

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 074**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

C12N 9/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.1999 E 09175303 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2158923**

54 Título: **Conjugados de peg-oxidasa de urato y su uso**

30 Prioridad:

06.08.1998 US 219318 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2013

73 Titular/es:

MOUNTAIN VIEW PHARMACEUTICALS, INC.
(50.0%)
3475-S EDISON WAY
MENLO PARK, CA 94025-1813, US y
DUKE UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

WILLIAMS, L. DAVID;
HERSHFIELD, MICHAEL S.;
KELLY, SUSAN J.;
SAIFER, MARK G. P. y
SHERMAN, MERRY R.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 404 074 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

Conjugados de peg-oxidasa de urato y su uso

Campo de la invención

5 La presente invención trata sobre la modificación química de proteínas para prolongar su vida en circulación y reducir su inmunogenia. Más específicamente, la invención aborda la conjugación de polietilenglicol u óxido de polietileno con oxididas de urato, que elimina considerablemente la inmunogenia de la oxidasa de urato sin comprometer su actividad uricolítica.

Antecedentes de la Invención

10 Las declaraciones que aparecen en esta sección no constituyen una admisión de la tecnología anterior, sino que reflejan los comentarios e interpretaciones subjetivas de los inventores sobre el estado que guardaba la tecnología en el momento que se llevó a cabo esta invención. Dichas interpretaciones pueden reflejar las ideas personales de los inventores, y por lo tanto no conocidas, las cuales no forman parte por sí mismas de la arte anterior.

15 Las oxididas de urato (uricasas; E. C. 1.7.3.3) son enzimas que catalizan la oxidación del ácido úrico en un producto más soluble, alantaina, un metabolito que es más fácil de excretar. Los seres humanos no producen uricasas activas enzimáticamente como resultado de varias mutaciones del gen para uricasa adquirido durante la evolución de los primates superiores. Wu, X, *et al.*, (1992) *J Mol Evol* **34**:78-84. En consecuencia, en individuos susceptibles, una concentración excesiva de ácido úrico en sangre (hiperuricemia) y en orina (hiperuricosuria) pueden ocasionar artritis dolorosa (gota), depósitos de urato desfigurantes (tofos) e insuficiencia renal. En algunos individuos afectados, los medicamentos disponibles como el alopurinol (un inhibidor de la síntesis del ácido úrico) producen efectos secundarios limitadores del tratamiento o no alivian los síntomas de manera satisfactoria. Hande, KR, *et al.*, (1984) *Am J Med* **76**:47-56; Fam, AG, (1990) *Baillière's Clin Rheumatol* **4**:177-192. Las inyecciones de uricasa pueden disminuir la hiperuricemia e hiperuricosuria, por lo menos de manera transitoria. No obstante, dado que la uricasa es una proteína extraña en los seres humanos, incluso la primera inyección de proteína no alterada de *Aspergillus flavus* ha dado lugar a reacciones anafilácticas en diferentes porcentajes de pacientes bajo tratamiento (Pui, C-H, *et al.*, (1997) *Leukemia* **11**:1813-1816) y las respuestas inmunológicas restringen su utilidad para tratamientos crónicos o intermitentes. Donadio, D, *et al.*, (1981) *Nouv Presse Méd* **10**:711-712; Leautic, M, *et al.*, (1983) *Rev Rhum Mal Osteoartic* **50**:553-554.

20 Durante varias décadas se ha reconocido que los resultados de los tratamientos disponibles para la hiperuricemia no alcanzan un nivel óptimo. Kissel, P, *et al.*, (1968) *Nature* **217**:72-74. De la misma manera, hace años que se reconoce la posibilidad de que determinados grupos de pacientes con gota severa podrían verse beneficiados por un tratamiento con uricasa inyectable en forma segura y eficaz. Davis, FF, *et al.*, (1978) in GB Broun, *et al.*, (Eds.) *Enzyme Engineering*, Vol. 4 (pp. 169-173) New York, Plenum Press; Nishimura, H, *et al.*, (1979) *Enzyme* **24**:261-264; Nishimura, H, *et al.*, (1981) *Enzyme* **26**:49-53; Davis, S, *et al.*, (1981) *Lancet* **2**(8241):281-283; Abuchowski, A, *et al.*, (1981) *J Pharmacol Exp Ther* **219**:352-354; Chen, RH-L, *et al.*, (1981) *Biochim Biophys Acta* **660**:293-298; Chua, CC, *et al.*, (1988) *Ann Int Med* **109**:114-117; Greenberg, ML, *et al.*, (1989) *Anal Biochem* **176**:290-293. Las uricasas derivadas de los órganos animales son prácticamente insolubles en disolventes que son compatibles con la administración segura mediante inyección. Patente estadounidense 3,616,231. Ciertas uricasas derivadas de las plantas o microorganismos son más solubles en disolventes aceptables en términos médicos. Sin embargo, la inyección de enzimas microbianas induce con rapidez respuestas inmunológicas que pueden ocasionar reacciones alérgicas potencialmente mortales o una inactivación o eliminación acelerada de la uricasa de la circulación. Donadio, *et al.*, (1981); Leautic, *et al.*, (1983). Las enzimas basadas en secuencias de aminoácidos deducidas de uricasas de mamíferos, incluyendo el cerdo y el babuino, o de insectos, como *Drosophila melanogaster* o *Drosophila pseudoobscura* (Wallrath, LL, *et al.*, (1990) *Mol Cell Biol* **10**:5114-5127), no han sido candidatos aconsejables para su uso clínico, debido a los problemas de inmunogenia e insolubilidad en el pH fisiológico.

