



MD/EP 3290436 T2 2019.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3290436 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 14/32 (2006.01.01)
A61K 38/00 (2006.01.01)
A23L 33/195 (2016.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2018 0783</p> <p>(22) Data de depozit: 2016.09.01</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16186895.5, 2016.09.01</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3290436, 2019.06.05</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2019, 2019.10.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 23/2019, 2019.06.05</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2018, 2018.09.30</p>
<p>(71) Solicitant: metaX Institut für Diätetik GmbH, DE</p> <p>(72) Inventatori: HOFFMANN Bernhard, DE; MUCKE Yvonne, DE; RASCHE Stefan, DE; JABLONKA Natalia, DE; SCHILLBERG Stefan, DE</p> <p>(73) Titular: metaX Institut für Diätetik GmbH, DE</p> <p>(74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Olga</p>	

(54) Proteină fără fenilalanină pentru tratamentul fenilcetonuriei

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la o proteină dietetică recombinantă, care nu conține fenilalanină și este o proteină dietetică cu o valoare biologică ridicată. Sunt furnizate în continuare un vector care codifică respectiva proteină dietetică, un microorganism care exprimă respectiva proteină, o metodă pentru producerea respectivei proteine și o compoziție dietetică cuprinzând respectiva proteină care, într-o

2
formă de realizare, este utilizată ca medicament și / sau aliment pentru scopuri medicale speciale la pacienții cu acumulări de fenilalanină în organism.

Secvențe: 7

Revendicări: 15

Figuri: 6

MD/EP 3290436 T2 2019.10.31

(54) Phenylalanine-free protein for the treatment of pku**(57) Abstract:**

1
A recombinant dietary protein is provided that is free of phenylalanine and is a dietary protein with a high biological value. Further provided are a vector encoding said dietary protein, a microorganisms expressing said protein, a method for the production of said protein, and a dietary composition comprising

2
said protein that in an embodiment is for use as a medicament and/or food for special medical purposes in patients with accumulations of phenylalanine in the body.

Sequences: 7

Claims: 15

Fig.: 6

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)****DOMENIUL TEHNIC**

- 5 Invenția se referă la o proteină dietetică recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia, în care proteina menționată nu cuprinde fenilalanină, pentru utilizare în alimentația pacienților afectați de fenilcetonurie.

CONTEXTUL INVENȚIEI

- 10 Fenilcetonuria (PKU) (OMIM 261600, ORPHA716) este o tulburare metabolică moștenită cu o incidență de 1:10.000 în Europa. În cele mai multe cazuri, aceasta este o tulburare a metabolismului aminoacizilor provocată de o funcție absentă sau deteriorată a enzimei hepatice fenilalanin hidroxilază (PAH). La rândul lor, deficiențele de PAH determină un exces de fenilalanină (Phe) în creier și plasmă. Deficiența de PAH se manifestă în cele din urmă prin lipsa tirozinei, care este un precursor pentru neurotransmițători. Împreună cu mutații care implică
- 15 enzime ale metabolismului pterinei, PKU este asociată cu hiperfenilalaninemie (HPA).

- Boala este în mod obișnuit diagnosticată în majoritatea țărilor imediat după naștere în timpul screening-urilor nou-născuților din cauza nivelului crescut de Phe din sânge. Lăsat nedetectat și netratat la începutul vieții, PKU duce la deteriorarea ireversibilă a sistemului nervos al sugarului, retard mental sever și dezvoltare slabă a creierului. Alte caracteristici decât
- 20 deficiențele intelectuale la pacienții netratați includ complicații neurologice, deficiențe neuropsihologice, precum și deficite de funcție executivă. S-a raportat că atunci când este lăsat netratat, un sugar suferă o scădere de IQ în primul an de viață. În funcție de vârsta la începutul tratamentului, nivelurile de Phe din sânge în diferite perioade de vârstă și complianța la terapia alimentară pentru PKU sunt însoțite invariabil de cel puțin o anumită scădere de IQ. Odată
- 25 detectată, afecțiunea este tratată prin furnizarea la sugar, și mai târziu la copil, a unei alimentații cu restricții de Phe. La adulți, suplimentele de proteine luate în mod obișnuit de către pacienții cu PKU clasici sunt lipsite de Phe, cu presupunerea că astfel de adulți vor primi cantități suficiente de Phe prin restul dietei, controlată într-un regim strict, astfel încât dieta globală să fie o alimentație cu Phe scăzută. În special, femeilor însărcinate care suferă de afecțiune li se recomandă să respecte un regim alimentar rigid cu Phe limitată, pentru a evita riscul de afectare a dezvoltării fătului și de malformații congenitale (sindromul PKU matern).

- În ultimii ani, s-a demonstrat că simptomele patologice care se manifestă datorită stării de
- exces de Phe, denumite colectiv hiperfenilalaninemie (HPA), pot fi împărțite în mai multe
- 35 tulburări distincte, care sunt diagnosticate în funcție de concentrațiile Phe plasmatice și de răspunsul la un co-factor pentru PAH. La un nivel inițial, HPA-urile pot fi împărțite în HPA cauzate ca urmare a unei deficiențe a cofactorului 6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterină (BH4) din cauza unor defecte enzimatice din metabolismul biopterinei (PKU malignă) și HPA provocată de o deficiență de PAH. Aceasta din urmă este în sub-împărțită suplimentar, rezultând cel puțin patru subcategorii în funcție de concentrația plasmatică a Phe în absența unei intervenții cu dietă
- 40 sau a unei alte intervenții terapeutice (denumită aici „concentrație de Phe plasmatică nerestricționată”) și de răspunsul la co-factorul BH4.

- Homeostazia Phe plasmatică normală este controlată strâns, ceea ce duce la o concentrație plasmată de Phe de $60 \mu\text{mol/L} \pm 15 \mu\text{mol/L}$. PKU clasică (ORPHA79254) este cea mai severă formă de PKU și este provocată de mutații nule sau severe în PAH, ceea ce duce la concentrații de
- 45 Phe plasmatică nerestricționate mai mari de $1200 \mu\text{mol/L}$ atunci când este lăsată netratată. Persoanele cu PKU clasică (sau severă) trebuie tratate cu un regim dietetic strict care se bazează pe o dietă cu Phe foarte scăzută pentru a reduce concentrațiile de Phe la un interval sigur. Au fost caracterizate și forme mai ușoare de PKU. O formă mai puțin severă de PKU este cea care se manifestă prin concentrații de Phe plasmatice nerestricționate de 10-20 mg/dL ($600\text{-}1200 \mu\text{mol/L}$) și este denumită în general „PKU ușoară” (ORPHA79253). Această formă moderată de PKU este gestionată prin utilizarea unor restricții dietetice moderate, de exemplu o dietă relativ scăzută în
- 50 proteine fără nevoia de suplimentare cu formule de aminoacizi fără Phe. HPA ușoară, denumită și HPA benignă sau HPA non-PKU (ORPHA79651) este caracterizată prin concentrații de Phe plasmatice nerestricționate cuprinse între $180\text{-}600 \mu\text{mol/L}$. Persoanele cu HPA non-PKU nu sunt tratate de rutină, deoarece sunt considerate a avea niveluri de Phe plasmatice care sunt în intervalul
- 55 „sigur”. În terapia dietetică pentru PKU, este vizat un interval sub $<360 \mu\text{mol/L}$, cu un interval de până la $600 \mu\text{mol/L}$ considerat acceptabil. În final, PKU/HPA cu răspuns la BH4 (ORPHA293284) este caracterizat prin concentrații de Phe plasmatice nerestricționate de $>360 \mu\text{mol/L}$ care pot fi reduse semnificativ sau normalizate după încărcare orală cu tetrahidrobiopterină (BH4; diclorhidrat de sapropterină). Această formă ușoară până la moderată de PKU/HPA este cauzată de
- 60

mutații specifice ale genei PAH care duc la proteine mutante cu activitate enzimatică reziduală semnificativă. Suplimentarea BH4 ca parte a managementului PKU/HPA permite ca unii pacienți să-și relaxeze regimul alimentar restricționat în Phe. Trebuie să se înțeleagă că termenii "tratament al PKU" sau "pacient cu PKU", așa cum este utilizat aici, sunt destinați să se refere la tratamentul pacienților și la pacienții cu următoarele forme de HPA, de exemplu PKU clasică, PKU ușoară, HPA ușoară și PKU/HPA cu răspuns la BH4.

La începutul terapiei dietetice a PKU la începutul anilor 1950, pacienților li s-au oferit aminoacizi esențiali (cu excepția Phe) prin hidrolizate de proteine. Prin urmare, o proteină cu un nivel relativ ridicat de aminoacizi esențiali, cum ar fi cazeina (o proteină care se găsește în mod obișnuit în laptele de mamifer, care constituie 80% din proteinele din laptele de vacă) sau albumina serică bovină, a fost hidrolizată urmat de o etapă de filtrare a peptidelor pentru a elimina cât mai mult din contaminarea cu Phe și/sau prin combinarea aminoacizilor liberi într-un amestec care include o proteină hidrolizată. Astăzi, sunt furnizate pacienților în mod tipic amestecuri echilibrate de aminoacizi cristalini liberi cuprinzând aminoacizi esențiali (cu excepția Phe). Astfel de amestecuri de aminoacizi pot avea un gust amar, pot provoca senzație de nisip în gură și pot fi considerate improprii sau nedorite pentru anumite utilizări. Ca urmare, astfel de amestecuri includ uneori arome care să mascheze gustul aminoacizilor liberi și/sau proteinei hidrolizate. În unele cazuri, compozițiile în care o proporție din conținutul de aminoacizi este furnizată prin polipeptide sau proteine se dovedesc a avea un gust mai bun decât compozițiile cu o proporție ridicată de aminoacizi totali furnizați ca aminoacizi liberi și/sau anumite proteine hidrolizate. Totuși, disponibilitatea unor astfel de compoziții a fost limitată, deoarece, în mod tradițional, formulările nutritive au fost fabricate din proteine izolate din produse alimentare naturale, precum zer izolat din lapte sau proteina din soia izolată din soia. Profilurile de aminoacizi ale acestor proteine nu îndeplinesc obligatoriu cerințele de aminoacizi pentru un mamifer. În plus, proteinele comerciale sunt constituite în mod obișnuit din amestecuri de proteine și/sau hidrolizate de proteine care pot varia în compoziția proteinelor lor, ducând astfel la imprevizibilitate în ceea ce privește valoarea lor nutritivă. Mai mult decât atât, numărul limitat de surse de astfel de proteine cu o valoare biologică ridicată a însemnat că doar anumite combinații de aminoacizi sunt disponibile pe scară largă pentru ingestia sub formă de proteine.

Glicomacropetida (GMP), o proteină naturală din zer produsă în timpul fabricării brânzei, a fost utilizată în tratamentul PKU. GMP în forma sa pură nu conține aminoacizii aromatici fenilalanină (Phe; F), tirozină (Tyr; Y) și triptofan (Trp; W), precum și arginină (Arg; R), histidină (His; H) și cisteină (Cys; C), dar este îmbogățită în aminoacizii neutri mari izoleucină (Ile; I) și treonină (Thr; T). Ca proteină dietetică disponibilă în comerț, ea conține cantități minime de Phe. Cu toate acestea, utilizată ca sursă proteică unică în suplimentele alimentare medicale pentru gestionarea dietetică a PKU, aceasta trebuie să fie suplimentată cu Trp, Arg, Leu, His și Tyr pentru a satisface nevoile zilnice de aport ale acestor aminoacizi esențiali și semi-esențiali și pentru a oferi un raport scăzut adecvat Phe/Tyr (<1). Devenind esențial la pacienții cu PKU, Tyr îmbunătățește comportamentul emoțional al acestora dependent de disponibilitatea pentru sinteza neurotransmițătorilor.

Prezenta invenție abordează problemele de mai sus, prin furnizarea unei proteine dietetice care cuprinde toți aminoacizii esențiali (cu excepția Phe) care are proprietăți îmbunătățite, cum ar fi o valoare biologică ridicată sau un gust neutru. Mai mult decât atât, proteina dietetică poate fi furnizată sub forma unui produs nutritiv care poate constitui parte din dieta normală a pacienților, cum ar fi produse coapte, cereale sau batoane presate. În mod alternativ, proteina dietetică poate fi furnizată într-o formă care este adecvată pentru producerea unui produs nutritiv de către pacient, cum ar fi amestecuri de coacere pre-preparate sau amestecuri de supă de legume.

