelhados e estendidos com DNA polimerase para produzir o gene de AvFAL de comprimento completo, e depois amplificados com os iniciadores N-Nhe-AvFAL e AvFALrev-r. O produto da PCR resultante foi digerido com NheI, embotado com *Klenow*, digerido com *NotI*, e ligado no vetor pET28a+ (preparado pela digestão com NdeI, embotamento com Klenow, e digestão com NotI). O plasmídeo resultante foi denominado 3p86-23.

[00275] Novos sítios de restrição foram adicionados por PCR. A AvFAL foi amplificada do plasmídeo 3p86-23 com o iniciador dianteiro AvEcoRIfor (5'-CACTGTGAATTCATGAAGACACTATCTCAAGCAC AAAG-3') (SEQ ID NO: 24) e iniciador inverso AvSmaIrev (5'-CACGCC GGGTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCT-3') (SEQ ID NO: 25). O produto da PCR resultante foi digerido com EcoRI e SmaI e ligado no vetor PIBX7 digerido em EcoRI e SmaI. O plasmídeo resultante foi denominado 7p56 Av3.

Mutantes de Cisteína

[00276] Dois códons de cisteína no gene de AvFAL, correspondentes às posições 503 e 565 do polipeptídeo de AvFAL, foram substituídos por códons de serina por mutagênese dirigida ao sítio (QuickChange XL II, Stratagene). O códon de cisteína na posição 503 foi mudado para um códon de serina no plasmídeo 7p56 Av3 por PCR com o iniciador dianteiro Av_C503S (5'-GTCATTACGATGCACGCGCC**TCT**CTATCACCTGCAA CTGAG-3') (SEQ ID NO: 26) e iniciador inverso Av_C503Srev (5'-CTCAGTTGCAGGTGATAG**AGA**GGCGCGTGCATC GTAATGAC-3') (SEQ ID NO: 27). O códon de serina é sublinhado e a mutação de G para C no filamento codificador (mutação de C para G no filamento não codificador) é indicado em negrito. O plasmídeo resultante foi denominado j282. O códon de cisteína na posição 565 foi mudado para um códon de serina no plasmídeo j282 com o iniciador dianteiro Av_C565S (5'-CAGTTCAAGATATCTTACCC**TCC**TTGCATTAACCCGGGCTGC-3') (SEQ ID NO:28) e iniciador inverso Av_C565Srev (5'-GCAGCCCGGGTTAATGCAA**GGA**GGGTAAGATATCTTGAACTG-3') (SEQ ID NO: 29). O cólon de serina é sublinhado e a mutação de G para C no filamento codificador (mutação de C para G no filamento não codificador) é indicada em negrito. O plasmídeo resultante foi denominado j298a.

[00277] Os códons de cisteína no gene AvFAL nas posições 64, 318 e 565 do polipeptídeo de AvFAL foram da mesma forma substituídos por códons de serina com o uso dos seguintes pares de iniciadores: C64S, iniciador dianteiro Av_C64S (5'-GCAGGGTATTCAGGCA**TCT**TCTGAT TACATTAATAATGCTGTTG-3') (SEQ ID NO: 30) e iniciador inverso Av_C64Srev (5'-CAACAGCATTATTAATGTAATC**AGA**AGATGCCTG AATACCCTGC-3') (SEQ ID NO: 31); C318S, iniciador dianteiro Av_C318S (5'-CAAGATCGTTACTCACTCCGATCCCT**TCC**CCAGTAT TTGGGGC-3') (SEQ ID NO:

32) e iniciador inverso Av_C318Srev (5'-GCCCCAAATACTGG**GGA**AGGGATCGGAGTGAGTAACGATCTTG-3') (SEQ ID NO: 33); e C565S, iniciador dianteiro Av_C565S (SEQ ID NO: 28) e iniciador inverso Av_C565Srev (SEQ ID NO: 29). Os códons de serina são sublinhados, e as mutações de G para C nos filamentos codificadores e as mutações de C para G nos filamentos não codificadores são indicadas em negrito.

EXEMPLO 11: ATIVIDADE ENZIMÁTICA *IN VITRO* DAS VARIANTES DE AvFAL (MUTANTES DE CISTEÍNA)

[00278] A finalidade deste estudo foi determinar o efeito da substituição da serina dos vários resíduos de cisteína no polipeptídeo de AvFAL sobre a atividade *in vitro* da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL).

[00279] As variantes de AvFAL (isto é, mutantes de cisteína) foram clonadas como descrito no Exemplo 10. Os plasmídeos de expressão do mutante da cisteína de AvFAL foram transformados em bactérias e os polipeptídeos de mutantes da cisteína de AvFAL foram expressos como descrito no Exemplo 1 e purificados como descrito no Exemplo 2.

[00280] A AvFAL do tipo selvagem (WT) e os mutantes de cisteína de AvFAL foram testados quanto à atividade enzimática da FAL in vitro como descrito no Exemplo 3. A Tabela 7 mostra que, em comparação com o AvFAL WT não peguilado, a atividade específica da FAL *in vitro* das proteínas mutantes de cisteína de AvFAL purificadas, não peguiladas foi reduzida pela substituição da serina do resíduo de cisteína na posição 64 (AvFAL_C64S), porém não foi negativamente afetada pela substituição da serina dos resíduos de cisteína em qualquer das posições 503 ou 565, ou em ambas as posições 503 e 565 (AvFAL_C503S, AvFAL_C565S e AvFAL_C565SC503S, respectivamente).

TABELA 7: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MUTANTES DE CISTEÍNA DE AvFAL

Proteína de AvFAL	Peguilação	Atividade Específica (U/mg)

WT AvFAL	-	1,7
AvFAL_C503S	-	1,9
AvFAL_C64S	-	1,3
AvFAL_C565S E1	-	2,0
AvFAL_C565S E2	-	2,1
AvFAL_C565SC503S	-	2,2
WT AvFAL	+	1,1
AvFAL_C565SC503S	+	1,1

[00281] Para determinar se a introdução dos resíduos de serina tinha qualquer efeito sobre a atividade enzimática das proteínas de AvFAL peguiladas, a WT AvFAL e o mutante de cisteína dupla, AvFAL_C565SC503S, foram peguilados como descrito no Exemplo 6. A Tabela 7 mostra que a atividade específica da FAL *in vitro* da proteína de AvFAL peguilada não foi adversamente afetada pela substituição da serina dos resíduos de cisteína em ambas as posições 503 e 565.

EXEMPLO 12: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA *IN VITRO* DAS VARIANTES DE AvFAL (MUTANTES DE CISTEÍNA)

[00282] A finalidade deste estudo foi determinar o efeito da substituição da serina dos vários resíduos de cisteína no polipeptídeo de AvFAL sobre: (1) estabilidade acelerada; (2) formação de agregados; e (3) peguilação específica do sítio.

Estabilidade Acelerada

[00283] O efeito da substituição da serina dos resíduos de cisteína em AvFAL sobre a estabilidade *in vitro* foi determinado pela armazenagem dos mutantes de cisteína de AvFAL purificados, ou peguilados ou não peguilados, por vários períodos de tempo em 37°C, e depois medindo-se a atividade específica de FAL *in vitro* destas proteínas como descrito no Exemplo 3.

[00284] AvFAL do tipo selvagem e mutantes de cisteína de AvFAL, ou não peguilados ou peguilados, foram preparados como descrito no Exemplo 11.

[00285] Como mostrado na Figura 9A, as atividades específicas das proteínas de AvFAL não peguilado ficaram estáveis por pelo menos 5 dias em 37°C, e não foram adversamente afetadas pela substituição da serina dos resíduos de cisteína na posição 565, ou em ambas as posições 503 e 565. De forma semelhante, como mostrado na Figura 9B, as atividades específicas das proteínas de AvFAL peguiladas ficaram estáveis por pelo menos 6 dias em 37°C. O mutante único de AvFAL de cisteína, o AvFAL_C565S, apresentou estabilidade um tanto reduzida em comparação com a AvFAL do tipo selvagem e com o mutante duplo de AvFAL de cisteína, o AvFAL_C565SC503S, após 6 dias em 37°C.

Formação do Agregado

[00286] O efeito da substituição da serina dos resíduos de cisteína em AvFAL sobre a formação dos agregados protéicos na solução, foi determinado pela separação da AvFAL do tipo selvagem e dos mutantes de cisteína da AvFAL, ou por desnaturação e eletroforese em gel nativo, ou por SEC-HPLC.

[00287] As preparações de AvFAL purificadas foram separadas por eletroforese em gel ou sob condições de desnaturação (4 a 12% de NuPAGE Bis-Tris) ou condições nativas (8% de Tris-Gly, pH 8,3). As proteínas de AvFAL separadas foram coradas com Azul de Coomassie.

[00288] As preparações de AvFAL purificadas foram separadas por SEC-HPLC. As proteínas de AvFAL foram carregadas em uma coluna de gel TSK (G3000SWx1, 7,8 mm x 30 cm, 5 μm (Tosoh Bioscience, LLC)) em fosfato de sódio 20 mM, NaCl 300 mM, pH 6,9 e eluídas em um índice de fluxo de 0,5 ml/minuto. As proteínas de AvFAL separadas foram analisadas em um espectrômetro Agilent série 1100.

[00289] Os agregados estiverem presentes na preparação de AvFAL do tipo selvagem e nas preparações de AvFAL_C503S e AvFAL_C64S, mas não nas preparações de AvFAL_C565S e AvFAL_C565SC503S, conforme julgado ou por

eletroforese em gel (Figura 10A) ou SEC-HPLC (Figura 10B).

Peguilação específica do sítio

[00290] O efeito da substituição da serina dos resíduos de cisteína em AvFAL sobre a peguilação específica do sítio, foi determinado pela peguilação da AvFAL do tipo selvagem e pelo mutante de cisteína dupla AvFAL_C503SC565S, como descrito no Exemplo 6, e depois comparando-se a peguilação relativa nos resíduos de lisina de AvFAL: K2, K10, K32, K115, K145, K195, K301, K335, K413, K419, K493, K494 e K522.

[00291] Aproximadamente 100 μg (10 μl em 10 μg/μl) de proteínas de AvFAL não peguiladas ou peguiladas foram desnaturados em uréia 8 M. As proteínas desnaturadas foram então digeridas em um volume de reação de 100 μl com tripsina em pH 8,2, durante a noite (~20 horas) em 37°C. As proteínas digeridas com tripsina foram reduzidas pelo tratamento com 1 μl de DTT 1 M por 1 hora em 37°C, seguido por extinção com 3 μl de TFA a 15%. As proteínas digeridas foram separadas em uma coluna de fase reversa C18. O percentual de peguilação de cada um dos peptídeos de AvFAL peguilados foi calculado pelo mapeamento subtrativo dos peptídeos do peptídeo não peguilado correspondente.

[00292] Como mostrado na Figura 11, em uma relação de proteína de AvFAL:PEG de 1:3, não houve nenhuma diferença surpreendente no percentual de peguilação de qualquer dos resíduos de lisina (K) com a exceção possível de K419, em que o percentual de peguilação do mutante de cisteína dupla C565SC503S foi menor em comparação com a AvFAL do tipo selvagem. Entretanto, os resultados obtidos com o uso do mutante de cisteína dupla no aumento das relações de proteína de AvFAL:PEG, em que nenhum relacionamento de dose-resposta havia sido observado, em conjunto com o percentual relativamente pequeno da peguilação, indicam que as diferenças em K1419 observadas não são prováveis de serem significativas. Assim sendo, a substituição da serina dos resíduos de cisteína nas

posições 503 e 565 não parecem afetar a peguilação específica do sítio da AvFAL.

EXEMPLO 13: MECANISMO DA AGREGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE AvFAL

[00293] Estudos foram realizados para pesquisar o mecanismo da agregação das proteínas de AvFAL bacterianamente expressas.

[00294] Concentrando-se as preparações de AvFAL purificadas, e incubando-se as soluções protéicas concentradas por 2 horas em 37°C, a agregação acelerada das proteínas de AvFAL purificadas em solução. A agregação foi detectada pela separação das proteínas de AvFAL por SEC-HPLC. Para se determinar se a ligação cruzada do dissulfeto foi responsável pela agregação, ditiotreitol (DTT) 50 mM foi adicionado à solução protéica concentrada, seguido por incubação por 2 horas em 37°C.

[00295] As proteínas de AvFAL expressas em bactérias foram purificadas como descrito no Exemplo 2, e concentradas com o uso de um filtro de rotação (Millipore Biomax -10K NMWL). As proteínas foram giradas em cerca de 15.000 g por uns poucos minutos em uma Centrífuga Eppendorf 5415C. Quanto aos mutantes de cisteína que tendem a agregar (por exemplo, AvFAL_C503S e AvFAL_C64S), as proteínas foram concentradas em cerca de 20 mg/ml e incubadas por 2 horas em 37°C. Quanto aos mutantes de cisteína que sejam resistentes à agregação (por exemplo, AvFAL_C565S e AvFAL_C565SC503S), as proteínas foram concentradas em cerca de 40 mg/ml e incubadas por 2 horas em 37°C.

[00296] Como mostrado na Tabela 8, as preparações dos mutantes de cisteína de AvFAL, AvFAL_C64S e AvFAL_C503S formaram agregados após a incubação por 2 horas em 37°C. Como esperado, esta agregação foi exacerbada quando as proteínas de AvFAL foram concentradas antes da incubação por 2 horas em 37°C. A agregação pôde ser bloqueada pela exposição das proteínas concentradas ao DTT, indicando que a agregação era devida à ligação cruzada do dissulfeto. Ao contrário, as preparações dos mutantes purificados de cisteína de

AvFAL, os AvFAL_C565S e AvFAL_C565SC503S, não formaram agregados após a incubação por 2 horas em 37°C, indicando que o resíduo de cisteína na posição 565 se acha envolvido na agregação da AvFAL através da ligação cruzada do dissulfeto.

TABELA 8: AGREGAÇÃO DOS MUTANTES DE CISTEÍNA DA AvFAL RELACIONADA À LIGAÇÃO CRUZADA DO DISSULFETO

Proteína de AvFAL	Tratamento	Formação do Agregado
AvFAL_C503S	37 °C/2 h	+
AvFAL_C64S	37 °C/2 h	+
AvFAL_C565S E1	37 °C/2 h	-
AvFAL_C565S E2	37 °C/2 h	-
AvFAL_C565SC503S	37 °C/2 h	-
AvFAL_C503S	Concentrado + 37 °C/2 h	++
AvFAL_C64S	Concentrado + 37 °C/2 h	++
AvFAL_C565S E1	Concentrado + 37 °C/2 h	-
AvFAL_C565S E2	Concentrado + 37 °C/2 h	-
AvFAL_C565SC503S	Concentrado + 37 °C/2 h	-
AvFAL_C503S	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-
AvFAL_C64S	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-
AvFAL_C565S E1	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-
AvFAL_C565S E2	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-
AvFAL_C565SC503S	Conc. + DTT + 37 °C/2 h	-

[00297] Para se determinar quais os resíduos de cisteína que existem como sulfidrilas livres, uma preparação de AvFAL purificada foi desnaturada na presença de uréia 8 M, alquilada por iodoacetamida, digerida com tripsina, e analisada por LC/MS. Todos os resíduos de cisteína da AvFAL foram rotulados por iodoacetamina, indicando que todos os resíduos de cisteína da AvFAL bacterianamente expressa existem como sulfidrilas livres.

[00298] Para se determinar quais os resíduos de cisteína que se acham

presentes sobre a superfície da proteína nativa, uma preparação de AvFAL purificada foi primeiro tratada com N-etilmaleimida (NEM), depois desnaturada na presença de uréia 8 M, alquilada por iodoacetamina, digerida com tripsina e analisada por LC/MS. Os resíduos de cisteína nas posições 235 e 424 não foram alquilados pela NEM, e o resíduo de cisteína na posição 318 foi apenas parcialmente alquilado pela NEM, indicando que os resíduos de cisteína nas posições 64, 503 e 565 se acham sobre a superfície da AvFAL nativa, e o resíduo de cisteína na posição 318 se acha parcialmente exposto sobre a superfície da AvFAL nativa.

[00299] Para se determinar quais resíduos de cisteína se acham envolvidos na ligação cruzada de dissulfeto entre cadeias, 67 μl de uma solução de 0,7 mg/ml da preparação de AvFAL do tipo selvagem não peguilada foi desnaturada em uréia 8 M por 1 hora em 37°C, e depois digerida em um volume de reação de 100 μl com tripsina, em um pH de 8,2, durante a noite (~17,5 horas) em 25°C. As proteínas digeridas com tripsina foram separadas e analisadas por espectrometria de massa, em que os peptídeos correspondentes aos pares de dissulfetos previstos, foram identificadas e quantificadas como contagens totais de íons (TIC).

