



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 105**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/53** (2006.01)

**C12N 9/06** (2006.01)

**C12N 9/96** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 38/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01923265 .1**

96 Fecha de presentación : **07.02.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1254237**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.11.2002**

54

Título: **Urato oxidasa sin agregados para la preparación de conjugados poliméricos inmunogénicos.**

30

Prioridad: **10.02.2000 US 501730**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.07.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.07.2010**

73

Titular/es: **Mountain View Pharmaceuticals, Inc.**  
**3475-S Edison Way**  
**Menlo Park, California 94025-1813, US**  
**Duke University**

72

Inventor/es: **Sherman, Merry, R.;**  
**Saifer, Mark, G., P.;**  
**Williams, L., David;**  
**Hershfield, Michael, S. y**  
**Kelly, Susan, J.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 343 105 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Urato oxidasa sin agregados para la preparación de conjugados poliméricos inmunogénicos.

5 **Declaración de los derechos del gobierno en la invención**

Una parte de la investigación descrita en esta solicitud se hizo con el apoyo de la U.S.-Israel Binational Industrial Research and Development Foundation. De acuerdo con esto, el Gobierno de EEUU puede tener determinados derechos en la invención.

10 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

15 La presente invención se refiere a la purificación y modificación química de proteínas para prolongar sus vidas medias circulantes y reducir su inmunogenicidad. Más específicamente, la invención se refiere a la eliminación de agregados mayores que octámeros de urato oxidasas (uricasas) antes de la conjugación con poli(etilen glicoles) o poli(etilen óxidos). Esto elimina sustancialmente la inmunogenicidad de la uricasa sin comprometer su actividad uricolítica.

20 **Descripción de la técnica relacionada**

Las declaraciones contenidas en esta sección de antecedentes no constituyen una admisión de la técnica anterior, en lugar de esto reflejan los comentarios subjetivos del propio inventor sobre el estado de la técnica y las interpretaciones del estado de la técnica en el momento en el que se hizo la invención. Estas interpretaciones pueden incluir la visión personal, no descrita hasta este momento, de los inventores, cuyas visiones no eran parte en sí mismas de la técnica anterior.

30 Las urato oxidasas (uricasas; E.C. 1.7.3.3) son enzimas que catalizan la oxidación del ácido úrico a un producto más soluble, alantoína, un metabolito de purina que se excreta más fácilmente. Los seres humanos no producen uricasa enzimáticamente activa, como resultado de varias mutaciones en el gen de la uricasa adquiridas durante la evolución de los primates superiores. Wu, X, *et al.*, (1992) *J Mol Evol* **34**:78-84. Consecuentemente, en individuos susceptibles, concentraciones excesivas de ácido úrico en la sangre (hiperuricemia) y en la orina (hiperuricosuria) pueden dar lugar a artritis dolorosa (gota), depósitos de urato desfigurantes (tofos) y fallo renal. En algunos individuos afectados, los fármacos disponibles tales como allopurinol (un inhibidor de la síntesis del ácido úrico) producen efectos adversos que limitan el tratamiento o no alivian estas condiciones adecuadamente. Hande, KR, *et al.*, (1984) *Am J Med* **76**:47-56; Farn, AG, (1990) *Baillière's Clin Rheumatol* **4**:177-192. Las inyecciones de uricasa pueden disminuir la hiperuricemia y la hiperuricosuria, al menos temporalmente. Como la uricasa es una proteína extraña para los seres humanos, sin embargo, incluso la primera inyección de la proteína no modificada de *Aspergillus flavus* indujo reacciones anafilácticas en un cierto porcentaje de pacientes tratados (Pui, C-H, *et al.*, (1997) *Leukemia* **11**:1813-1816), y las respuestas inmunológicas limitan su utilidad para el tratamiento crónico o intermitente. Donadio, D, *et al.*, (1981) *Nouv Presse Méd* **10**:711-712; Leauistic, M, *et al.*, (1983) *Rev Rhum Mal Osteoartic* **50**:553-554.

45 La Solicitud de Patente de EEUU No. de Serie 09/370.084 y la Solicitud Internacional publicada No. PCT/US99/17514, describen poli(etilen glicol)-urato oxidasa (PEG-uricasa) que retiene al menos aproximadamente 75% de la actividad uricolítica de la uricasa no conjugada y tiene una inmunogenicidad sustancialmente reducida. En dicha uricasa purificada, cada subunidad está unida covalentemente a una media de 2 a 10 cadenas de PEG, en la que cada molécula de PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 5 kDa y 100 kDa.

50 Se sabe que la agregación de proteínas incrementa su inmunogenicidad. Este conocimiento ha contribuido al desarrollo de métodos para agregar proteínas intencionadamente por tratamientos tales como desnaturalización térmica y entrecruzamiento por exposición a glutaraldehído antes de usarse en la preparación de vacunas o para la inmunización de animales para producir antisueros.

55 También se ha admitido que la agregación no intencionada de proteínas contribuye a la inmunización o sensibilización durante el uso clínico de proteínas terapéuticas, *p. ej.* para la gamma globulina humana (Henney *et al.* (1988) *N. Engl. J. Med.* **278**:2244-2248) y para la hormona del crecimiento humana (Moore *et al.* (1980) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**:691-697). La contribución de los agregados a la inmunogenicidad del interferón alfa humano se ha demostrado en ratones BALB/c (Braun *et al.* (1997) *Pharm. Res.* **14**:1472-1478) y se ha desarrollado un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para su medida (Braun *et al.* (1997) *Pharm. Res.* **14**:1394-1400).

65 En contraste con los efectos conocidos de la agregación en la inmunogenicidad de proteínas, no hay publicaciones del efecto de la agregación en la inmunogenicidad de proteínas conjugadas con poli(alquilen glicoles) tales como PEG. Existe una necesidad de conjugados de poli(alquilen glicol)-uricasa que eliminen sustancialmente la inmunogenicidad de la uricasa sin comprometer su actividad uricolítica. La presente invención proporciona dichas composiciones.

## Compendio de la invención

La conjugación de proteínas con poli(alquilen glicoles), especialmente PEG, produce conjugados con una inmunogenicidad reducida y una persistencia incrementada en la corriente sanguínea. En un intento de producir conjugados de uricasa sustancialmente no inmunogénicos que retienen sustancialmente toda la actividad uricolítica de la preparación de uricasa no modificada, se descubrió que trazas de agregados grandes de uricasa en el material de partida eran sorprendentemente eficaces para provocar tanto la formación de anticuerpos como el aclaramiento acelerado de la circulación, siendo ambos perjudiciales, después de inyecciones repetidas de los conjugados con PEG preparados a partir de uricasa que contiene dichos agregados. Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que la inmunogenicidad incrementada y el aclaramiento acelerado *no* eran debidos a la presencia de agregados bien definidos, de tamaño moderado de la subunidad de la uricasa que son mayores que el tetrámero nativo, *p. ej.* agregados que contienen ocho subunidades (octámeros). La forma octamérica de la uricasa está presente en concentraciones suficientemente altas en la mayoría de las preparaciones de uricasa como para ser detectable por su absorbancia de luz UV, *p. ej.* a 214 nm ó 276 nm, o por su contribución al índice de refracción u otras medidas de la concentración de proteínas. No obstante, se encontró que los octámeros en sí mismos contribuyen mínimamente a la inmunogenicidad y aclaramiento acelerado de los conjugados PEG-uricasa, en contraste con las cantidades mucho menores de los agregados mucho mayores que no son detectables por absorbancia de UV en las condiciones ensayadas pero que se detectan fácilmente por dispersión de la luz estática (Rayleigh) o dinámica. Por lo tanto, se encontró que la eliminación de dichas trazas de agregados muy grandes antes de la conjugación con PEG disminuía la inmunogenicidad y el aclaramiento acelerado de los conjugados PEG-uricasa resultantes en un grado sorprendente.

Una realización de la presente invención es un conjugado de uricasa que comprende una urato oxidasa (uricasa) purificada conjugada con poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido), en el que dicha uricasa contiene formas tetraméricas y octaméricas de la uricasa purificadas que se pueden preparar por eliminación de los agregados mayores que octámeros, en el que dicha uricasa no contiene más de aproximadamente 2% de agregados mayores que octámeros. Preferiblemente, la uricasa es una uricasa de mamíferos. Más preferiblemente, la uricasa es uricasa de hígado porcino, hígado bovino o hígado ovino. En un aspecto de esta realización preferida, la uricasa es recombinante. En otro aspecto de esta realización preferida, la uricasa tiene sustancialmente la secuencia de uricasa de hígado porcino, bovino, ovino o de babuino. Ventajosamente, la uricasa es quimérica. Preferiblemente, la uricasa es uricasa PKS. En otro aspecto de esta realización preferida, la uricasa tiene sustancialmente la secuencia de la uricasa de hígado de babuino en la que la tirosina 97 se ha reemplazado por histidina. Preferiblemente, la uricasa comprende un extremo amino terminal y un extremo carboxi terminal, y en la que la uricasa está truncada en un extremo o ambos extremos. Ventajosamente, la uricasa es una uricasa fúngica o microbiana. Preferiblemente, la uricasa fúngica o microbiana se aísla de *Aspergillus flavus*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus sp.* o *Candida utilis*, o es una enzima recombinante que tiene sustancialmente la secuencia de una de dichas uricasas. Alternativamente, la uricasa es una uricasa de invertebrados. Preferiblemente, la uricasa de invertebrados se aísla de *Drosophila melanogaster* o *Drosophila pseudoobscura*, o es una enzima recombinante que tiene sustancialmente la secuencia de una de dichas uricasas. En otro aspecto de esta realización preferida, la uricasa es una uricasa de plantas. Preferiblemente, la uricasa de plantas se aísla a partir de los nódulos radiculares de *Glycine max* o es una enzima recombinante que tiene sustancialmente la secuencia de la uricasa.