25 Se han utilizado las alteraciones covalentes de las proteínas con polietilenglicol u óxido de polietileno (ambos conocidos como PEG) para aumentar la hemivida de las proteínas y reducir la inmunogenia. Patentes estadounidenses 4,179,337, 4,766,106 y 4,847,325; Saifer, MGP, *et al.*, (1994) *Adv Exp Med Biol* **366**:377-387. La combinación de PEG de peso molecular elevado para producir conjugados con ciclos vitales de circulación prolongada o inmunogenia reducida – mientras que se conserva la actividad funcional– se demostró con anterioridad para otra enzima, la dismutasa de superóxido (Somack, R, *et al.*, (1991) *Free Rad Res Commun* **12-13**:553-562; Patentes estadounidenses 5,283,317 y 5,468,478) y para otros tipos de proteínas, por ejemplo citocinas (Saifer, MGP, *et al.*, (1997) *Polym Preprints* **38**:576-577; Sherman, MR, *et al.*, (1997) in JM Harris, *et al.*, (Eds.), *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series 680* (pp. 155-169) Washington, DC: American Chemical Society). Asimismo, se han descrito conjugados de uricasa con polímeros distintos a PEG. Patente estadounidense 4,460,683.

Prácticamente todos los intentos registrados de PEGilar la uricasa (es decir, combinar covalentemente PEG con uricasa), el PEG se agregó predominantemente a grupos amino, incluyendo los residuos amino-terminal y los residuos disponibles de lisina. En las uricasas más utilizadas, el número total de lisinas en cada una de las cuatro subunidades idénticas se encuentra entre 25 (*Aspergillus flavus* (Patente estadounidense 5,382,518)) y 29 (cerdo (Wu, X, *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:9412-9416)). Algunas lisinas no están disponibles para la PEGilación en la conformación nativa de la enzima. El método más común para reducir la inmunogenia de la uricasa ha sido combinar grandes cantidades de cadenas de PEG de bajo peso molecular. Esto ha tenido como resultado un gran descenso de la actividad enzimática de los conjugados resultantes.

Los investigadores anteriores utilizaron uricasa inyectada para catalizar la conversión del ácido úrico en alantoina *in vivo*. Véase Pui, *et al.*, (1997). Ésta es la base para el uso en Francia e Italia de la uricasa derivada del hongo *Aspergillus flavus* (Uricozyme®) para prevenir o corregir provisionalmente la hiperuricemia asociada con la terapia citotóxica para neoplasias hematológicas y para reducir de manera transitoria la hiperuricemia grave en pacientes con gota. Potaux, L, *et al.*, (1975) *Nouv Presse Méd* **4**:1109-1112; Legoux, R, *et al.*, (1992) *J Biol Chem* **267**:8565-8570; Patentes estadounidenses 5,382,518 y 5,541,098. Debido a su corta vida de circulación, Uricozyme® requiere inyecciones diarias y, además, no es muy aconsejable para terapias de largo plazo debido a su inmunogenia.

Una sola inyección intravenosa de un preparado de uricasa derivado de *Candida utilis* combinado con PEG de 5 kDa redujo el urato sérico a niveles indetectables en cinco sujetos humanos cuyo promedio de concentración de urato sérico antes de la inyección era de 6,2 mg/dL, lo cual está dentro del intervalo normal (Davis, *et al.*, (1981). A los sujetos se les administró una inyección adicional cuatro semanas después, pero no se registraron sus respuestas. Utilizando un ensayo de difusión en gel relativamente no sensible, no se detectó ningún anticuerpo a la uricasa después de la segunda (última) inyección. Esta referencia no aportó resultados sobre tratamientos crónicos o subcrónicos en humanos o en animales utilizados con fines experimentales.

Un preparado de uricasa derivado de *Arthrobacter protoformiae* combinado con PEG de 5 kDa se utilizó para controlar por un tiempo la hiperuricemia en un solo paciente con linfoma cuya concentración de urato sérico antes de la inyección era de 15 mg/dL, Chua, *et al.*, (1988). Debido al estado crítico del paciente y a la corta duración del tratamiento (cuatro inyecciones en un periodo de 14 días), no fue posible evaluar la eficacia o seguridad a largo plazo del conjugado.

En esta solicitud, el término «inmunogenia» se entiende como la inducción de una respuesta inmunológica mediante la inyección de un preparado de uricasa modificada con PEG o no modificada (el antígeno), en tanto que la «antigenia» se entiende como la reacción de un antígeno con anticuerpos ya existentes. En conjunto, la antigenia y la inmunogenia se entienden como la «inmunorreactividad». En investigaciones anteriores de la PEG-uricasa, la inmunorreactividad se evaluaba mediante diferentes métodos, incluyendo: 1) la reacción *in vitro* de PEG-uricasa con anticuerpos preformados; 2) medición de la síntesis de anticuerpos inducida; y 3) tasas de eliminación acelerada tras inyecciones repetidas.