Prin urmare, prezenta invenție are ca scop îmbunătățirea calității vieții pacienților cu PKU, deoarece toți pacienții PKU trebuie să respecte o dietă specială cu un nivel scăzut de Phe pentru o dezvoltare optimă a creierului. „Dieta pe viață” a devenit standardul recomandat de majoritatea experților. Dieta necesită restricționarea severă sau eliminarea alimentelor bogate în Phe, cum ar fi carne, pui, pește, ouă, nuci, brânză, legume, lapte și alte produse lactate. Alimentele cu amidon, cum ar fi cartofii, pâinea, paste și porumbul, trebuie să fie monitorizate. Aspartamul îndulcitor, prezent în multe alimente dietetice și băuturi răcoritoare, trebuie de asemenea evitat, deoarece aspartamul este constituit din doi aminoacizi: fenilalanina și acidul aspartic.

Sugarii pot fi în continuare alăptați la sân pentru a le oferi toate beneficiile laptelui matern, dar cantitatea trebuie, de asemenea, monitorizată și va fi necesară suplimentarea nutrienților lipsă. La acești pacienți sunt utilizate formulele suplimentare pentru sugari pentru a furniza aminoacizii și alte substanțe nutritive necesare, care altfel ar lipsi într-o dietă cu un nivel scăzut de fenilalanină. Pe măsură ce copilul crește, acestea pot fi înlocuite cu tablete, formule și alimente special formulate. Deoarece Phe este necesară pentru sinteza multor proteine, aceasta este necesară pentru

o creștere adecvată, dar nivelurile trebuie să fie controlate strict la pacienții cu PKU. În plus, tirozina, care este derivată în mod normal din fenilalanină, trebuie să fie suplimentată în dieta pacienților cu PKU.

5 Administrarea orală de tetrahidrobiopterină (sau BH4) (un co-factor pentru oxidarea fenilalaninei) poate reduce nivelul sanguin de Phe la anumiți pacienți. Un preparat tabletă din compusul sapropterină diclorhidrat (Kuvan®), care este o formă de tetrahidrobiopterină, este disponibil comercial. Kuvan® este primul medicament care poate ajuta pacienții cu PKU
10 responsabili la BH4 (ORPHA293284, în funcție de setarea clinică definită în rândul clinicienilor ca aproximativ 25-50% din populația cu PKU) scade nivelurile de Phe până la intervale recomandate. Lucrand indeaproape cu un dietetician, este posibil ca unii pacienți PKU care răspund la Kuvan® să poată crește cantitatea de proteine naturale pe care o pot mânca. Totuși, pacienții vor necesita în continuare o dietă cu restricție de Phe.

15 În teorie, secvențe de polipeptide sintetice cuprinzând un amestec dorit de aminoacizi ar putea fi proiectate și produse într-un cadru de laborator. Totuși, această abordare poate naște diverse probleme și, prin urmare, nu este întotdeauna aplicabilă. În primul rând, specialiștii calificați sunt conștienți că obținerea unor niveluri ridicate de producție a unor astfel de secvențe sintetice poate fi foarte dificilă. În al doilea rând, chiar dacă o astfel de proteină sintetică ar fi sintetizată, potrivirea ei pentru utilizare într-un produs nutritiv ar fi incertă. De exemplu, o astfel de polipeptidă care nu există în mod natural poate fi alergen sau toxină. Așadar, sunt preferate
20 proteinele naturale.

Înlocuirea resturilor de Phe în proteine naturale urmată de producerea prin recombinare a acestor proteine a fost propusă, de asemenea, în Brevetul U.S. nr. 6.495.344, referitor la ovalbumină și caseină, două proteine extrem de abundente în ouă și, respectiv, în lapte, și Brevetul U.S. nr. 6.004.930, care dezvăluie zeine gamma, o clasă de proteine prezente la porumb. Cu toate acestea, înlocuirea Phe în proteine naturale nu este întotdeauna posibilă și poate schimba structura
25 proteinei astfel încât proteina să nu mai fie exprimată.

WO 2013/148332 se referă la secvențe de polipeptide nutritive care există în mod natural compuse din combinații de aminoacizi care nu conțin Phe sau conțin Phe scăzută, unele dintre ele fiind secrete. WO 2014/081884 se referă la formulări de astfel de polipeptide nutritive izolate, de exemplu pentru scopuri nutritive. WO 2016/046234 se referă la o metodă pentru prepararea unei
30 proteine recombinat fără Phe sau cu Phe scăzută.

REZUMATUL INVENTIEI

Un obiect al invenției este de a furniza o proteină dietetică recombinată fără Phe, cu o valoare biologică ridicată, pentru utilizarea în compoziții dietetice pentru pacienții cu acumulare de
35 fenilalanină în organism, pentru a furniza toți ceilalți aminoacizi esențiali într-un echilibru suficient din punct de vedere dietetic.

Intr-un aspect, invenția se referă la o proteină dietetică recombinată care cuprinde o secvență de polipeptidă care este cel puțin 70% identică cu SECV ID NR. 2. Într-o variantă de realizare, proteina dietetică recombinată cuprinde o secvență de polipeptidă care este cel puțin
40 75%, mai preferabil cel puțin 80%, mai preferabil cel puțin 85%, mai preferabil cel puțin 90%, mai preferabil cel puțin 95%, mai preferabil cel puțin 98% identică cu SECV ID NR 2. Într-o variantă de realizare și mai preferată, proteina dietetică recombinată cuprinde o secvență polipeptidică 100% identică cu SECV ID NR 2. Proteina dietetică recombinată poate fi o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a secvenței din SECV ID NR 2 care este, cu preferință crescătoare, cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu SECV ID NR. 2.

Intr-o altă variantă de realizare, proteina dietetică recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia cuprinde una sau mai multe secvențe de proteină suplimentare care sunt prelungiri sau marcaje de purificare. Intr-o variantă de realizare preferată, secvența de
45 proteină suplimentară cuprinde SECV ID NR. 3.

Intr-un alt aspect, invenția se referă la un vector care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică proteina dietetică recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia.

Intr-un alt aspect, invenția se referă la un microorganism recombinat care cuprinde vectorul care codifică proteina dietetică recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia. Intr-o variantă de realizare, microorganismul este selectat din grupul format din
55 *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Actinomycetes*, *Caulobacter*, *Pichia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium botulinum*, *Flavobacterium heparinum*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha*, *Neurospora crassa*, *Arxula adenivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*,

Pseudomonas fluorescens, *Bacillus subtilis* și *Bacillus megaterium*. Într-o variantă de realizare preferată, microorganismul este selectat din grupul format din *Bacillus* sau *Pseudomonas*. Într-o variantă de realizare mai preferată, microorganismul menționat este *Bacillus subtilis* sau *Pseudomonas fluorescens*.

5 Într-un alt aspect, invenția se referă la o metodă de producere a proteinei dietetice sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia, metoda cuprinzând cultivarea microorganismului recombinat care poartă vectorul care codifică proteina recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia în condiții adecvate pentru producție. Proteina dietetică recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia pot
10 fi purificate. Într-o variantă de realizare, purificarea este efectuată cu ajutorul unei prelungiri de purificare. Este preferat ca proteina recombinată purificată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia să nu cuprindă mai mult de 1 g de Phe la 100 g proteină, de preferință nu mai mult de 0,45 g Phe contaminantă la 100 g proteină, mai de preferat nu mai mult de 0,35 g de Phe contaminantă la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,25 g de Phe contaminantă la
15 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,15 g Phe contaminantă la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,13 g de Phe contaminantă la 100 g proteină și cel mai preferat nu mai mult de 0,10 g de Phe contaminantă la 100 g proteină.

Într-un alt aspect, invenția se referă la o compoziție dietetică ce cuprinde proteina dietetică sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia. Într-o variantă de realizare,
20 compoziția dietetică constă din proteina dietetică sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia. Într-o altă variantă de realizare, proteina dietetică sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia este combinată cu excipienți suplimentari. Într-o variantă de realizare preferată, compoziția dietetică nu conține mai mult de 0,2 g de Phe la 100 g proteină, de preferință nu mai mult de 0,1 g de Phe contaminantă la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,05 g de Phe contaminantă la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,04 g de Phe contaminantă la 100 g proteină, mai de preferat nu mai mult de 0,03 g de Phe contaminantă la 100
25 g proteină și cel mai preferat nu mai mult de 0,02 g de Phe contaminantă la 100 g proteină.

Proteina dietetică sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică se utilizează ca aliment pentru scopuri medicale speciale; se face referire la directivele UE 2009/39/EG („Diatrahmenrichtlinie”) și 1999/21/EG („diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke”), precum și la regulamentul UE 609/2013 („Alimente pentru grupuri speciale”; „Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder, Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke und Tagesrationen für gewichtskontrollierende Ernährung”), care intră în vigoare pe 20 iulie 2016. În particular, proteina dietetică sau o porțiune suficientă din punct de
35 vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică menționată pot fi prevăzute pentru utilizare în îngrijirea unei tulburări caracterizate prin acumularea de fenilalanină în organism, cum ar fi hiperfenilalaninemia (HPA), de preferință fenilcetonuria (PKU). Astfel, într-un alt aspect, proteina dietetică sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică menționată este utilizată ca medicament. Într-o variantă de realizare preferată, proteina dietetică sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia este prevăzută pentru utilizare în
40 tratamentul unei tulburări caracterizate prin acumularea de fenilalanină în organism. Într-o variantă de realizare mai preferată, tulburarea este HPA, mai preferabil PKU.

FIGURI

45 Figura 1 arată evoluția în greutate a șoarecilor cu PKU tratate cu dietă standard de șoareci (grupul 1, fără tratament), dieta cu proteină GSP105 fără Phe (grupul 2) sau dieta cu aminoacizi fără Phe (grupul 3, tratament standard) pe durata de 28 zile de hrănire. Axa X reprezintă zilele din perioada de hrănire, axa y indică greutatea animalelor în grame.

50 Figura 2 ilustrează grafic concentrații medii de Phe în plasma sanguină la cele trei grupuri de șoareci diferite în decurs de 28 de zile de hrănire. Axa X reprezintă zilele perioadei de hrănire, axa y indică nivelul de L-Phe în micromoli pe litru de plasmă sanguină.

Figura 3 prezintă un exemplu de șoarece din fiecare grup de dietă cu modificări mai mult sau mai puțin parțiale, exprimate diferențiat, ale hipopigmentării pielii de șoarece după 28 de zile de hrănire.

55 Figura 4 arată raportul dintre fenilalanină și tirozină în sângele celor trei grupuri de șoareci diferite în decurs de 28 de zile de hrănire. Axa X reprezintă zilele din perioada de hrănire, axa y indică raportul fenilalanină/tirozină în sânge.

60 Figura 5 prezintă concentrațiile medii de Phe și Tyr în creierul șoarecilor de tip sălbatic (WT) și șoarecilor cu PKU tratați cu dietă standard de șoarece, dietă de proteină GSP105 fără Phe sau dietă cu aminoacizi fără Phe.

Figura 6 arată rapoartele medii Phe/Tyr în creierul de la șoareci WT și șoareci cu PKU tratați cu dietă standard de șoareci, dietă cu proteină GSP105 fără Phe sau dietă cu aminoacizi fără Phe.

DESCRIERE DETALIATĂ

5 Așa cum este utilizat în lucrarea de față, "recombinat" se referă la o biomoleculă, de exemplu, o genă sau o proteină, care (1) a fost scoasă din mediul său natural, (2) nu este asociată cu întreaga sau cu o porțiune a unei polinucleotide în care gena se găsește în natură, (3) este legată operabil la o polinucleotidă la care nu este legată în natură și/sau (4) nu apare în natură. Termenul "recombinat" poate fi utilizat pentru referire la izolate de ADN clonat, analogi de polinucleotidă sintetizați chimic sau analogi de polinucleotidă care sunt sintetizați biologic de sisteme heterologe, precum și proteine și/sau ARNm-uri codificate de astfel de acizi nucleici. Astfel, de exemplu, o proteină sintetizată de un microorganism este recombinată dacă este sintetizată dintr-un ARNm sintetizat dintr-o genă recombinată prezentă în celulă.