En un aspecto de esta realización preferida, la uricasa descrita anteriormente se conjuga con poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) en condiciones tales que la uricasa en el conjugado no tiene sustancialmente agregados mayores que octámeros. Preferiblemente, la uricasa se conjuga con poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) mediante una unión uretano (carbamato), amina secundaria o amida. En un aspecto de esta realización preferida, el poli(etilen glicol) es monometoxi poli(etilen glicol). En otro aspecto de esta realización preferida, el poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa y 30 kDa. Preferiblemente, el poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) tiene un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y 20 kDa. Ventajosamente, el número medio de cadenas de dicho poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es entre aproximadamente 2 y 12 cadenas por subunidad de uricasa. Más ventajosamente, el número medio de cadenas de dicho poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es entre aproximadamente 6 y 10 por subunidad de uricasa. Lo más ventajosamente, el número medio de cadenas de dicho poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es entre aproximadamente 7 y 9 por subunidad de uricasa. Preferiblemente, el poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es lineal. Alternativamente, el poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es ramificado.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para disminuir los niveles de ácido úrico en un fluido o tejido corporal, que comprende el conjugado de uricasa descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición se estabiliza por liofilización y se disuelve después de la reconstitución para proporcionar disoluciones adecuadas para la administración parenteral.

Otra realización de la invención es un método para purificar uricasa que tiene una inmunogenicidad reducida, que comprende la etapa de separar los agregados de uricasa mayores que octámeros en fracciones de uricasa, y excluir dichos agregados de la uricasa purificada. Preferiblemente, la etapa de separación comprende la etapa de detectar los agregados mayores que octámeros de al menos una parte de las fracciones de uricasa y excluir las fracciones que contienen los agregados. Ventajosamente, la etapa de detección comprende la medida de la dispersión de la luz.

La presente invención también proporciona uricasa aislada preparada por el método descrito anteriormente.

## ES 2 343 105 T3

### Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 ilustra la actividad uricasa, concentraciones totales de proteína y sal en fracciones de una columna de intercambio aniónico Pharmacia Biotech Mono Q (1 x 10 cm). La actividad uricasa se midió a temperatura ambiente monitorizando la disminución de la absorbancia a 292 nm de 100  $\mu$ M de ácido úrico en 200 nM de borato sódico, pH 9,2. La proteína total se determinó a partir del área bajo la curva del pico de absorbancia de uricasa en análisis de exclusión por tamaño en HPLC.

La Figura 2 ilustra el análisis de exclusión por tamaño en HPLC en una columna Pharmacia Superdex 200 (1 x 30 cm) de la carga y fracciones seleccionadas de una cromatografía preparativa Mono Q de uricasa porcina que contiene las mutaciones R291K y T301S (uricasa PKS) que muestra datos obtenidos por un detector de dispersión de la luz a 90°C (curvas superiores) y por absorbancia a 276 nm (curvas inferiores). Las diferentes intensidades de la señal de las formas tetraméricas, octaméricas y más altamente agregadas de uricasa en la muestra no fraccionada (carga) y las diferentes fracciones son evidentes. La carga se diluyó 1/5 con tampón de la columna Mono Q, la fracción 5 se diluyó 1/3 y la fracción 6 se diluyó 1/9. Las fracciones 5 y 6 se combinaron para formar el “conjunto bajo en sal”.

La Figura 3 ilustra el análisis de exclusión por tamaño de las fracciones de la columna Mono Q de la Figura 1, que muestra los datos obtenidos por un detector de dispersión de la luz a 90° y por absorbancia a 276 nm, como en la Figura 2. Las fracciones mostradas en esta figura se usaron para formar el “conjunto alto en sal”, a partir del cual se prepararon los conjugados con PEG y se inyectaron en ratones BALB/c. Las actividades en suero resultantes y las respuestas inmunológicas de los ratones BALB/c se muestran en las Figuras 5 y 6.

La Figura 4 ilustra el contenido en octámero, determinado por absorbancia a 276 nm y por dispersión de la luz a 90°, calculado a partir de los datos de las Figuras 2 y 3, de uricasa PKS sin fraccionar y de fracciones seleccionadas de la cromatografía en columna preparativa MonoQ de uricasa PKS (Figura 1).

La Figura 5 ilustra los ensayos UV, como en la Figura 1, de la actividad uricasa después de una incubación de 4 horas a 37°C, en sueros recogidos 24 horas después de cada una de las seis inyecciones semanales de conjugados de 6 x 10-kDa PEG de uricasa PKS o de conjuntos de fracciones de la columna Mono Q.

La Figura 6 ilustra el análisis ELISA de la formación de anticuerpo IgG frente a conjugados de PEG de uricasa PKS y frente a conjugados de PEG de los conjuntos de fracciones de la columna Mono Q mostrados en la Figura 1, en sueros recogidos 24 horas después de cada una de las seis inyecciones semanales de ratones hembra BALB/c con 0,2 mg de proteína uricasa por 20 gramos de peso corporal. Para cada ratón, se muestran los datos de sangrados 24 horas después de la primera de seis inyecciones de izquierda a derecha. Las condiciones del ensayo se describen en el Ejemplo 6. Los datos para los ocho ratones de cada grupo se organizaron en orden creciente de respuesta inmune, de izquierda a derecha.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los estudios previos han mostrado que cuando se consigue una reducción significativa de la inmunogenicidad y/o antigenicidad de la uricasa por conjugación con PEG (PEGilación), está invariablemente asociada con una pérdida sustancial de la actividad uricolítica. La presente invención incluye la observación de que trazas de agregados de urato oxidasas mayores que octámeros contribuyen sustancialmente a la inmunogenicidad y a la inducción de aclaramiento acelerado de los conjugados PEG-uricasa. Lo más probable es que este descubrimiento sea aplicable a proteínas distintas de las uricasas, incluyendo interferones y factores de crecimiento.

La seguridad, conveniencia y rentabilidad de los compuestos biofarmacéuticos se ven influidas adversamente por las disminuciones en sus potencias y la necesidad resultante de incrementar la dosis administrada. Así, existe una necesidad de un medio alternativo seguro y eficaz para disminuir los niveles elevados de ácido úrico en los fluidos corporales, incluyendo la sangre y la orina. La presente invención proporciona un método para producir uricasa que excluye los agregados de uricasa mayores que octámeros para usarse en la síntesis de PEG-uricasa. Esta PEG-uricasa retiene toda o casi toda la actividad uricolítica de la enzima no modificada. La presente invención también proporciona uricasa purificada sustancialmente sin agregados mayores que octámeros. El término “sustancialmente sin” indica que la uricasa purificada no comprende más de aproximadamente 2%, y preferiblemente no más de aproximadamente 1% de agregados mayores que octámeros.

La presente invención proporciona un método para purificar uricasa de manera que los agregados mayores que octámeros se excluyen de la preparación purificada. Debido a que estos agregados grandes son altamente inmunogénicos, su presencia en la preparación de uricasa purificada no es deseable. El método implica la monitorización de las fracciones de la columna por dispersión de la luz en lugar de o además de absorbancia ultravioleta a 280 nm, ya que los agregados pueden estar demasiado diluidos para ser detectados por absorbancia ultravioleta. La uricasa purificada se conjuga entonces con polímeros solubles en agua, preferiblemente poli(etilen glicoles) o poli(etilen óxidos) como se describe en la Solicitud de EEUU No. de Serie 09/370.084 en tramitación con la presente.

La eliminación de la uricasa agregada de una preparación que consiste predominantemente en uricasa tetramérica puede conseguirse por cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración a través de una membrana microporosa

y centrifugación, incluyendo ultracentrifugación. El método de separación puede incluir la separación y análisis de fracciones y el rechazo o exclusión de aquellas fracciones que contienen cantidades excesivas de agregados grandes. La preparación de uricasa resultante es más adecuada para la síntesis de conjugados sustancialmente no inmunogénicos de uricasa que la uricasa no fraccionada. Para la administración crónica, es importante que los conjugados PEG de proteínas, *p. ej.* PEG-uricasa, tengan una baja inmunogenicidad y que no provoquen progresivamente un aclaramiento más rápido de la corriente sanguínea después de dosis repetidas.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas de los conjugados polímero-uricasa. Estos conjugados son sustancialmente no inmunogénicos y retienen al menos 75%, preferiblemente 85% y más preferiblemente 95% o más de la actividad uricolítica de la enzima no modificada. Las uricasas adecuadas para conjugación con polímeros solubles en agua incluyen las urato oxidasas naturales aisladas de bacterias, hongos y tejidos de plantas y animales, tanto vertebrados como invertebrados, así como formas recombinantes de uricasa, incluyendo variantes de uricasa mutadas, híbridas y/o truncadas enzimáticamente activas. Los polímeros solubles en agua adecuados para usarse en la presente invención incluyen poli(etilen glicoles) o poli(etilen óxidos) lineales y ramificados, conocidos todos comúnmente como PEG. Los ejemplos de PEG ramificados son el tema de la Patente de EEUU 5.643.575. Un ejemplo preferido de PEG lineal es monometoxiPEG, que tiene la estructura general  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ , en la que  $n$  varía de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.300.