Se sabe que se realizaron intentos previos para eliminar la inmunogenia de uricasas derivadas de diferentes fuentes mediante la combinación de varias cantidades de cadenas de PEG a través de varios vínculos, lo cual tuvo un éxito limitado. Los primeros en descubrir las PEG-uricasas fueron Davis e Inada junto con sus colaboradores. Davis, *et al.*, (1978); patente estadounidense 4,179,337; Nishimura, *et al.*, (1979); patentes japonesas 55-99189 y 62-55079. El conjugado descrito en la patente '337 fue sintetizado al reaccionar la uricasa de origen desconocido con un excedente molar de 2.000 veces de 750 Da de PEG, indicando que una gran cantidad de moléculas del polímero era semejante al que se había añadido a cada subunidad de uricasa. La patente '337 aborda la combinación de PEG o del polipropilenglicol con pesos moleculares de 500 a 20.000 Da, preferiblemente entre 500 y 5.000 Da, para brindar conjugados activos, solubles en agua y no inmunogénicos de varias hormonas de polipéptidos y enzimas incluyendo oxidoreductasas, de los cuales la uricasa es uno de los tres ejemplos. Además, la patente '337 destaca la combinación de 10 a 100 cadenas de polímeros por molécula de la enzima y la retención de por lo menos 40 % de actividad enzimática. No se informaron los resultados de las pruebas en relación con la combinación de PEG con los grupos amino disponibles de uricasa, la actividad uricolítica específica residual o la inmunorreactividad del conjugado.

El resumen de los datos derivados de las 13 menciones relacionadas con PEGilación de uricasa se encuentra en la tabla 1. Asimismo, algunos de estos resultados se presentan gráficamente en las figuras 1A-2B. Siete de estas publicaciones describen importantes reducciones en la actividad uricolítica medida *in vitro* generada por la combinación de grandes cantidades de cadenas de PEG con la uricasa derivada de *Candida utilis*. La combinación de grandes cantidades de cadenas de PEG de 5 kDa con la uricasa del hígado porcino da resultados semejantes, según lo describe la publicación de Chen y en la presentación en un simposio del mismo grupo. Chen, *et al.*, (1981); Davis, *et al.*, (1978).

Entre los estudios resumidos en la tabla 1, se documentó que en siete de ellos se redujo la inmunorreactividad, mientras que se eliminó en cinco de ellos gracias a la PEGilación. En tres de los últimos cinco estudios, la eliminación de la inmunorreactividad se asoció a la marcada disminución de la actividad uricolítica, hasta casi el 15, 28 o 45 % de su actividad inicial. Nishimura, *et al.*, (1979) (15% actividad); Chen, *et al.*, (1981) (28% actividad); Nishimura, *et al.*, (1981)

(45% actividad). En el cuarto informe, se documentó que el PEG se combinó con el 61 % de los residuos de lisina disponibles, sin embargo no se expresó la actividad específica residual Abuchowski, *et al.*, (1981). No obstante, un equipo de investigadores que contaba con dos de los mismos científicos y que utilizaba los mismos métodos documentó que este exceso de combinación dejaba una actividad residual de sólo 23-28 %. Chen, *et al.*, (1981). Las publicaciones de 1981 de Abuchowski *et al.* y Chen *et al.*, indican que para reducir significativamente la inmunogenia de la uricasa, el PEG debe combinarse con aproximadamente el 60 % de los residuos de lisina disponibles (tabla 1). En la primera publicación en que se dio a conocer la eliminación de la inmunorreactividad no se reveló el exceso de combinación de PEG, la actividad uricolítica residual o la naturaleza del enlace PEG-proteína. Veronese, FM, *et al.*, (1997) in JM Harris, *et al.*, (Eds.), *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series 680* (pp. 182-192) Washington, DC: American Chemical Society.

La conjugación de PEG con una pequeña fracción de residuos de lisina en uricasa redujo pero no eliminó su inmunorreactividad en el caso de los animales experimentales. Tsuji, J, *et al.*, (1985) *Int J Immunopharmacol* 7:725-730 (28-45 % de los grupos amino acoplados); Yasuda, Y, *et al.*, (1990) *Chem Pharm Bull* 38:2053-2056 (38 % de los grupos amino acoplados). Las actividades uricolíticas residuales de los aductos correspondientes comprende desde <33 % (Tsuji, *et al.*) hasta el 60 % (Yasuda, *et al.*) de sus valores iniciales. Tsuji, *et al.* sintetizaron los conjugados de PEG-uricasa con PEG de 7,5 kDa y 10 kDa, además de PEG de 5 kDa. Todos los conjugados resultantes fueron de alguna manera inmunogénicos y antigénicos, si bien mostraban actividades enzimáticas notablemente reducidas (Tabla 1; figuras 1A-1B).

Se documentó que un preparado PEGilado de uricasa derivada de *Candida utilis* que se administró de manera segura dos veces a cinco seres humanos retuvo sólo el 11 % de su actividad inicial. Davis, *et al.*, (1981). Varios años después, la uricasa modificada con PEG derivada de *Arthrobacter protoformiae* se administró cuatro veces a un paciente con linfoma avanzada e hiperuricemia severa. Chua, *et al.*, (1988). Mientras que la actividad residual de esta preparación enzimática no fue medida, Chua, *et al.*, demostraron la ausencia de anticuerpos de antiuricasa en el suero del paciente 26 días después de la primera inyección de PEG-uricasa, utilizando el ensayo inmunoenzimático (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*).

