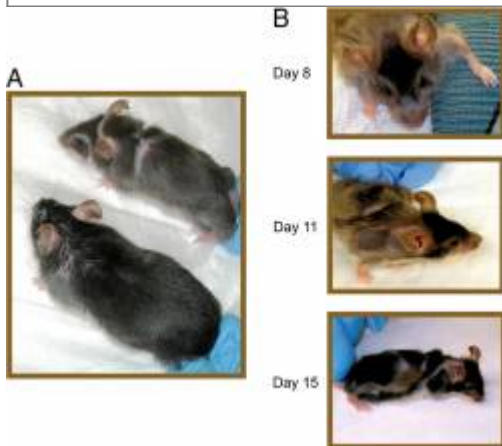


# PEG-PAL

**Questa voce è solo un abbozzo. Contribuisci a migliorarla, traducendola secondo le convenzioni di PKUinfo.**



Topi di laboratorio utilizzati per i test del PEG-PAL<sup>1)</sup>

La **fenilalanina ammoniase** (PAL) è un enzima batterico non presente negli umani o in altri mammiferi, che trasforma la fenilalanina (Phe) in ammoniaca e acido trans-cinnamico, che sono facilmente espulsi dall'organismo (negli esseri umani esiste un enzima diverso, fenilalanina idrossilasi (PAH) che, con il cofattore BH<sub>4</sub>, permette il metabolismo della fenilalanina e ne regola il livello nel sangue). La ricerca su questo enzima e sulla terapia enzimatica sostitutiva per pazienti con PKU è stata sviluppata allo scopo di fornire un meccanismo alternativo al metabolismo della fenilalanina (Phe).

I primi studi pre-clinici sugli animali hanno dimostrato come questo enzima, somministrato per via sottocutanea per 12 settimane tramite una singola dose mono-settimanali, permetta di:

- ridurre i livelli plasmatici di fenilalanina al di sotto dei valori di normalità;
- far regredire nel topo l'ipopigmentazione correlata alla malattia;
- promuovere l'incremento ponderale del topo.

L'efficacia si attenua nel tempo a causa della produzione di anticorpi inibitori, ma il PAL, modificato attraverso tecniche di ingegneria molecolare (polietilene glicosilazione - PEG), supera questi problemi.

In linea teorica, questo tipo di terapia potrebbe quindi essere efficace per qualsiasi soggetto PKU e potrebbe potenzialmente normalizzare i livelli di Phe anche nel caso di soggetti non a dieta.

## Perché utilizzare il PEG-PAL ?

Non è possibile semplicemente sostituire l'enzima PAH nei soggetti PKU, per alcune ragioni:

- L'enzima PAH è efficace solo all'interno delle cellule, quindi la semplice somministrazione non permette la riduzione dei livelli di Phe nel sangue;
- E' stato dimostrato che il tempo di emivita del PAH (riduzione del 50% dell'efficacia) è molto breve;
- il pH ottimale per l'attivazione del PAL è 8.0, valore molto vicino a quello medio del piccolo

intestino;

- il PAL viene inattivato molto rapidamente nel duodeno; pertanto per preservarne l'attività deve essere protetto dalla proteolisi intestinale.
- reazioni immunologiche indesiderate e sviluppo di anticorpi diretti contro l'enzima, in risposta a ripetute somministrazioni;

Da Wang, Gamez, Sarkissian e altri, nel 2006, è stata quindi sperimentata una variante di tale enzima modificato tramite tecniche di ingegneria molecolare (polietilenglicosilazione-PEG) in grado di possedere:

- una maggiore specificità d'azione
- un'emivita prolungata
- una ridotta immunogenicità in vivo

Ugualmente la casa farmaceutica Biomarin, ha scelto una particolare mutazione del PAL che si trova nel batterio *Anabaena variabilis*<sup>2)</sup> e per incrementare il tempo di emivita (da 1 a 4 giorni nei topi da laboratorio e nei primati non umani), una versione ricombinata (PEG) che previene anche alcuni potenziali problemi legati all'immunogenicità dell'enzima mutato.