Una realización de la presente invención es un conjugado de urato oxidasa (uricasa) que retiene al menos aproximadamente 75% de la actividad uricolítica de la uricasa no conjugada y tiene una inmunogenicidad sustancialmente reducida. La uricasa de este aspecto de la invención puede ser recombinante. Ya sea recombinante o no, la uricasa puede ser de origen mamífero. En un aspecto de esta realización, la uricasa puede ser uricasa de hígado porcino, bovino u ovino. En otro aspecto de esta realización, la uricasa puede ser quimérica. La uricasa quimérica puede contener partes de uricasa de hígado porcino y/o de hígado de babuino. Por ejemplo, la uricasa quimérica puede ser uricasa porcina que contiene las mutaciones R291K y T301S (uricasa PKS). Alternativamente, la uricasa puede ser uricasa de hígado de babuino en la que la tirosina 97 se ha reemplazado por histidina, por lo cual la actividad específica de la uricasa puede incrementarse al menos aproximadamente 60%. La uricasa de la invención, independientemente del origen, también puede estar en una forma que está truncada, bien en el extremo amino terminal o en el extremo carboxilo terminal o en ambos extremos. Asimismo, la uricasa puede ser uricasa fúngica o microbiana. En un aspecto de esta realización, la uricasa fúngica o microbiana puede ser una forma de uricasa natural o recombinante de *Aspergillus flavus*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus sp.* o *Candida utilis*. Alternativamente, la uricasa puede ser una uricasa de invertebrados, tal como, por ejemplo, una forma de uricasa natural o recombinante de *Drosophila melanogaster* o *Drosophila pseudoobscura*. La uricasa de la invención también puede ser una uricasa de plantas, por ejemplo, una forma de uricasa natural o recombinante de nódulo radicular de soja (*Glycine max*). El PEG puede tener un peso molecular medio entre aproximadamente 5 kDa y 100 kDa; preferiblemente el PEG puede tener un peso molecular medio entre aproximadamente 8 kDa y 60 kDa; más preferiblemente, el PEG puede tener un peso molecular medio entre aproximadamente 10 kDa y 40 kDa, tal como, por ejemplo, 10 a 20 kDa. El número medio de cadenas de PEG covalentemente acopladas puede ser 2 a 12 cadenas por subunidad de uricasa; preferiblemente, el número medio de cadenas covalentemente acopladas puede ser 6 a 10 por subunidad; más preferiblemente, el número medio de cadenas de PEG puede ser 7 a 9 por subunidad. En un aspecto de esta realización, la uricasa puede ser tetramérica. Las cadenas de PEG pueden estar unidas covalentemente a la uricasa mediante uniones uretano (carbamato), uniones de amina secundaria y/o uniones amida. Cuando la uricasa es una forma recombinante de cualquiera de las uricasas mencionadas en la presente memoria, la forma recombinante puede tener sustancialmente la secuencia de la forma natural.

Una uricasa de mamíferos preferida es uricasa quimérica de cerdo-babuino recombinante, compuesta por partes de la secuencia de uricasa de hígado de cerdo y de hígado de babuino, habiéndose determinado las dos en primer lugar por Wu, *et al.* (1989). Un ejemplo de dicha uricasa quimérica contiene los primeros 288 aminoácidos de la secuencia porcina (SEQ ID NO: 1) y los últimos 16 aminoácidos de la secuencia de babuino (SEQ ID NO: 2). Hershfield *et al.*, Publicación Internacional WO 00/08196, Urato Oxidasa, publicado el 17 de febrero, 2000. Como la última secuencia se diferencia de la secuencia porcina sólo en dos posiciones, que tienen una lisina (K) en lugar de arginina en el resto 291 y una serina (S) en lugar de treonina en el resto 301, este mutante se refiere como uricasa de cerdo K-S o PKS (SEQ ID NO: 3). La uricasa PKS tiene un resto más de lisina y, por lo tanto, un sitio potencial más de PEGilación respecto a la secuencia porcina y de babuino. Las secuencias se muestran en la Tabla A.

Los ADNc de varias uricasas de mamíferos, incluyendo uricasa PKS, se subclonaron y se determinaron las condiciones óptimas para la expresión en *E. coli*, usando métodos estándar. Véanse Erlich, HA, (Ed.) (1989) *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. Nueva York: Stockton Press; Sambrook, J, *et al.*, (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Segunda Edición*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Las uricasas recombinantes se extrajeron, se purificaron y se evaluó su estabilidad y actividad usando una modificación de ensayos estándar. Véanse Fridovich, I, (1965) *J Biol Chem* **240**:2491-2494; Nishimura, *et al.*, (1979), y los Ejemplos 1 y 5.

En una realización de la invención, la uricasa puede conjugarse mediante una unión biológicamente estable, no tóxica, covalente a un número de cadenas de PEG relativamente pequeño. Dichas uniones pueden incluir uniones uretano (carbamato), uniones amina secundaria, y uniones amida. Varios PEG activados adecuados para dicha conjugación están disponibles comercialmente en Shearwater Polymers, Huntsville, AL.

## ES 2 343 105 T3

Por ejemplo, las uniones uretano con la uricasa pueden formarse incubando la uricasa en presencia del derivado carbonato de succinimidilo (SC) o carbonato de *p*-nitrofenilo (NPC) de PEG. SC-PEG puede sintetizarse usando el procedimiento descrito en la Patente de EEUU 5.612.460. NPC-PEG puede sintetizarse haciendo reaccionar PEG con clorofornato de *p*-nitrofenilo según los métodos descritos en Veronese, FM, *et al.*, (1985) *Appl Biochem Biotechnol* 11:141-152, y en la Patente de EEUU 5.286.637. Los métodos descritos en la patente '637 se adaptan a los PEG de alto peso molecular ajustando las concentraciones de los reactantes para mantener una estequiometría similar. Un método alternativo de síntesis de NPC-PEG se describe en Büttner, W, *et al.*, Especificación de Patente de Alemania del Este DD 279 486 A1.

Las uniones amida con la uricasa pueden obtenerse usando un éster de *N*-hidroxisuccinimida de un derivado de ácido carboxílico de PEG (Shearwater Polymers). Las uniones de amina secundaria pueden formarse usando 2,2,2-trifluoroetanosulfonil PEG (tresil PEG; Shearwater Polymers) o por alquilación reductora usando PEG aldehído (Shearwater Polymers) y cianoborohidruro de sodio.

En los conjugados que contienen PEG con un peso molecular de 10 kDa, el número máximo de cadenas de PEG que estaban acopladas por subunidad, que retenían al menos 75% de la actividad uricolítica de la enzima no modificada, fue aproximadamente 12 cadenas para las uricasas de mamíferos (*p. ej.* uricasa PKS, una muteína de uricasa porcina; véanse las condiciones de ensayo en el Ejemplo 5). El último grado de PEGilación corresponde a aproximadamente 40% de los grupos amino totales. En una realización de la invención, el número medio de cadenas de PEG acopladas por subunidad de uricasa es aproximadamente entre 2 y 12. En una realización preferida, el número medio de cadenas de PEG acopladas por subunidad de uricasa es aproximadamente entre 6 y 10. En una realización más preferida, el número medio de cadenas de PEG unidas covalentemente por subunidad de uricasa es aproximadamente entre 7 y 9. En otra realización, el peso molecular del PEG usado para la reacción de acoplamiento es aproximadamente entre 5 kDa y 30 kDa, preferiblemente aproximadamente entre 10 kDa y 20 kDa.

Hay varios factores que pueden influir en la elección del peso molecular y número de cadenas de PEG óptimos para el acoplamiento a una forma dada de la uricasa. En general, La reducción o eliminación de la inmunogenicidad sin pérdida sustancial de actividad uricolítica puede requerir el acoplamiento de relativamente más cadenas de PEG con un peso molecular menor, comparado con relativamente menos cadenas de PEG con un peso molecular mayor. Asimismo, cada forma diferente de uricasa puede tener un óptimo diferente tanto respecto al tamaño como al número de cadenas. El número óptimo de cadenas de PEG y el peso molecular de PEG pueden determinarse fácilmente usando los métodos descritos en la presente memoria.

Cuando los conjugados de PEG de uricasa de mamíferos se prepararon a partir de las formas tetraméricas y octaméricas de la enzima (que contienen cuatro u ocho subunidades de aproximadamente 35 kDa), muestran una inmunogenicidad en ratones profundamente disminuida, en contraste con la inmunogenicidad moderada de los conjugados de PEG de preparaciones de uricasa que contienen agregados grandes (véase la Figura 6) y la muy alta inmunogenicidad de la enzima no modificada.

Las preparaciones purificadas de uricasas naturales y recombinantes contienen habitualmente una mezcla de agregados muy grandes de la enzima, además de las formas tetraméricas (140 kDa) y octaméricas (280 kDa). El porcentaje de cada preparación de uricasa que está en forma tetramérica u octamérica varía generalmente de aproximadamente 20% a 95% (véanse las Figuras 2-4). A pesar de la evidencia de que los agregados no PEGilados de otras muchas proteínas son altamente inmunogénicos (véanse, *p. ej.*, Moore, WV, *et al.*, (1980) *J Clin Endocrinol Metab* 51:691-697), estudios previos de PEG-uricasa no describen esfuerzos para limitar el contenido de agregados, lo que sugiere que no se consideró la inmunogenicidad potencial de los agregados de PEG modificados. Tomando como base las observaciones de los presentes inventores, parece probable que dichos agregados estaban presentes en las preparaciones de enzima usadas para las síntesis previas de PEG-uricasa. Su presencia puede haber hecho más difícil la tarea de preparar conjugados no inmunogénicos. También parece que las grandes pérdidas de actividad uricolítica observadas en esfuerzos previos para PEGilar uricasa estaban relacionados con el gran número de cadenas de bajo peso molecular de PEG que se acoplaron. Por otra parte, los métodos para purificar y PEGilar uricasa descritos en la presente memoria permiten la unión covalente de tantas como 12 cadenas de PEG por subunidad mientras que se retiene más del 75% de la actividad uricolítica, al menos para determinadas uricasas, *p. ej.*, uricasa PKS (una muteína de uricasa porcina) y la enzima de *Bacillus sp.* termofílicas.