Como se resume en la tabla 1, estudios previos de uricasa PEGilada muestran que la actividad catalítica se reduce significativamente al combinar una cantidad suficiente de cadenas de PEG para reducir en un grado importante su inmunorreactividad. Además, la mayoría de los preparados anteriores de PEG-uricasa se sintetizaban utilizando el PEG activado con cloruro de cianuro, un derivado de triazina (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina) que introducía nuevos determinantes antigénicos, así como inducir anticuerpos en los conejos. Tsuji, *et al.*, (1985).

TABLA 1: Características de las PEG-uricasas derivadas de estudios previos

Fuente de la uricasa	Enlace de acoplamiento	Peso molecular del PEG (kDa)	Porcentaje de lisinas con PEG añadido	Actividad uricolítica residual (%)	Antigenia o inmunogenia <i>Comentarios</i>	Referencia
No revelada	Azida	0.7 diol	No revelado	No revelada	No revelada	Patente estadounidense 4,179,337
<i>Candida utilis</i>	Triazina (cloruro de cianuro)	5	% de "98":		Antigenia con suero de conejo (% de la enzima no modificada)	Nishimura, H, <i>et al.</i> , 1979
			20	31	70 %	
			26	21	6 %	
			43	15	0	
			48	5	0	

Fuente de la uricasa	Enlace de acoplamiento	Peso molecular del PEG (kDa)	Porcentaje de lisinas con PEG añadido	Actividad uricolítica residual (%)	Antigenia o inmunogenia <i>Comentarios</i>	Referencia
<i>Candida utilis</i>	Triazina PEG ₂	2 x 5	22	87	86 %	Nishimura, H, <i>et al.</i> , 1981
			25	70	49 %	
			36	45	0	
			46	31	0	
			50	27	0	
<i>Candida utilis</i>	Triazina	5	71	11	Cinco hombres toleraron dos inyecciones en 30 días.	Davis, S, <i>et al.</i> , 1981
<i>Candida utilis</i>	Triazina de acuerdo con Chen, R H-L, <i>et al.</i> , 1981	5	49	No revelada	Inmunogenia similar en aves a uricasa nativa	Abuchowski, A, <i>et al.</i> , 1981
			61	No revelada	Inmunogenia negativa	
<i>Hígado porcino</i>	Triazina	5	37	60	Eliminación acelerada en ratones	Chen <i>et al.</i> , 1981
			47	45	Eliminación acelerada en ratones	
			58	28	Eliminación constante (hemivida ca. 8 horas)	
<i>Candida utilis</i>	Triazina	5	57	23	Eliminación constante (hemivida ca. 8 horas)	
<i>Candida utilis</i>	Triazina de acuerdo con Chen, R H-L, <i>et al.</i> , 1981	5	35 70	No revelada	Inmunogenia reducida PEG en conejos.	Savoca, KV, <i>et al.</i> , (1984) <i>Int Arch Allergy Appl Immunol</i> 75:58-67
<i>Candida utilis</i>	Triazina	5	No revelado	No revelada	PEG-uricasa se administró vía oral a pollo en liposomas (una vez)	Nishida, Y, <i>et al.</i> , (1984) <i>J Pharm Pharmacol</i> 36:354-355

ES 2 404 074 T3

Fuente de la uricasa	Enlace de acoplamiento	Peso molecular del PEG (kDa)	Porcentaje de lisinas con PEG añadido	Actividad uricolítica residual (%)	Antigenia o inmunogenia <i>Comentarios</i>	Referencia
<i>Candida utilis</i>	Triazina	5 7,5 10	44 45 28 37 41 45	9,4 7,8 32 11 3, 7,3	Inmunogenicidad reducida, pero positiva en conejos. (Los anticuerpos no son para uricasa: reaccionan en cruzado con PEG-dismutasa de superóxido). La antigenicidad ensayada con anticuerpos de cobaya se redujo.	Tsuji, et al. 1985
<i>Arthrobacter protoformiae</i>	No revelada	5	No revelado	No revelada	ELISA no detectó ningún anticuerpo 26 días después de la primera de las cuatro inyecciones de PEG-uricasa.	Chua, CC, et al., 1988
<i>Candida utilis</i>	Triazina PEG ₂	2x5	10 12 15 21 38	90 89 80 70 60	No revelada No revelada No revelada No revelada Se redujo un 75 % la antigenia probada con suero de conejo.	Yasuda, Y, et al., 1990
<i>Candida utilis</i>	Triazina PEG ₂	2x5	22	68	Una sola inyección. PEG incrementó la hemivida de 1 hora ca. a 8 horas ca. en ratones. PEG bloqueó la eliminación por hígado, bazo y riñón (duración del estudio 24 h.)	Fujita, T, et al., 1991

Fuente de la uricasa	Enlace de acoplamiento	Peso molecular del PEG (kDa)	Porcentaje de lisinas con PEG añadido	Actividad uricolítica residual (%)	Antigenia o inmunogenia <i>Comentarios</i>	Referencia
<i>No revelada</i>	PEG PEG ₂ No se informó el enlace	No revelado	No revelado Se informó que es el mismo que para PEG	No revelada No revelada	Se redujo la inmunogenicidad en ratones un 98 % (PEG) o 100 % (PEG ₂)	Veronese, FM, <i>et al.</i> , 1997