## Il PEG-PAL negli animali

L'enzima ha già dimostrato una buona efficacia nei topi di laboratorio con PKU. In un modello di topo con PKU, le cavie hanno ricevuto iniezioni settimanali di PEG-PAL per 2 mesi, rilevando i livelli di Phe sono stati rilevati al giorno 3 e al giorno 7 dopo ogni iniezione. Per gli stessi topi, il trattamento è stato interrotto per 2 mesi, per permettere di ripristinare i valori elevati di fenilalanina e determinare la sostenibilità della soppressione di Phe. Successivamente i topi sono stati nuovamente sottoposti ad altri 2 mesi di iniezioni settimanali con lo stesso dosaggio. Durante ciascun periodo di trattamento, i livelli di Phe sono diminuiti da 1250 umol/L a 250 umol/L, fin dalla prima settimana di trattamento e i livelli sono rimasti stabili per tutto il periodo.

## Fasi dello studio e tappe successive



Fasi dei test clinici dei farmaci<sup>3)</sup>

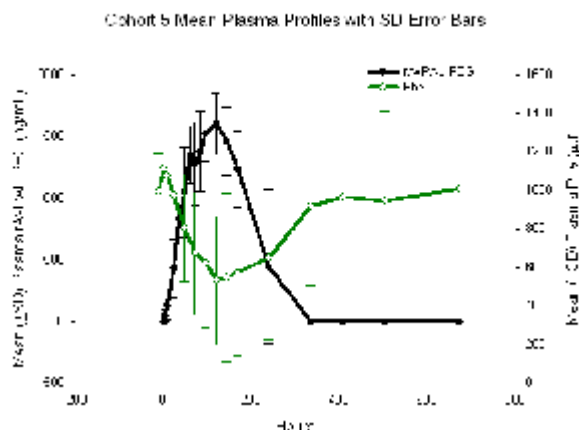
Alla fine del 2007 la Biomarin ha presentato alla FDA la richiesta di una nuova sperimentazione per la PEG-PAL (Poly Ethylene Glycol-Phenylalanine Ammonia Liase), precedentemente noto come Phenylase, da attuarsi nel corso del 2008.

Nel maggio 2008 è stata avviata la fase 1 dello studio<sup>4)</sup>. Alla fine di aprile 2009, la Biomarin ha

annunciato di aver completato la fase 1 dei test.

Lo studio è stato inizialmente strutturato per verificare la sicurezza e la farmacocinetica di iniezioni di dosi crescenti in 7 gruppi di dosaggi di somministrazione (dosi da 0.001 mg/kg a 0.1 mg/kg), con 5 soggetti PKU per gruppo. I risultati dei trial della fase 1, hanno messo in luce una riduzione significativa dei livelli di fenilalanina plasmatici in media del 62% (da 36% a 97%) in tutti i pazienti, solo in corrispondenza della quinta dose (da 0.1 mg/kg), con un livello iniziale medio di base di 1,113  $\mu\text{mol/L}$ .

Substantial Phe Reductions Correlate with Plasma Concentration of PEG-PAL



Risultati della fase 1<sup>5)</sup>

Il 22 settembre 2009 la BioMarin ha annunciato che il primo paziente ha iniziato la Fase 2 degli studi clinici sul PEG-PAL, per il trattamento della fenilchetonuria (PKU). I primi risultati si prevedono per entro la fine del 2010.