En otra realización preferida, pueden eliminarse sustancialmente todos los agregados grandes de la enzima por cromatografía de intercambio iónico (Figuras 1-3) o cromatografía de exclusión por tamaño a un pH entre aproximadamente 9 y 10,5, preferiblemente 10,2, antes de la conjugación con PEG de la preparación de uricasa resultante sustancialmente sin agregados. El peso molecular de la uricasa en cada fracción de la columna preparativa puede monitorizarse por cualquier técnica analítica dependiente de tamaño, incluyendo, por ejemplo, HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño convencional, centrifugación, dispersión de la luz, electroforesis capilar o electroforesis en gel en un tampón no desnaturizante. En el caso de la uricasa sin agregados aislada usando cromatografía de exclusión por tamaño, las fracciones que contienen sólo las formas de 140 kDa y 280 kDa de la enzima pueden juntarse y usarse para conjugación con PEG. En el caso de la uricasa tetramérica más octamérica aislada usando cromatografía de intercambio iónico, las fracciones de la columna de intercambio iónico pueden analizarse respecto al tamaño para determinar qué fracciones contienen cantidades sustanciales de las formas tetraméricas y octaméricas sin los agregados grandes detectados por dispersión de la luz. En el producto purificado, los agregados grandes no deseados pueden constituir así tan poco como aproximadamente 1% o menos de la uricasa total.

Los resultados presentados en la presente memoria indican que, incluso cuando están muy PEGiladas, las formas de uricasa PKS más grandes de octámero provocan aclaramiento acelerado (Figura 5) y son en algún grado inmunogénicas en ratones (Figura 6). Por el contrario, los conjugados preparados a partir de uricasa que no tiene esencialmente agregados grandes (detectables por dispersión de la luz) podrían reinyectarse al menos seis veces en intervalos semanales con mucha menos evidencia de tasas de aclaramiento acelerado (Figura 5) y sin la formación detectable de anticuerpos, según se mide por un inmunoensayo ligado a enzima sensible (Figura 6). El uso de uricasa tetramérica u octamérica altamente purificada distingue más los conjugados mejorados de la presente invención de las preparaciones PEG-uricasa descritas previamente. Por el contrario, la presencia de un contenido significativo de agregados grandes en las preparaciones de uricasa usadas por algunos investigadores previos pueden haberles hecho acoplar números altos de cadenas de PEG con la intención de suprimir la inmunogenicidad. Consecuentemente, la actividad enzimática de los conjugados resultantes disminuyó sustancialmente.

Los conjugados PEG-uricasa de la presente invención son útiles para disminuir los niveles de ácido úrico en los fluidos y tejidos corporales de mamíferos, preferiblemente seres humanos, y pueden usarse así para el tratamiento de los niveles elevados de ácido úrico asociados con condiciones que incluyen gota, tofo, insuficiencia renal, trasplante de órganos y enfermedades malignas. Los conjugados PEG-uricasa pueden inyectarse en un mamífero que tiene niveles excesivos de ácido úrico por cualquiera de varias vías, incluyendo las vías intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular e intraperitoneal. Alternativamente, pueden aerosolizarse e inhalarse. Véanse Patton, JS, (1996) *Adv Drug Delivery Rev* 19:3-36 y la Patente de EEUU 5.458.135. La dosis eficaz de PEG-uricasa de la presente invención dependerá del nivel de ácido úrico y del tamaño del individuo. En una realización de este aspecto de la invención, la PEG-uricasa se administra en un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad que va de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1 g. En una realización preferida, la cantidad administrada está entre aproximadamente 100 µg y 500 mg. Más preferiblemente, la uricasa conjugada se administra en una cantidad entre 1 mg y 100 mg, tal como, por ejemplo, 5 mg, 20 mg ó 50 mg. Las masas proporcionadas para las cantidades de dosificación de las realizaciones se refieren a la cantidad de proteína en el conjugado.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen PEG-uricasa pueden prepararse por técnicas convencionales, p. ej., como se describe en Gennaro, AR (Ed.) (1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, Easton, PA; Mack Publishing Co. Los excipientes adecuados para la preparación de disoluciones inyectables incluyen, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer con lactato, agua, polioles y glicerol. Las composiciones farmacéuticas para inyección parenteral comprenden líquidos estériles acuosos o no acuosos, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables así como polvos estériles para reconstitución en disoluciones o dispersiones estériles inyectables justo antes de su uso. Estas formulaciones pueden contener componentes adicionales, tales como, por ejemplo, conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, antioxidantes y diluyentes.

La PEG-uricasa también puede proporcionarse como composiciones de liberación controlada para implante en un individuo para controlar continuamente los niveles elevados de ácido úrico en los fluidos corporales. Por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, colágeno regenerado, poli-L-lisina, alginato sódico, goma gellan, quitosán, agarosa, liposomas multilamelares y muchas otras formulaciones de liberación lenta convencionales comprenden materiales bioerodibles o biodegradables que pueden formularse con las composiciones biológicamente activas. Estos materiales, cuando se implantan o inyectan, se degradan gradualmente y liberan el material activo en el tejido circundante. Por ejemplo, un método para encapsular PEG-uricasa comprende el método descrito en la Patente de EEUU 5.653.974. El uso de formulaciones bioerodibles, biodegradables y otras de formulación lenta se contempla expresamente en la presente invención. El uso de bombas de infusión y sistemas de atrapamiento en una matriz para la administración de PEG-uricasa también está en el alcance de la presente invención. PEG-uricasa puede estar incluida ventajosamente en micelas o liposomas. La tecnología de encapsulación en liposomas es muy conocida en la técnica. Véase, p. ej., Lasic, D, et al., (Eds.) (1995) *Stealth Liposomes*. Boca Raton, FL; CRC Press.

Las composiciones farmacéuticas de PEG-uricasa de la invención disminuirán la necesidad de hemodiálisis en pacientes con alto riesgo de fallo renal inducido por urato, p. ej., receptores de trasplante de órganos (véase Venkateshan, VS, et al., (1990) *Nephron* 56:317-321) y pacientes con algunas enfermedades malignas. En pacientes con grandes acumulaciones de urato cristalino (tofo), dichas composiciones farmacéuticas mejorarán la calidad de vida más rápidamente que los tratamientos que están disponibles actualmente.

Los ejemplos siguientes, que no deben considerarse limitativos de la invención de ninguna forma, ilustran los diferentes aspectos descritos anteriormente. Estos ejemplos describen PEG-uricasas preparadas acoplando PEG activado (p. ej., el derivado carbonato de *p*-nitrofenilo) con una muteína de uricasas porcinas. Estos ejemplos proporcionan una guía para un experto en la técnica para producir conjugados de uricasa sustancialmente no inmunogénicos que retienen al menos aproximadamente 75% de la actividad uricolítica de la enzima no modificada y que son idóneos para la administración crónica.

## ES 2 343 105 T3

### Ejemplo 1

#### *Cromatografía de intercambio iónico preparativa de uricasa*

5 La cromatografía de intercambio iónico preparativa se realizó en un equipo de Cromatografía Líquida de Proteína Rápida (FPLC) (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). La columna Mono Q (1 x 10 cm, Amersham Pharmacia) se eluyó con un gradiente de 50 mM carbonato de sodio, pH 10,3, 0,1 M NaCl (Tampón A) a 50 mM carbonato de sodio, pH 10,3, 0,6 M NaCl (Tampón B) con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, excepto que la muestra se cargó a una velocidad de flujo menor. Esta técnica se usó para fraccionar 25 mL de una disolución de uricasa PKS (pH 10,3).  
10 La uricasa PKS se obtuvo de Bio-Technology General Limited (Rehovot, Israel). La última es una uricasa porcina recombinante en la que un resto de lisina (K) y un resto de serina (S) se han reemplazado por un resto de arginina y un resto de treonina, respectivamente, en la secuencia porcina parental (Lee *et al.* (1988) *Science* **239**:1288-1291; Wu *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:9412-9416). Después de cargar la muestra, la columna se lavó con 100 mL de Tampón A. El pico de uricasa empezó a eluir al final de un gradiente lineal de 31 mL de 0 a 28% de Tampón B. La mayor parte de la uricasa se eluyó isocráticamente con 7 mL de tampón que contenía 26% de Tampón B. El resto de la uricasa recuperada se eluyó con un gradiente lineal de 89 mL de 26% a 100% de tampón B. Se recogieron fracciones de 4 mL ó 6 mL. Se ensayaron alícuotas de las Fracciones #4-11 para uricasa y proteína total (Figura 1) y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de exclusión por tamaño como se describe en el Ejemplo 2 (Figuras 2 y 3). El resto de las partes de las Fracciones #5-10 se acoplaron a PEG, como se describe en el Ejemplo 3. Tomando como base los resultados de los análisis del Ejemplo 2, los conjugados PEG de las Fracciones #5 y 6 se combinaron como el “Conjunto Bajo en Sal” y los conjugados PEG de las Fracciones #7-10 se combinaron como el “Conjunto Alto en Sal”, como se indica en la Figura 1.