[00300] A Tabela 9 mostra que os pares de dissulfeto foram detectados quanto a C503-C503, C503-C565, C565-C318 e C565-C565. Os resíduos de cisteína na posição 565, e em uma menor amplitude na posição 503, foram observados nos pares de dissulfeto na preparação de AvFAL purificada.

TABELA 9: PARES DE DISSULFETO NOS AGREGADOS

Par de Dissulfeto	Resultados (TIC/1000)
C64-C318	n.d.
C64-C64	n.d.
C64-C503	n.d.
C64-C565	n.d.
C503-C318	n.d.
C503-C503	11

C503-C565	112
C565-C318	13
C565-C565	37
C318-C318	n.d.

n.d. = não detectado

[00301] Os estudos foram realizados para determinar se mecanismos adicionais, além da ligação cruzada do dissulfeto, poderiam estar envolvidos na agregação da proteína da AvFAL.

[00302] As preparações de AvFAL purificadas foram incubadas ou com 0,05% de Tween ou EDTA 10 mM, e depois separadas por SEC-HPLC como descrito no Exemplo 12. O Tween reduz a agregação protéica por causa das interações hidrofóbicas, e o EDTA reduz a agregação protéica por causa da presença de cátions divalentes. Como mostrado na Figura 12, a exposição a 0,05% de Tween ou de EDTA 10 mM não teve nenhum efeito sobre a agregação protéica da AvFAL. O pico adicional em 10 minutos na AvFAL tratada com EDTA 10 mM foi devido à absorbância do EDTA em 210 nm.

[00303] Para ainda pesquisar o papel da ligação cruzada do dissulfeto na agregação protéica de AvFAL, a AvFAL purificada foi reduzida pelo tratamento com DTT e, depois, dessalinizada antes da separação por SEC-HPLC. Como mostrado na Figura 13A, a agregação protéica da AvFAL foi minimizada pelo tratamento com DTT, e os agregados receberam novas formas em seguida à incubação por 18 horas em 37°C. Ao contrário, como mostrado na Figura 13B, os agregados não receberam novas formas logo que as cisteínas superficiais da AvFAL tenham sido modificadas (isto é, alquiladas) mediante tratamento com N-metilmaleimida (NEM) após exposição ao DTT, mas antes da dessalinização e incubação por 18 horas em 37°C.

[00304] Com base no acima, a agregação da AvFAL bacterianamente expressa parece ter sido devida unicamente à formação de ligações dissulfeto entre cadeias, e não devida aos efeitos hidrofóbicos ou à presença de cátions divalentes.

Os resíduos de cisteína nas posições 565 e 503 são envolvidos na formação de ligações dissulfeto entre cadeias nas preparações da AvFAL.

EXEMPLO 14: EFEITOS DAS VARIANTES DE AvFAL (MUTANTES DE CISTEÍNA) E SUAS FORMAS PEGUILADAS EM CAMUNDONGOS

[00305] A finalidade destes estudos foi determinar o efeito da substituição da serina dos resíduos de cisteína nas posições 503 e 565 no polipeptídeo de AvFAL sobre os níveis de fenilalanina (PHE) *in vivo* em camundongos.

[00306] As formas peguiladas do mutante de cisteína dupla de AvFAL, AvFAL_C565SC503S foram testadas quanto à atividade *in vivo* em camundongos ENU2 homozigotos (também conhecidos como $BTBR^{enu2}$) basicamente como descrito no Exemplo 8. O camundongo ENU2 é mutante homozigoto no *lócus* PAH, resultando em um animai com HPA severo. Os elevados níveis de Phe plasmático tornam este animal o modelo apropriado para avaliar a capacidade da FAL para reduzir a Phe plasmática.

[00307] No primeiro estudo, o mutante AvFAL_C565SC503S de cisteína dupla de AvFAL foi testado em várias doses. Os camundongos ENU2 (machos e fêmeas) foram divididos em grupos de 5 doses: 4 grupos de teste (n=4) e um grupo veículo (n=2). Cada camundongo recebeu 8 doses s.c. semanais de veículo, o mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL em baixa dose (0,25 IU), o mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL em dose média (1,0 IU), o mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL em dose elevada (4,0 IU), ou AvFAL peguilada do tipo selvagem (4,0 IU). O plasma foi colhido em pré-dose e em 48 horas após a dose (até o dia 57) e foi analisado quanto aos níveis de Phe. O soro foi também colhido em pré-dose e em 48 horas após a dose (até o dia 57) para análise dos níveis de anticorpos anti-AvFAL. Os camundongos foram também pesados uma vez por semana, começando-se 2 dias antes da primeira dose (até o dia 40).

[00308] Dois camundongos morreram durante o estudo, um camundongo

tratado com veículo e um camundongo tratado com o mutante de cisteína dupla peguilado AvFAL em baixa dose. Como mostrado na Figura 14, uma redução dependente da dose nos níveis de Phe foi observada no plasma 48 horas após cada injeção s.c. de mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL. Em doses equivalentes, não houve qualquer diferença nos níveis de Phe plasmática entre os camundongos tratados com AvFAL peguilada do tipo selvagem ou mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL; Como mostrado na Figura 15, não houve também nenhuma diferença significativa nos pesos corporais entre os camundongos tratados com veículo, AvFAL do tipo selvagem peguilada, ou mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL. É provável que nenhuma diferença significativa nos pesos corporais tenha sido observada, tendo em vista que tanto os camundongos machos quanto os fêmeas foram usados no estudo.

[00309] Os títulos dos anticorpos anti-AvFAL nestes camundongos foram analisados com um ensaio ELISA indireto. Neste ensaio, as placas microtituladoras foram cobertas com AvFAL, bloqueadas, e depois expostas a soros apropriadamente diluídos de cada sangue dos camundongos. A AvFAL, que foi ligada à superfície das placas microtituladores, foi reconhecida e ligada pelos anticorpos específicos da AvFAL presentes nas amostras de soro. Anticorpos de IgG anti-camundongo de cabra detectavelmente rotulados detectaram os anticorpos anti-AvFAL ligados. As amostras de soro foram inicialmente diluídas a 1:50, e analisadas em comparação com o “ponto de corte”, as quais vieram do soro dos camundongos reunidos diluído a 1:50. As amostras com menor sinal do que o ponto de corte foram relatadas como <50, ou “Negativas”. As amostras restantes, consideradas “Positivas”, foram ainda diluídas em série a 1:3, titulando-se a uma diluição em que o sinal havia caído abaixo do ponto de corte. O fator de diluição mais elevado, que deu um sinal positivo (isto é, mais elevado do que o ponto de corte) foi relatado como o título daquela amostra. Durante esta série de títulos, uma mudança de 3 vezes do título pode não refletir uma diferença

significativa do anticorpo detectado. porque a diferença poderia ser o resultado de uma mudança mínima de sinal no nível do ponto de corte.

[00310] Como mostrado na Tabela 10, os títulos de anticorpos anti-AvFAL foram mais baixos nos camundongos tratados com o mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL em comparação com os camundongos tratados com uma dose equivalente (4,0 IU) de AvFAL peguilada do tipo selvagem. Embora nenhuma resposta de dose nítida tenha sido observada, os camundongos tratados com a alta dose (4,0 IU) de mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL tiveram títulos de anticorpos anti-AvFAL mais elevados do que os camundongos tratados com baixa dose (0,25 IU) do mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL.

TABELA 10: TÍTULOS DE IgG ANTI-AvFAL

Proteína de AvFAL Peguilada	Amostra	Pre	D 8	D 15	D 22	D 29
AvFAL C565SC503S (0,25 IU)	S 2 03	<50	50	<50	50	50
	S 2 04	<50	50	50	50	450
	S 2 05	<50	<50	<50	<50	<50
	S 2 06	<50	<50	50	50	50
AvFAL C565SC503S (1,0 IU)	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
AvFAL C565SC503S (4,0 IU)	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 AvFAL (4,0 IU)	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 de AvFAL Peguilada	Amostra	Pre	D 36	D 43	D 50	D 57
AvFAL_C565SC503S (0,25 TU)	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
AvFAL C565SC503S (1,0 1U)	S 3 07	<50	50	150	>1350	150
	S 3 08	<50	<50	<50	<50	<50
	S3 09	<50	450	>1350	>1350	450
	S 3 10	<50	<50	50	50	<50
AvFAL C565SC503S (4,0 IU)	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
Proteína de AvFAL	Amostra	Pre	D 36	D 43	D 50	D 57
WT AvFAL (4,0 IU)	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

*Nenhuma amostra/dados não disponíveis.

[00311] Os títulos de IgG anti-AvFAL reduzidos nos camundongos que receberam a administração de 4,0 IU de mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL em comparação com 4,0 IU de AvFAL peguilada do tipo selvagem, foram mantidos na totalidade do estudo.

[00312] No segundo estudo, o mutante de cisteína dupla de AvFAL, AvFAL_C565SC503S foi testado em diferentes relações de peguilação. Camundongos ENU2 machos foram divididos em 5 grupos de dose (n=4) e um grupo de veículo (n=2). Cada camundongo recebeu 8 doses de veículo s.c. semanalmente, o mutante de cisteína dupla peguilada de baixa dose AvFAL (4 IU e relação de AvFAL:PEG de 1:1,6), mutante de cisteína dupla peguilada de dose média AvFAL (4

IU e relação de AvFAL:PEG de 1:2,4), mutante de cisteína dupla peguilada de alta dose AvFAL (4 IU e relação de AvFAL:PEG de 1:3), ou AvFAL do tipo selvagem peguilada (4 IU e relação de AvFAL:PEG de 1:3). O plasma foi em pré-dose e em 4 dias após a dose (até o dia 61) e analisado quanto aos níveis de Phe. O soro também foi coletado em pré-dose em 4 dias após a dose (até dia 57) para análise dos níveis de anticorpos anti-AvFAL. Os camundongos foram também pesados uma vez por semana, iniciando-se 2 dias antes da primeira dose (até o dia 40).

[00313] Um camundongo tratado com veículo morreu durante o estudo. Como mostrado na Figura 16, uma redução dependente da relação de PEG nos níveis de Phe foi observada no plasma 4 dias após cada injeção s.c. do mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL. Nas relações equivalentes de PEG, não houve nenhuma diferença nos níveis de Phe do plasma entre os camundongos tratados com AvFAL do tipo selvagem peguilada ou com o mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL. Como mostrado na Figura 17, os pesos corporais dos camundongos tratados com AvFAL peguilada do tipo selvagem ou mutante de cisteína dupla pequilada AvFAL, foram significativamente mais elevados do que os camundongos tratados com veículo.

[00314] Os títulos de anticorpos anti-AvFAL nestes camundongos foram analisados com o ensaio ELISA indireto descrito acima.

[00315] Como mostrado na Tabela 11, os títulos de anticorpos anti-AvFAL foram inferiores nos camundongos tratados com o mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL em comparação com os camundongos tratados com uma dose equivalente de AvFAL do tipo selvagem peguilada tendo a mesma relação (1:3) de AvFAL para PEG. Uma resposta de dose inversa foi observada entre os títulos de anticorpos anti-AvFAL e a relação de AvFAL para PEG, consistente com a expectativa de que a peguilação das proteínas, tais como AvFAL, seja associada com a imunogenicidade reduzida *in vivo*.

TABELA 11: TÍTULOS DE IgG ANTI-AvFAL

Proteína de AvFAL peguilada	Amostra	Pre	D 15	D 28	D 43	D 64

WT AvFAL (PEG 1:3 NOF)	S I 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
AvFAL 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
AvFAL 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
AvFAL 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
Veículo	S 5 05	<50	<50	<50	<50	N/A*
	S 5 15	<50	<50	<50	<50	<50

*N/A: nenhuma amostra de soro para este ponto do tempo.

[00316] Os resultados acima mostram que o mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL, AvFAL_C565SC503S, tem atividade de enzima FAL *in vivo* que é comparável à AvFAL peguilada do tipo selvagem. Tendo em vista que a AvFAL do tipo selvagem não peguilada não tinha atividade de enzima de FAL *in vivo* (ver Exemplo 8), concluiu-se que as variantes de AvFAL, incluindo o mutante de cisteína dupla peguilada AvFAL, AvFAL_C565SC503S, e a AvFAL peguilada do tipo selvagem, têm atividade de conversão da fenilalanina mais elevada do que a AvFAL do tipo selvagem.

[00317] Os resultados acima também mostram que a variante de AvFAL peguilada, que tenha agregação protéica reduzida *in vitro* por causa das substituições da cisteína por serina, em ambas as posições 503 a 565. tem imunogenicidade reduzida em comparação com a AvFAL peguilada do tipo selvagem. Tendo em vista que a própria peguilação é associada com a imunogenicidade reduzida, concluiu-se que as variantes de AvFAL têm imunogenicidade reduzida in vivo em comparação com a AvFAL do tipo selvagem.

EXEMPLO 15: GERAÇÃO DAS FORMA REPEGUILADAS DAS VARIANTES DE AvFAL

[00318] Estudos foram realizados para se determinar se as formas peguiladas das variantes de AvFAL poderiam ser submetidas a repeguilação para aumentar a quantidade de peguilação, isto é, o percentual de moléculas de PEG sobre os resíduos de lisina de AvFAL e, caso positivo, se as formas repequiladas das variantes de AvFAL retêm a atividade enzimática *in vitro* e têm qualquer propriedade aprimorada *in vitro*, a saber, imunogenicidade reduzida.

Peguilação das Variantes de AvFAL

[00319] O mutante de cisteína dupla AvFAL, AvFAL_C565SC503S, foi peguilado basicamente como descrito no Exemplo 6 em relações diferentes de FAL:PEG (isto é, AvFAL_C565SC503S:SUNBRIGHT ME-200HS 20 kDa de PEG ativado por NHS (NOF)).

[00320] Resumidamente, a mistura de reação padrão continha: 7 mg/ml (correspondente a resíduos de lisina 2 mM) de AvFAL_C565SC503S e 2, 3, 4 ou 6 mM de mPEG20K-NHS (éster de metoxipolietilenoglicol-carboximetil-N-hidroxissuccinimida, 20 kDa, SUNBRIGHT ME-200HS, NOF) em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 8,5, correspondente à relação molar de 1:1, 1:1,5, 1:2 ou 1:3, respectivamente, dos resíduos totais de lisina de AvFAL para as moléculas de PEG (ver Tabela 12). Após uma incubação de 3 horas na temperatura ambiente, a mistura

de reação foi trocada de tampão para fosfato de potássio 200 mM, pH 8,5, e concentrada a mais do que 20 mg/ml, com o uso de filtração de fluxo tangencial (Vivaflow 50 ou 200, polietersulfona ou membrana de celulose regenerada, 100 kDa de MWCO, Sartorius) na preparação para a etapa de repegulação subsequente.

TABELA 12: CONDIÇÕES DE PEGUILAÇÃO E REPEGUILAÇÃO PARA AvFAL

PEGuilação			RePEGuilação		
AvFAL (mg/ml)	Resíduos totais de lisina. (^{mM})	mPEG20K-NHS (mM)	rAvFAL-PEG (mg/m/)	Resíduos totais de lisina. (mM)	mPEG20K-NHS (mM)
7	2	6	-	-	-
7	2	6	7	2	6
7	2	6	3,5	1	3
7	2	6	7	2	2
7	2	6	7	2	4
7	2	6	7	2	6
7	2	6	10,5	3	6
7	2	2	-	-	-
7	2	2	7	2	2
7	2	2	7	2	6
7	2	2	10,5	3	6
7	2	2	14	4	6
7	2	3	7	2	6
7	2	4	7	2	6

Repegulação de Variantes de AvFAL Peguiladas

[00321] AvFAL_C565SC503S, peguilada em diferentes relações de FAL:PEG, foi repeguilada basicamente como descrito no Exemplo 6, com o uso de várias concentrações de enzima peguilada, e diferentes quantidades de diferentes relações

de resíduos de lisina na enzima de AvFAL e moléculas de SUNBRIGHT ME-200HS 20 kDa PEG ativado por NHS (NOF).

[00322] Para cada reação de repeguilação, o material de partida foi uma AvFAL_C565SC503S peguilada (rAvFAL-PEG) que foi concentrada a mais do que 20 mg/ml em fosfato de potássio 200 mM, pH 8,5. A mPEG20K-NHS foi pesada separadamente para cada reação de repeguilação, e foi recolocada em suspensão em um volume mínimo de água. A rAvFAL-PEG, diluída no tampão quando necessário, foi adicionada diretamente à solução de mPEG20K-NHS até alcançar a concentração final indicada na Tabela 12. As reações de repeguilação foram deixadas prosseguir por 3 horas na temperatura ambiente, e depois extintas por diluição por duas vezes com TrisHCl 25 mM, pH 7,3. O método de filtração de fluxo tangencial (Vivaflow 50 ou 200, polietersulfona ou membrana de celulose regenerada, 100 kDa de MWCO, Sartorius) foi usado para a troca de tampão e concentrar as amostras de rAvFAL-PEG repeguiladas em Tris HCL 10 mM, NaCl 135 mM, L-Phe 1 mM, pH 7,3. As amostras finais de rAvFAL-PEG repeguiladas foram ainda concentradas, quando necessário, com o uso de concentração centrífuga.