15 Termenul "proteină dietetică", așa cum este utilizat aici, se referă la o proteină adecvată pentru ingestie umană. Proteinele dietetice care furnizează toți aminoacizii esențiali sunt denumite proteine cu o valoare biologică ridicată. O proteină fără Phe care furnizează toți ceilalți aminoacizi esențiali este, de asemenea, considerată a fi o proteină cu o valoare biologică ridicată. Cazeina (o proteină întâlnită în mod obișnuit în laptele de mamifer, care constituie 80% din proteinele din laptele de vacă) și zerul (proteina din lichidul care rămâne după ce laptele a fost încheșat și presat) sunt surse majore de proteine dietetice cu o valoare biologică ridicată. Proteina dietetică din invenție cuprinde toți aminoacizii esențiali cu excepția Phe. Termenul "porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia" se referă la o parte a proteinei dietetice. Porțiunea suficientă din punct de vedere dietetic a proteinei dietetice are mai puțini aminoacizi decât proteina dietetică din invenție, dar cuprinde totuși toți aminoacizii esențiali, cu excepția Phe.

20 Termenul "suficient din punct de vedere dietetic", așa cum este utilizat aici, se referă la o secvență de polipeptidă care cuprinde toți aminoacizii esențiali cu excepția fenilalaninei, și este o proteină cu o valoare biologică ridicată.

25 Termenul "aminoacizi esențiali", așa cum este utilizat aici, se referă la histidină (His, H), arginină (Arg, R), izoleucină (Ile, I), leucină (Leu, L), lizină (Lys, K), metionină (Met, M), fenilalanină (Phe, F), treonină (Thr, T), triptofan (Trp, W) și valină (Val, V), care sunt aminoacizi necesari pentru sănătate și creștere, dar care nu pot fi sintetizați de corpul uman și trebuie obținuți din alimente.

Termenul "microorganism recombinat", așa cum este utilizat aici, se referă la un microorganism care a fost modificat pentru a purta o copie a unei gene recombinante.

35 Așa cum se utilizează aici, o „compoziție dietetică” este o compoziție adecvată consumului uman. Compoziția dietetică poate cuprinde majoritar proteină. Compoziția dietetică din invenție cuprinde proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia și are conținut scăzut de fenilalanină totală.

40 Termenul "proteină existentă natural", așa cum este utilizat aici, se referă la o proteină care este generată dintr-o secvență nealterată de om prezentă într-o gazdă naturală. Prin urmare, nici secvența de ADN care codifică proteina, nici secvența de aminoacizi a proteinei în sine nu a fost modificată față de secvențele care se găsesc în gazda naturală.

45 Pentru scopurile acestei dezvăluiri, un „produs nutritiv” este un produs adecvat consumului uman care cuprinde proteina dietetică recombinată din invenției sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică din invenție și conține o cantitate dorită de aminoacizi esențiali. Cantitatea dorită de aminoacizi esențiali necesară pentru un pacient pe zi depinde de vârsta pacientului și de dieta pacientului, adică de nivelul de restricție de proteine și/sau de Phe. Cantitatea dorită zilnic poate fi determinată de medic și/sau dietetician prin metode cunoscute în domeniu. O cantitate tipică este, de exemplu, pe bază de 0,8 g proteină pe kg corp pe zi pentru adulți sau 1,2 g proteină pe kg corp pe zi pentru copii. Produsul nutritiv în sine, adică înainte să fie adăugată proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică din invenție, nu conține proteine sau are un conținut scăzut în componente proteice.

50 Așa cum s-a utilizat aici, o „prelungire de purificare” este orice polipeptidă care are un partener de legare care poate fi utilizat pentru a detecta, a izola și/sau a purifica o a doua proteină sau secvență de polipeptidă de interes fuzionată cu prelungirea de purificare. În domeniu sunt cunoscute mai multe exemple și acestea includ o prelungire His-6, un epitop FLAG, un epitop c-myc, un Strep-TAGII, o prelungire biotină, o glutation 5-transferază (GST), o proteină de legare la chitină (CBP), o proteină de legare la maltoză (MBP), o prelungire de afinitate la metal sau Tag54 (Rasche și colab., The Open Biotechnology Journal 2011, 5: 1-6) sau modificări ale acestora.

60 Invenția se referă într-un aspect la o proteină dietetică recombinată fără Phe, cu o valoare biologică ridicată. Exemplul 1 descrie procedeul pentru identificarea unei astfel de

proteine dietetice utilizate pentru producerea proteinei dietetice recombinat e f ar e Phe conform invenției care poate fi utilizată pentru îngrijirea dietetică a pacienților cu acumulare de fenilalanină in organism. "Proteina de stres general 160 (G160_BACSU)" (SECV. NR. 1) (banca de date de proteine UniprotKb cu nr. de inregistrare P80872) de la *Bacillus subtilis* (tulpina 168) a fost identificată ca fiind un candidat proteină adecvat. Restul de Phe unic a fost înlocuit cu aminoacidul triptofan similar din punct de vedere structural (Trp) prin inlocuirea tripletei de baze de codificare a Phe cu o tripletă de baze de codificare a triptofanului la nivelul ADNc. Această înlocuire are ca rezultat o proteină dietetică ce nu conține Phe, ci în schimb aminoacidul esen ial Trp, oferind astfel o proteină dietetică ce conține toți aminoacizii esențiali, cu excepția Phe. Prin urmare, substitu ia este avantajoasă din două motive:  n primul rând este furnizată o proteină dietetică f ar e Phe, în al doilea rând toți ceilal i aminoacizi esențiali sunt prezen i în proteina dietetică  i nu este necesară o suplimentare. Acest lucru este deosebit de avantajos, deoarece Trp are un gust foarte amar  i adăugarea de Trp liber într-o compoziție dietetică ar avea ca rezultat o aromă amară. Mai mult decat atat, s-a constatat surprinzător că introducerea aminoacidului cu gust amar Trp nu a dus la o proteină dietetică cu gust amar. Astfel, într-o variantă de realizare, proteina dietetică recombinată cu o valoare biologică ridicată, care este f ar e Phe  i conține toți aminoacizii esențiali are o secvența de polipeptidă care este identică cu SECV ID NR. 2. O astfel de proteină dietetică este denumită GSP105. Într-o altă variantă de realizare, proteina dietetică recombinată cuprinde o secvența de polipeptidă care este cel puțin 70% identică cu SECV ID NR. 2. Mai preferabil, proteina dietetică recombinată cuprinde o secvența de polipeptidă care este cel pu in 75%, mai preferabil cel pu in 80%, mai preferabil cel pu in 85%, mai preferabil cel pu in 90%, mai preferabil cel pu in 95%, mai preferabil cel puțin 98% identică, mai preferabil cel puțin 99% identică  i cel mai de preferat cel puțin 100% identică cu SECV ID NR 2. Trebuie să se  nţelege a că identitatea secven ei trebuie determinată în raport cu secvența SECV ID NR 2 pe intreaga sa lungime. De exemplu, o proteină care cuprinde secvența din SECV ID NR 2  i care are la capătul C-terminal  i/sau N-terminal al proteinei dietetice aminoacizi suplimentari este considerată că are o identitate de secvența de 100% cu secvența SECV ID NR 2, deoarece aminoacizii C-terminali  i/sau N-terminali pot fi ignora i pentru compara ia de secvența.

Proteina dietetică recombinată poate cuprinde o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a secven ei din SECV ID NR 2 care este, în ordinea crescătoare a preferin ei, cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 % sau 99% identică cu SECV ID NR. 2.

Proteina dietetică recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia pot cuprinde una sau mai multe secvențe de proteine suplimentare care sunt prelungiri sau marcaje de purificare. Secven a de proteină suplimentară poate fi înlăturată op ional prin clivare. Dacă proteina dietetică sau por iunea suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia cuprinde mai mult de o secvența de proteină suplimentară, fiecare astfel de secvența, orice combina ie sau toate pot fi îndepărtate prin clivare. Trebuie înţeles că secvența de proteină suplimentară nu introduce un rest Phe sau, in cazurile in care o secvența de proteină suplimentară cuprinde un rest Phe, o astfel de secvența de proteină suplimentară este eliminată prin clivare. Într-o variantă de realizare, secvența de proteină suplimentară cuprinde SECV ID NR. 3. Într-o variantă de realizare preferată, secvența de proteină suplimentară cuprinde o TAG54 modificată (*Rasche  i colab.*) in care restul Phe a fost înlocuit cu un alt aminoacid, de preferin a un rest tirozină sau alanină. Astfel, intr-o variantă de realizare preferată particulară, secvența de proteină suplimentară cuprinde SECV ID NR 4, Tag54 modificată în care restul Phe a fost înlocuit cu un rest alanină. Într-o altă variantă de realizare preferată particulară, secvența de proteină suplimentară cuprinde Tag54 modificată în care restul Phe a fost înlocuit cu un rest tirozină (SECV ID NR 5). O astfel de înlocuire are avantajul că con inutul de Tyr este crescut  i raportul Phe/Tyr al proteinei dietetice este scăzut. Intr-o variantă de realizare preferată suplimentară, proteina dietetică recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia cuprinde în plus o prelungire C-terminală His-6. Intr-o variantă de realizare preferată în special, proteina dietetică recombinată cuprinde o secvența de polipeptidă care este identică cu SECV ID NR 2  i cuprinde ca secvențe de proteine suplimentare o prelungire C-terminală His-6  i SECV ID NR 4, rezultând proteina dietetică recombinată prelungită având secvența dezvăluită în SECV ID NR 6 (= GSP105-6His-Tag54-P15). Caracteristicile proteinei dietetice recombinat e prelungite (SECV. NR. 6) in compara ie cu proteina de stres general 160 (GSP160) de la *B. subtilis* sunt enumerate in Tabelul 1.

Tabelul 1: Compara ia între proteina existentă natural GSP160  i proteina dietetică recombinată prelungită GSP105 (SECV ID NR. 6) produsă în *Bacillus subtilis*  i *Pseudomonas fluorescens*

	GSP160	GSP105-6His-Tag54-P15
--	--------	-----------------------

	GSP160	GSP105-6His-Tag54-P15	
Origine	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Conținut de Phe [%]	0,6	0	0
greutate moleculară [kDa]	19	21	21
modificări	-	Phe → Trp prelungire His6, Tag54-P15	Phe → Trp prelungire His6, Tag54-P15
proprietăți speciale	secretată, stabilă la căldură	secretată, stabilă la căldură, aromă neutră	stabilă la căldură, aromă neutră

5 Prelungirea His-6 și/sau Tag54 modificată pot fi utilizate pentru purificarea proteinei dietetice recombinante sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia. S-a descoperit surprinzător că prelungirea Tag54-P15 îmbunătățește exprimarea proteinei în *B. subtilis*. Mai mult, secvența de proteină suplimentară a Tag54 modificată furnizează în mod avantajos aminoacizi pentru compoziția totală de aminoacizi a proteinei dietetice îmbunătățind astfel compoziția totală de aminoacizi a proteinei dietetice recombinante. Încă în plus, Tag54 modificată poate servi ca epitop de detecție pentru proteina de fuziune.

10 Proteina dietetică recombinantă din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia poate cuprinde în plus o coadă de proiectant. O „coadă de proiectant” se referă la o întindere scurtă de aminoacizi care poate fi adăugată la capătul C-terminal sau N-terminal al proteinei. Coada de proiectant conține 1 până la 5 aminoacizi. Într-o variantă de realizare, proteina dietetică cuprinde o secvență de polipeptidă care este cel puțin 70% identică cu SECV ID NR 2 și o coadă de proiectant. Opțional, proteina dietetică poate cuprinde în plus una sau mai multe secvențe de proteină suplimentare, cum ar fi o prelungire His-6 și/sau o Tag54 modificată. Într-o variantă de realizare preferată, coada de proiectant este fabricată din tirozină. Într-o variantă de realizare preferată în special, coada de proiectant are o tirozină, mai preferabil două tirozine și cel mai de preferat trei tirozine. Astfel, într-o variantă de realizare, proteina dietetică sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia cuprinde o secvență de polipeptidă care este cel puțin 70% identică cu SECV ID NR 2, o coadă de proiectant realizată din tirozină cuprinzând cel puțin un rest de tirozină, o prelungire His-6 și o Tag54 modificată.

25 Intr-un alt aspect, invenția se referă la un vector care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia. Într-o variantă de realizare, vectorul este o plasmidă. Într-o variantă de realizare preferată, plasmida este plasmida de expresie pHT43 inductibilă de către IPTG (MoBiTec) sau plasmida de expresie pDAB107209 inductibilă de către IPTG (Dow; US2008/0269070 A1).