### Ejemplo 2

#### *Cromatografía de exclusión por tamaño de uricasa monitorizada por dispersión de la luz y absorbancia ultravioleta*

30 La HPLC de exclusión por tamaño se realizó a temperatura ambiente en una columna Superdex 200 (1 x 30 cm, Amersham Pharmacia Biotech) en uricasa PKS no fraccionada y en fracciones seleccionadas de la cromatografía preparativa Mono Q de la uricasa PKS del Ejemplo 1. El eluato del monitor de absorbancia (UV 2000) de HPLC de Thermo Separations (Sunnyvale, CA) se analizó por dispersión de la luz a 90° de la luz incidente, usando un detector MiniDawn de Wyatt Technologies (Santa Barbara, CA).

35 Los resultados mostrados en las Figuras 2-4 ilustran la resolución entre el tetrámero, octámero y los agregados mayores de la subunidad de uricasa y las diferentes proporciones de las señales detectadas de estas formas de uricasa en las diferentes muestras. A diferencia de la señal de absorbancia, que es directamente proporcional a la concentración, la señal de dispersión de la luz es proporcional al producto de la concentración por el tamaño de la unidad de dispersión de la luz. La sensibilidad resultante del detector de dispersión de la luz respecto a cantidades muy pequeñas de uricasa muy agregada reveló la presencia de los agregados mayores, que eluyeron a o cerca del volumen vacío (aproximadamente 7 mL).

### Ejemplo 3

#### *Síntesis de conjugados PEG-uricasa*

45 La uricasa PKS no fraccionada (de Bio-Technology General Limited) y la uricasa de las fracciones de la columna Mono Q del Ejemplo 1 se acoplaron a PEG de 10 kDa usando el derivado carbonato de *p*-nitrofenilo de PEG (NPC-PEG) obtenido de Shearwater Polymers (Huntsville, AL). La preparación de NPC-PEG a partir de PEG usando fenilcloroformatos se ha descrito en varias publicaciones (*p. ej.* Veronese, FM, *et al.*, (1985) *Appl Biochem Biotechnol* **11**:141-152; Kito, M, *et al.*, (1996) *J Clin Biochem Nutr* **21**:101-111) y NPC-PEG se ha usado para la síntesis de conjugados PEG-proteína por investigadores previos incluyendo los presentes inventores (*p. ej.* Veronese *et al.*, *supra*; Sherman, MR, *et al.*, en JM Harris, *et al.*, (Eds.) *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series 680* (p. 155-176) Washington, DC: American Chemical Society). Se determinó que el número de cadenas de PEG de 10 kDa acopladas a cada subunidad de uricasa era seis por el método descrito por Kumitani, M, *et al.*, (1991) *J Chromatogr* **588**:125-137.

### Ejemplo 4

#### *Persistencia en suero e inmunogenicidad in vivo de uricasa y PEG-uricasa*

65 Los conjugados PEG de uricasas de mamíferos recombinantes, preparados según el método del Ejemplo 3, se ajustaron a 1 mg de proteína/mL en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, para inyección. Las muestras se congelaron y se almacenaron hasta que se analizaron o inyectaron. Las muestras se calentaron hasta 37°C durante hasta 1 hora antes de la inyección en grupos de ocho ratones hembra BALB/c. Los grupos de ratones tenían pesos medios en el intervalo de 18-22 g al comienzo de los estudios.

## ES 2 343 105 T3

Los pesos de todos los ratones se monitorizaron y se registraron las evidencias de reacciones adversas de las inyecciones u otras evidencias de mala salud. Veinticuatro horas después de cada una de seis inyecciones semanales, los animales se anestesiaron con ketamina y se obtuvieron 100-200  $\mu\text{L}$  de sangre retro-orbitalmente, excepto en el sacrificio (exsanguinación) en el que se recogió un volumen mayor. El suero se preparó a partir de sangre que había coagulado durante entre 4 y 32 horas a 2-8°C. Los sueros se almacenaron a -20°C. Los sueros se analizaron para actividad uricolítica como se describe en el Ejemplo 5 y se analizaron para anticuerpos frente a uricasas como se describe en el Ejemplo 6.

### 10 Ejemplo 5

#### *Ensayos de actividad uricolítica de PEG-uricasa en sueros de ratones a los que se inyectó PEG-uricasa*

Se realizó un ensayo de actividad basado en absorbancia de luz ultravioleta (ensayo UV) con 100  $\mu\text{M}$  ácido úrico como sustrato en 200 mM borato sódico, pH 9,2, en una adaptación a microplacas del método de I. Fridovich (*J Biol Chem.* (1965) **240**:2491-2494). La disminución de la absorbancia a 292 nm se monitorizó durante 15 minutos a temperatura ambiente en una placa de 96 pocillos con un fondo transparente a UV (Costar, Corning, NY) usando un lector de microplacas SpectraMAX 250 de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Los datos se analizaron encontrando la pendiente máxima (en unidades de mili-absorbancia por minuto) de medidas de absorbancia hechas durante el intervalo durante el cual se oxidó entre 10 y 40% del sustrato. Los resultados obtenidos con este ensayo se ilustran en las Figuras 1 y 5.

El valor medio de la vida media en suero de ratones a los que se inyectó por primera vez uricasa PKS acoplada a seis cadenas de PEG 10kDa por subunidad (6 x PEG 10 kDa PKS) fue  $29 \pm 4$  horas, tomando como base los datos de suero obtenidos 24 y 72 horas después de la inyección.

En experimentos independientes, se estableció que la actividad uricolítica detectable en los sueros de los ratones a los que se inyectó PEG-uricasa disminuía durante el almacenamiento a -20°C y que la recuperación máxima de esta actividad se obtiene por una incubación de 4 horas a 37° antes del ensayo. La Figura 5 muestra que la recuperación de la actividad uricolítica después de inyecciones semanales repetidas de 6 x PEG 10 kDa uricasa PKS fue mayor cuando la enzima se purificó por cromatografía en columna Mono Q, como en el Ejemplo 1, antes de la PEGilación según el método del Ejemplo 3. La recuperación fue mayor después de la inyección de conjugados preparados a partir del conjunto de eluato alto en sal del Ejemplo 1 (véase la Figura 1), que tiene el menor contenido de los agregados muy grandes (véanse los perfiles de dispersión de la luz de las Fracciones 7-10 en la Figura 3). Se obtuvo una recuperación inmediata con los conjugados preparados a partir del conjunto de eluato bajo en sal a partir de la columna Mono Q del Ejemplo 1, y la recuperación más baja se obtuvo con los conjugados hechos a partir de uricasa PKS no fraccionada, que tiene el mayor contenido de agregados muy grandes (véase la Figura 2). Se observó el mismo orden de actividades relativas recuperadas en sueros después de inyecciones repetidas (conjunto alto en sal > conjunto bajo en sal > uricasa no fraccionada) independientemente de si se usó el ensayo UV descrito anteriormente o un ensayo colorimétrico adaptado de P. Fossati *et al.* (*J. Clin Chem* (1980) **26**:227-231), e independientemente de si los sueros se incubaron a 37°C antes de ensayarlos.

### 45 Ejemplo 6

#### *Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) de sueros de ratones a los que se inyectó PEG-uricasa*

Se realizaron análisis ELISA no competitivos con uricasa porcina unida a placas de 96 pocillos Immulon 2 (Dyner Technologies, de VWR Scientific, San Francisco, CA). Los anticuerpos primarios fueron de ratones a los que se inyectó uricasa o conjugados 6 x PEG 10 kDa preparados según el método del Ejemplo 3. El anticuerpo secundario fue IgG anti-ratón de cabra acoplada con peroxidasa de rábano (Calbiochem-Novabiochem #401 253, La Jolla, CA) y el sustrato fue dihidrocloruro de  $\alpha$ -fenilendiamina (Sigma P-9187, St. Louis, MO), como describen B. Porstmann *et al.* (*J Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1981) **19**:435-440).

La Figura 6 ilustra los resultados de los análisis ELISA no competitivos. Los resultados demuestran que 6 x PEG 10 kDa uricasa PKS sintetizado según el método del Ejemplo 3 a partir del eluato alto en sal de la columna Mono Q del Ejemplo 1 (mostrado en la Figura 1) no produjo respuestas inmunes detectables en ninguno de los ocho ratones que recibieron inyecciones semanales durante seis semanas. Unos pocos de los ratones a los que se inyectó conjugados preparados a partir de uricasa PKS no fraccionada según el método del Ejemplo 3 mostraron respuestas inmunes bajas pero detectables. La incidencia más alta de respuestas inmunes fue en ratones a los que se inyectó conjugados preparados según el método del Ejemplo 3 a partir del conjunto de eluato bajo en sal de la columna Mono Q del Ejemplo 1.