La patente japonesa 3-148298 de A Sano, *et al.*, describe proteínas modificadas, incluyendo uricasa, derivatizada con PEG que tiene un peso molecular de 1-12 kDa que muestra una antigenia reducida y una acción «mejor y prolongada» así como métodos para realizar dichos péptidos derivatizados. Sin embargo, no existe información sobre el recuento de cadenas, ensayo de enzimas, pruebas biológicas o el significado de «mejor y prolongada». Las patentes japonesas 55-99189 y 62-55079, ambas de Y Inada, incluyen conjugados de uricasa preparada con PEG-triazina o *bis*-PEG-triazina (denotado como PEG₂ en la tabla 1), respectivamente (Nishimura, *et al.*, (1979 y 1981). En el primer tipo de conjugado, los pesos moleculares de los PEG son 2 kDa y 5 kDa, mientras que en el segundo tipo de conjugado, sólo se utilizó 5 kDa. Nishimura *et al.* (1979) dieron a conocer la recuperación del 15 % de actividad uricolítica después de la modificación del 43 % de lisinas disponibles con PEG lineales de 5 kDa, en tanto que Nishimura, *et al.*, (1981) registraron la recuperación del 31 % o 45 % de la actividad uricolítica después de la modificación del 46 % o 36 % de lisinas, respectivamente, con PEG₂.

Resumen de la invención

Estudios previos muestran que cuando una reducción importante en la inmunogenia o antigenia de uricasa se logra mediante la PEGilación, de manera invariable se asocia con una pérdida sustancial de la actividad uricolítica. La seguridad, conveniencia y la relación coste-eficacia de los productos biofarmacéuticos se ven negativamente afectados por las reducciones en sus potencias y la necesidad resultante de aumentar la dosis administrada. Por lo tanto, existe la necesidad de contar con medios alternativos seguros y eficaces para reducir los elevados niveles de ácido úrico en los fluidos corporales, incluyendo la sangre y la orina.

La presente descripción presenta una PEG-uricasa esencialmente no inmunogénica que retiene toda o casi toda la actividad de la enzima no modificada.

Una realización de la presente invención es un conjugado de oxidasa de urato (uricasa), tal y como se describe en la reivindicación 1. Otras realizaciones se definen en las reivindicaciones 2 a 6. La uricasa de este aspecto de la invención puede ser recombinante. Ya sea o no recombinante, 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. Es posible que la uricasa quimérica contenga porciones del hígado porcino o uricasa de hígado de babuino. *Por ejemplo*, la uricasa quimérica puede ser uricasa quimérica de cerdo-babuino (uricasa PBC, por sus siglas en inglés) o uricasa porcina que contenga las mutaciones R291k y T301S (uricasa PKS) (véase secuencias de la figura 6 y los resultados de los estudios fisiológicos e inmunológicos de las figuras 7-12). Alternativamente, la uricasa puede ser uricasa de bazo e hígado en la cual la tirosina 97 se reemplaza por histidina, por medio de lo cual la actividad específica de la uricasa puede aumentarse al menos en casi un 60 %. La uricasa de la invención, cualquiera que sea su origen, puede también tener una forma que sea truncada, ya sea en el terminal de amino, en el terminal de carboxilo o en ambos terminales. Asimismo, la uricasa puede ser uricasa fúngica o microbiana. En un aspecto de esta realización, la uricasa fúngica o microbiana puede ser una forma naturalmente ocurrente o recombinante de uricasa derivada de *Aspergillus flavus*, *Arthrobacter globiformis* o *Candida utilis*. De manera alternativa, la uricasa puede ser una uricasa invertebrada, como una forma naturalmente ocurrente o recombinante de uricasa derivada de *Drosophila melanogaster* o *Drosophila pseudoobscura*. Asimismo, es posible que esta uricasa de la invención sea una uricasa vegetal, *por ejemplo* una forma naturalmente ocurrente o recombinante de uricasa derivada del nódulo de la raíz de la soja (*Glycine max*). El PEG puede tener un peso molecular promedio de entre 5 kDa y 100 kDa; preferiblemente, el PEG puede tener un peso molecular promedio de entre 10 kDa y 60 kDa; idealmente, el PEG puede tener un peso molecular promedio de entre 20 kDa y 40 kDa, *por ejemplo* 30 kDa. La cantidad promedio de las cadenas combinadas covalentemente de PEG puede ser de 2 a 10 cadenas por subunidad de uricasa; preferiblemente, la cantidad promedio de las cadenas combinadas covalentemente de PEG pueden ser de 3 a 8 cadenas por subunidad de uricasa; idealmente, la cantidad promedio de las cadenas combinadas covalentemente de PEG pueden ser de 4 a 6 cadenas por subunidad de uricasa. En un aspecto de esta realización, la uricasa puede ser tetramérica. Las cadenas de PEG pueden unirse covalentemente a la uricasa por vía de enlaces de uretano (carbamato), enlaces secundarios de amina y/o enlaces de amida. Cuando la uricasa es una

forma recombinante de cualesquiera de las uricasas aquí mencionadas en el presente, la forma recombinante puede tener sustancialmente la secuencia de la forma naturalmente ocurriente.