30 O secvență de acid nucleic care codifică proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia poate fi determinată cu ușurință de către un specialist în domeniu folosind metode cunoscute, cum ar fi translația inversă. Translația inversă este o metodă în care o secvență de proteină este utilizată ca intrare și după utilizarea unui tabel de utilizare a codonilor se obține o secvență de ADN care reprezintă cea mai probabilă secvență de codificare non-degenerată. Secvența de acid nucleic obținută poate fi optimizată folosind algoritmi de optimizare cunoscuți. Aceasta a permis persoanei de specialitate să obțină o secvență de acid nucleic optimizată pentru exprimarea într-o gazdă specifică. O persoană de specialitate poate obține, de asemenea, acizi nucleici în mod comercial, furnizând secvența de aminoacizi dorită și organismul gazdă în care proteina urmează să fie produsă. O secvență de acid nucleic exemplificatoare pentru producerea proteinei dietetice recombinante având secvența polipeptidică din SECV ID NR 6 în *B. subtilis* este arătată în SECV ID NR. 7. Cu toate acestea, trebuie înțeles că alte secvențe de acid nucleic, cum ar fi secvențe de acid nucleic care sunt optimizate la codoni pentru celule gazdă specifice, pot să se abată de la secvența exemplificatoare producând totuși în continuare proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia. Chiar și pentru același organism secvența de acid nucleic poate varia în funcție de producătorul comercial și de algoritmul utilizat.

45 Intr-un alt aspect, invenția se referă la un microorganism recombinat care cuprinde vectorul care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia. Astfel, invenția se referă la un microorganism recombinat care exprimă proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune

suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia. Într-o variantă de realizare, microorganismul este selectat din grupul format din *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Actinomycetes*, *Caulobacter*, *Pichia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium botulinum*, *Flavobacterium heparinum*, *Lactococcus lactis*, *extorquens* *Methylobacterium extorquens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha*, *Neurospora crassa*, *Arxula adeninivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* și *Bacillus megaterium*. Într-o variantă de realizare preferată, microorganismul este selectat din grupul format din *Bacillus* sau *Pseudomonas*. Într-o variantă de realizare mai preferată, microorganismul este *Bacillus subtilis* sau *Pseudomonas fluorescens*.

Într-un alt aspect, invenția se referă la o metodă de producere a proteinei dietetice recombinante din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia, metoda cuprinzând cultivarea microorganismului recombinat din invenție în condiții adecvate pentru producerea proteinei dietetice sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia de către microorganismul recombinat. Într-o variantă de realizare, metoda cuprinde cultivarea microorganismului recombinat, extragerea proteinei dietetice recombinante sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia, purificarea proteinei dietetice recombinante sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia și uscarea proteinei obținute. Într-o altă variantă de realizare, metoda cuprinde etapele de cultivare a microorganismului recombinat, cum ar fi *Bacillus*, recoltarea supernatantului, opțional concentrarea supernatantului, purificarea proteinei dietetice recombinante sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia, schimbarea tamponului cu apă și uscarea cu înghețare și/sau cu pulverizare și/sau cu tambur și/sau cu extrudare a proteinei obținute. Cultivarea microorganismului recombinat cuprinde, de preferință, utilizarea culturilor inițială și principală. Recoltarea și concentrarea supernatantului cuprind, de preferință, diafiltrare, mai preferabil filtrarea în flux încrucișat folosind fibre cavitate cu diferite dimensiuni ale porilor. Este de preferat ca supernatantul după concentrare să fie concentrat de cel puțin 10 ori. Purificarea proteinei dietetice recombinante sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia poate cuprinde cromatografia de afinitate cu ioni metalici imobilizați (IMAC), de preferință folosind ioni de zinc și sefaroză chelatoare. Opțional, proteina purificată poate fi concentrată după schimbarea tamponului cu apă. Astfel, într-o variantă de realizare preferată, metoda cuprinde etapele de cultivare a microorganismului recombinat folosind inițială și principală, recoltarea supernatantului, concentrarea supernatantului de cel puțin 10 ori, purificarea proteinei dietetice recombinante sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia, schimbarea tamponului cu apă, opțional concentrarea proteinei purificate și uscarea cu congelare și/sau cu pulverizare a proteinei obținute.

Metoda de producere a proteinei dietetice recombinante din invenție sau a unei porțiuni suficiente din punct de vedere dietetic a acesteia are ca rezultat un randament ridicat de proteină, cum ar fi cel puțin 100-500 mg/L în *B. subtilis* sau cel puțin 2,4 g/L în *Pseudomonas fluorescens*. Proteina recombinată purificată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia cuprinde nu mai mult de 1 g de Phe la 100 g proteină, de preferință nu mai mult de 0,45 g de Phe de contaminare la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,35 g de Phe de contaminare la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,25 g de Phe de contaminare pentru 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,15 g de Phe de contaminare pentru 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,13 g de Phe de contaminare pentru 100 g proteină și cel mai preferat nu mai mult de 0,10 g de Phe de contaminare pentru 100 g proteină.

Proteina purificată uscată cu înghețare și/sau cu pulverizare și/sau cu tambur și/sau cu extrudare poate fi păstrată în stare congelată, cum ar fi la -20°C, în condiții răcite, cum ar fi la 4°C sau la temperatura camerei. Într-o variantă de realizare preferată, proteina purificată uscată cu înghețare și/sau cu pulverizare și/sau cu tambur și/sau cu extrudare este păstrată la -20°C.

Într-un alt aspect, invenția se referă la o compoziție dietetică cuprinzând proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia, fie singură, fie opțional cu alți excipienți. Într-o variantă de realizare, compoziția dietetică din invenție este suplimentată cu excipienți suplimentari selectați din grupul constând din vitamine esențiale, minerale și oligoelemente, substanțe asemănătoare vitaminelor (cum ar fi, dar fără a se limita la acestea, taurină, mio-inozitol, colină și carnitină), lipide (cum ar fi, dar fără a se limita la acestea, grăsimi, uleiuri, acizi grași, acid docosahexaenoic (DHA), acid eicosapentaenoic (EPA), trigliceride, fosfolipide, lecitină, esteri de acizi grași sau colesterol), carbohidrați (cum ar fi, dar fără a se limita la acestea, mono-zaharide/di-zaharide/oligo-zaharide/polizaharide, amidon, glucani, fructani sau pentosani), nucleotide, proteine, peptide, aminoacizi (cum ar fi tirozina) și produsele de reacție ale acestora, acizi, regulatori de aciditate, agenți anti-aglomerare, agenți anti-

spumare, anti-oxidanți, lianți, substanțe tampon (cum ar fi, dar fără a se limita la acestea, citrat de sodiu, carbonat de magneziu, bicarbonat de magneziu, carbonat de calciu, bicarbonat de calciu), agenți de aglomerare, emulgatori, enzime, agenți de întărire, arome, intensificatori de arome, agenți de spumare, agenți de gelifiere (cum ar fi, dar fără a se limita la acestea, guar, xantan, alginat, caragen, pectină), agenți de glazură, umectanți, amidon modificat, conservanți, gaz propulsor, agenți de inițiere, secheștranti, stabilizatori, agenți de îngroșare (cum ar fi, dar fără a se limita la acestea, amidon, celuloză), îndulcitori, coloranți alimentari, ierburi, condimente, extracte de plante și fitochimice. Într-o variantă de realizare preferată, compoziția dietetică poate fi suplimentată cu tirozină.

10 Intr-o variantă de realizare, compoziția dietetică este preparată sub formă de pulbere, granule, tabletă, capsulă, aglomerat, compoziție congelată, peletă, soluție, soluție macromoleculară, hidrocoloid, sistem de dispersie complex, suspensie, emulsie, lichid, spumă, gel, sol, sol solid, spumă solidă, cristal, solid amorf, pastilă, extrudat sau pastă. Compoziția dietetică poate fi păstrată cu sau fără răcire într-o formă uscată, uscată cu congelare, uscată cu pulverizare, 15 uscată cu tambur sau uscată cu extrudare.

Intr-o variantă de realizare preferată, compoziția dietetică nu conține mai mult de 0,2 g de Phe la 100 g proteine, de preferință nu mai mult de 0,1 g de Phe de contaminare la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,05 g de de Phe de contaminare la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,04 g de Phe de contaminare la 100 g proteină, mai de preferat nu mai mult de 0,03 g 20 de Phe de contaminare la 100 g proteină și cel mai preferat nu mai mult de 0,02 g de Phe de contaminare la 100 g proteină.

Proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică din invenție poate fi utilizată într-un produs nutritiv. Produsul nutritiv poate fi selectat, dar nu se limitează la acestea, din grupul format din băuturi, 25 supe, batoane presate, napolitane, gofre, budinci, alimente de tip gel, alimente de tip carne, cum ar fi analogii de carne care cuprind fibre non-animale, analogi de cârnați, produse coapte, sosuri, sosuri pentru salate, cereale, fulgi, amestecuri de copt, cum ar fi amestecuri de briose, amestecuri de gofre sau amestecuri de clătite, făinuri, fursecuri, biscuiți, creme, spume, tarte, creme de șarlotă, compoturi, înghețată, șerbeturi, parfait, marinate, produse de intins pe paine, siropuri, piureuri, aluat, jeleuri, unturi, gemuri, analogi de brânză, analogi de brânză cremă, analogi de iaurt, analogi de lapte, cipsuri și produse solide extrudate. Produsul nutritiv poate fi fabricat și cumpărat cuprinzând compoziția dietetică a invenției sau poate fi preparat individual de către pacient. De exemplu, băuturile sau supele pot fi preparate adăugând compoziția dietetică în apă, suc de fructe, lapte de orez sau bulion de legume. In mod avantajos, proteina dietetică recombinată sau o 35 porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia tolerează tratamentele cu căldură fără modificări ale valorii sale nutritive, consistenței sau aromei sale. Astfel, atunci când se prepară un produs nutritiv, cum ar fi de exemplu produsele coapte, cerealele, supele sau batoanele presate, proteina dietetică recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia pot fi încălzite, coapte, fierte, prăjite, prăjite profund, preparate sote, fripte înăbușit, fierte înăbușit, 40 fripte, gătite la aburi, fierte, fierte la foc mic, fripte la grătar, gătite la sub-vid (la temperatură scăzută timp îndelungat), omogenizate, sterilizate, tindalizate, tratate la presiune înaltă-temperatură scăzută, gătite la vid, prelucrate prin congelare, pasteurizate sau extrudate.

Intr-o variantă de realizare, produsul nutritiv conține cantități foarte mici de Phe. Într-o variantă de realizare preferată, produsul nutritiv nu conține Phe. Cantitatea de Phe de contaminare 45 din compoziția dietetică din invenție care este adăugată la produsul nutritiv poate varia în funcție de produsul nutritiv. Intr-o variantă de realizare, produsul nutritiv nu conține mai mult de 0,2 g de Phe la 100 g proteină, de preferință nu mai mult de 0,1 g de Phe de contaminare la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,05 g de Phe de contaminare la 100 g proteină, mai mult de preferință nu mai mult de 0,04 g de Phe de contaminare la 100 g proteină, mai preferabil nu mai mult de 0,03 g de Phe de contaminare la 100 g proteină și cel mai mult preferabil nu mai mult de 0,02 g de Phe de contaminare la 100 g proteină. 50

Intr-un alt aspect, invenția se referă la proteina dietetică recombinată din invenție sau la o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau la compoziția dietetică a invenției pentru utilizare ca medicament și/sau aliment pentru scopuri medicale speciale. Proteina dietetică 55 recombinată sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică poate fi sub formă de pulbere, granule, tablete, pelete, suspensie, emulsie, lichid, pastile, extrudat sau pastă. Administrarea poate fi de trei până la de cinci ori pe zi. Doza poate fi, de exemplu, de cel puțin 5, 10, 15, 20, 30, 40 sau 50 g proteină dietetică. Administrarea poate fi în timpul meselor. Administrarea poate fi orală sau enterică. De preferință, administrarea este orală. 60 Medicamentul poate fi administrat copiilor, adolescenților și adulților. Într-o variantă de realizare preferată, proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere

dietetic a acesteia sau compoziția dietetică din invenție este destinată pentru utilizare în tratamentul unei tulburări caracterizate prin acumularea de fenilalanină în organism. Într-o variantă de realizare chiar și mai preferată, tulburarea este hiperfenilalaninemia sau fenilcetonuria. Într-o variantă de realizare preferată suplimentară, proteina dietetică recombinată sau o porțiune

5 suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică este utilizată în combinație cu un medicament pentru gestionarea PKU sau HPA, cum ar fi BH4 sau analogul acestuia.