Sin la ventaja del detector de dispersión de la luz para los análisis de exclusión por tamaño en HPLC, como se describe en el Ejemplo 2, no hubiera sido evidente que la presencia de los agregados mayores, no de la forma octamérica de la uricasa, está asociada con la recuperación progresivamente disminuida de los conjugados PEG-uricasa después de inyecciones repetidas, como se observa en el Ejemplo 5 (Figura 5) y con una inmunogenicidad incrementada en ratones BALB/c, como se observa en el Ejemplo 6 (Figura 6). Estos resultados tienen implicaciones



ES 2 343 105 T3

5 Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr  
 225 230 235 240

Asp Ile Gln Val Leu Thr Leu Gly Gln Val Pro Glu Ile Glu Asp Met  
 245 250 255

10 Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Leu Asn Ile Asp Met Ser Lys  
 260 265 270

15 Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro  
 275 280 285

20 Tyr Gly Arg Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Thr Ser Arg Leu  
 290 295 300

SEQ ID NO: 2

25 Met Ala Asp Tyr His Asn Asn Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Leu Glu Phe  
 1 5 10 15

30 Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile Gln  
 20 25 30

35 Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln  
 35 40 45

40 Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp  
 50 55 60

45 Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys  
 65 70 75 80

Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu  
 85 90 95

50 Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val  
 100 105 110

55 Glu Glu Ile Pro Trp Lys Arg Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val  
 115 120 125

His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Leu Glu Val Glu  
 130 135 140

60

65

ES 2 343 105 T3

5 Gln Leu Arg Ser Gly Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp  
 165 170 175  
 10 Gln Phe Thr Thr Lys Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln  
 180 185 190  
 15 Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Glu  
 195 200 205  
 20 Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu Glu Lys Phe Ala Gly  
 210 215 220  
 25 Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr  
 225 230 235 240  
 30 Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met  
 245 250 255  
 35 Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys  
 260 265 270  
 40 Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro  
 275 280 285  
 Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu  
 290 295 300  
 SEQ ID NO: 3  
 45 Met Ala His Tyr Arg Asn Asp Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe  
 1 5 10 15  
 50 Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln  
 20 25 30  
 55 Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln  
 35 40 45  
 60 Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp  
 50 55 60  
 65

# ES 2 343 105 T3

Val Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys  
 65 70 75 80

5

Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu  
 85 90 95

10

His Phe Leu Ser Ser Phe Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val  
 100 105 110

15

Glu Glu Val Pro Trp Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val  
 115 120 125

20

His Ala Phe Ile Tyr Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu  
 130 135 140

25

Gln Ile Arg Asn Gly Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu  
 145 150 155 160

30

Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp  
 165 170 175

35

Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln  
 180 185 190

40

Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu  
 195 200 205

45

Ala Thr Trp Asp Thr Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly  
 210 215 220

50

Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr  
 225 230 235 240

55

Asp Ile Gln Val Leu Thr Leu Gly Gln Val Pro Glu Ile Glu Asp Met  
 245 250 255

60

Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Leu Asn Ile Asp Met Ser Lys  
 260 265 270

65

Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro  
 275 280 285

Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu  
 290 295 300

## ES 2 343 105 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado de uricasa que comprende una urato oxidasa purificada (uricasa) conjugada con poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido), en el que dicha uricasa contiene formas tetraméricas y octaméricas purificadas de la uricasa que se pueden preparar por eliminación de los agregados mayores que octámeros, en el que dicha uricasa no contiene más de aproximadamente 2% de agregados mayores que octámeros.
- 10 2. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que la uricasa es uricasa de mamíferos.
- 10 3. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 2, en el que la uricasa es uricasa de hígado porcino, de hígado bovino o de hígado ovino.
- 15 4. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que la uricasa es recombinante.
- 15 5. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 4, en el que la uricasa tiene sustancialmente la secuencia de uricasa de hígado porcino, bovino, ovino o de babuino.
- 20 6. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que la uricasa es quimérica.
- 20 7. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 6, en el que la uricasa quimérica contiene partes de uricasa de hígado porcino y de hígado de babuino.
- 25 8. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 6, en el que la uricasa quimérica es uricasa porcina en la que el resto de arginina 291 de SEQ ID NO:1 se ha reemplazado por lisina (R291 K) y el resto de treonina 301 de SEQ ID NO:1 se ha reemplazado por serina (T301 S) (uricasa PKS).
- 30 9. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 4, en el que la uricasa tiene la secuencia de uricasa de hígado de babuino que tiene SEQ ID NO:2 en la que el resto de tirosina 97 de SEQ ID NO:2 se ha reemplazado por histidina.
- 30 10. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 4, en el que la uricasa comprende un extremo amino terminal y un extremo carboxilo terminal, y en el que la uricasa está truncada en un extremo o en ambos extremos.
- 35 11. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que la uricasa es una uricasa fúngica o microbiana.
- 35 12. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 11, en el que la uricasa fúngica o microbiana se aísla de *Aspergillus flavus*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus sp.* o *Candida utilis*, o es una enzima recombinante que tiene sustancialmente la secuencia de una de dichas uricasas.
- 40 13. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que la uricasa es una uricasa de invertebrados.
- 40 14. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 13, en el que la uricasa de invertebrados se aísla de *Drosophila melanogaster* o *Drosophila pseudoobscura*, o es una enzima recombinante que tiene sustancialmente la secuencia de una de dichas uricasas.
- 45 15. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que la uricasa es una uricasa de plantas.
- 45 16. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 15, en el que la uricasa de plantas se aísla de nódulos radiculares de *Glycine max* o es una enzima recombinante que tiene sustancialmente la secuencia de dicha uricasa.
- 50 17. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que dicho poli(etilen glicol) es monometoxi poli(etilen glicol).
- 55 18. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que dicha uricasa se conjuga con dicho poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) mediante una unión seleccionada del grupo que consiste en uretano (carbamato), amina secundaria y amida.
- 55 19. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que dicho poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa y 30 kDa.
- 60 20. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 19, en el que dicho poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) tiene un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y 20 kDa.
- 65 21. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que el número medio de cadenas de dicho poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es entre aproximadamente 2 y 12 por subunidad de uricasa.
- 65 22. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 21, en el que el número medio de cadenas de dicho poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es entre aproximadamente 6 y 10 por subunidad de uricasa.

## ES 2 343 105 T3

23. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 22, en el que el número medio de cadenas de poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es entre aproximadamente 7 y 9 por subunidad de uricasa.

24. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que el poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es lineal.

25. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que el poli(etilen glicol) o poli(etilen óxido) es ramificado.

26. Una composición farmacéutica para disminuir los niveles de ácido úrico en un fluido o tejido corporal, que comprende el conjugado de la Reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

27. La composición farmacéutica de la Reivindicación 26, en la que dicha composición se estabiliza por liofilización y se disuelve después de reconstitución para proporcionar disoluciones adecuadas para la administración parenteral.

28. Un método para purificar uricasa que tiene una inmunogenicidad reducida, que comprende la etapa de separar los agregados de uricasa mayores que octámeros en fracciones de uricasa, y excluir dichos agregados de la uricasa purificada, en el que la uricasa purificada contiene formas tetraméricas y octaméricas purificadas de la uricasa que se pueden preparar por eliminación de los agregados mayores que octámeros, en el que dicha uricasa no contiene más de aproximadamente 2% de agregados mayores que octámeros.

29. El método de la Reivindicación 28, en el que dicha etapa de separación se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, y ultrafiltración.

30. El método de la Reivindicación 28, en el que dicha etapa de separación comprende la etapa de detectar los agregados mayores que octámeros en las fracciones de uricasa y excluir dichas fracciones que contienen dichos agregados.

31. Uricasa aislada preparada por el método de la reivindicación 28.

32. Un método para obtener un conjugado de uricasa, comprendiendo dicho método las etapas de:

aplicar una disolución de uricasa que comprende uricasa tetramérica, uricasa octamérica, y agregados de uricasa mayores que octámeros en al menos una columna de separación;

recuperar de dicha columna una o más fracciones que contienen uricasa tetramérica y octamérica aislada que se puede preparar por eliminación de los agregados mayores que octámeros, en el que dicha uricasa no contiene más de aproximadamente 2% de agregados mayores que octámeros; y

PEGilar dicha uricasa.

33. El método de la Reivindicación 32, en el que dicha columna de separación se selecciona del grupo que consiste en columna de intercambio iónico y columna de exclusión por tamaño.

34. El método de la Reivindicación 33, en el que dicha disolución de dicha uricasa se aplica en dicha columna a un pH de 10,2.

35. El método de la Reivindicación 33, que comprende además la etapa de analizar dichas fracciones para determinar al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en presencia de dicha uricasa octamérica y ausencia de agregados de uricasa que son mayores que octámeros.

36. El método de la Reivindicación 35, en el que dicha etapa de análisis comprende al menos una técnica de análisis seleccionada del grupo que consiste en cromatografía, centrifugación, dispersión de la luz y electroforesis.