Métodos de Caracterização In Vitro

[00323] Ensaio de Proteína Total: As concentrações das amostras de rAvFAL-PEG foram determinadas pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA), usando-se um kit de ensaio comercialmente disponível da Pierce (catálogo 23227) com uma albumina de soro bovino como um padrão. Resumidamente, 25 μl de amostras e padrões foram incubados com 200 μl do reagente de BCA em 37°C por 30 minutos. A absorbância em 562 nm foi lida no espectrofotômetro de microplacas SPECTRAmax PLUS (Molecular Devices Corporation).

[00324] Ensaio da Atividade de rAvFAL: As atividades específicas das amostras de rAvFAL-PEG peguiladas e repeguiladas foram determinadas com base no protocolo de ensaio de atividade de FAL estabelecido conforme descrito no

Exemplo 3. Resumidamente, após a adição das amostras de proteína (25 a 50 μl) à reação do ensaio de 1 ml, o aumento na OD_{200} foi monitorado como L-Phe e convertido para ácido trans-cinâmico. Quando necessário, as amostras eram diluídas no tampão de diluição do ensaio (TrisHCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 7,3) antes do ensaio. Cada ponto de dados representava um valor médio de três medições independentes.

[00325] Eletroforese Capilar em Gel (CGE): As análises de CGE foram realizadas com o uso do Kit de Análises de SDS-MW ProteomeLab da Beckman-Coulter (catálogo 390953). Amostras de rAvFAL-PEG e rAvFAL-PEG-RP1 foram aquecidas em 95 °C por 5 minutos na presença de SDS e de β-mercaptoetanol, e depois foram carregadas em capilares (sílica fundida PA800 CE, 23 cm) no Sistema de Eletroforese Capilar P/ACE MDQ da Beckman-Coulter. Os perfis da CGE apresentam a quantidade de absorbância de UV em 214 nm. Cada amostra de CGE continha 10 kDa de marcador de migração como uma referência para as análises. Os capilares foram recondicionados entre as amostras de rAvFAL-PEG.

[00326] Ensaio de TNBS: Um ensaio de ácido trinitrobenzenossulfônico foi usado para prover uma estimativa dos três grupos de amina livre presentes nas amostras de rAvFAL-PEG peguiladas e repeguiladas.

[00327] Mapeamento de Peptídeo: O mapeamento de peptídeo tríptico das amostras de rAvFAL-PEG e rAvFAL-PEG- foi realizado como descrito no Exemplo 10 para determinar o percentual de peguilação nos resíduos de lisina nas proteínas da variante de AvFAL. A quantidade de peguilação, isto é, o percentual de moléculas de PEG sobre os resíduos de lisina de AvFAL, K10, K32, K115, K145, K195, K301, K335, K413, K493/K494 e K522, da AvFAL_C565SC503S repeguilada, foi determinado.

Caracterização In Vitro das Variantes de AvFAL Peguiladas e Repeguiladas

[00328] Atividade da Enzima rAvFAL: Como mostrado na Figura 18 (parte superior), a peguilação ou repeguilação causou uma redução temporária na atividade da enzima de rAvFAL *in vitro*. Isto pareceu ser devido à peguilação reversível nos

resíduos de tirosina específicos próximo ao sítio ativo catalítico. Em comparação com a peguilação única, a repeguilação pareceu intensificar o efeito das reações de peguilação sobre a atividade da enzima de rAvFAL, isto é, reduzir temporariamente sua atividade específica, a qual gradualmente se recuperava no decorrer do tempo. Uma concentração mais elevada de PEG na reação de peguilação correlacionou-se com uma redução temporária mais elevada na atividade específica. Entretanto, após umas poucas semanas, em 4°C, a atividade específica da rAvFAL-PEG repeguilada, primeiro gerada com o uso de uma variedade de relações de FAL:PEG e concentrações da enzima e moléculas de PEG (as concentrações de mM dos resíduos de lisina em AvFAL e PEG são indicados), alcançou pelo menos cerca de 80% da AvFAL-PEG unicamente peguilada gerada com o uso de uma relação de FAL:PEG de 1:3 (resíduos de lisina 2 mM:PEG 6 mM, círculos cheios). Além disso, as enzimas de AvFAL-PEG peguiladas e repeguiladas experimentaram índices comparáveis de recuperação da atividade após a peguilação.

[00329] Como mostrado na Figura 18 (na parte inferior), uma tendência semelhante foi observada quando a rAvFAL-PEG peguilada foi primeiro gerada com o uso de uma relação de FAL:PEG de 1:1 (resíduos de lisina 2 mM:PEG 2 mM, quadrados cheios). Além de tudo, embora a atividade de AvFAL tenha afetado temporariamente a repeguilação, as atividades específicas resultantes da rAvFAL-PEG repeguilada estiveram dentro de faixas aceitáveis em comparação com a rAvFAL-PEG unicamente peguilada gerada em uma relação de FAL:PEG de 1:3.

[00330] Análise de CGE da rAvFAL Peguilada e Repeguilada: As análises de CGE indicaram que a repeguilação aumentou a extensão global da peguilação, em relação à peguilação única. Como mostrado na Figura 19A, a repeguilação resultou na mobilidade eletroforética reduzida da rAvFAL-PEG, envolvendo um tamanho molecular aumentado devido à ligação das moléculas de PEG adicionais. Além disso, o grau de peguilação correlacionou-se bem com a concentração de PEG usada

durante a etapa de repeguilação. Como mostrado na Figura 19B, sem considerar as condições de reação durante a primeira etapa de peguilação, 6 mM ou mais de concentração de mPEG20K-NHS foi igualmente eficaz em aumentar a peguilação da rAvFAL-PEG. Resumindo, em comparação com a rAvFAL unicamente peguilada, a rAvFAL-PEG repeguilada claramente apresentou mobilidade de CGE reduzida e, em consequência, massa molecular aumentada.

[00331] Aminas Livres na rAvFAL-PEG após a Repeguilação: O ensaio de TNBS foi realizada para estimar a quantidade de grupos de amina livre presentes na rAvFAL-PEG repeguilada em relação à rAvFAL-PEG unicamente peguilada. Como mostrado na Tabela 13, a repeguilação na presença de concentrações mais elevadas de PEG, tal como 6 mM, mais significativamente reduziu a quantidade de aminas livres presentes na proteína de rAvFAL, indicando um aumento global na peguilação. Sob as condições aqui usadas, a maioria das aminas livre na rAvFAL não peguilada, que se acham disponíveis para a modificação química, são eficazmente peguiladas após a repeguilação.

TABELA 13: AMINAS LIVRE PRESENTES NA rAvFAL-PEG REPEGUILADA

	[AvFAL] µM	aminas livres µM	aminas livres/monômero de rAvFAL	mol de PEG/mol de rAvFAL
rAvFAL	13,9	204,0	14,6	-
2 mM Lys: 6 mM PEG	23,5	66,8	2,8	11,8
2:6 and 1:3	22,9	42,3	1,8	12,8
2:6 and 2:2	33,1	118,1	3,6	11,0
2:6 and 2:4	32,9	96,3	2,9	11,7
2:6 and 2:6	26,3	16,8	0,6	14,0
2:6 and 3:6	30,5	37,2	1,2	13,4

[00332] Percentual de Peguilação dos Resíduos de Lisina após a Repeguilação: Como mostrado na Figura 20, o mapeamento do peptídeo tríptico

indicou que a repeguilação melhorou o percentual de peguilação dos resíduos de lisina sobre a rAvFAL-PEG. Exceto quanto ao resíduo de lisina na posição 10 da AvFAL, que já foi 100% peguilado durante a etapa de peguilação única, os resíduos de lisina não conjugados remanescentes foram objetivados para a peguilação após a repeguilação. De forma muito notável, a peguilação no resíduo de lisina na posição 301 da AvFAL aumentou em tanto quanto 500% após a repeguilação. As condições de repeguilação na presença de concentrações mais elevadas de MPEG20K-NHS ativado, tal como 6 mM, pareceu serem mais eficazes em aumentar a extensão de peguilação em rAvFAL-PEG do que as concentrações de PEG mais baixas, tais como 2 mM.

EXEMPLO 16: EFEITO DE REPEGUILAR UMA VARIANTE DE AvFAL-PEG EM CAMUNDONGOS

[00333] A AvFAL_C565SC503S (rAvFAL-PEG-RP1 repeguilada, gerada com o uso de uma relação de FAL:PEG de 1:3 nas primeira e segunda reações de peguilação como descrito no Exemplo 15, foi comparada à AvFAL_C565SC503S (rAvFAL- PEG), unicamente peguilada, gerada com o uso de uma relação de FAL:PEG de 1:3 como descrito nos Exemplos 6 e 15, em relação à sua capacidade de reduzir os níveis de Phe do plasma em um modelo de camundongo de PKU, e induzir uma resposta de anticorpo *in vivo.*

[00334] A atividade específica das duas enzimas de variantes de AvFAL peguiladas e repeguiladas, foi medida como descrito no Exemplo 3. A rAvFAL-PEG-RP1 foi observada ter uma atividade específica (1,17 U/mg), que foi cerca de 20% inferior à atividade especifica da rAvFAL-PEG (1,47 U/mg).

[00335] As formas peguiladas e repeguiladas das AvFAL_C565SC503S, rAvFAL-PEG e rAvFAL-PEG-RP1 respectivamente, foram testadas quanto à atividade in vivo em camundongos ENU2 homozigotos (também conhecidos como $BTBR^{ENU2}$) basicamente como descrito no Exemplo 8. O projeto de estudo é mostrado abaixo na

Tabela 14.

TABELA 14: PROJETO DO ESTUDO *IN* VIVO PARA COMPARAR AS FORMAS PEGUILADAS E REPEGUILADAS DE UMA VARIANTE DE AvFAL

Grupo#	N	Artigo de teste	período de dosagem (semanas)	Dose (mg/kg)	Atividade Nominal do Artigo de Teste (TU/mL)	volume da Dose (mg/kg)	Total das Doses e Frequências das Doses
1	4	rAvFAL-PEG	Semanas 1 - 8	80	12	10	14 Administração 1 vez por semana (dia 1 De uma semana de 7)
			Semanas 9 - 14	20	3		
2	4	rAvFAL-PEG-RPI	Semanas 1 - 8	80	12		
			Semanas 9 - 14	20	3		
3	4	rAvFAL-PEG	Semanas 1 - 8	80	12		
		rAvFAL-PEG-RP1	Semanas 9 - 14	20	3		

[00336] Dois grupos de camundongos, grupos 1 e 2, receberam por via subcutânea uma alta dose semanal (80 mg/kg) ou de rAvFAL-PEG ou de rAvFAL-PEG-RP1, respectivamente, por 8 semanas, seguido por uma baixa dose semanal (20 mg/kg) de rAvFAL-PEG ou de rAvFAL-PEG-RP1, respectivamente, por 6 semanas. Um grupo de camundongos, grupo 3, recebeu a administração de dose elevada de rAvFAL-PEG seguida pela dose baixa de rAvFAL-PEG-RP1. O plasma foi colhido em pré-dose e em vários dias após a dose, e analisado quanto aos níveis de Phe. Os níveis de Phe do plasma foram medidos como descrito no Exemplo 8, e os dados obtidos são mostrados na Figura 21. O soro foi também colhido em pré-dose e em vários dias após a dose, para a análise dos níveis de anticorpos anti-AvFAL. Os títulos de IgG anti-rAvFAL do soro foram medidos como descrito no Exemplo 14, e os dados obtidos são mostrados na Tabela 15.

[00337] Como mostrado na Figura 21, para todos os 3 grupos, a dosagem

subcutânea de 80 mg/kg semanalmente de 7 a 8 semanas do rAvFAL-PEG (DP, círculos cheios ou triângulos invertidos cheios) ou rAvFAL-PEG-RP1 (2xPEG, círculos abertos) resultou na estabilização dos níveis de Phe do plasma em <200 μM. Após a estabilização, uma redução da dosagem subcutânea para 20 mg/kg semanais com rAvFAL-PEG resultou em níveis de Phe do plasma de 4 dias para <200 μM. Os níveis de Phe do plasma em camundongos ENU2 tratados com 20 mg/kg de rAvFAL-PEG (DP, círculos cheios) foram menores do que nos camundongos tratados com 20 mg/kg de rAvFAL-PEG-RP1 (2xPEG, círculos abertos ou triângulos invertidos cheios), possivelmente devido à atividade específica mais elevada da rAvFAL-PEG unicamente peguilada em comparação com aqueles da rAvFAL-PEG-RP1 duplamente peguilada.

[00338] Como mostrado na Tabela 15, os títulos de IgG anti-AvFAL foram menores nos camundongos ENU2 que receberam rAvFAL-PEG-RP1 (grupo 2) do que aqueles que receberam rAvFAL-PEG (grupos 1 e 3). Isto indicou que a repeguilação de uma variante de AvFAL para ter uma quantidade aumentada de peguilação, em particular com 20 kDa de moléculas de PEG lineares, foi associada com uma imunogenicidade reduzida in vivo.

TABELA 15: TÍTULOS DE IgG ANTI-AvFAL

Proteína de AvFAL Peguilada	Amostra	D -2	D 14	D 26	D 42	D 68
rAvFAL-PEG	1-1	<50	50	150	150	150
	1-2	<50	50	1350	450	150
	1-3	150	450	4050	1350	1350
	1-4	150	1350	450	450	1350
rAvFAL-PEG-RP I	2-1	<50	<50	50	150	50
	2-2	150	50	<50	50	<50
	2-3	<50	<50	<50	50	<50
	2-4	<50	<50	<50	<50	<50
rAvFAL-PEG semanas 1 a 8, depois	3-1	50	450	1350	1350	450
rAvFAL-PEG-RP1 semanas 9 a 14.	3-2	50	1350	1350	1350	1350
	3-3	<50	450	4050	1350	1350

	3-4	<50	50	450	150	450

[00339] Em resumo, a repeguilação de uma variante de AvFAL-PEG com 20 kDa de moléculas de PEG lineares para aumentar o percentual de peguilação em vários resíduos de lisina em AvFAL, foi associada com uma atividade enzimática levemente reduzida *in vitro*, mas, de forma importante, reduziu a imunogenicidade *in vivo*.

EXEMPLO 17: AVALIAÇÃO CLÍNICA COM COMPOSIÇÕES DE FAL PROCARIÓTICAS

[00340] O seguinte exemplo fornece orientação sobre os parâmetros a serem usados para a avaliação clínica das composições contendo FAL procariótica ou suas variantes, mutantes e fragmentos biologicamente ativos (“FAL”) nos métodos terapêuticos da presente invenção. Como aqui completamente examinado, a FAL será usada no tratamento de HPA, incluindo HPA, fenilcetonúria branda (PKU) e PKU clássica. Os testes clínicos serão conduzidos de modo que forneçam uma avaliação das doses de FAL orais ou subcutâneas para segurança, farmacocinética e resposta inicial tanto de pontos finais de substituição quanto clínicos definidos. O teste será conduzido por um mínimo, não necessariamente limitado, de 24 semanas para coletar suficiente informação de segurança para os 100 indivíduos avaliáveis. A dose inicial para os testes variará de cerca de 0,001 a cerca de 1,0 mg/kg/semana. Na eventualidade de que esta dose não produza uma redução nos níveis de fenilalanina (Phe) plasmática em excesso em um indivíduo, ou produza um benefício clínico direto significativo medido como uma capacidade para aumentar a ingestão de Phe oral diária sem aumento nos níveis de Phe plasmático, a dose deve ser aumentada quando necessário, e mantida por um período mínimo adicional, mas não necessariamente limitado, de 24 semanas, para estabelecer segurança e para se avaliar ainda a eficácia.

[00341] As medições da segurança incluirão eventos adversos, reações alérgicas, painel da química clínica completo (função dos rins e do fígado), urinálise,

e CBC com diferencial. Além disso, outros parâmetros incluindo a redução nos níveis de Phe de sangue, testes neuropsicológicos e cognitivos, e avaliações globais, também serão monitorados. O presente exemplo também considera a determinação dos parâmetros farmacocinéticos do medicamento na circulação, e a distribuição geral e a meia-vida da FAL no sangue. Espera-se que estas medidas ajudem a relacionar a dose com a resposta clínica.