Potrivirea proteinei dietetice recombinante din invenție pentru utilizare în gestionarea fenilcetonuriei (PKU) este prezentată în Exemplul 3. Exemplul 3 arată rezultatele unui studiu pilot

10 in care șoareci cu PKU sunt tratați fie cu o dietă în care unica lor sursă de aminoacizi este un amestec de aminoacizi liberi fără Phe, dar cu 1,5% Tyr (Harlan Teklad TD.97152; Seagraves și McBride, Mol Genet Metab 2012, 107 (4): 650-658) (denumită aici în continuare "dieta cu aminoacizi fără Phe") care seamănă cu standardul actual în produsele alimentare medicale pentru

15 pacienții cu PKU, sau cu o dietă în care unica lor sursă de aminoacizi este proteina dietetică recombinată GSP105 suplimentată cu 0,2% Phe (menționată aici sub denumirea de „dieta cu proteină GSP105 fără Phe” sau „dieta cu GSP105 fără Phe”). Suplimentarea dietei cu Phe în experiment s-a făcut deoarece șoarecii nu aveau altfel acces în niciun fel la acest aminoacid

20 esențial. Șoarecii hrăniți cu dieta cu proteină GSP105 fără Phe au arătat menținerea în greutate sau creșterea în greutate, spre deosebire de șoarecii alimentați cu dieta cu aminoacizi fără Phe, care au prezentat pierdere în greutate (Figura 1). Acest lucru se poate explica prin faptul că proteina dietetică recombinată este o sursă de proteină intactă structural. Deși în domeniul dieteticii există o

25 dezbatere asupra faptului dacă proteinele și fragmentele de proteine rămân disponibile pentru scopuri metabolice în comparație cu compozițiile de aminoacizi liberi, se crede că grupul de aminoacizi disponibili dintr-o compoziție de aminoacizi cristalini trebuie să fie metabolizat

30 imediat, deoarece organismul nu le poate stoca pentru utilizarea metabolică viitoare. Proteinele și fragmentele de proteine sunt însă digerate succesiv, ceea ce asigură o eliberare continuă de aminoacizi liberi disponibili pentru scopuri metabolice pe o perioadă mai lungă de timp. Astfel, folosind proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică din invenție ar putea furniza aminoacizi pe o perioadă

35 mai lungă, conducând astfel la menținerea în greutate sau la creșterea în greutate.

Fără legătură cu teoria, scăderea în greutate la șoarecii hrăniți cu dieta de aminoacizi fără Phe ar putea de asemenea să fie determinată de lipsa cantității minime de Phe necesară în dietă, deoarece este posibil ca animalele să ajungă la metabolism catabolic în care proteina endogenă a fost metabolizată pentru a menține nivelurile de Phe necesare în sânge. Un astfel de fenomen poate

40 fi observat și la pacienții cu PKU care suferă de malnutriție, care metabolizează proteina endogenă și în schimb suferă de niveluri ridicate de Phe în sânge. Absența completă și absolută a Phe în dieta pacienților cu PKU nu este de dorit și este imposibilă, astfel că pacienții cu PKU obțin cantitatea minimă din aminoacidul esențial Phe prin alimentele lor. Pe de altă parte, malnutriția poate apărea și la pacienții cu PKU, deoarece dieta strictă poate provoca o lipsă și a altor aminoacizi esențiali.

45 Astfel, utilizând proteina dietetică recombinată din invenție sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia sau compoziția dietetică din invenție s-ar putea preveni malnutriția la pacienții cu PKU.

EXEMPLE

Exemplul 1 - Descoperirea genelor candidate

Pentru identificarea potențialilor candidați proteine care îndeplinesc criteriile necesare pentru o proteină nutritivă fără fenilalanină, a fost utilizat un algoritm de căutare auto-proiectat. Secvențe de proteine din diverse genuri sau specii au fost obținute din baza de date UniProt

50 (<http://www.uniprot.org>) folosind caracteristica de import din CLC Main Workbench 6.6.1.

Au fost utilizate proteine provenite din specii care sunt surse obișnuite pentru alimente precum legume (de exemplu cartoful), dar și provenite din microorganisme (de exemplu, drojdie) sau animale (de exemplu, bovine). Ca lanț de căutare a fost utilizat fie numele latin sau comun al speciei/genului, în funcție de numele care a dus la un număr mai mare de potriviri. Toate

55 potrivirile, cu excepția proteinelor necaracterizate, au fost descărcate, rezultând un număr total de 836.037 de secvențe din diverse specii. Următoarele lanțuri de căutare au fost utilizate pentru a identifica potrivirile enumerate în Tabelul 2.

Funcția „Creează statistici de secvență” din cadrul CLC cu loturi de 5.000 până la 10.000 de secvențe a fost utilizată în continuare pentru a genera liste cu aminoacizii prezenți în fiecare dintre cele 836.037 de gene. Aceste liste au fost importate în Excel, iar compoziția de aminoacizi a fost comparată cu două standarde nutriționale: așa-numitul principiu cartof-ou (Kartoffel-Ei Standard, KES), precum și compoziția de aminoacizi pe care producătorul Milupa o folosește în

60

produsul său PKU1, o compoziție de aminoacizi fără Phe, utilizată pentru tratamentul pacienților cu PKU.

În plus, a fost analizat numărul total de Phe în secvența de aminoacizi, precum și numărul total de aminoacizi. Toți factorii analizați au fost evaluați în funcție de setările din Tabelul 3.

5 **Tabelul 2: Lanțuri de căutare pentru selectarea genelor și numărul de potriviri corespunzător**

Lanț de căutare	Potriviri	Lanț de căutare	Potriviri	Lanț de căutare	Potriviri
Lactobacillus	259251	Porphyra	1214	Mango	241
Bifidobacterium	80262	Gadus	1084	Merluccius	231
Saccharomyces cerevisiae	73620	Psetta	979	Clupea	221
Oryza	67411	Musca	898	Lophius	163
Porumb	63309	Căpșună	739	Echinochloa	154
Bacillus subtilis	47456	Secale	721	Equisetum arvense	146
Panicum	40273	Morcov	668	Urchloa	145
Setaria	39691	Spinacia oleracea	624	Grau + siloz	112
Solanum lycopersicon	37921	Năut	584	Digitaria	101
Sorg	34201	Thunnus	551	Hypericum perforatum	84
Orz	26663	Latuca sativa	500	Achillea millefolium	81
Salmo	14939	Linum usitatissimum	499	Sardina	76
Triticum	8766	Salvia	472	Pollachius	60
Bos taurus	7498	Cucurbita	401	Plantago lanceolata	57
Citrus	5694	Cucurbita	395	Verbascum	45
Sus scrofa	4905	Pennisetrum	374	Thymus	44
Sebastes	2980	Crataegus	289	Viscum Album	44
Cartof	2548	Eragrostis	288	Urtica dioica	42
Ipomoea	1635	Eleusine	288	Matricaria	40
Cyprinus	1559	Coix	274	Rosmarinus officinalis	24
Essox	1509	Papalum	245	Tussilago farfara	18

10 Potrivirile peste un scor total de 20 (suma scorurilor pentru conținutul de Phe, greutatea moleculară și abaterea la KES și PKU1 pentru o singură proteină) au fost evaluate manual în ceea ce privește starea secvenței (completă sau parțială), existența proteinei (dovezi la nivel de proteine, presupus, dedus din omologie), funcția proteică și potențialul alergen (http://www.allergenonline.org, fereastra de culisare de 80 de meri). Proteinele cu o secvență completă, dovezi la nivel de proteine și lipsite de potențial alergen au fost preselectate și
15 analizate în continuare cu privire la funcția lor moleculară. Toate proteinele care au o activitate de legare ADN/ARN cunoscută sau presupusă, precum și proteine toxice au fost respinse de pe lista potențialilor candidați.

Printre ceilalți candidați am identificat „Proteina de stres general 160 (G160_BACSU)” din *Bacillus subtilis* (tulpina 168) ca candidat proteic adecvat.

20 Pe baza secvenței de proteine publicate de UniProt (www.uniprot.org) am proiectat o genă de sinteză folosind funcția de transcriere inversă a CLC Main Workbench.

Tabelul 3: Evaluarea proteinelor candidat

Conținut de fenilalanină		Greutate moleculară		Abaterea în compoziția de aminoacizi în raport cu PKU1 și KES (fără F, Q, N)	
Număr total de Phe	Scor	AS	Scor	Abatere	Scor
> 10	-10	> 500	0	> 80	-2
< 10	1	< 500	1	< 80	0
< 6	2	< 200	2	< 60	2
< 3	4	< 80	0	< 40	5
< 2	8	< 50	-100	< 30	10
< 1	10				

*Abaterea se calculează ca valoarea adăugată absolută între fiecare aminoacid din secvența proteică analizată în comparație cu compoziția de referință KES și PKU1 (procentuală).

5 Două secvențe de etichetă epitop (Tag54-P15, tag 6 His6) au fost adăugate la capătul 3' al secvenței de codificare a proteinei de stres General (GSP) pentru a permite detectarea, cuantificarea și purificarea specifică a proteinelor, rezultând secvența de nucleotide prezentată în SECV ID Nr.: 7. În plus, situsurile enzimei de restricție BamHI și AatII au fost adăugate la capătul 5' și 3' permițând clonarea constructului genei într-un vector de expresie.

Secvența genică a fost desemnată ca GSP105 și optimizată în ceea ce privește utilizarea codonului și stabilitatea ARN pentru exprimarea în *Bacillus subtilis* și ulterior sintetizate de GenScript (SUA).

10 **Exemplul 2 - Producția în *B. subtilis***

Genă sintetică GSP105 având secvența de nucleotide așa cum este arătat în SECV. ID NR.: 7 a fost introdusă în *Bacillus subtilis* vector de expresie pHT43 (MoBiTec, Göttingen, Germania), care permite secreția proteinei recombinante în mediul de cultură și este introdusă *B. subtilis* tulpina WB800N cu deficit de protează (MoBiTec), urmând instrucțiunile de fabricație.

15 După transformare, clonele pozitive au fost selectate pe plăcile de selecție cu antibiotic; prezența vectorului de expresie a fost confirmată în continuare prin PCR, extracție plasmidică și secvențarea ulterioară a ADN-ului. Culturile stocuri de glicerol au fost generate și stocate la -80°C.

20 O cultură inițială a recombinantului *B. subtilis* GSP105 a fost preparată prin inoculare de 1 L mediu-TB (Carl Roth, Karlsruhe, Germania), completat cu cloramfenicol (Carl Roth) și neomicină (Carl Roth) la concentrații finale de 5 μg/ml fiecare, cu 1 ml soluție stoc *B. subtilis* GSP105. Cultura a fost cultivată timp de 24 de ore la 28°C și 160 rpm în 2,5 L "Ultra Yield Flasks" (Thomson Instrument Company, California, SUA).

25 Pentru expresia proteinelor recombinante, mediul TB suplimentat cu cloramfenicol și neomicină a fost inoculat cu cultura inițială la un raport de 1:20 (v/v). Pentru a induce expresia proteinei țintă, IPTG a fost adăugat la o concentrație finală de 0,5 μM. Cultura a fost cultivată timp de 20 ore la 37°C și 160 rpm.

30 După cultivare, celulele de au fost îndepărtate prin centrifugare, urmate de filtrare sterilă folosind un modul de filtrare cu fibre goale de 0,22 μm (N02-E20U-05-N, Spectrum Labs, Los Angeles, SUA) la 2,5 L/min cu o presiune transmembrană de până la 1,6 bar. Pentru a reduce volumul procesului, supernatantul de cultură clarificată a fost concentrat de 10 ori utilizând un modul de fibre goale de 10 kDa (N02-E010-05-N, Spectrum Lab) la 2,5 L/min cu o presiune transmembrană de până la 1,6 bar.