Noi rimaniamo ottimistici su questo programma e crediamo che, se approvato, PEG-PAL potrà offrire un significativo beneficio per molti pazienti PKU, specialmente quelli che non rispondono adeguatamente al Kuvan. Nella nostra visione, la struttura flessibile del protocollo della Fase 2, permetterà di trovare facilmente una dose ottimale ed una frequenza di somministrazione, almeno tollerabili in un sottogruppo della popolazione PKU. Noi siamo incoraggiati dai risultati della Fase 1, che ha permesso di ottenere riduzioni dei valori di Phe nel sangue con una dose di 0.1 mg/kg, senza particolari effetti collaterali o reazioni, come ci si sarebbe aspettato con una proteina di questa natura

I test clinici della Fase 2 saranno condotti su 35 pazienti, con dosi crescenti da 0.001 mg/kg. Inizialmente saranno otto iniezioni settimanali a dose fissa, seguite da otto settimane con ottimizzazione delle dosi e della frequenza ed un periodo aggiuntivo durante il quale le dosi potranno aumentare fino a 2.0 mg/kg/settimana.

Il principale scopo della Fase 2 è quello di valutare l'effetto del PEG-PAL sui livelli di Phe nel sangue nei soggetti PKU. L'obiettivo secondario è quello di valutare la sicurezza e la tollerabilità, la risposta immune e la farmacocinetica delle iniezioni sottocutanee di diverse dosi di PEG-PAL.

## Rischi e valutazioni

Il rischio maggiore è relativo alla sicurezza e alla immunogenicità, seguito dalla tolleranza dei pazienti. L'introduzione di un enzima batterico estraneo, espone i pazienti a potenziali rischi di sviluppare anticorpi.

## What is PAL ?

*Christineh N. Sarkissian, John Adams and Alejandra Gámez<sup>6)</sup>*

PKU and related hyperphenylalaninemias result from compromised phenylalanine hydroxylase (PAH) activity, causing excess phenylalanine (Phe) accumulation (3). The harmfully augmented levels of Phe can be diminished by phenylalanine metabolizing enzymes via enzyme replacement with PAH or enzyme substitution with PAL.

Enzyme replacement therapy with the native PAH (the primary choice), requiring a multi-enzyme complex to function, presents a number of challenges. PAH is inherently unstable; its complex activity and cofactor (BH<sub>4</sub>), oxygen and iron requirements, in addition to the inherent degradation sensitivity and potential immunogenicity in a person lacking the functional enzyme, further complicates its therapeutic viability (3).

PAL is a more stable enzyme and does not require a cofactor to function. Therefore enzyme substitution therapy with PAL alone could metabolize Phe. PAL enzyme can act as a surrogate to the deficient PAH enzyme and convert the excess phenylalanine to trans-cinnamic acid and ammonia. Trans-cinnamic acid is a harmless metabolite, as it degrades and is rapidly excreted in the urine as hippuric acid, and the ammonia does not accumulate in sufficient quantity to pose a threat of hyperammonemia (1, 2, 4-6).

## What is PEG ?

PEG stands for polyethylene glycol. It is a water soluble and non-toxic compound that is safely cleared from the body. Its primary use to date in currently approved drugs has been to favourably alter the properties of biologics (7). The attachment of PEG to a therapeutic protein (a process called PEGylation) can improve its biopharmaceutical properties by increasing its stability and resistance towards inactivation and directed degradation. It also diminishes immunogenicity (ability of a foreign protein (drug) to elicit an immune response), by masking the presence of the drug from the host's immune system, and enhances and extends its performance by reducing clearance and prolonging circulatory time (8).

## Why is PAL pegylated for therapeutic use ?

An injectable form of phenylalanine ammonia lyase (PAL) could have a therapeutic profile for PKU. However PAL is a non-human protein that the immune system recognizes as foreign. Long-term reduction of phenylalanine levels by PAL is hampered by clearance of the enzyme via an immune response; PAL alone (without PEGylation), although shown to be harmless upon repeated dosing to

the PKU mouse model, permanently loses its ability to metabolize systemic phenylalanine one week following initial administration (2).

## Research

We have shown that the blood phenylalanine concentration in the PKU mouse model can safely be reduced down to normal levels by the administration of PEG-PAL. All PEG-PAL formulations that we tested were effective catalysts; they had prolonged activity and certain forms had profoundly suppressed immunogenicity, a desirable feature for clinical use (2, 4).