Métodos

[00342] Indivíduos que tenham elevados níveis de Phe plasmático serão submetidos a uma linha de referência, uma história médica e um exame físico, testes neuropsicológicos e cognitivos, um conjunto padrão de testes de laboratório clínico (CBC, Painel 20, CH50, UA), níveis de proteínas urinárias, níveis de diidropteridina redutase (DHPR), e um painel de aminoácidos séricos do sangue de jejum (plasma). O indivíduo será seguido rigorosamente com visitas semanais ao clínico. Os indivíduos retornarão ao clínico para uma completa avaliação uma semana após completar o período de tratamento. Caso o aumento da dose seja necessário, os indivíduos seguirão o mesmo programa delineado acima. A segurança será monitorada na totalidade dos exames.

Diagnóstico e Critérios de Inclusão/Exclusão

[00343] O indivíduo pode ser homem ou mulher, com um diagnóstico de HPA ou de PKU brando documentado, confirmado por testes genéticos e evidência de elevados níveis de Phe no sangue. O estudo incluirá indivíduos de HPA ou de PKU que não seguem precisamente o controle dietético. Os indivíduos femininos de gravidez potencial devem fazer um teste negativo de gravidez (β-hCG da urina) logo antes de cada dosagem, e devem ser advertidos quanto ao uso de um método aceito do ponto de vista médico de contracepção na totalidade do estudo. Uma indivíduo será excluída deste estudo se ela estiver grávida ou em lactação; se tiver recebido um medicamento de pesquisa dentro dos 30 dias anteriores ao envolvimento no estudo;

ou tenha uma condição médica, doença superveniente séria, ou outra circunstância atenuante que possa significativamente reduzir a concordância com o estudo.

Intervenção Dietética

[00344] Em seguida à randomização inicial e ao período de tratamento de duas semanas, todos os participantes do estudo se submeterão a um aconselhamento dietético e seguirão uma dieta padrão e/ou uma dieta padrão restrita em Phe complementada com alimentos médicos específicos de pHe por um total de quatro a seis semanas. As dietas serão controladas em casa e a ingestão dietética será registrada em registros diários. As análises das ingestões de nutrientes e de alimentos médicos e o percentual de Ingestões Dietéticas Recomendadas (RDI) serão comparados entre os grupos de tratamento.

Segurança da FAL

[00345] A terapia de FAL será determinada de modo a ser segura caso nenhuma reação significativa, aguda ou crônica, do medicamento, venha a ocorrer no decurso do estudo. A administração de prazo mais longo do medicamento será determinada de modo a ser segura caso nenhuma anormalidade significativa seja observada nos exames clínicos, nos laboratórios clínicos, ou em outros estudos apropriados.

EXEMPLO 18: AVALIAÇÃO CLÍNICA DE UMA VARIANTE PEGUILADA DE AvFAL

[00346] O mutante de AvFAL de cisteína dupla peguilada, o AvFAL_C565SC503S será clinicamente avaliado em seres humanos. O objetivo da avaliação clínica é determinar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética (PK) e eficácia em indivíduos de PKU. Os níveis de fenilalanina (Phe) do sangue servirão como ponto clínico final.

Fase 1

[00347] A Fase 1 é um estudo de aumento da dose única em 35 indivíduos de

PKU de idades entre 16 e 50 anos. O objetivo principal é avaliar a segurança e tolerabilidade da AvFAL mutante de cisteína dupla peguilada, AvFAL_C565SC503S, e os objetivos secundário são avaliar a PK das enzimas peguiladas e redução da Phe. Sete coortes de 5 indivíduos são administrados sequencialmente com doses crescentes de 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 e 1 mg/kg de AvFAL_C565SC503S peguilada. Os indivíduos em cada coorte recebem uma dose única, e depois são acompanhados por um total de 6 semanas. Os critérios de inclusão são que o nível de Phe do sangue na triagem e o nível médio de Phe do sangue decorridos 3 anos, sejam ≥600 μM.

Fase 2

[00348] O estudo da Fase 2 é dividido em duas partes, sem qualquer interrupção:

- Parte 1 – 16 semanas – administração de 8 semanas, depois otimização da dose
- Parte 2 – 40 semanas – extensão

[00349] A Fase 2 é um estudo de otimização da dose, de rótulo aberto, de duas partes, em indivíduos com PKU. A parte 1, conduzida através de um período de 16 semanas de duração, envolve a administração de doses de AvFAL_C565SC503S peguilada uma vez por semana por 8 semanas, seguida por um período de otimização da dose. Cada dose do indivíduo é ajustada para se obter concentrações de Phe do sangue abaixo de 600 μM. O objetivo principal é avaliar a segurança e a tolerabilidade da administração múltipla da AvFAL_C565SC503S peguilada, e os objetivos secundários são avaliar os efeitos da enzima peguilada sobre as concentrações de Phe do sangue, a resposta imune, por exemplo os títulos de anticorpos anti-AvFAL, e a PK de estado estacionário. Na parte 2, os indivíduos recebem a administração de AvFAL_C565SC503S peguilada por 40 semanas, com a dose otimizada individualizada e frequência de administração.

Fase 3

[00350] Uma vez completos os estudos das Fases 1 e 2, estudos adicionais podem potencialmente incluir um estudo duplamente cego de seis meses de Fase 3 em um número maior de indivíduos, com estudos adicionais em populações especiais, tais como, por exemplo, e não como limitação, indivíduos de hiperfenilalanemia (HPA), não PKU, indivíduos de PKU responsivos a BH4 e indivíduos de PKU não responsivos a BH4.

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de fenilalanina amônia-liase de *Anabaena variabilis* (AvFAL) **CARACTERIZADA** pelo fato de que a variante de AvFAL compreende:

(i) uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 na qual o resíduo na posição 565 é um resíduo de serina; ou

(ii) uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 na qual os resíduos nas posições 503 e 565 são resíduos de serina.

2. Variante de AvFAL, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que ainda compreende um polímero solúvel em água.

3. Variante de AvFAL, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a variante de AvFAL é peguilada.

4. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a variante de AvFAL, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

5. Uso da variante de AvFAL, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento de fenilcetonúria (PKU).

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a referida PKU é PKU clássica grave.

FIGURA 1A

Sequência de genes da PAL de Nostoc punctiforme

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

FIGURA 1B

Sequência de proteínas de PAL de Nostoc punctiforme

MNITSLQQNITRSWQIPFTNSSDSIVTVGDRNLTIDEVVNVARH

GTQVRLTDNADVIRGVQASCDYINNAVETAQPIYGVTSGFGGMADVVISREQAAELQT

NLIWFLKSGAGNKLSLADVRAAMLLRANSHLYGASGIRLELIQRIETFLNAGVTPHVY

EFGSIGASGDLVPLSYITGALIGLDPSFTVDFDGKEMDAVTALSRLGLPKLQLQPKEG

LAMMNGTSVMTGIAANCVYDAKVLLALTMGVHALAIQGLYGTNQSFHPFIHQCKPHPG

QLWTADQMFSLLKDSSLVREELDGKHEYRGKDLIQDRYSLRCLAQFIGPIVDGVSEIT

KQIEVEMNSVTDNPLIDVENQVSYHGGNFLGQYVGVTMDRLRYYIGLLAKHIDVQIAL

LVSPEFSNGLPPSLVGNSDRKVNMGLKGLQISGNSIMPLLSFYGNSLADRFPTHAEQF

NQNINSQGYISANLTRRSVDIFQNYMAIALMFGVQAVDLRTYKMKGHYDARTCLSPNT

VQLYTAVCEVVGKPLTSVRPYIWNDNEQCLDEHIARISADIAGGGLIVQAVEHIFSSL

KST

FIGURA 2A

Sequência de genes da PAL de Anabaena variabilis

1 atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga
61 aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg
121 gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggtatt
181 caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg
241 acatctggtt ttggcggtat ggccaatgtt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc
301 caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc cttggcggat
361 gtgcgcgcag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcatc tggcatcaga
421 ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgtat
481 gagtttggtt caattggtgc aagtggtgat ttagtgccac tatcctacat tactggttca
541 ctgataggct tagatcccag ttttaaggtt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcca
601 acagctctac gtcaactgaa tttgtcaccc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg
661 atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgtcta cgatactcaa
721 attttaactg cgatcgctat gggcgttcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc
781 aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggtca attatgggca
841 gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gttagatggt
901 aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcactccg atgccttccc
961 cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaaat tgaaatcgaa
1021 atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga
1081 ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg
1141 ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat
1201 ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaaggt
1261 ctgcaaatat gcggtaactc aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc
1321 gatcgctttc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact
1381 tcagcgactc tagcccgccg ttctgtggat atcttccaga attatgtggc gatcgctctg
1441 atgtttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactggtca ttacgatgca
1501 cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga
1561 caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag
1621 catattgccc ggatttctgc tgatatcgct gctggtggtg tgattgtgca agcagttcaa
1681 gatatcttac cctgcttgca ttaa

FIGURA 2B

Sequência de proteínas da PAL de Anabaena variabilis

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

FIGURA 3

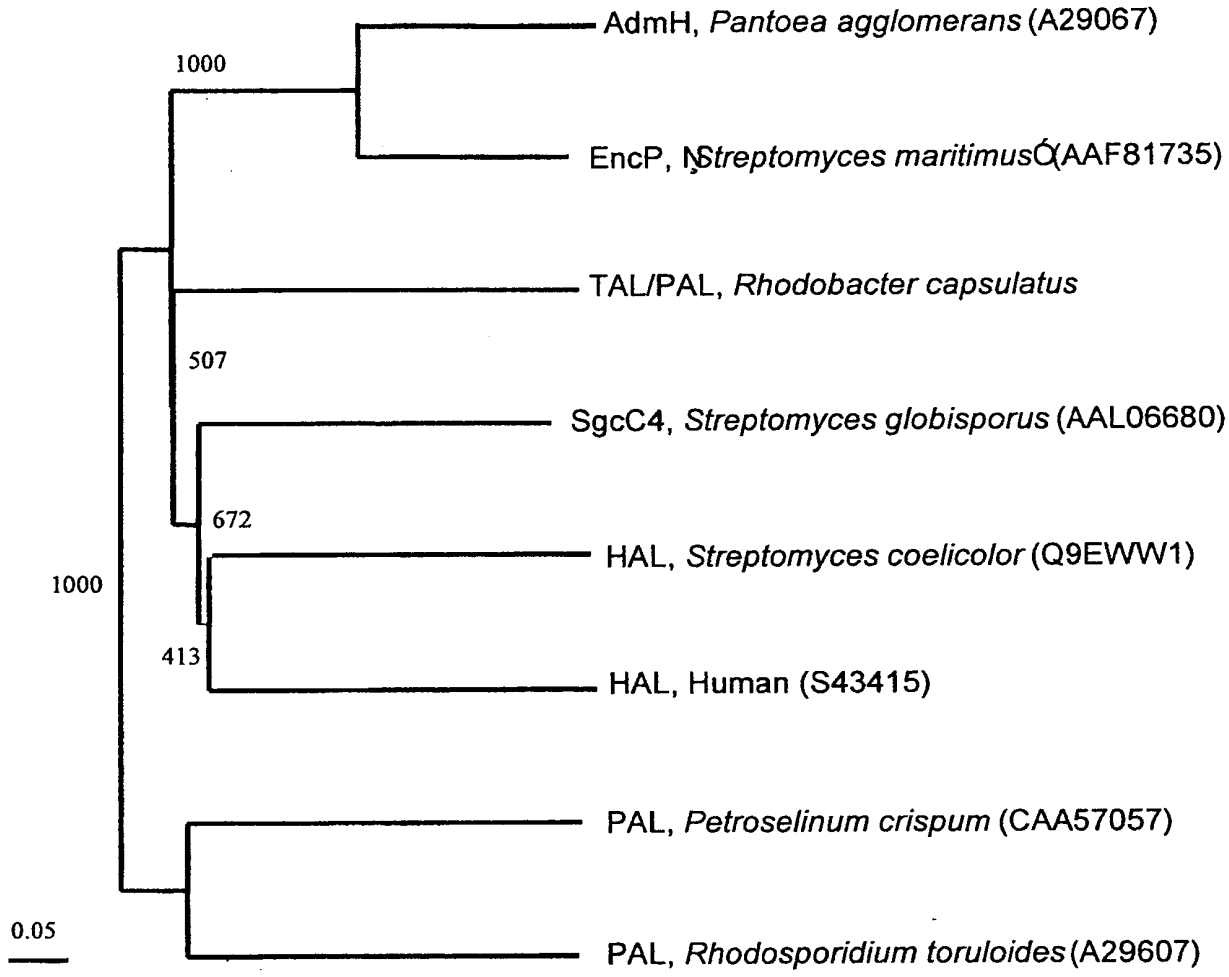

AdmH, Pantoea agglomerans (A29067)
1000
EncP, Streptomyces maritimus (AAF81735)
TAL/PAL, Rhodobacter capsulatus
507
SgcC4, Streptomyces globisporus (AAL06680)
672
HAL, Streptomyces coelicolor (Q9EWW1)
1000
413
HAL, Human (S43415)
PAL, Petroselinum crispum (CAA57057)
0.05
PAL, Rhodosporidium toruloides (A29607)

FIGURA 4

Alinhamento das sequência de proteínas cianobacterianas da PAL de N. punctiforme(SEQ ID NO: 4) e A. variabilis SEQ ID NO: 2) com PAL de EncP (SEQ ID NO: 5) e HAL de P. putida (SEQ ID NO: 6). Os resíduos do sítio ativo que correspondem à atividade de PAL ou HAL são realçados.

```
Avar03005300      MKTLSQAQSK TSSQQFSFTG NSSANVIIGN QKLTINDVAR VARNGTLVSL
Npun02008223      MNITSLQQNI TRSWQIPFTN SSDSIVTVGD RNLTIDEVVN VARHGTQVRL
EncP              .......... .......... ..MTFVIELD MNVTLDQLED AARQRTPVEL
PputidaHAL        .......... .......... ..MTELTLKP GTLTLAQLRA IHAAPVRLQL

Avar03005300      TNNTDILQGI QASCDYINNA VESGEPIYGV TSGFGGMANV AISREQASEL
Npun02008223      TDNADVIRGV QASCDYINNA VETAQPIYGV TSGFGGMADV VISREQAAEL
EncP              S..APVRSRV RASRDVLVKF VQDERVIYGV NTSMGGFVDH LVPVSQARQL
PputidaHAL        D..ASAAPAI DASVACVEQI IAEDRTAYGI NTGFGLLAST RIASHDLENL

Avar03005300      QTNLVWFLKT GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHMRGASGIR LELIKRMEIF
Npun02008223      QTNLIWFLKS GAGNKLSLAD VRAAMLLRAN SHLYGASGIR LELIQRIETF
EncP              QENLINAVAT NVGAYLDDTT ARTIMLSRIV SLARGNSAIT PANLDKLVAV
PputidaHAL        QRSLVLSHAA GIGAPLDDDL VRLIMVLKIN SLSRGFSGIR RKVIDALIAL

Avar03005300      LNAGVTPYVY EFGSIGASGD LVPLSYITGS LIGLDPSFKV DFNGKEMDAP
Npun02008223      LNAGVTPHVY EFGSIGASGD LVPLSYITGA LIGLDPSFTV DFDGKEMDAV
EncP              LNAGIVPCIP EKGSLGTSGD LGPLAAIALV CAGQW...KA RYNGQIMPGR
PputidaHAL        VNAEVYPHIP LKGSVGASGD LAPLATMSLV LLGEG...KA RYKGQWLSAT

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

Avar03005300      ALDIQALNGT NQSFHPFIHN SKPHPGQLWA ADQMISLLAN SQLVRDELDG
Npun02008223      ALAIQGLYGT NQSFHPFIHQ CKPHPGQLWT ADQMFSLLKD SSLVREELDG
EncP              ALSVEGLAGM TKPFDPRVHG VKPHRGQRQV ASRLWEGLAD SHLAVNELDT
PputidaHAL        GLSVEAVLGS RSPFDARIHE ARGQRGQIDT AACFRDLLGD SSEVS.....
```