35 GSP105 a fost purificat din supernatantul de cultură concentrată prin IMAC folosind 500 ml Cheparing Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Suedia) ambalat într-o coloană XK 50/40 și încărcat cu ioni Zn conform instrucțiunilor de fabricație. Supernatantul a fost încărcat pe coloană cu 76 cm/h; apoi coloana a fost spălată cu 5 volume de coloană (CV) PBS la 92 cm/h. Proteina legată a fost eluată din coloană cu 5 CV PBS, pH 8,0, 250 mM imidazol la 92 cm/h. Frațiunile de eluție IMAC au fost reunite și tamponul a fost schimbat în apă fără sare folosind un modul de fibre goale de 10 kDa (S02-Eo10-05N, Spectrum Labs) la 900 ml/min cu o presiune transmembrană de până la 1,6 bar. Pentru a asigura un schimb eficient de tampon, volumul eșantionului a fost înlocuit de șapte ori. Proteina purificată și re-tamponată a fost menținută la -20°C și ulterior congelată și uscată prin pulverizare.

40

Concentrația GSP105 a fost determinată prin concurența ELISA (Piotrkowski și colab., PLoS ONE, 2012, 7 (9): e45803), integritatea și puritatea proteinelor au fost confirmate de SDS-Gel și de imunoblot (Rasche și colab.).

Exemplul 3 - Studiu de hrănire a șoarecilor (studiu pilot)

5 **Model de studiu:**

Șase șoareci PKU homozigoti, masculi, adulți (Pah^{enu2/2}; Shedlovsky și colab., Genetics 1993, 134: 1205; <http://www.pahdb.mcgill.ca/?Topic=Information&Section=Mouse&Page=1>) au fost separați în 3 grupuri de 2 șoareci fiecare. Animalele aparținând aceluiași grup au împărțit o cușcă. Grupurile au fost hrănite cu diete așa cum sunt enumerate în Tabelul 4. Principalele diferențe între diete au fost componenta proteică și conținutul de Phe, așa cum este stabilit în Tabelul 5. Înainte de studiul de hrănire, șoarecii PKU au fost alimentați cu diete standard pentru șoareci. Studiul de hrănire s-a extins pe o perioadă de 28 de zile, timp în care animalelor li s-a oferit hrană și apă *ad libitum*.

15 **Tabelul 4: Grupuri de animale și dietele animalelor (N = 6)**

Grup de animale	Dietă	Număr de animale
1	Dieta standard pentru șoareci	2
2	Dieta cu proteine GSP105 fără Phe	2
3	Dieta fără aminoacizi Phe	2

Tabelul 5: Dietele animalelor

Dietă	% proteină	Conținut Phe
Dieta standard pentru șoarece	18,5 (proteine brute)	Proteine brute (cazeină)
Dieta cu proteine GSP105 fără Phe	18,5 (GSP105)	GSP105, suplimentat cu Phe la 2 g/kg
Dieta fără aminoacizi Phe (Harlan Teklad, TD.97152)	15,4 (fără aminoacizi)	Înlocuit cu tirozină 1,5%

20 "Dieta cu proteine GSP105 fără Phe" sau "dieta GSP105 fără Phe" se referă la o dietă în care singura sursă de aminoacizi este proteina dietetică recombinantă GSP105 suplimentată cu 0,2% Phe. Dieta cu proteine Phe fără GSP105 nu a fost complet lipsită de Phe. Frația de proteină GSP105 purificată a conținut o cantitate mică de contaminare probabilă rezultată din urme de medii sau metaboliți secundari, care s-au ridicat la 0,45 grame Phe la 100 g de proteine totale. Proteina GSP105 în sine nu era complet fără Phe. Contaminarea minoră cu Phe nu a prezentat probleme pentru șoarecii PKU. Mai mult, din moment ce Phe este un aminoacid esențial și nu au fost puse la dispoziția animalelor surse alternative nutritive, Phe în formă cristalină a fost adăugat la dieta cu proteină GSP105 fără Phe până la o concentrație finală de Phe de aproximativ 0,2%.

25 "Dieta fără aminoacizi Phe" se referă la o dietă în care singura sursă de aminoacizi este un amestec de aminoacizi fără Phe, dar cu Tyr 1,5%, care seamănă cu standardul actual în alimentele medicale pentru pacienții cu PKU. Dieta fără aminoacizi Phe a fost complet lipsită de Phe, în timp ce conținutul de tirozină a crescut la 1,5%.

In „dieta standard pentru șoarece”, singura sursă de proteine a fost cazeina.

30 In zilele 0, 1, 7, 14, 21 și 28, 5-10 μl de sânge au fost prelevate din vena de la coadă a animalelor după ce au postit 4 ore. Conținutul de plasmă sanguină Phe și conținut de tirozină a fost determinat prin analiza MS/MS.

35 In zilele 0, 1, 2, 4 și 7, șoarecii au fost cântăriți și a fost verificată starea lor generală de sănătate.

In zilele 14, 21 și 28, șoarecii doar au fost cântăriți. În ziua 28, toate animalele au fost eutanasiate cu CO₂. Ficatul, rinichii, creierul și inimile fiecărui animal au fost recoltate și congelate în azot lichid pentru analize ulterioare.

Rezultate:

Greutate corporală

45 Hrănirea cu dieta standard pentru șoareci a avut drept principiu menținerea greutății (Figura 1, linii solide cu pătrate). Când au fost hrăniți cu dietă proteică GSP105 fără Phe, șoarecii PKU au câștigat în greutate (Figura 1, linii punctate cu cercuri), în timp ce acei șoareci alimentați cu dieta cu aminoacizi fără Phe au demonstrat o ușoară pierdere în greutate (Figura 1, liniile intrerupte cu triunghiuri). Deși dimensiunea grupului mic nu a permis analiza statistică, tendința observată

susține GSP105 ca o componentă proteică adecvată pentru menținerea în greutate și/sau creșterea în greutate. Creșterea în greutate observată se poate datora faptului că este o proteină dietetică cu o valoare biologică mai mare decât cazeina.

Reducerea nivelului de Phe din sange

5 Șoarecii PKU aflați pe dietă standard de șoarece au păstrat un nivel mediu ridicat de Phe în sange (Figura 2, linie solidă cu pătrate). Dieta fără aminoacizi Phe a dus la o scădere drastică a nivelului mediu de Phe în sange (<360 micromoli pe litru, intervalul fiziologic vizat în tratamentul PKU) (Figura 2, linia întreruptă cu triunghiuri). Nivelurile medii de Phe din sange din dieta cu proteină GSP105 fără Phe au fost, de asemenea, reduse în mod clar, apropiindu-se de <360 micromoli pe litru după 28 de zile (Figura 2, linia punctată cu cercuri). Aceste rezultate indică faptul că proteina dietetică recombinantă dezvăluită este potrivită pentru gestionarea PKU dietetice.

15 Șoarecii PKU netratați având fond genetic C57BL/6 au blană brună spre deosebire de blana neagră observată la șoarecii de tip sălbatic din același fond genetic, fenomen numit hipopigmentare. Nivelurile crescute de Phe din sânge inhibă enzima tirozinază, care perturbă sinteza melaninei pigmentare. Nivelurile scăzute de Phe din sânge în cayul șoarecilor hrăniți cu diete pentru șoareci fără Phe sau cu conținut redus de Phe au dus la o hipopigmentare completă dar o inversare parțială pe întregul corp la animale (Figura 3). Figura 3 prezintă un exemplu de șoarece din fiecare grup de dietă cu modificări mai mult sau mai puțin parțiale ale hipopigmentării blănii de șoarece după 28 de zile de la hrănire. Fiecare șoarece este prezentat dorsal și ventral. Șoarecii alimentați cu dieta cu proteine GSP105 fără Phe au prezentat o culoare neagră aproape complet pe partea ventrală. Săgețile negre și albe indică cea mai puternică inversare a hipopigmentării atinsă după perioada de hrănire. Presupunem o inversare completă a culorii blănii de la maro la negru în cazul dietelor fără Phe sau cu conținut redus cu o perioadă de hrănire prelungită.

Raporturile Phe/Tyr în plasma sanguină

25 Dieta fără aminoacizi Phe a avut ca rezultat cel mai mic raport Phe/Tyr în plasma sanguină a șoarecilor PKU (Figura 4, liniile întrerupte cu triunghiuri), urmată de dieta cu proteină GSP105 fără Phe (Figura 4, linii punctate cu cercuri). Șoarecii PKU de la șoarecii cu dieta standard pentru șoarece sunt descriși în Figura 4 ca linii continue cu pătrate ca referință. Raportul Phe/Tyr pentru dieta fără proteine Phe fără GSP105 ar putea fi îmbunătățit prin reducerea cantității de contaminanți Phe din proteina dietetică recombinantă GSP105 și/sau prin suplimentarea cu tirozină cristalină, așa cum este utilizată în dieta cu aminoacizi fără Phe sau adăugarea unei tirozine care conține modelul coadă.

Exemplul 4 - Măsurarea concentrațiilor Phe și Tyr în creierul șoarecilor PKU din Exemplul 3

Metode:

Prepararea țesutului cerebral de șoarece

40 Au fost utilizate creierele animalelor din exemplul 3. Creierele de șoarece întregi înghețate au fost dezghețate pe gheață și lizate în tampon de omogenizare (10 μl/mg țesut) conținând 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitol, 0,2 mM fenilmetilsulfonil fluorură, 1 μM leupeptină și 1 μM de pepstatină și omogenizat folosind Quiagen TissueLyser II la 4°C. După centrifugare la 13.000 g și 4°C timp de 30 min, supernatanții s-au menținut înghețați la -80°C.

Măsurarea proteinelor

45 Concentrațiile de proteine din țesuturile omogeneizate au fost determinate prin metoda spectrofotometrică descrisă de Bradford, folosind γ-globulina ca calibrator.

Prepararea și derivatizarea probelor

50 Probele au fost preparate conform manualului kitului Phenomenex EZ: faast™, cu următoarele modificări: înainte de extragerea și derivatizarea aminoacizilor, 20 μl din fiecare soluție standard internă conținând 100 μM/L Phe-d5 și 20 μM/L Tyr-d4 (în 50 mM/L HCl) s-au adăugat la 40 μl de lizat de probă. Folosind reactivii kitului, aminoacizii sunt derivatizați cu cloroformat de propil, ceea ce duce la adăugarea unui format de propil la partea aminică și a unei grupări propil la capătul carboxilic al aminoacizilor. Gruparea hidroxi a lui Tyr este, de asemenea, derivatizată prin adăugarea unei grupări formilate de propil.

Instrumentare

60 Pentru separarea HPLC RP (fază inversată) a aminoacizilor, a fost utilizată o coloană C18 de 250 x 2 mm (Phenomenex EZ:faast™). Aminoacizii derivați au fost separați folosind următorul program: (i) flux izocratic 75% solvent B timp de 6 min; (ii) gradient liniar de la 75% la 95% solvent B (v/v) în 9 min; (iii) gradient liniar de la 95% la 100% solvent B în 0,1 min; (iv) debit izocratic 100% solvent B timp de 3 minute; (v) gradient liniar de la 100% la 75% solvent B în 0,1 min; (vi) debit izocratic 75% solvent B pentru 2 min. Solvenții A și B au fost formați cu 10

mmol/L de amoniu în H₂O și respectiv 10 nmol/L formiat de amoniu în metanol. Debitul a fost de 150 μl/min și volumul de injecție a fost de 10 μL. Pentru analiza LC-ESI-MSMS s-au utilizat un sistem SCPX SC 2000 de la PerkinElmer API 2000 LC-ESI-MSMS echipat cu un automatizator PerkinElmer Series 200 și două pompe PerkinElmer Series 200. Aminoacizii au fost achiziționați folosind modul de reacție multiplu (MRM), modul ionic pozitiv, cu următoarele tranziții: 294 → 206 (Phe), 299 → 211 (Phe-d5), 302 → 214 (Phe-d8), 396 → 308 (Tyr) și 400 → 312 (Tyr-d4). Durata de staționare a fost de 500 ms. Spectrele de masă au fost dobândite în intervalul de timp de 6 până la 20 min.

Rezultate:

10 **Reducerea nivelului de Phe cerebral**

Figura 5 prezintă concentrațiile medii de Phe și Tyr în creierul șoarecilor de tip sălbatic (WT), șoarecii PKU tratați cu dieta standard pentru șoareci, dieta cu proteine GSP105 fără Phe sau dieta cu aminoacizi fără Phe.

15 Concentrațiile medii ale aminoacizilor fenilalanină și tirozină în creierul șoarecilor de tip sălbatic (WT) au fost aproximativ aceleași (0,31 nmol Phe/mg proteină; 0,36 nmol Tyr/mg proteină) (Figura 5) asemănătoare cu situația de la oamenii sănătoși.