Applied to humans with PKU, this type of substitute enzyme therapy could provide substantial relief from the rigors of the diet and improve compliance, metabolic control, and clinical outcome in this relatively frequent disorder (2).

Phase I clinical study of PEG-PAL for the treatment of PKU was initiated on May 20th, 2008 (9).

## Collegamenti esterni

- [en] <http://www.pnas.org/content/105/52/20894>

## Riferimenti

1. Hodgins DS (1971) Yeast phenylalanine ammonia-lyase. Purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *J Biol Chem* 10: 2977- 2985.
2. Sarkissian CN, Gámez A, Wang L, Charbonneau M, Fitzpatrick P, Lemontt JF, Zhao B, Vellard M, Bell SM, Henschell C, Lambert A, Tsuruda L, Stevens RC, Scriver CR (2008) Pre-clinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20894-9.
3. Donlon K, Levy H, Scriver CR (2007) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, & Kinzler KW (McGraw-Hill, New York).
4. Gámez A, Sarkissian CN, Wang L, Kim W, Straub M, Patch MG, Chen L, Striepeke S, Fitzpatrick P, Lemontt JF, O'Neill C, Scriver CR, Stevens RC (2005) Development of pegylated forms of recombinant *Rhodospiridium toruloides* phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical phenylketonuria. *Mol Ther* 11: 986-989.
5. Hoskins JA and Gray J (1982) Phenylalanine ammonia lyase in the management of phenylketonuria: the relationship between ingested cinnamate and urinary hippurate in humans. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 35: 275-282.
6. Hoskins JA, Holliday SB, Greenway AM (1984) The metabolism of cinnamic acid by healthy and phenylketonuric adults: a kinetic study. *Biomed Mass Spectrom* 11: 296- 300.

7. [http://www.nektar.com/platform\\_technologies/technology\\_overview.html](http://www.nektar.com/platform_technologies/technology_overview.html)

8. Jain A and Jain SK (2008) PEGylation: An Approach for Drug Delivery. A Review. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 25: 403-447.

9. <http://www.biomarinpharm.com>

[ricerca, terapia, peg-pal](#)

<sup>1)</sup> PEG-PAL reverses hypopigmentation. (A) PKU mice were photographed on day 124, after vehicle (once weekly for 16 weeks and then on day 123) (Upper) and PEG-Av-p.C503S/p.C565S-PAL [4 I.U. once weekly (1-10) and day 123; 2 I.U. once weekly (11-16)] (Lower) treatments. (B) PKU mouse treated with 0.5 I.U. PEG-Np-WT-PAL on days 1, 4, 8, 11, and 14, photographed on study days 8, 11, and 15. <http://www.pnas.org/content/105/52/20894>

<sup>2)</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095795>

<sup>3)</sup> <http://www.bioblog.it/2007/11/26/farmaci-fasi-ricerca-clinica-test-clinici/20071811>

<sup>4)</sup> [http://www.espku.org/images/stories/Articles\\_PKU/PAL\\_PEG\\_-\\_Prof.\\_Longo.pdf](http://www.espku.org/images/stories/Articles_PKU/PAL_PEG_-_Prof._Longo.pdf)

<sup>5)</sup> <http://www.istockanalyst.com/article/viewiStockNews/articleid/3284460>

<sup>6)</sup> Sarkissian and Gámez are research scientists from the Departments of Biology, Human Genetics and Pediatrics, McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute, Canada, and Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, Spain, respectively. With over two decades of combined research experience in the field, the main focus of our research has been the development of an enzyme substitution therapy with PAL for the treatment of PKU. John Adams is a PKU parent and the President & CEO of the Canadian PKU and Allied Disorders Inc.

From:

<http://www.pkuinfo.it/> - **PKUInfo**

Permanent link:

<http://www.pkuinfo.it/peg-pal>

Last update: **2014/05/22 11:00**