FIGURA 4 (CONT.)

```
Avar03005300      .........K HDYRDHELIQ DRYSLRCLPQ YLGPIVDGIS QIAKQIEIEI
Npun02008223      .........K HEYRGKDLIQ DRYSLRCLAQ FIGPIVDGVS EITKQIEVEM
EncP              EQTLAGEMGT VAKAGSLAIE DAYSIRCTPQ ILGPVVDVLD RIGATLQDEL
PputidaHAL        .......... LSHKNCDKVQ DPYSLRCQPQ VMGACLTQLR QAAEVLGIEA

Avar03005300      NSVTDNPLID VDNQASYHGG NFLGQYVGMG MDHLRYYIGL LAKHLDVQIA
Npun02008223      NSVTDNPLID VENQVSYHGG NFLGQYVGVT MDRLRYYIGL LAKHIDVQIA
EncP              NSSNDNPIVL PEEAEVFHNG HFHGQYVAMA MDHLNMALAT VTNLANRRVD
PputidaHAL        NAVSDNPLVF AAEGDVISGG NFHAEPVAMA ADNLALAIAE IGSLSERRIS

Avar03005300      LLASPEFSNG LPPSLLGNRE RKVNMGLKGL QICGNSIMPL LTFYGNSIAD
Npun02008223      LLVSPEFSNG LPPSLVGNSD RKVNMGLKGL QISGNSIMPL LSFYGNSLAD
EncP              RFLDKSNSNG LPAFLCREDP .GLRLGLMGG QFMTASITAE TRTLTIPMSV
PputidaHAL        LMMDKHMS.Q LPPFLVENG. .GVNSGFMIA QVTAAALASE NKALSHPHSV

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

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

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

FIGURA 5A

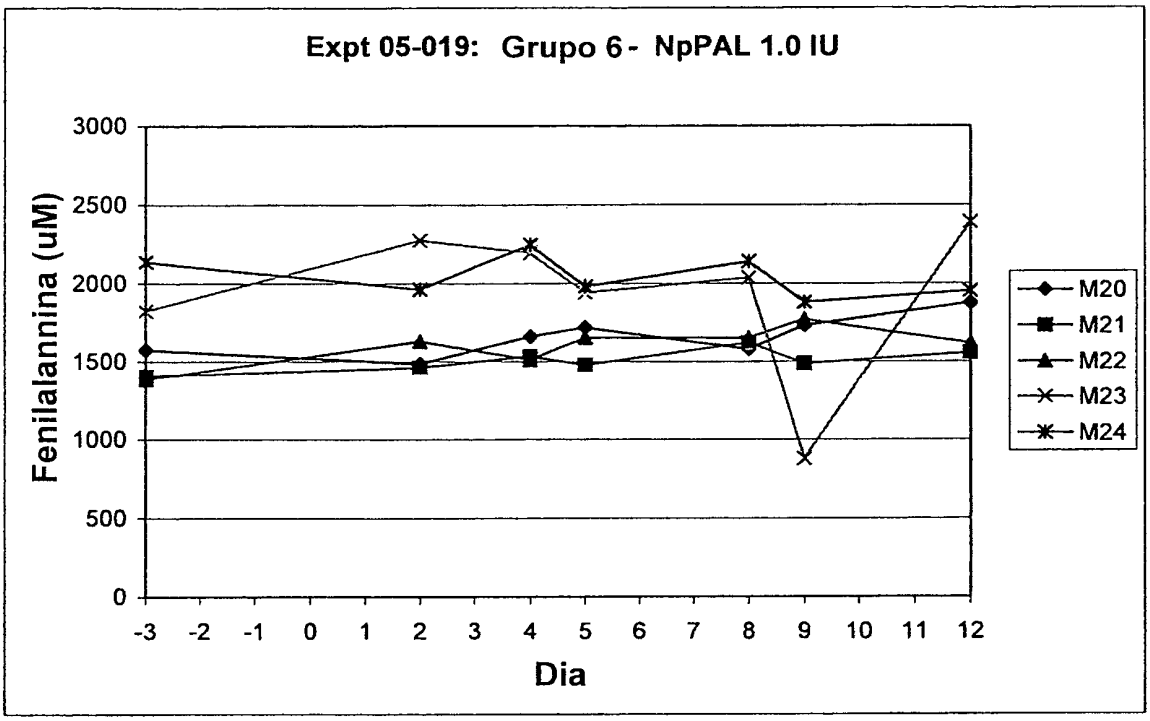

Expt 05-019: Grupo 6 - NpPAL 1.0 IU
Fenilalannina (uM)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Dia
M20
M21
M22
M23
M24

FIGURA 5B

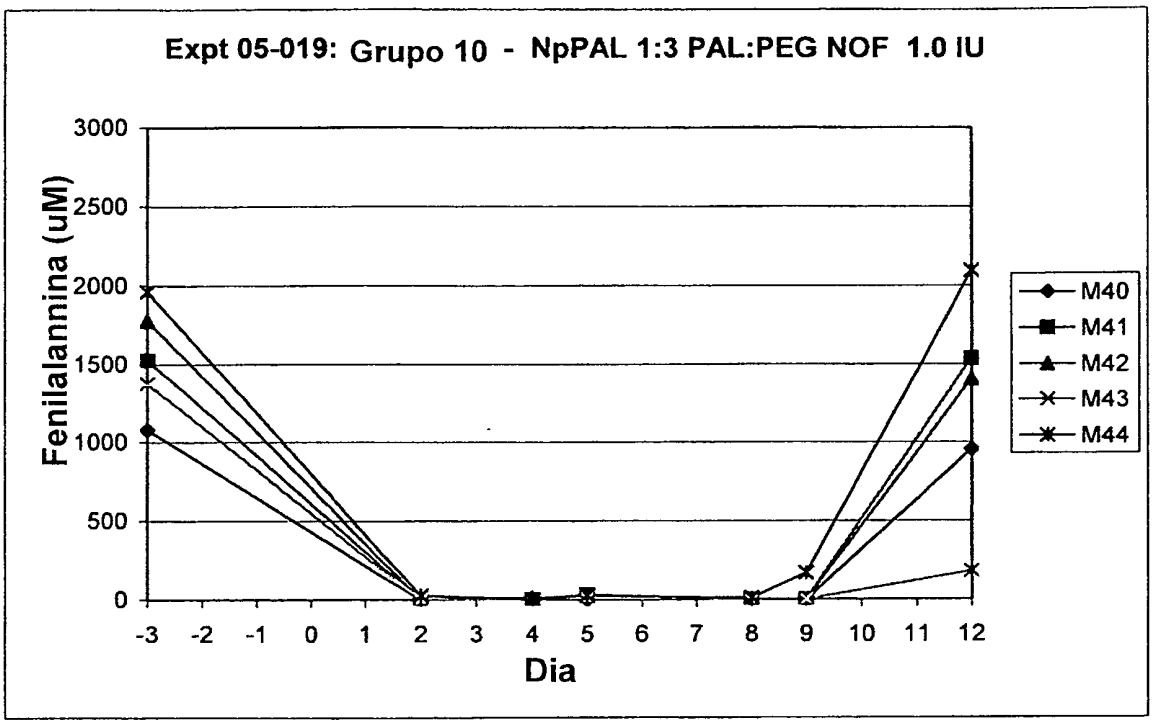

Expt 05-019: Grupo 10 - NpPAL 1:3 PAL:PEG NOF 1.0 IU
Fenilalannina (uM)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Dia
M40
M41
M42
M43
M44

FIGURA 6A

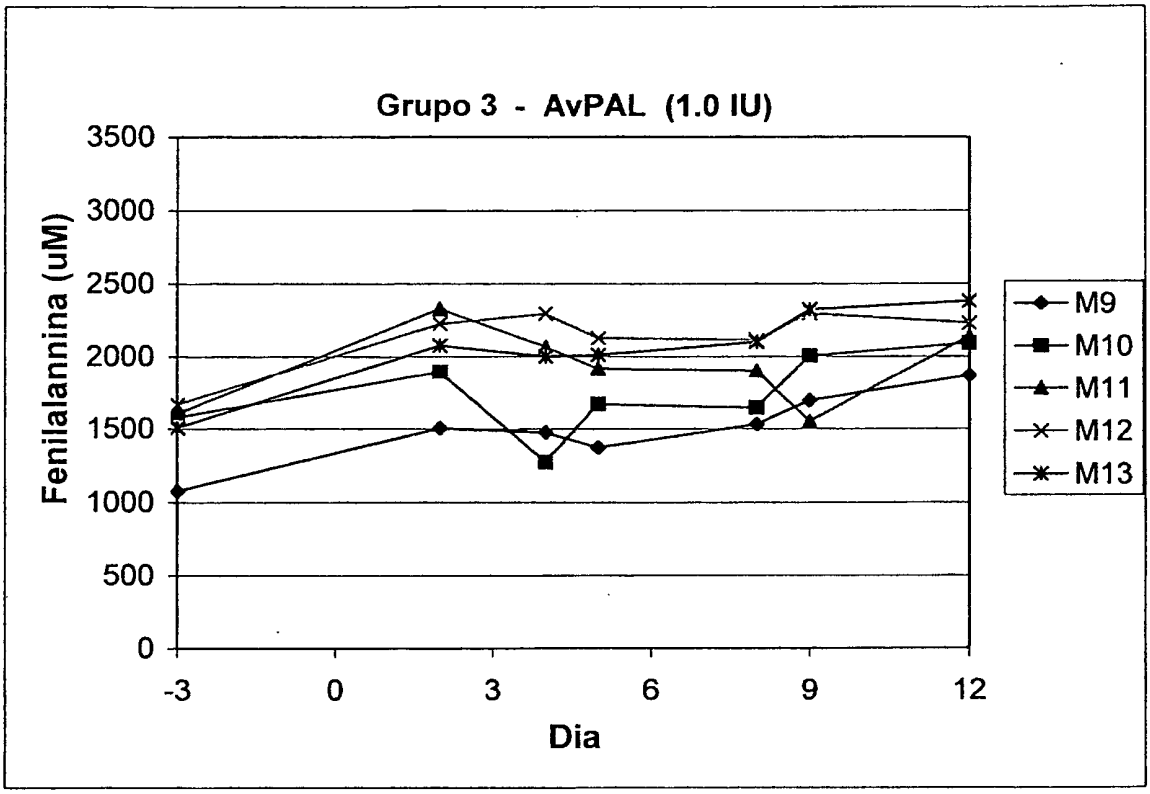

Grupo 3 - AvPAL (1.0 IU)
Fenilalannina (uM)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-3
0
3
6
9
12
Dia
M9
M10
M11
M12
M13

FIGURA 6B

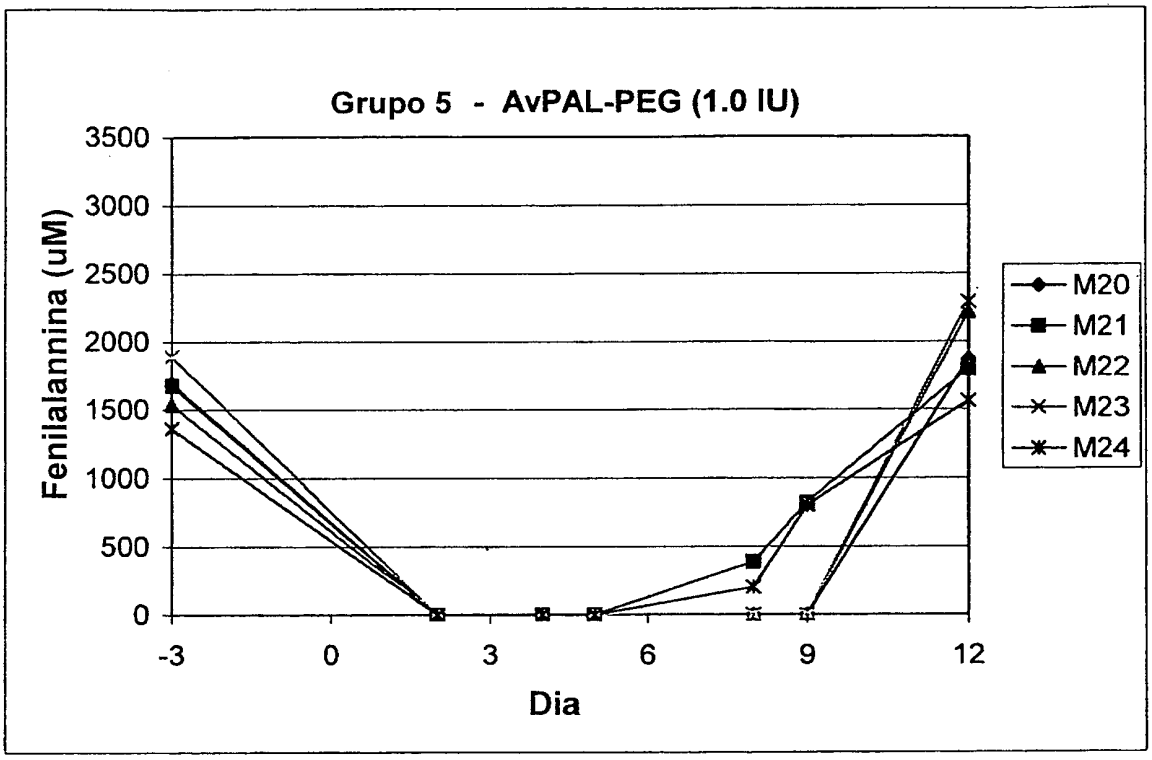

Grupo 5 - AvPAL-PEG (1.0 IU)
Fenilalannina (uM)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-3
0
3
6
9
12
Dia
M20
M21
M22
M23
M24

FIGURA 7

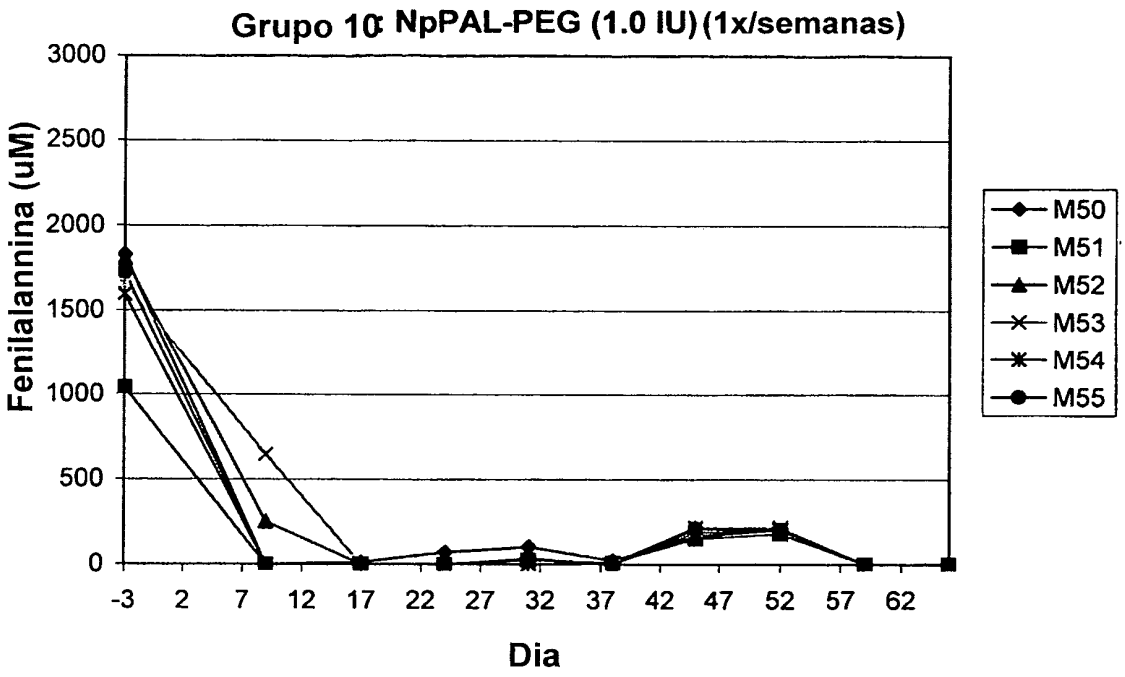

Grupo 10: NpPAL-PEG (1.0 IU) (1x/semanas)
Fenilalannina (uM)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-3
2
7