Otra realización de la presente invención es una composición farmacéutica, tal y como se describe en la reivindicación 6. La composición puede ser estabilizada por liofilización y disuelta inmediatamente después de la reconstitución para ofrecer soluciones aconsejables en la administración parenteral.

La presente descripción también presenta el uso de PEG-uricasa para reducir los niveles de ácido úrico en los fluidos y tejidos del cuerpo de un mamífero. El uso abarca la administración a un mamífero de una cantidad de PEG-uricasa que reduce con eficacia el ácido úrico. La PEG-uricasa puede ser una uricasa purificada de dos o más subunidades en la que cada subunidad puede unirse covalentemente con un promedio de 2 a 10 cadenas de PEG lineal o ramificado, en el que cada molécula de PEG puede tener un peso molecular medio de entre aproximadamente 5 kDa y 100 kDa, en un portador aceptable farmacéuticamente. El mamífero puede ser un ser humano. La fase de administración puede ser, *por ejemplo*, una inyección vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal; o bien, una presentación en aerosol para su inhalación. Los elevados niveles de ácido úrico pueden encontrarse en la sangre, orina u otros fluidos y tejidos corporales, así como estar relacionados con la gota, tofos, insuficiencia renal, trasplante de órgano o cualquier otra enfermedad maligna.

Un método puede incluir las siguientes fases: aplicar la solución a por lo menos una columna de separación en un pH de entre casi 9 y 10,5, *por ejemplo* 10,2; recuperar las fracciones del eluato e identificar aquellos que puedan contener uricasa tetramérica separada, en la que las fracciones están básicamente libres de agregados de uricasa; y combinar las fracciones de la uricasa tetramérica separada. La columna de separación puede fundamentarse en un intercambio de iones, exclusión de tamaño o cualquier otro criterio de separación válido. De igual manera, el método puede abarcar un análisis de las fracciones para determinar la presencia de uricasa tetramérica o la ausencia de agregados de uricasa. *Por ejemplo*, dicho análisis puede incluir cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC: *high performance liquid chromatography*), otros métodos de cromatografía, dispersión de la luz, centrifugación y/o electroforesis. En un aspecto de esta realización, la uricasa tetramérica purificada puede contener menos del 10 % de agregados de uricasa.

25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada derivada de *Candida utilis* como una función del número de cadenas de PEG acoplado por subunidad.

La figura 1B muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada derivada de *Candida utilis* como una función de la masa total de PEG acoplado por subunidad.

30 La figura 2A muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada derivada del hígado porcino como una función del número de cadenas de PEG acoplado por subunidad.

La figura 2B muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada derivada del hígado porcino como una función de la masa total de PEG acoplado por subunidad.

35 La figura 3A muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada quimérica de cerdo-babuino (PBC: *pig-baboon chimeric*) como una función del número de cadenas de PEG acoplado por subunidad.

La figura 3B muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada PBC como una función de la masa total de PEG acoplado por subunidad.

La figura 4A muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada derivada de *Aspergillus flavus* como una función del número de cadenas de PEG acoplado por subunidad.

40 La figura 4B muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada derivada de *Aspergillus flavus* como una función de la masa total de PEG acoplado por subunidad.

La figura 5A muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada recombinante derivada del nódulo de la raíz de soja como una función del número de cadenas de PEG acoplado por subunidad.

45 La figura 5B muestra la retención de la actividad por medio de la uricasa PEGilada recombinante derivada del nódulo de la raíz de soja como una función de la masa total de PEG acoplado por subunidad.

La figura 6 muestra las secuencias de aminoácidos deducidas de uricasa quimérica de cerdo-babuino (uricasa PBC), la uricasa PBC que se trunca en terminales amino y carboxilo (PBC-NT-CT) y la uricasa porcina que contiene las mutaciones R291K y T301S (uricasa PKS), en comparación con las secuencias porcinas y de babuino.

La figura 7 muestra la actividad de uricasa en el suero de ratón 24 horas después de cada cuatro o cinco inyecciones intraperitoneales de uricasa modificada-PEG PBC, en relación con el valor de 24 horas después de la primera inyección.

La figura 8 muestra la relación inversa entre la actividad de la uricasa inyectada modificada-PEG PBC en el suero de un ratón carente de uricasa y la concentración del ácido úrico en el suero y la orina.

- 5 La figura 9 muestra una menor gravedad de un defecto concentrante en la orina en ratones (*uox-/-*) carentes de uricasa que fueron tratados con uricasa modificada-PEG PBC.

La figura 10 muestra la menor gravedad de la diabetes insípida nefrogénica en ratones (*uox-/-*) carentes de uricasa que fueron tratados con uricasa modificada-PEG PBC.

- 10 La figura 11 muestra la menor gravedad de la nefropatía inducida por ácido úrico, según se observó a través del microscopio de resonancia magnética, en ratones (*uox-/-*) carentes de uricasa que fueron tratados con uricasa modificada-PEG PBC.

La figura 12 muestra la eliminación acelerada derivada de la circulación de ratones BALB/c de octámero de uricasa PBC inyectada, en comparación con el tetrámero, cuando ambos están acoplados con 5-6 cadenas de PEG de 10 kDa por subunidad.