20 Dimpotrivă, concentrația medie de Phe în creierul șoarecilor PKU alimentați cu dieta standard de șoarece (grupul 1) a arătat o creștere de 10 ori (3,82 nmol Phe/mg proteină), cu o concentrație medie de 0,18 nmol Tyr/mg proteină, corespunzător situației pacienților care nu au fost tratați cu PKU.

Alimentarea cu dieta proteică GSP105 fără Phe (grup 2) a condus la o reducere de 50% a concentrației medii de Phe în creier (proteină Phe 1,78 nmol/mg) în comparație cu alimentarea cu dieta standard de șoarece, în timp ce concentrația medie de Tyr a fost menținută redusă (0,15 nmol/mg proteină).

25 Cel mai scăzut nivel mediu de Phe în creier și cel mai mare nivel mediu de Tyr în creier au fost atinse cu dieta de aminoacizi fără Phe din grupul 3 (proteină Phe 1,16 nmol/mg; 0,22 nmol/mg proteină).

30 Rezultatele analizei concentrațiilor Phe- și Tyr în creierul șoarecilor WT, precum și al șoarecilor PKU tratați și netratați, potrivite cu nivelurile corespunzătoare de Phe în sânge și Tyr în sânge în diferitele grupuri de hrănire a animalelor (Figurile 2 și 4).

35 Cea mai puternică scădere a concentrației de Phe în creier a fost obținută cu dieta cu aminoacizi fără Phe. Ținând cont de faptul că influența unei diete cu Phe redus asupra nivelului de Phe cerebral este întârziată și nu la fel de abruptă ca și influența asupra concentrației de Phe în sânge, presupunem o reducere suplimentară a Phe în creier într-o perioadă de hrănire prelungită cu hrană cu proteine GSP105 fără Phe. Această ipoteză se bazează pe observația că nivelurile de Phe din sânge din acest grup au aproximat concentrațiile de Phe în sângele șoarecilor alimentați cu dieta cu aminoacizi fără Phe după o perioadă de hrănire de 28 de zile.

Raportul mediu de Phe/Tyr în creier

40 Figura 6 prezintă raporturile medii Phe/Tyr din creierul șoarecilor WT, al șoarecilor PKU tratați cu dieta standard de șoarece, dieta proteică GSP105 fără Phe sau dieta fără aminoacizi Phe.

45 Dieta fără aminoacizi Phe a avut ca rezultat cel mai mic raport Phe/Tyr din creierul șoarecilor PKU (Figura 6, coloana verificată), urmată de dieta cu proteine GSP105 fără Phe (Figura 6, coloana cu dungi în diagonală). Șoarecii PKU aflați pe dieta standard de șoarece sunt descriși în Figura 6 ca o coloană albă cu cadru negru. Proporția Phe/Tyr este semnificativ mai bună decât la șoarecii PKU cu dieta standard. Dieta proteică GSP105 fără Phe ar putea fi îmbunătățită prin reducerea cantității de contaminanți Phe din proteina dietetică recombinantă GSP105 și/sau prin suplimentarea de tirozină cristalină, așa cum este utilizată în dieta cu aminoacizi fără Phe sau prin adăugarea unei tirozină care conține modelul coadă.

LISTA DE SECVENȚE

- <110> MetaX Institut für Diätetik GmbH
- <120> Proteină fără fenilalanină pentru tratamentul PKU
- <130> M10927-EP/RN
- <160> 7
- <170> Patent în versiunea 3.5
- <210> 1
- <211> 168

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Lys Ala Ala Ala Ser Arg
 165

<210> 2

<211> 168

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> GSP105

<400> 2

MD/EP 3290436 T2 2019.10.31

19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Lys Ala Ala Ala Ser Arg
165

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> epitop din Tag54

<400> 3

Lys Asp Trp Glu His Leu
1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Tag54 cu o substituție Phe -> Ala

<400> 4

Lys His Ile Lys Asp Trp Glu His Leu Glu Glu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Tag54 cu o substituție Phe -> Tyr

<400> 5

Lys His Ile Lys Asp Trp Glu His Leu Glu Glu Tyr
 1 5 10

<210> 6

<211> 186

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> GSP105-6His-Tag54P15

<400> 6

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

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

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

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

Glu Ile Asp Arg Glu Leu Leu Glu Glu Val Asn Arg Ala Leu Gln Lys
 65 70 75 80
 Met Lys Asp Gly Thr Tyr Gly Val Cys Glu Lys Thr Gly Gln Glu Ile
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 558

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

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

```

<400> 7
atggcactga caaaagaaca aacgcaacat ctgtatcata aactgcttga catgcaaaaa      60
gaactgagcg gagaaaagaa agaaacggaa tcaatgacag aagaagtcgg tgaattaagc      120
aatggcgtag ataaccatat ggccgatcat ggcacattgg ttacggatcg tatgacagac      180
caaacggtga aagaaattga tagagaactg cttgaagaag tcaatcgcgc attacaaaa      240
atgaaagatg gcacatatgg agtatgcgaa aaaacgggtc aggaaatccc gtatgaacgt      300
ttagaagcgg tcccttacgc tcggatgaca gttgaagccc aagcagatgt ggaagatgac      360
ttggaacgg acgcaccgtc ttatgaacgc gaatggcatg aacaggtgaa agatctgtcc      420
aaciaaagaaa caattgacca aaaatcaagc cagacgtacg aaatccttga tagagaacag      480
gactctaaag cggccgcttc tagacatcat catcatcatc ataacatat caaagactgg      540
gaacatctgg aagaagcc                                          558

```

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- NAFISEH SOLTANIZADEH ET AL: "Strategies Used in Production of Phenylalanine-Free Foods for PKU Management", COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY, vol. 13, no. 3, 16 May 2014 (2014-05-16), pages 287-299, XP055234111, US ISSN: 1541-4337, DOI: 10.1111/1541-4337.12057
- WO-A1-95/02692
- WO-A1-2013/148332

(57) Revendicări:

1. Proteină dietetică recombinată care cuprinde o secvență polipeptidică ce este cel puțin 70% identică cu SECV ID NR 2, sau o porțiune suficientă din punct de vedere dietetic a acesteia, în care proteina menționată nu cuprinde fenilalanină.
2. Proteina dietetică recombinată conform revendicării 1, în care secvența polipeptidică este cel puțin 85%, de preferință 90%, mai preferabil 95% identică cu SECV ID NR 2.
3. Proteina dietetică recombinată conform revendicării 1 sau 2, în care proteina cuprinde în plus una sau mai multe secvențe de proteină suplimentare, în care secvența de proteină suplimentară este o prelungire sau marcaj de purificare.
4. Proteina dietetică recombinată conform revendicării 3, în care secvența de proteină suplimentară este o prelungire polipeptidică cuprinzând secvența de aminoacizi SECV ID NR 3.
5. Vector care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică proteina dietetică recombinată conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4.
6. Microorganism recombinat care cuprinde vectorul conform revendicării 5.
7. Microorganismul recombinat conform revendicării 6, în care microorganismul este selectat din grupul format din *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Actinomycetes*, *Caulobacter*, *Pichia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium botulinum*, *Flavobacterium heparinum*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha*, *Neurospora crassa*, *Arxula adenivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces*

lactis, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* și *Bacillus megaterium*.

8. Microorganismul recombinat conform revendicării 7, în care microorganismul menționat este din specia *Bacillus* sau *Pseudomonas*.

9. Microorganismul recombinat conform revendicării 8, în care microorganismul menționat este *Bacillus subtilis* sau *Pseudomonas fluorescens*.

10. Metodă de producere a proteinei dietetice recombinată conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4, metoda cuprinzând cultivarea microorganismului recombinat conform oricăreia dintre revendicările 6 până la 9 în condiții adecvate pentru producerea proteinei dietetice de către microorganismul recombinat.

11. Compoziție dietetică cuprinzând proteina dietetică recombinată conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 și, opțional, excipienți suplimentari.

12. Compoziția dietetică conform revendicării 11 care cuprinde cel mult 0,1 g de fenilalanină la 100 g proteină totală.

13. Proteina dietetică conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziția de proteină dietetică conform revendicării 11 pentru utilizare ca medicament și/sau aliment pentru scopuri medicale speciale.

14. Proteina dietetică conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziția de proteină dietetică conform revendicării 11 pentru utilizare în tratamentul unei tulburări **caracterizate prin** acumularea de fenilalanină în organism.

15. Proteina dietetică conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziția de proteină dietetică conform revendicării 11 pentru utilizarea conform revendicării 14, în care tulburarea menționată este hiperfenilalaninemia, preferabil fenilcetonuria.