12
17
22
27
32
37
42
47
52
57
62
Dia
M50
M51
M52
M53
M54
M55

FIGURA 8A-8E

Sequências de Proteínas das Variantes de AvPAL (Mutantes de Cisteína)

A. AvPAL_C64S (SEQ ID NO:7)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASSDYINNA
VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQLVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGLKG
LQICGNSIMPLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQNINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

B. AvPAL_C318S (SEQ ID NO:8)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQLVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRSLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGLKG
LQICGNSIMPLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQNINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

C. AvPAL_C503S (SEQ ID NO:9)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQLVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGLKG
LQICGNSIMPLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQNINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARASLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

D. AvPAL_C565S (SEQ ID NO:10)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQLVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGLKG
LQICGNSIMPLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQNINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPSLH

E. AvPAL_C565SC503S (SEQ ID NO:11)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTSGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQLVRDELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGLKG
LQICGNSIMPLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQNINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARASLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPSLH

FIGURA 9A

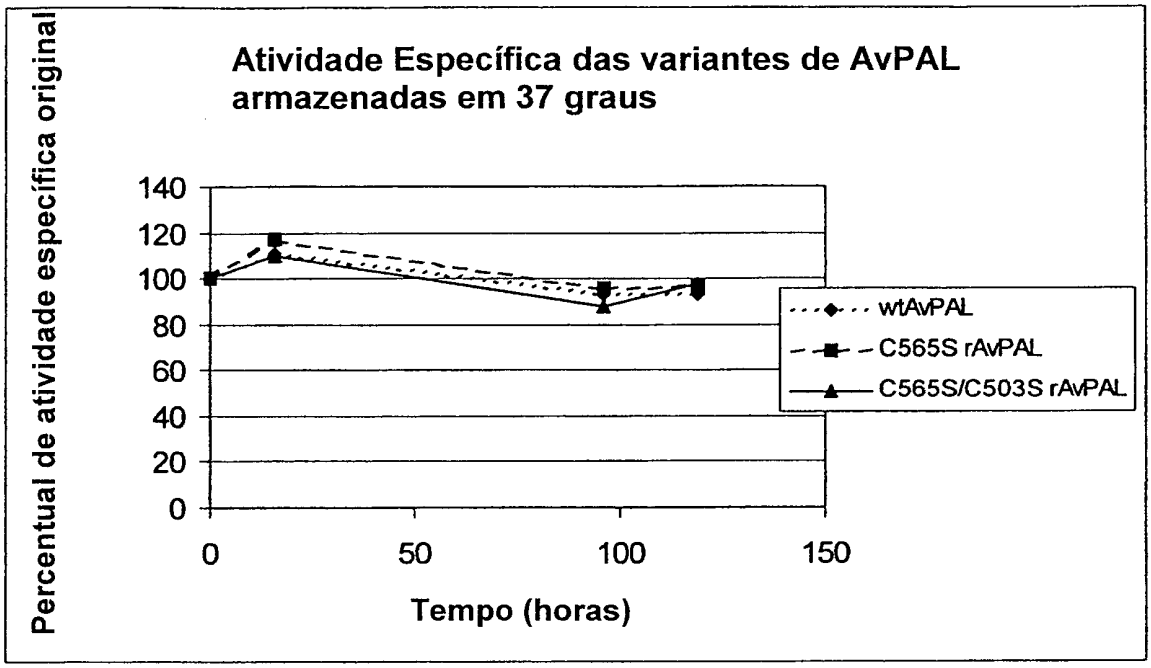

Atividade Específica das variantes de AvPAL armazenadas em 37 graus
Percentual de atividade específica original
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