15 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente descripción proporciona mejores conjugados de polímeros solubles en agua, preferiblemente polietilenglicoles u óxidos de polietileno, con uricasas. Asimismo, la invención ofrece composiciones farmacéuticas de conjugados mejorados. Estos conjugados son sobre todo no inmunogénicos y retienen el 75 % como mínimo, preferentemente el 85 %, e idealmente el 95 % o más de la actividad uricolítica de la enzima no modificada. Las uricasas aconsejables para la conjugación con polímeros solubles en agua incluyen oxidasas de urato de origen natural aisladas de bacterias, hongos y tejidos de plantas o animales, tanto vertebrados como invertebrados, así como formas recombinantes de uricasa, incluyendo las variantes mutadas, híbridas y/o truncadas enzimáticamente activas. Entre los polímeros solubles en agua aconsejables para su uso en la presente descripción se encuentran los polietilenglicoles u óxidos de polietileno, mejor conocidos como PEG. Ejemplos de PEG ramificados son los sujetos a la patente estadounidense 5,643,575. Un ejemplo preferido de PEG lineales es el monometoxiPEG, de estructura general $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, en donde n varía aproximadamente desde 100 a 2.300.

Una uricasa de origen mamífero preferida es la uricasa recombinante PBC, compuesta por porciones de secuencias de hígado de cerdo e hígado de babuino, Wu, *et al.*, (1989), fueron los primeros en determinarlos. Un ejemplo de dicha uricasa quimérica contiene los primeros 225 aminoácidos derivados de la secuencia de uricasa porcina (SEQ ID NO:1) y los últimos 79 aminoácidos derivados de la secuencia de uricasa de babuino (SEQ ID NO:2) (uricasa de cerdo-babuino o uricasa PBC; véase la figura 6). Otro ejemplo de esto es que una uricasa contiene residuos 7-225 de secuencia porcina (SEQ ID NO. 1) y residuos 226-301 de la secuencia de babuino (SEQ ID NO. 2); lo que es equivalente a la uricasa PBC que se trunca en terminales de amino y carboxilo (PBC-NT-CT; véase figura 6). Otro ejemplo de esto es que la uricasa quimérica contiene los primeros 288 aminoácidos derivados de la secuencia porcina (SEQ ID NO. 1) y los últimos 16 aminoácidos derivados de la secuencia de babuino (SEQ ID NO.2). Debido a que la última secuencia difiere de la secuencia porcina en sólo dos posiciones, con una lisina (K) en lugar de arginina en el residuo 291 y una serina (S) en lugar de treonina en el residuo 301, se hace referencia a esta mutación como una uricasa porcina-K-S o PKS. Cada una de las uricasas PKS, PBC y PBC-NT-CT tienen un residuo de lisina más y, por ende, un sitio más potencial de PEGilación que la secuencia porcina o de babuino.

40 Se subclonaron las cADN para varias uricasas de mamíferos, incluyendo uricasa PBC, uricasa PKS y uricasa recombinante similar al babuino, y se determinaron las condiciones óptimas para expresión en *E. coli*, utilizando los métodos estándar. Véase Erlich, HA, (Ed.) (1989) *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press; Sambrook, J, *et al.*, (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Se extrajeron y purificaron las uricasas recombinantes, así como se evaluó su estabilidad y actividad utilizando una modificación de ensayos estándar. Véase Fridovich, I, (1965) *J Biol Chem* **240**:2491-2494; Nishimura, *et al.*, (1979), y Ejemplo 1.

50 En una realización de la invención, la uricasa puede conjugarse a través de un enlace biológicamente estable, no tóxico, covalente con una cantidad relativamente pequeña de cadenas de PEG. Tales enlaces pueden incluir enlaces de uretano (carbamato), enlaces secundarios de amina y enlaces de amida. Shearwater Polymers, Huntsville, AL comercializa varios PEG activados aconsejables para dicha conjugación.

Por ejemplo, los enlaces de uretano con la uricasa pueden formarse mediante la incubación de uricasa en presencia del carbonato de succinimidilo (SC) o 4-nitrofenil carbonato (NPC) derivados de PEG. El SC-PEG puede sintetizarse

utilizando el procedimiento descrito en la patente estadounidense 5,612,460, aquí incorporada a modo de referencia. NPC-PEG puede sintetizarse reaccionando el PEG con 4-nitrofenil cloroformato de acuerdo con los métodos descritos en Veronese, FM, *et al.*, (1985) *Appl Biochem Biotechnol* 11:141-152, y en la patente estadounidense 5,286,637, incorporada a la presente a modo de referencia. Los métodos descritos en la patente '637 están adaptados a los PEG de peso molecular más elevado al ajustar las concentraciones de los reactantes para mantener una estequiometría semejante. Se describe un método alternativo de síntesis de NPC-PEG en Büttner, W, *et al.*, East German Patent Specification DD 279 486 A1.

Los enlaces de amida con la uricasa pueden obtenerse utilizando un éster de *N*-hidroxisuccinimida de un derivado de ácido carboxílico de PG (Shearwater Polymers). Los enlaces secundarios de amina pueden formarse utilizando 2,2,2-trifluoetanesulfonyl PEG (PEG tresilo; *Shearwater Polymers*) o mediante la alquilación reductiva que utiliza PEG aldehído (Shearwater Polymers) y cianoborohidrido de sodio.