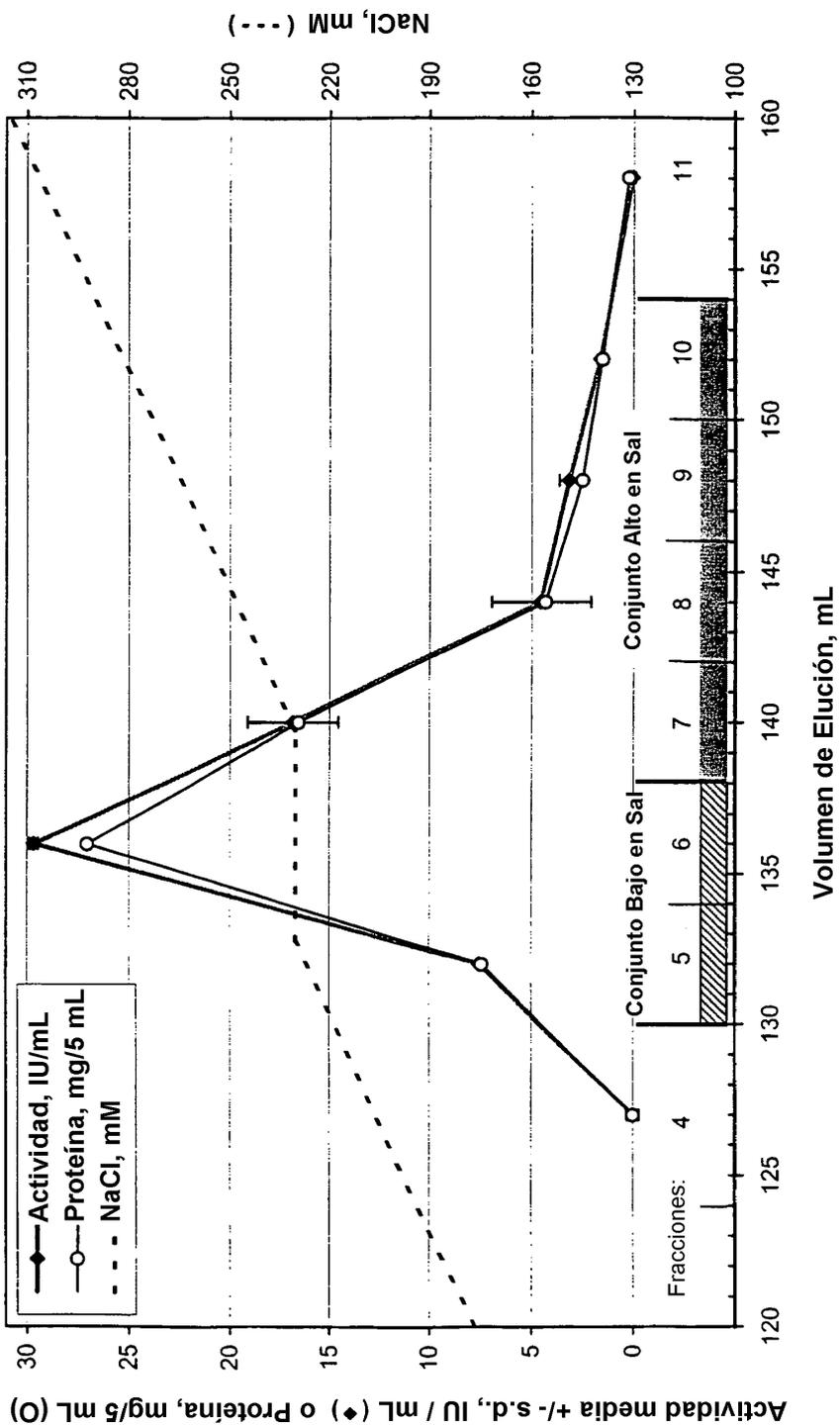
37. El método de la Reivindicación 36, en el que dicha cromatografía es cromatografía líquida de alta resolución.

38. Un método para purificar uricasa que tiene una inmunogenicidad reducida, que comprende: separar los agregados de uricasa mayores que octámeros en fracciones de uricasa; y recuperar una fracción, en el que dicha fracción contiene uricasa octamérica pero no contiene agregados de uricasa mayores que octámeros.

39. El conjugado de uricasa de la Reivindicación 1, en el que al menos 2,5% de dicha uricasa está en la forma octamérica.

Figura 1

Ensayo UV de la Actividad Uricolítica en Fracciones de Cromatografía Mono Q de Uricasa PKS  
(Proteína Basada en HPLC de Exclusión por Tamaño)



HPLC de Exclusión por Tamaño en Superdex 200 de Uricasa PKS No Fraccionada (Carga) y Fracciones de la Columna Mono Q en el Conjunto Bajo en Sal

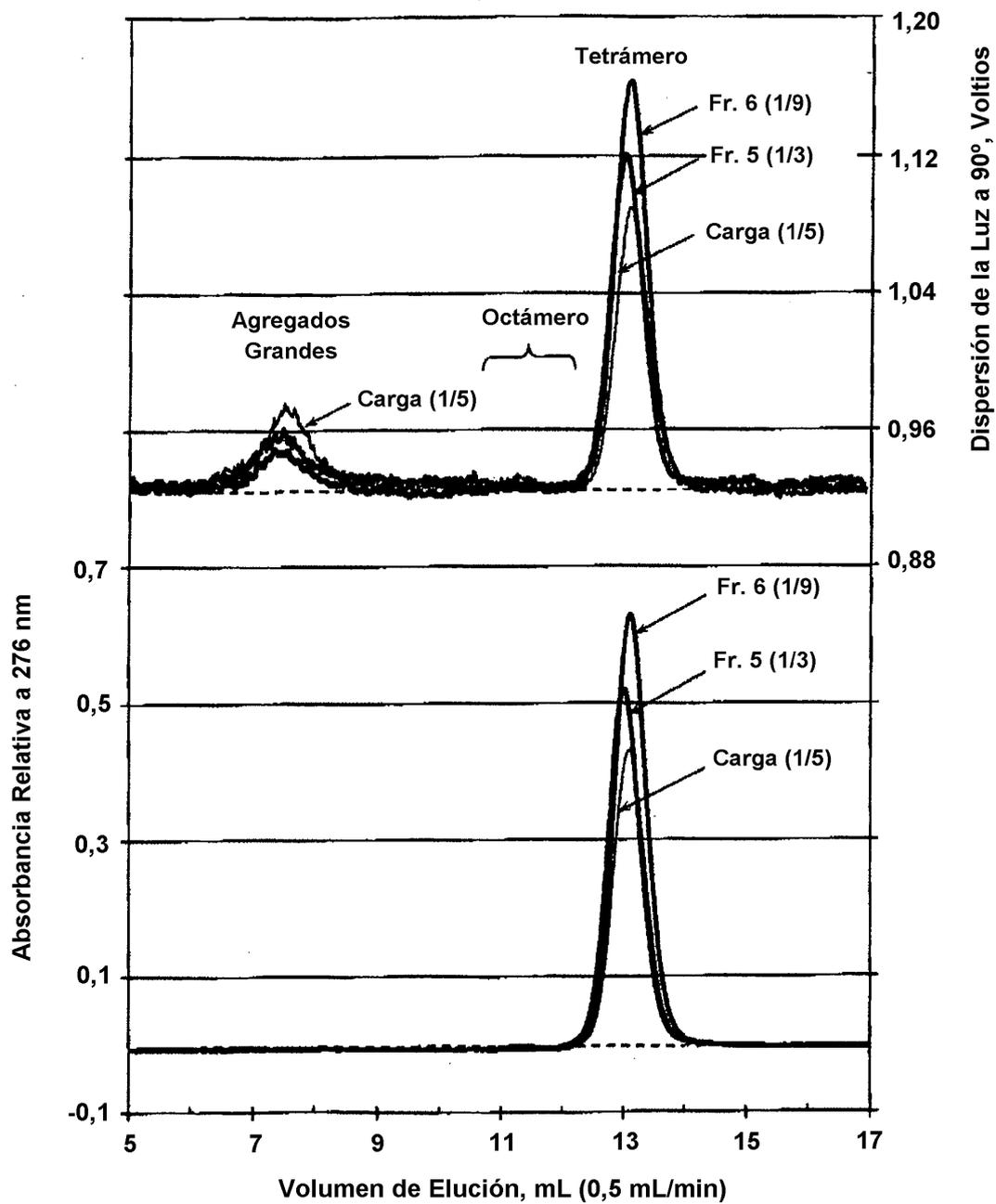


FIG. 2

Figura 3

HPLC de Exclusión por Tamaño en Superdex 200 de Uricasa PKS No Fraccionada (Carga) y Fracciones de la Columna Mono Q en el Conjunto Alto en Sal