Tempo (horas)
wtAvPAL
C565S rAvPAL
C565S/C503S rAvPAL

FIGURA 9B

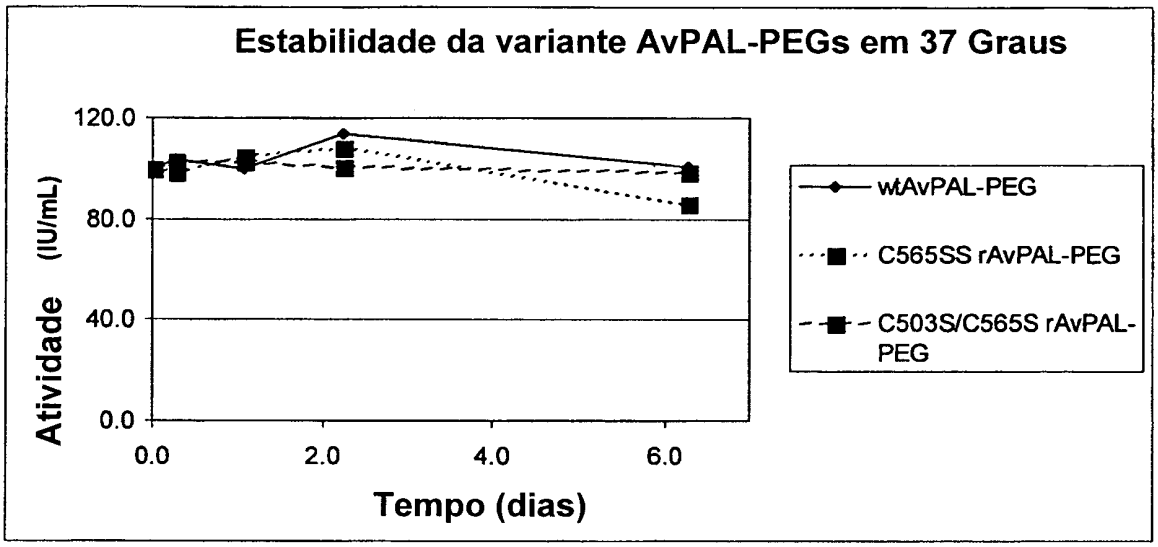

Estabilidade da variante AvPAL-PEGs em 37 Graus
Atividade (IU/mL)
120.0
80.0
40.0
0.0
0.0
2.0
4.0
6.0
Tempo (dias)
wtAvPAL-PEG
C565SS rAvPAL-PEG
C503S/C565S rAvPAL-PEG

FIGURA 10A

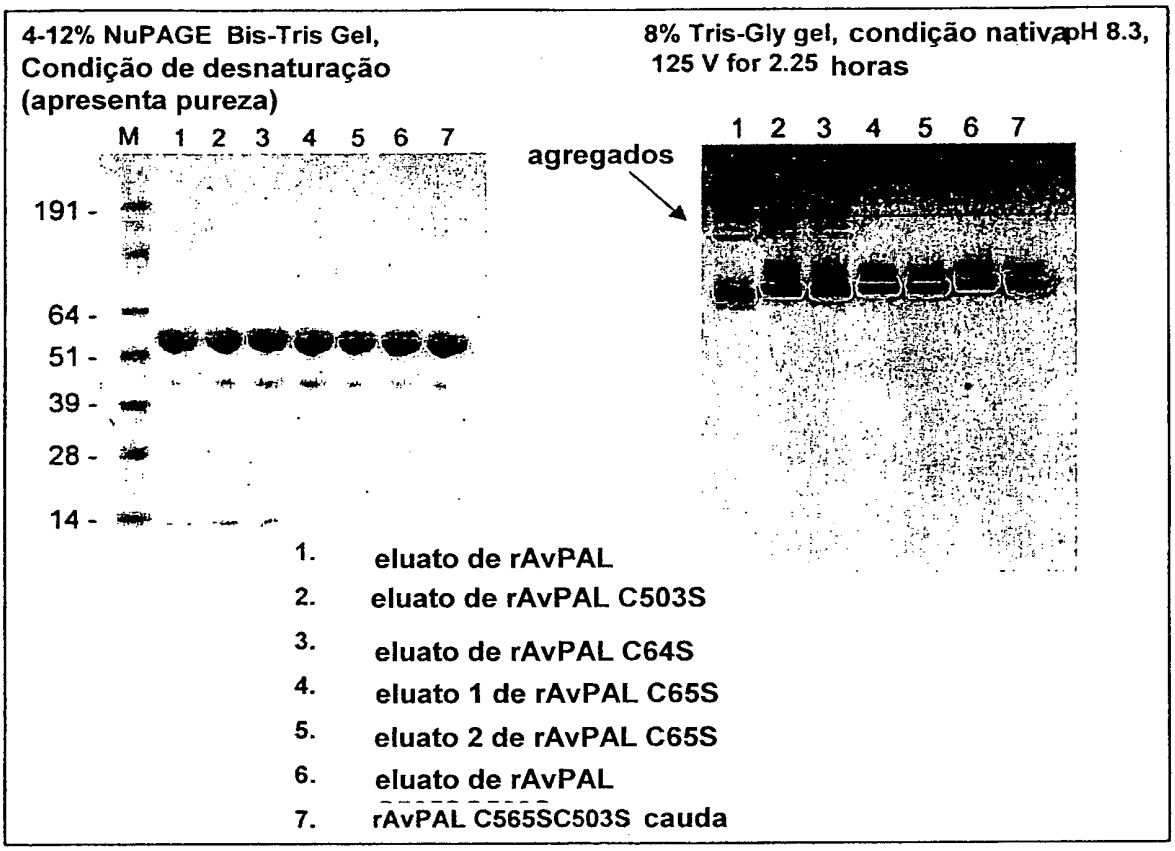

4-12% NuPAGE Bis-Tris Gel,
Condição de desnaturação
(apresenta pureza)
M 1 2 3 4 5 6 7
191 -
64 -
51 -
39 -
28 -
14 -
8% Tris-Gly gel, condição nativa pH 8.3,
125 V for 2.25 horas
1 2 3 4 5 6 7
agregados
1. eluato de rAvPAL
2. eluato de rAvPAL C503S
3. eluato de rAvPAL C64S
4. eluato 1 de rAvPAL C65S
5. eluato 2 de rAvPAL C65S
6. eluato de rAvPAL
7. rAvPAL C565SC503S cauda

FIGURA 10B

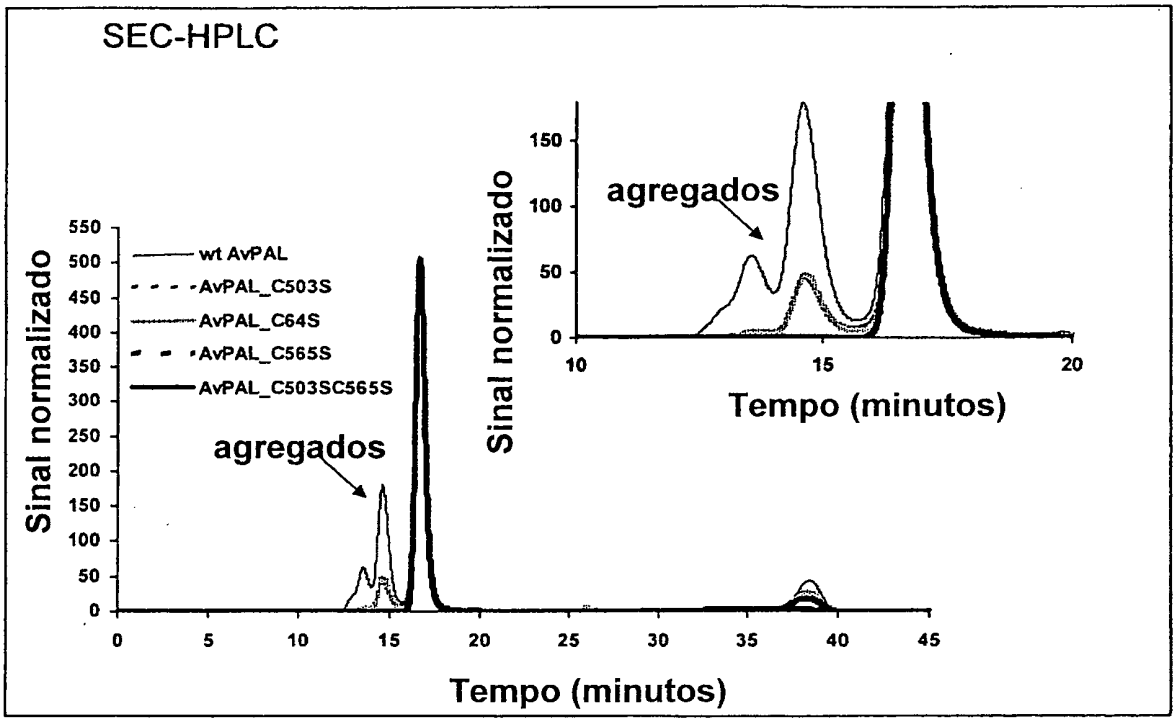

SEC-HPLC
Sinal normalizado
wt AvPAL
AvPAL_C503S
AvPAL_C64S
AvPAL_C565S
AvPAL_C503SC565S
agregados
Tempo (minutos)
Sinal normalizado
agregados
Tempo (minutos)

FIGURA 11

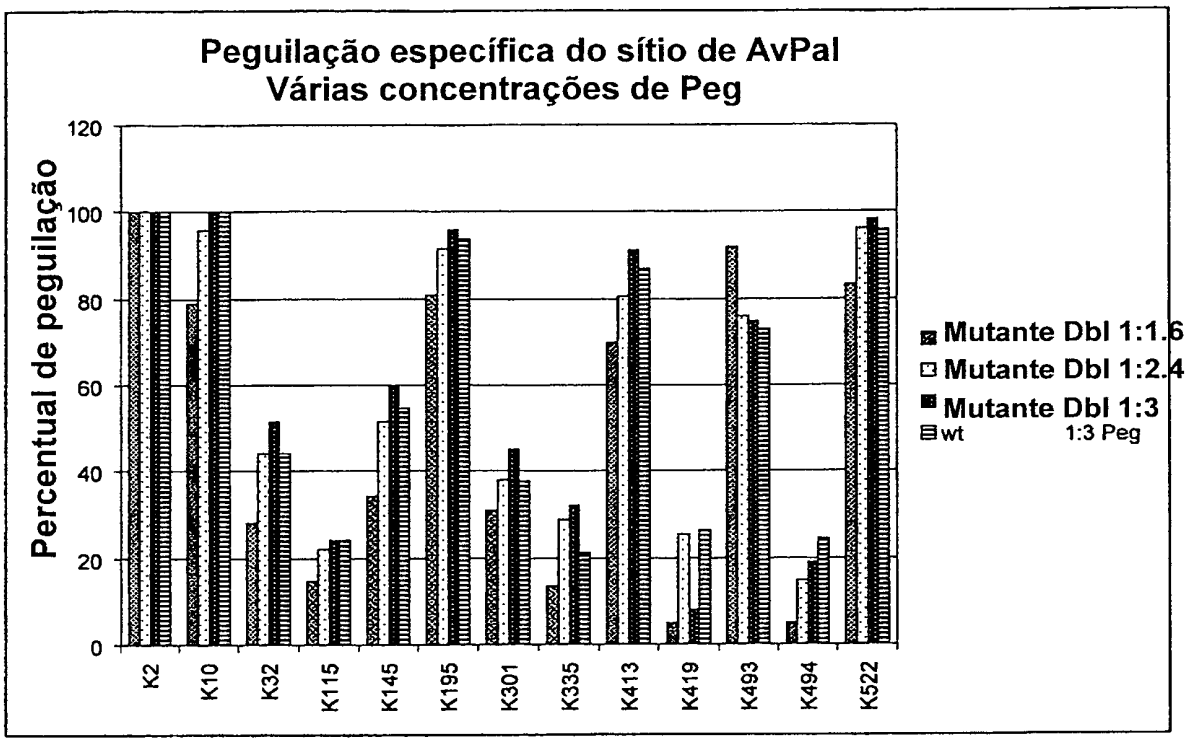

Peguilação específica do sítio de AvPal
Várias concentrações de Peg
Percentual de peguilação
120
100
80
60
40
20
0
K2
K10
K32
K115
K145
K195
K301
K335
K413
K419
K493
K494
K522
Mutante Dbl 1:1.6
Mutante Dbl 1:2.4
Mutante Dbl 1:3
wt
1:3 Peg

FIGURA 12

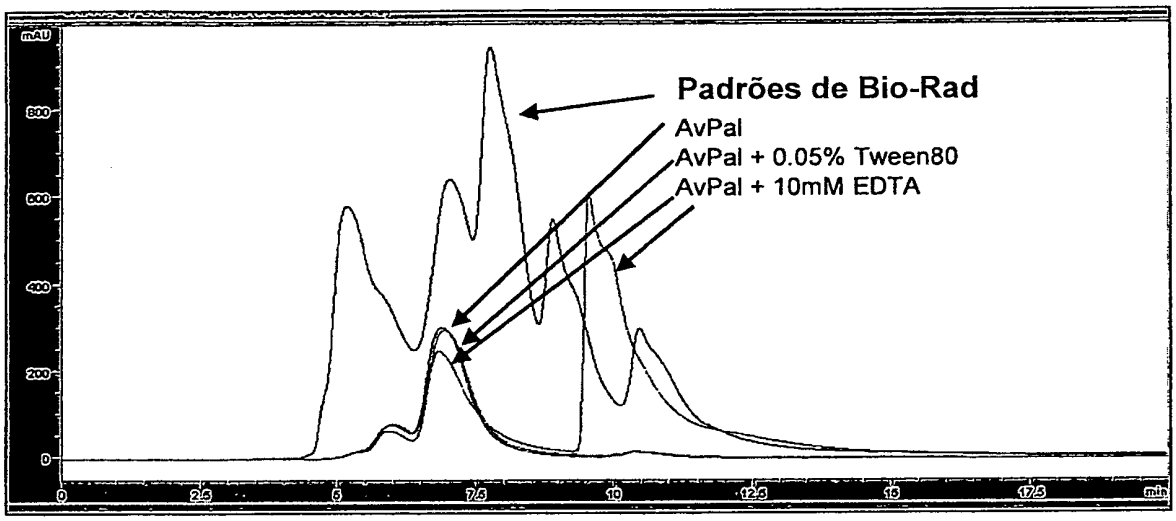

mAU
800
600
400
200
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
min
Padrões de Bio-Rad
AvPal
AvPal + 0.05% Tween80
AvPal + 10mM EDTA

FIGURA 13A

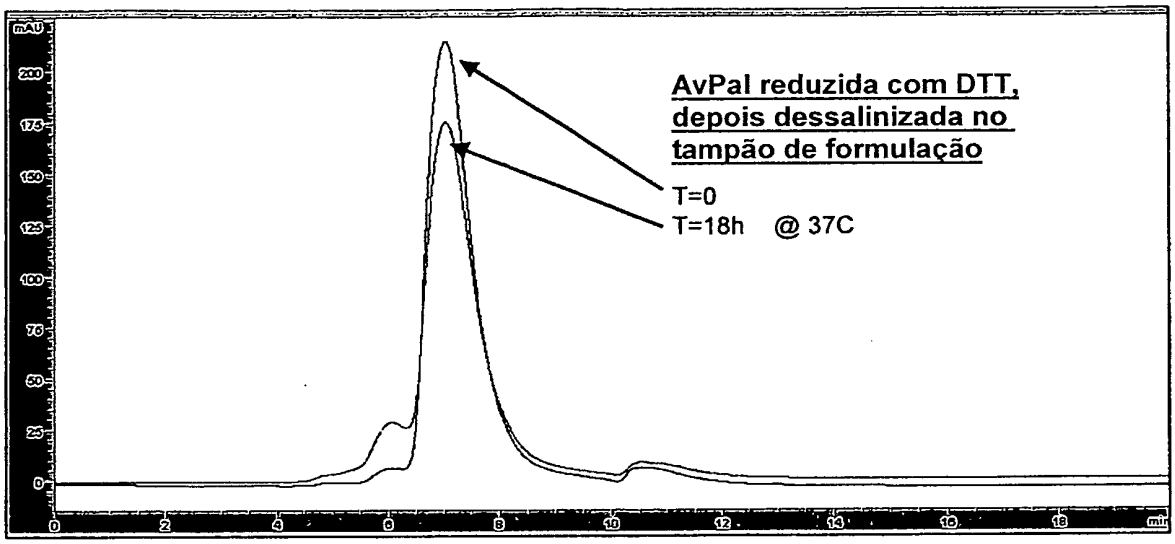

mAU
200
175
150
125
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
min
AvPal reduzida com DTT, depois dessalinizada no tampão de formulação
T=0
T=18h @ 37C

FIGURA 13B

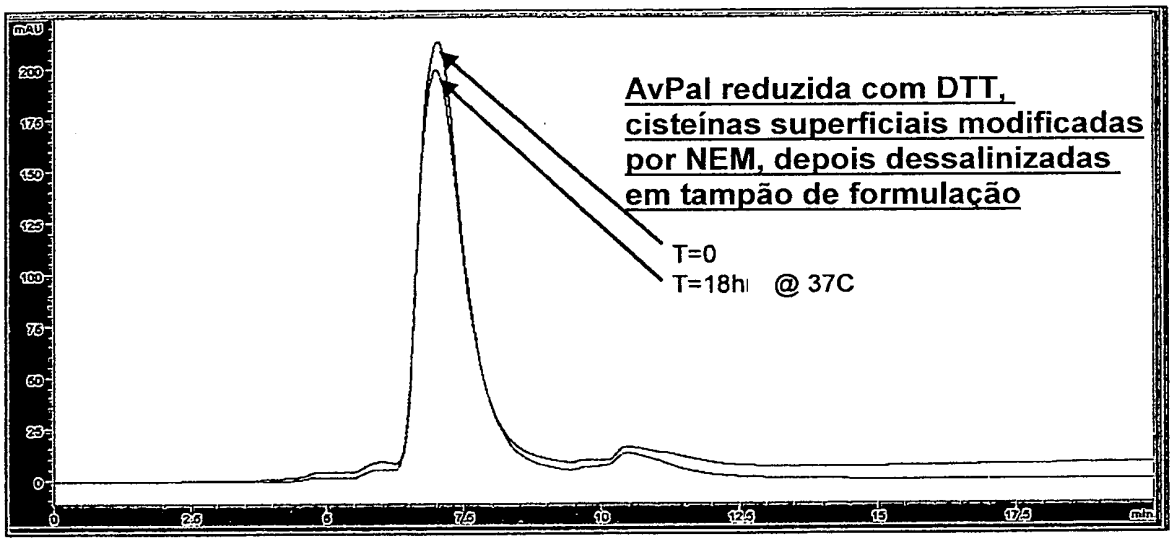

mAU
200
175
150
125
100
75
50
25
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
min
AvPal reduzida com DTT, cisteínas superficiais modificadas por NEM, depois dessalinizadas em tampão de formulação
T=0
T=18h @ 37C

FIGURA 14

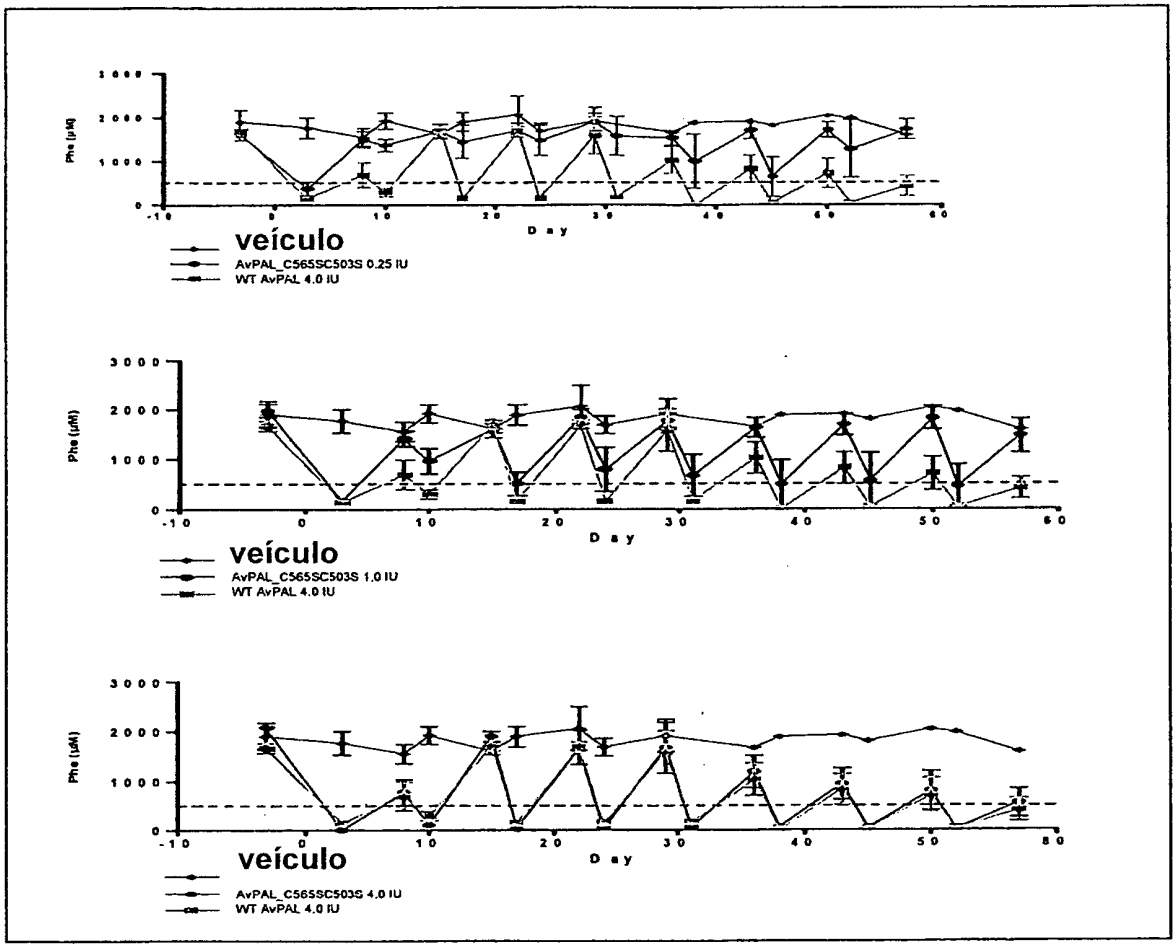

Phe (µM)
Day
veículo
AvPAL_C565SC503S 0.25 IU