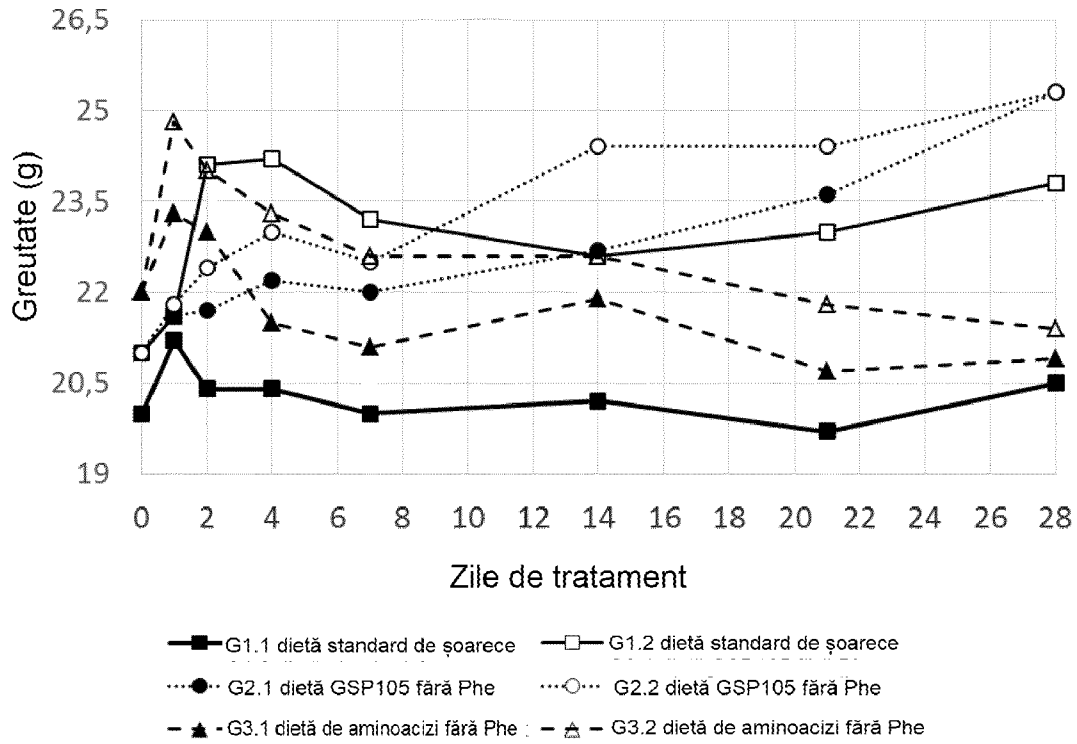


Fig. 1

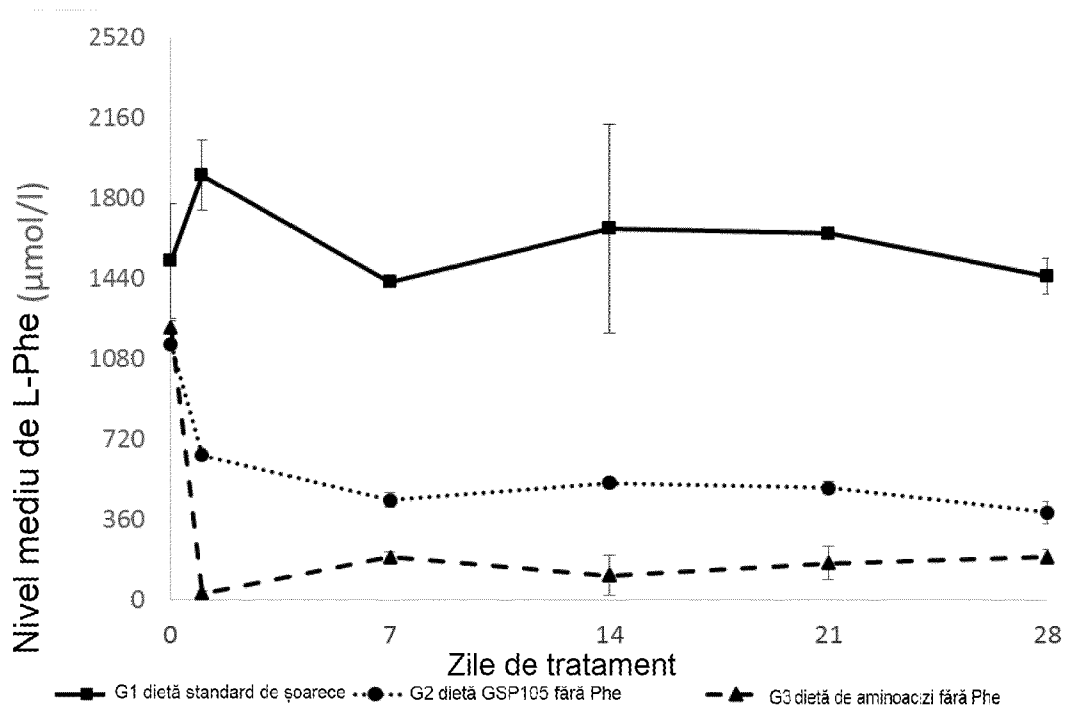


Fig. 2

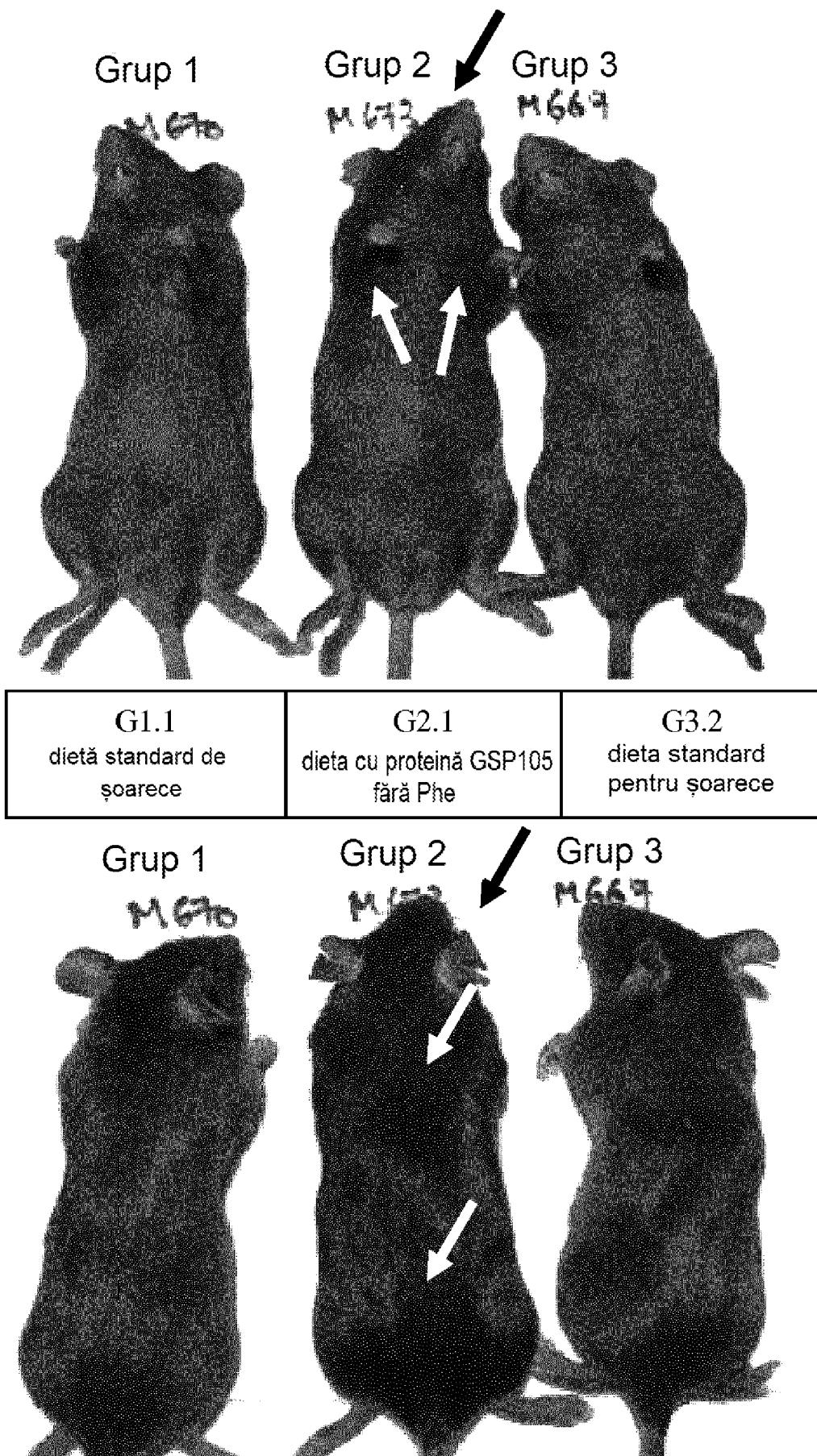


Fig. 3

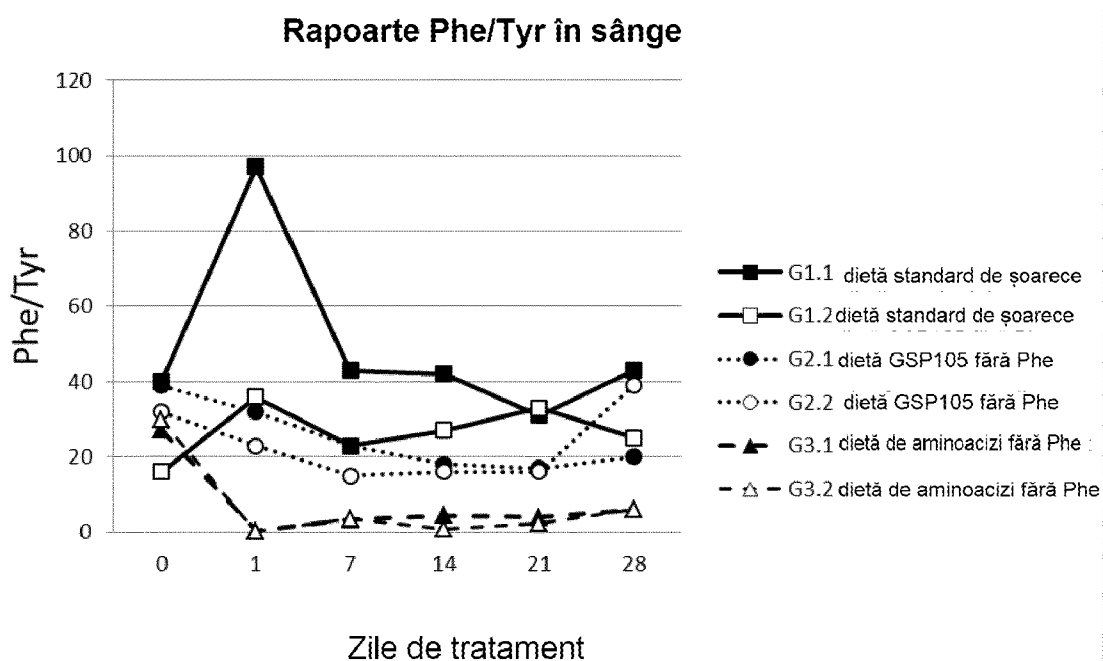


Fig. 4

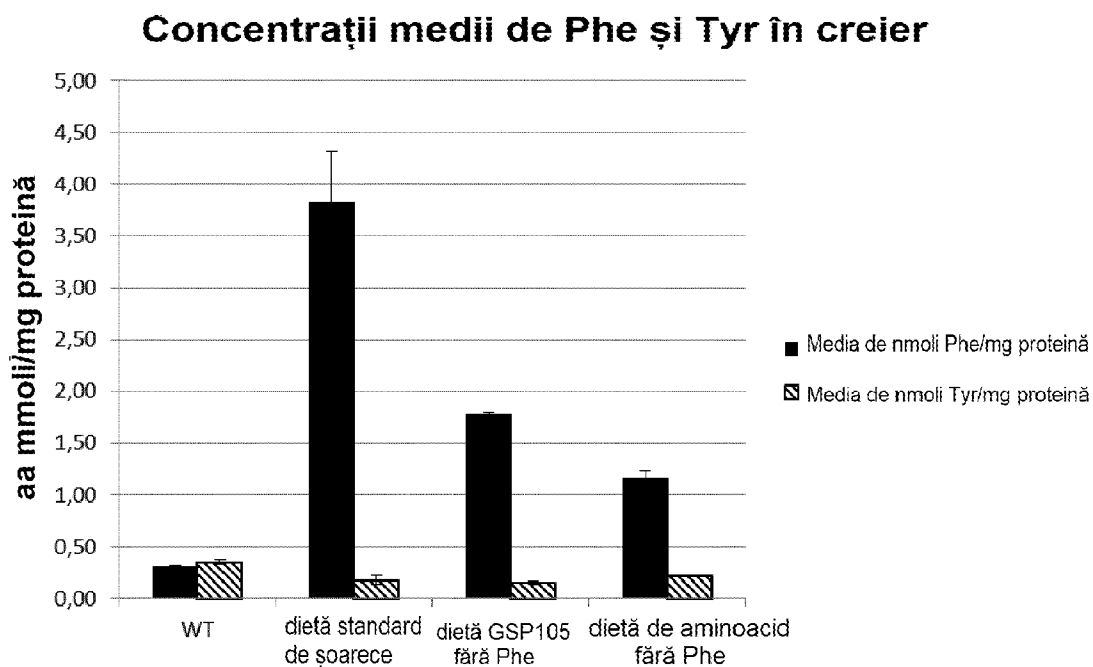
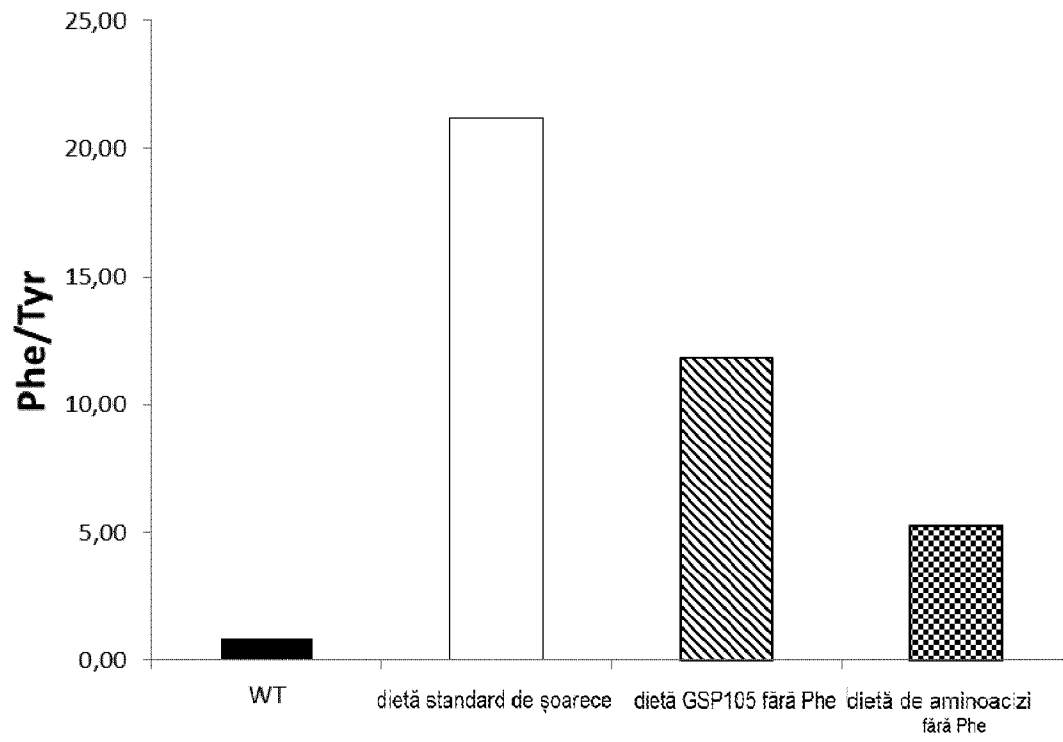


Fig. 5

Rapoarte Phe/Tyr în creier**Fig. 6**