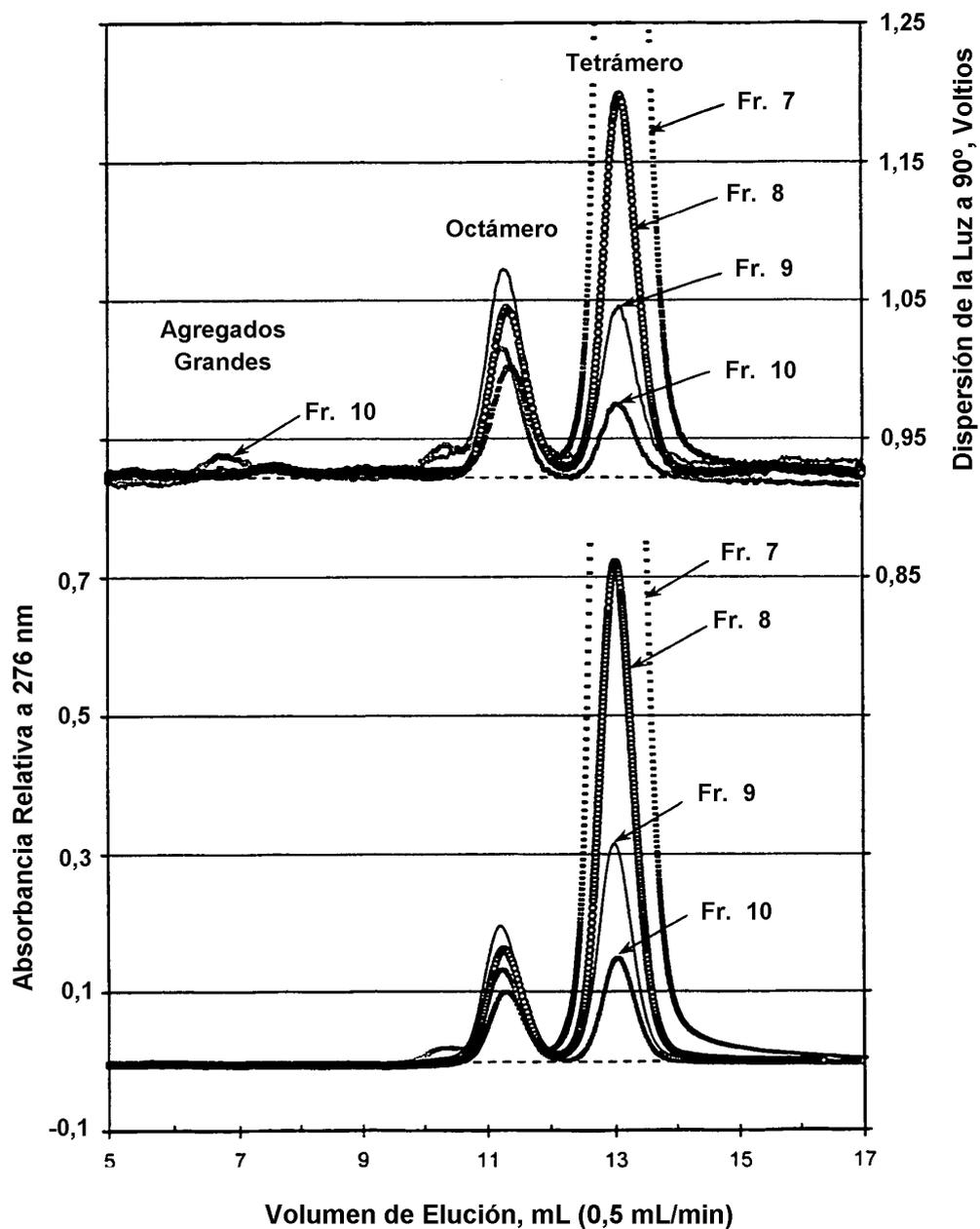


Figura 4

Contenido en Octámero de las Fracciones de la Columna Mono Q de Uricasa PKS

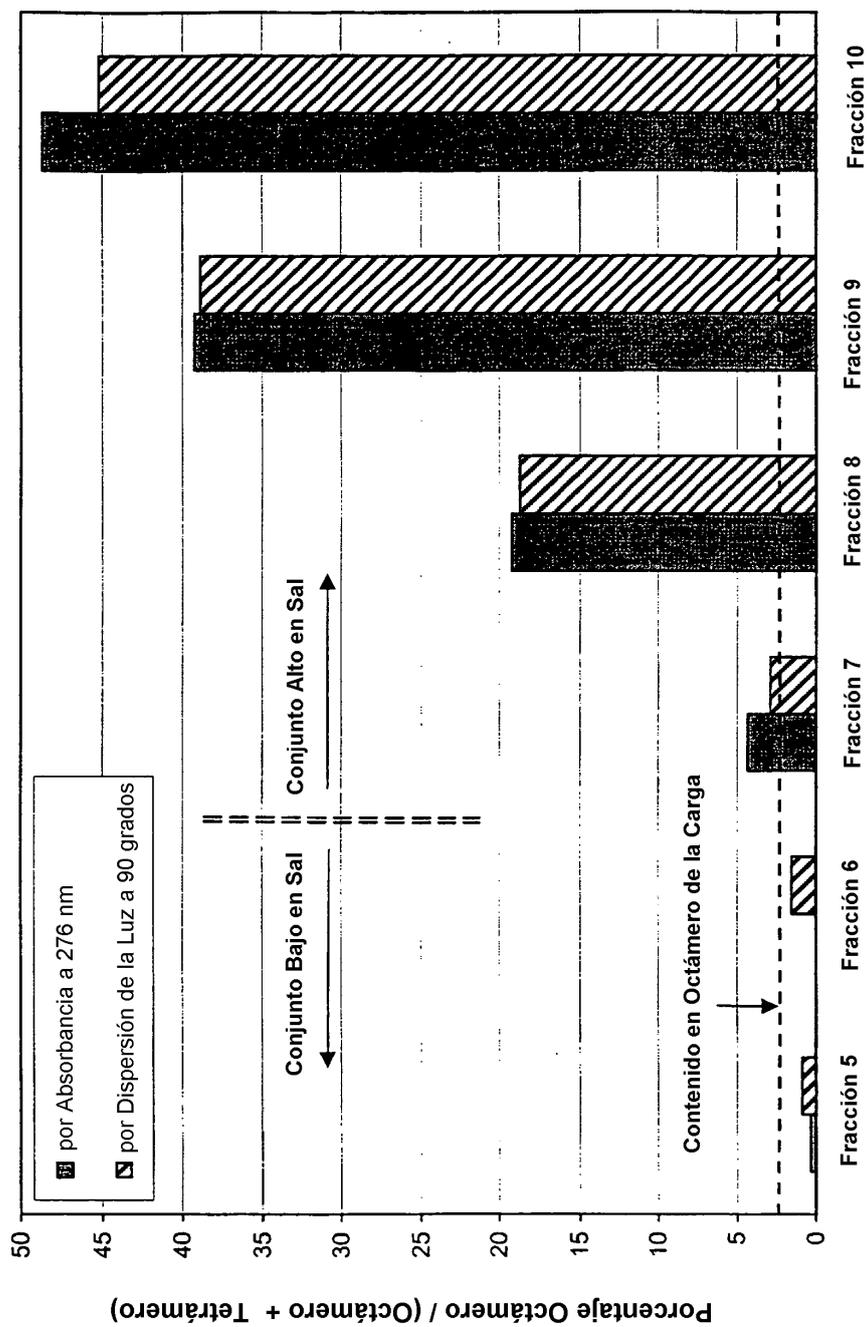
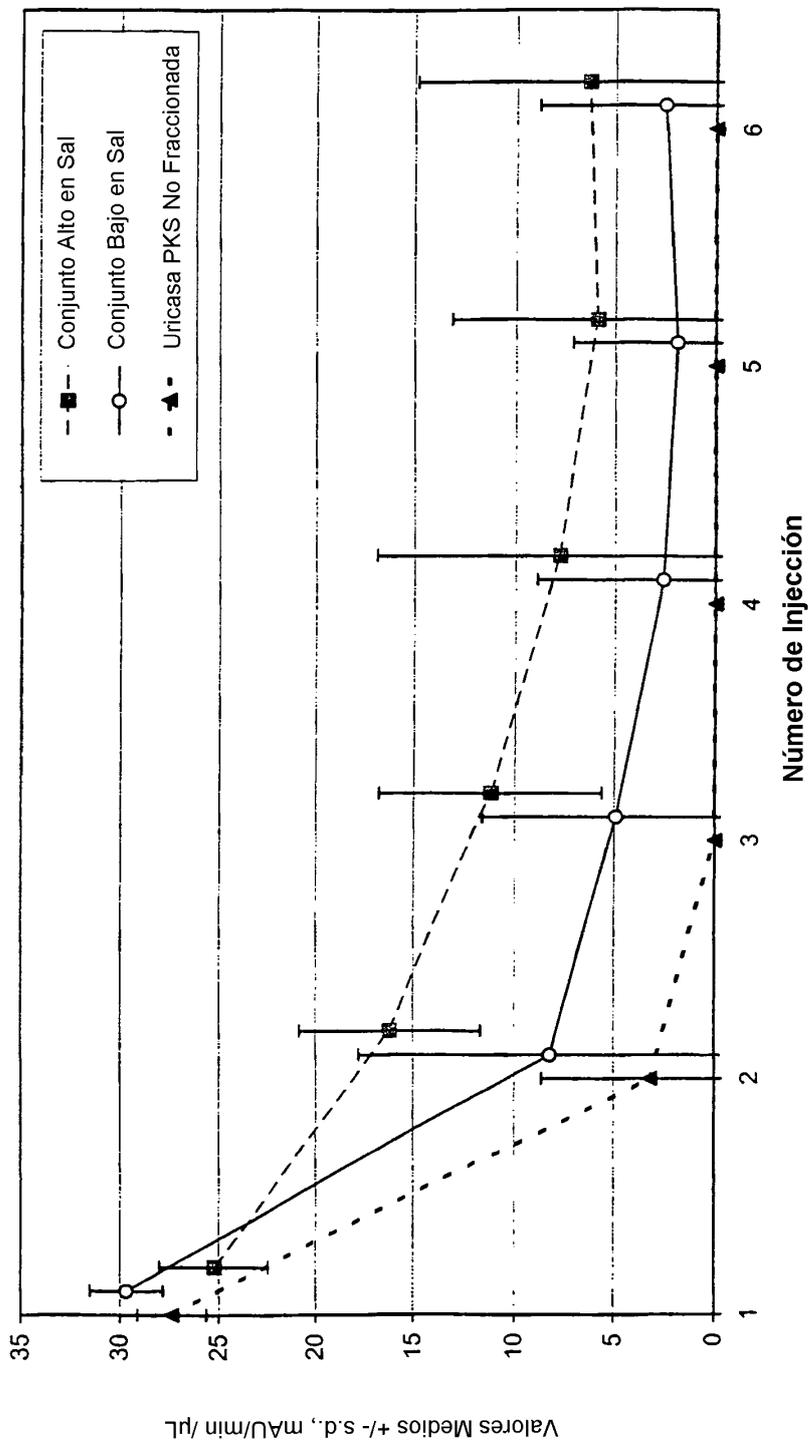


Figura 5

Ensayos UV de Uricasa de Sueros de Ratones a los que se inyectó Conjugados de PEG 6 x 10 kDa con Uricasa PKS o de Conjuntos de Fracciones de la Columna Mono Q

Los Ratones se Sangraron 24 Horas después de Cada Inyección Semanal



Los datos de los Conjuntos Bajo en Sal y Alto en Sal se desplazaron en el eje de las x 0,1 y 0,2 unidades, respectivamente

Figura 6