WT AvPAL 4.0 IU
Phe (µM)
Day
veículo
AvPAL_C565SC503S 1.0 IU
WT AvPAL 4.0 IU
Phe (µM)
Day
veículo
AvPAL_C565SC503S 4.0 IU
WT AvPAL 4.0 IU

FIGURA 15

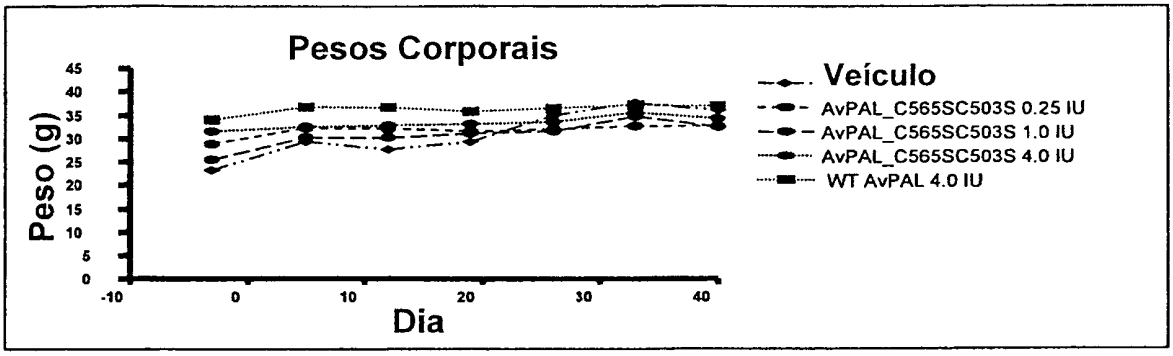

Pesos Corporais
Peso (g)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-10
0
10
20
30
40
Dia
Veículo
AvPAL_C565SC503S 0.25 IU
AvPAL_C565SC503S 1.0 IU
AvPAL_C565SC503S 4.0 IU
WT AvPAL 4.0 IU

FIGURA 16

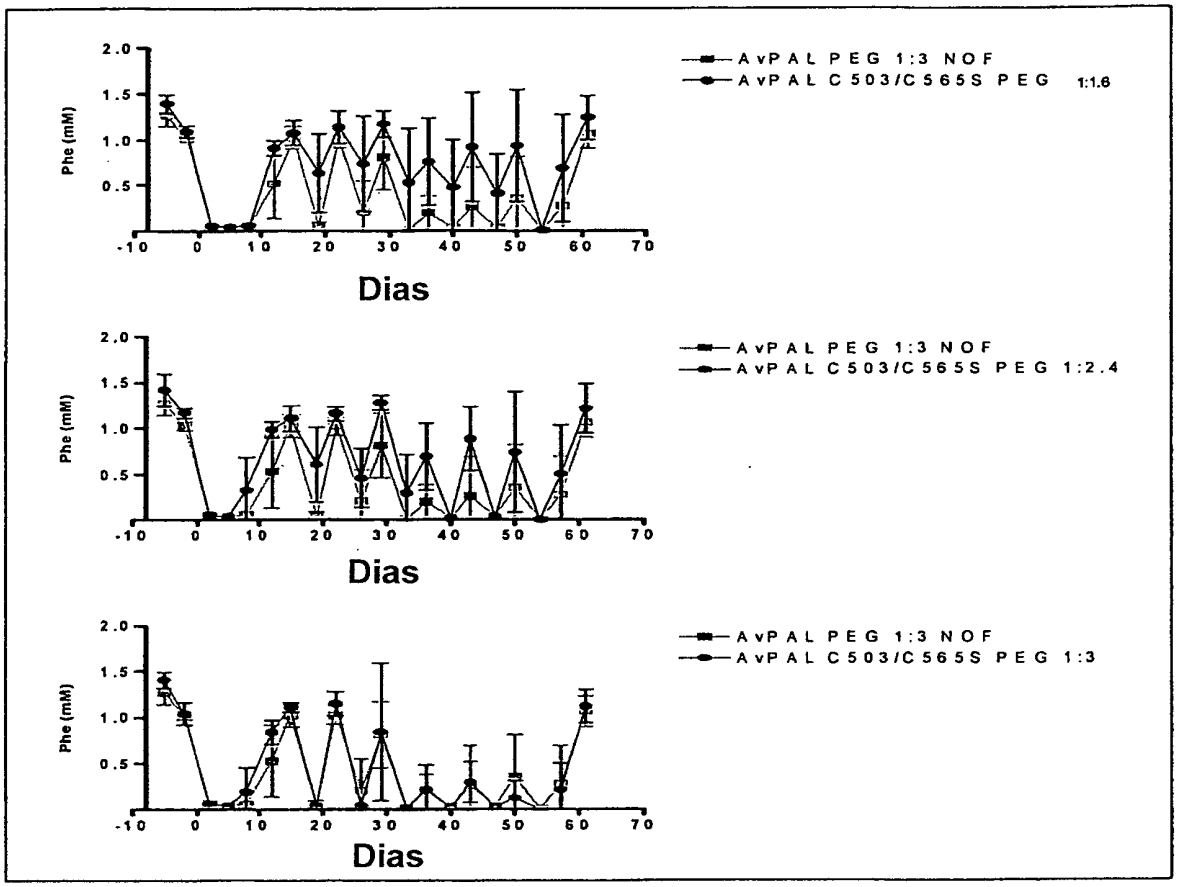

Phe (mM)
2.0
1.5
1.0
0.5
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
Dias
AvPAL PEG 1:3 NOF
AvPAL C503/C565S PEG 1:1.6
Phe (mM)
Dias
AvPAL PEG 1:3 NOF
AvPAL C503/C565S PEG 1:2.4
Phe (mM)
Dias
AvPAL PEG 1:3 NOF
AvPAL C503/C565S PEG 1:3

FIGURA 17

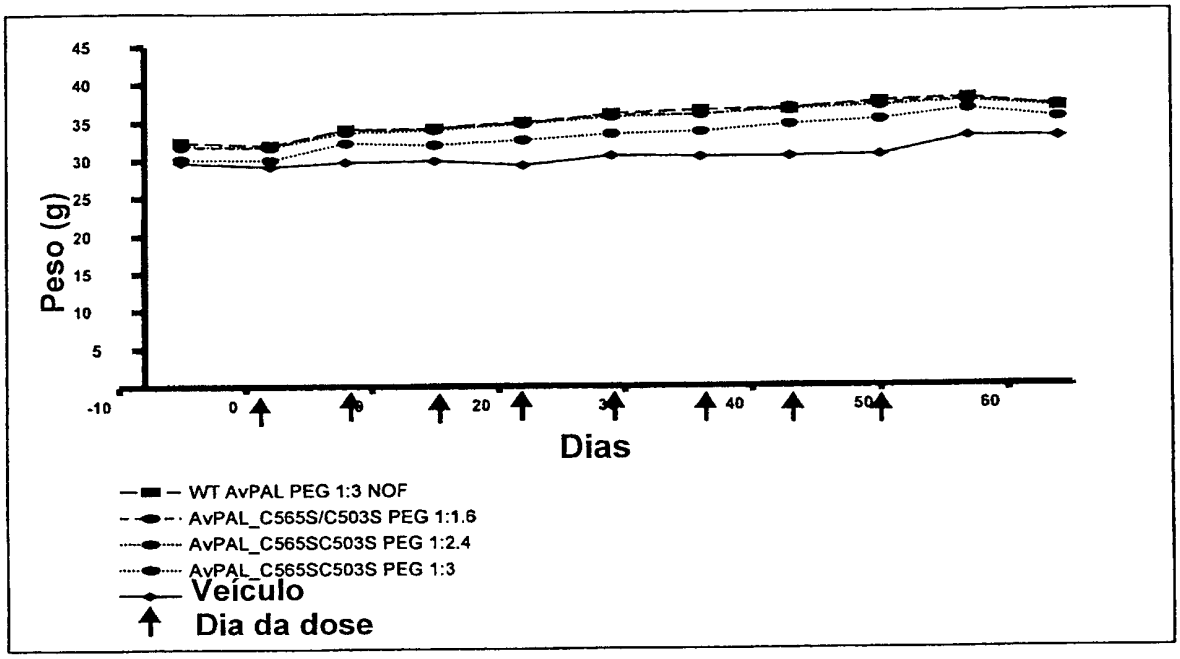
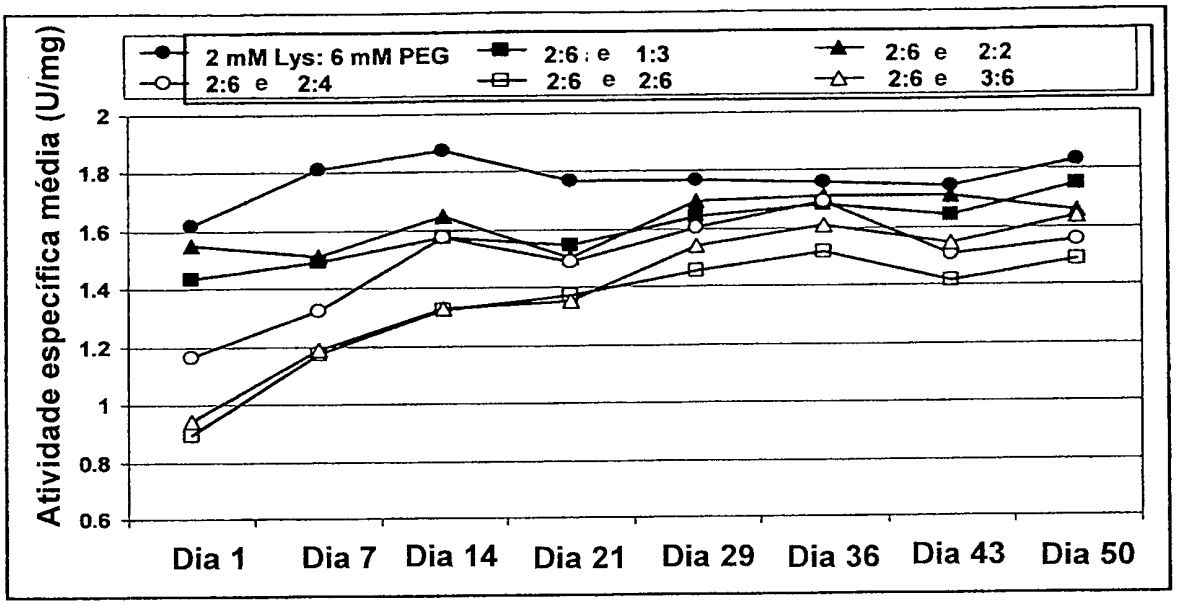

45
40
35
30
25
20
15
10
5
-10
0
20
40
60
Peso (g)
Dias
WT AvPAL PEG 1:3 NOF
AvPAL_C565S/C503S PEG 1:1.6
AvPAL_C565SC503S PEG 1:2.4
AvPAL_C565SC503S PEG 1:3
Veículo
Dia da dose

FIGURA 18


2 mM Lys: 6 mM PEG
2:6 e 1:3
2:6 e 2:2
2:6 e 2:4
2:6 e 2:6
2:6 e 3:6
Atividade específica média (U/mg)
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
Dia 1
Dia 7
Dia 14
Dia 21
Dia 29
Dia 36
Dia 43
Dia 50

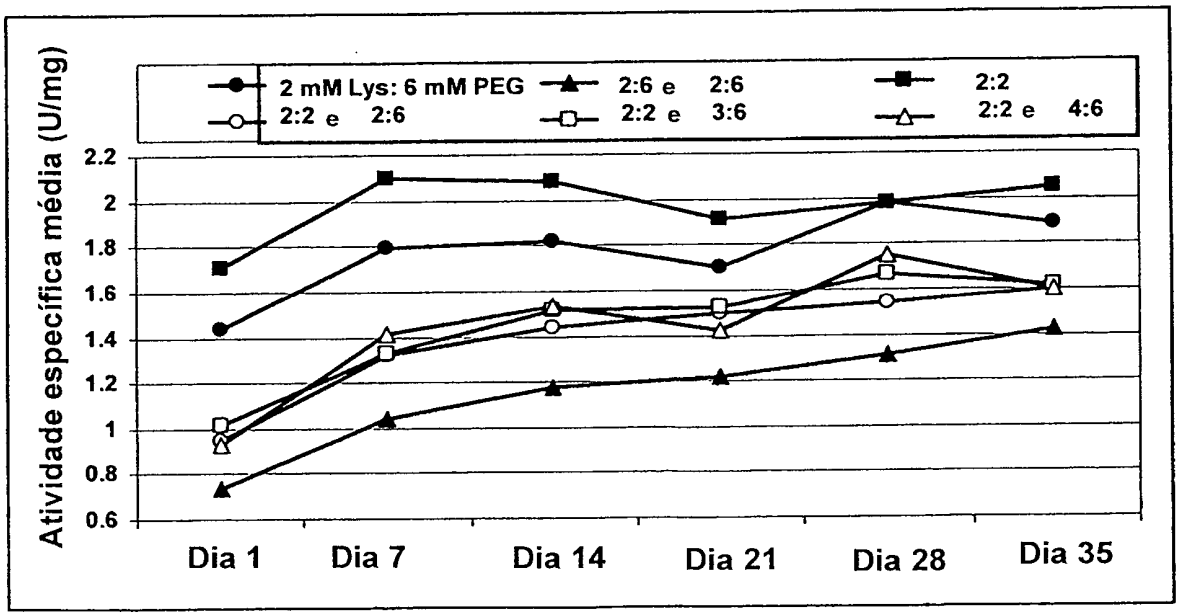
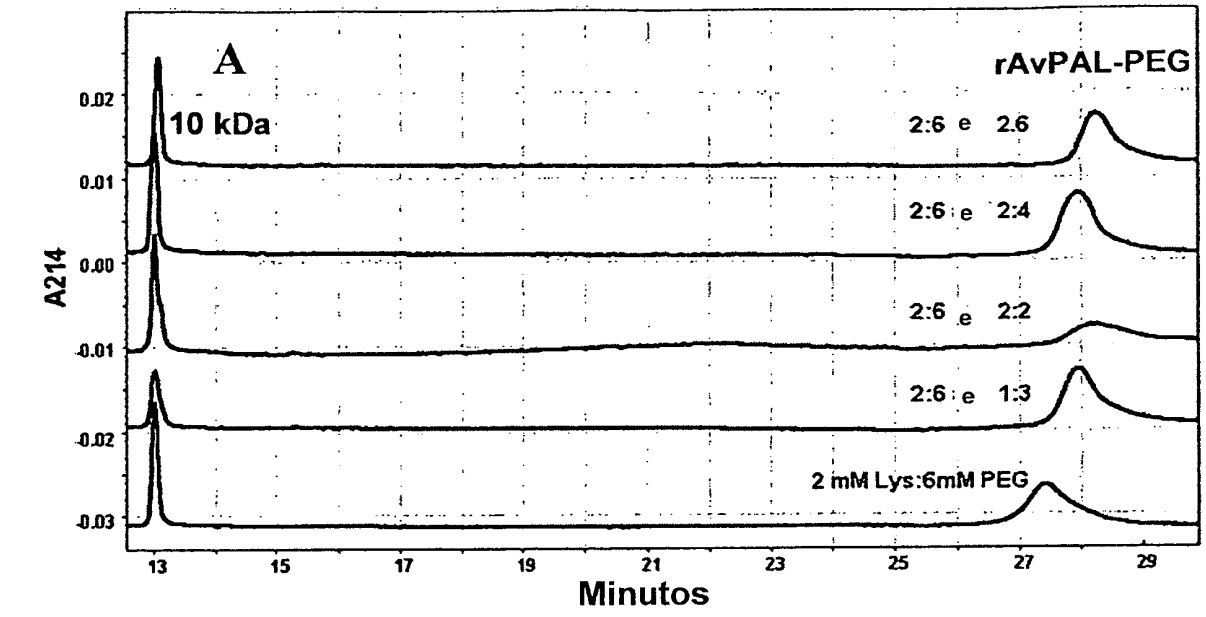

2 mM Lys: 6 mM PEG
2:6 e 2:6
2:2
2:2 e 2:6
2:2 e 3:6
2:2 e 4:6
Atividade específica média (U/mg)
2.2
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
Dia 1
Dia 7
Dia 14
Dia 21
Dia 28
Dia 35

FIGURA 19A e 19B



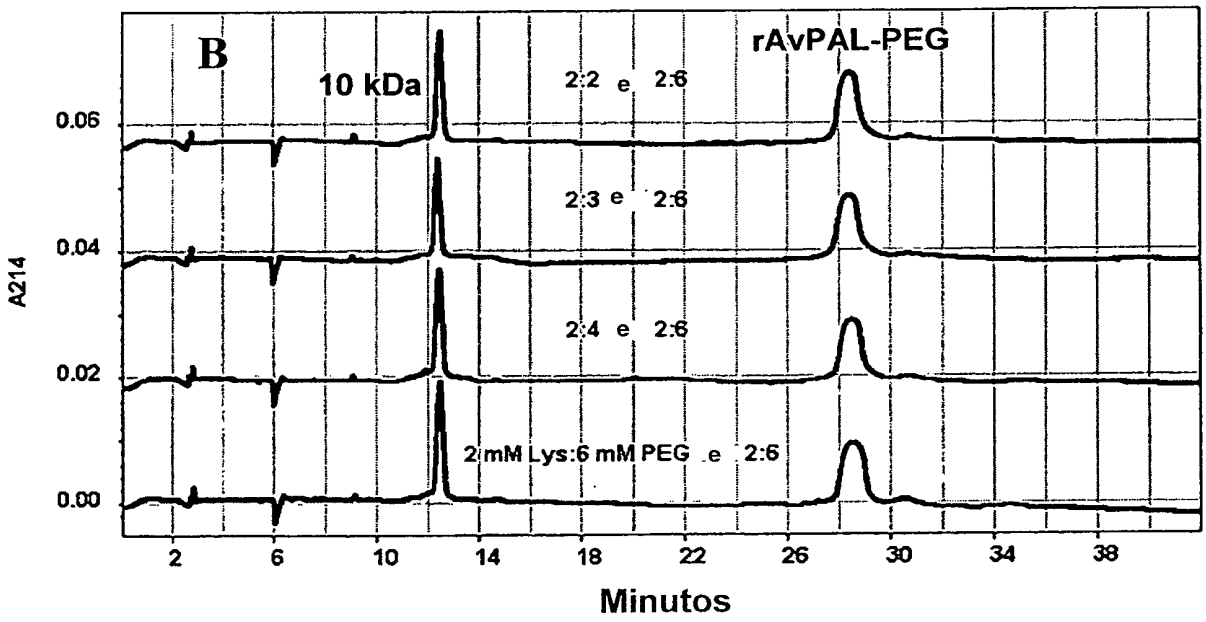


FIGURA 20

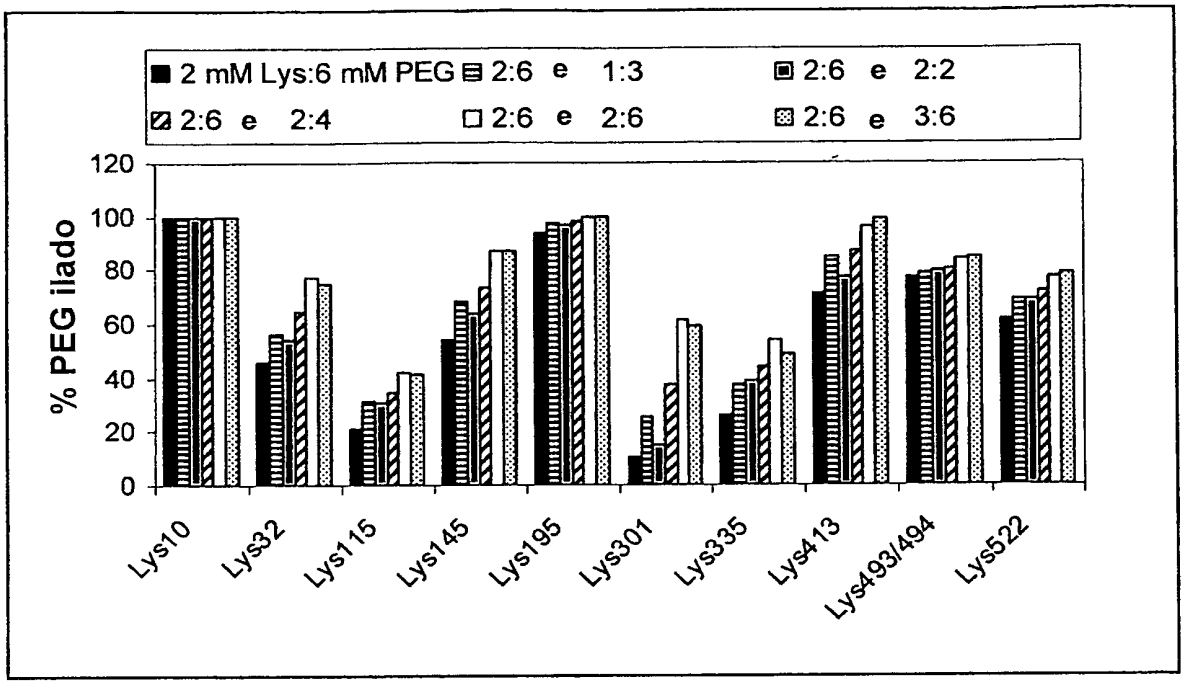
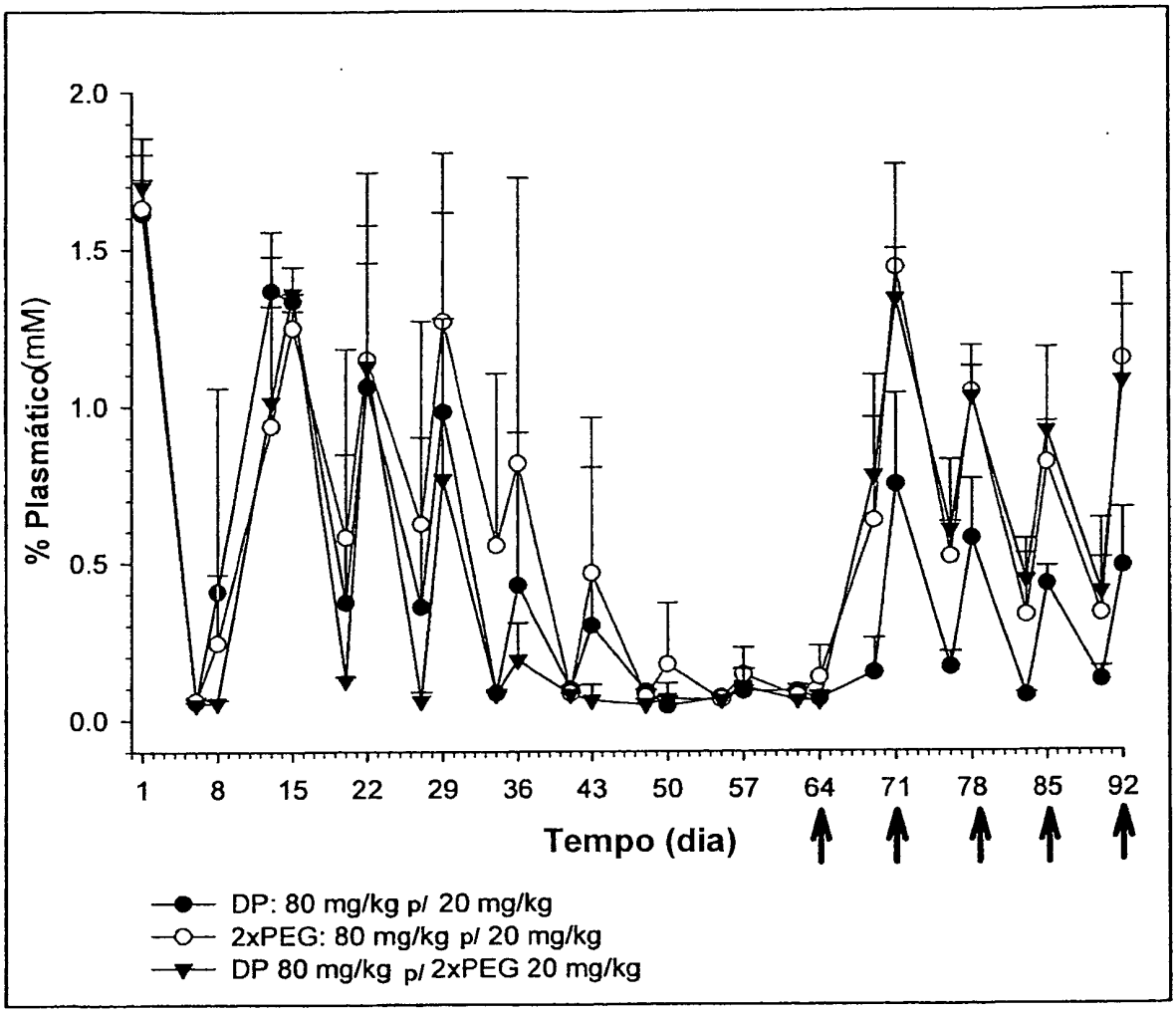

2 mM Lys:6 mM PEG
2:6 e 1:3
2:6 e 2:2
2:6 e 2:4
2:6 e 2:6
2:6 e 3:6
% PEG ilado
120
100
80
60
40
20
0
Lys10
Lys32
Lys115
Lys145
Lys195
Lys301
Lys335
Lys413
Lys493/494
Lys522

FIGURA 21


2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
% Plasmático(mM)
1
8
15
22
29
36
43
50
57
64
71
78
85
92
Tempo (dia)
DP: 80 mg/kg p/ 20 mg/kg
2xPEG: 80 mg/kg p/ 20 mg/kg
DP 80 mg/kg p/ 2xPEG 20 mg/kg