En conjugados que contienen PEG con pesos moleculares de entre 5 kDa y 30 kDa, la cantidad máxima de cadenas de PEG que fueron combinadas por subunidad, mientras que retiene por lo menos el 75 % de la actividad uricolítica de la enzima no modificada, tiene una gama entre un promedio de 2 cadenas para uricasa de soja a más de 10 cadenas para uricasa PBC (Véase condiciones de ensayo en el Ejemplo 1 y los resultados en las figuras 1A-5B). El último excedente de PEGilación corresponde a cerca de una tercera parte del total de grupos amino. En una realización de la invención, la cantidad promedio de cadenas de PEG combinadas por subunidad de uricasa se encuentra entre 2 y 10. En una realización preferida, la cantidad promedio de cadenas de PEG combinadas por subunidad de uricasa se encuentra entre 3 y 8. En una realización de mayor preferencia, la cantidad promedio de cadenas acopladas covalentemente de PEG por subunidad de uricasa se encuentra entre 4 y 6. En otra realización, el peso molecular de PEG utilizado para la reacción de combinación se localiza entre 5 kDa y 100 kDa, preferiblemente entre 10 kDa y 60 kDa, e idealmente entre 20 kDa y 40 kDa, *por ejemplo* 30 kDa.

Existen varios factores que pueden afectar la elección del peso molecular óptimo y la cantidad de cadenas de PEG para la combinación con una determinada forma de uricasa. En general, la reducción o eliminación de inmunogenia sin sufrir una pérdida sustancial de la actividad uricolítica pueden requerir la combinación de relativamente más cadenas de PEG de peso molecular inferior, en comparación con las relativamente pocas cadenas de PEG de peso molecular más elevado. *Por ejemplo*, ya sea 6 cadenas de PEG de 20 kDa por subunidad o 4 cadenas de PEG de 30 kDa por subunidad puede dar resultados óptimos. Asimismo, cada forma diferente de uricasa puede dar resultados óptimos diferentes en relación con el tamaño y la cantidad de cadenas. Véase figuras 1A-5B.

La conjugación de PEG convierte todas las uricasas solubles y estables en tampones para el pH fisiológico, sin la incorporación de un sustrato análogo o inhibidor, como en el caso de la 8-azaxantina que se utiliza como estabilizador en la uricasa fúngica (Uricozyme®) que vende Sanofi Winthrop en Francia e Italia. Dos diferentes conjugados de uricasa PBC, uno con aproximadamente 6 cadenas de PEG de 10 kDa por subunidad y el otro con aproximadamente 2 cadenas de PEG de 19 kDa por subunidad, retienen una actividad importante después de la incubación en el suero de ratón durante un periodo mayor de un mes a 37 °C. Además, varios de los conjugados de esta invención registraron una hemivida en circulación, en el caso de los ratones, mayor de dos días, en comparación con las medias vidas de 8 o 24 horas dadas a conocer para las uricasas modificadas-PEG de mamíferos y microbios. Chen, *et al.*, (1981); Fuertges, F, *et al.*, (1990) *J Contr Release* 11: 139-148; Fujita, T, *et al.*, (1991) *J Pharmacobiodyn* 14:623-629. Las medias vidas más duraderas de los medicamentos de proteínas inyectados las vuelven más efectivas en cuanto a costos y pueden mejorar la aceptación del paciente. La hemivida prolongada también es indicio de productos que son mejor tolerados por el cuerpo.

Cuando se prepararon los conjugados PEG de uricasa PBC de la forma tetramérica purificada de la enzima (cuatro subunidades de 35 kDa), pusieron en evidencia una inmunogenia profundamente reducida en ratones (figura 7), en comparación con la inmunogenia moderada de conjugados PEG en formas más grandes de la enzima (*por ejemplo*, octámeros de subunidad de 35 kDa; véase figura 12) y la inmunogenia muy elevada en la enzima no modificada. Los ratones carentes de uricasa inyectados en repetidas ocasiones con PEG-uricasa de la presente invención no presentaron hiperuricemia por más de dos meses y la estructura y función de sus riñones se vieron protegidos en contra de daños ocasionados por el ácido úrico (figuras 8-11).

Las inyecciones de conjugados totalmente activos de uricasa PBC con PEG de 10 kDa (figuras 3A-3B) redujeron significativamente la hiperuricemia de homocigotos, ratones carentes de uricasa (figura 8). Los niveles de ácido úrico en la orina también se vieron reducidos de manera significativa en todos los ratones carentes de uricasa tratados con uricasa modificado-PEG PBC. Los ratones carentes de uricasa recibieron una serie de inyecciones con un preparado de PEG-uricasa semejante a las que se utilizaron para obtener los datos de la figura 8. Este tratamiento redujo la gravedad de un defecto concentrante en la orina, según se probó por las medidas de la osmolalidad de orina en condiciones normales y después de un periodo de 12 horas de privación de agua (figura 9) y por su consumo de agua y producción de orina, en comparación con las medidas correspondientes en ratones genéticamente iguales no tratados. De igual

manera, se demostró que diez semanas de tratamiento, iniciando dentro de los primeros diez días de vida, en ratones *knockout* homocigóticos carentes de uricasa (*oux^{-/-}*) con una PEG-uricasa de esta invención disminuyó la gravedad del trastorno inducido por el urato de la arquitectura renal, según se apreció mediante microscopio de resonancia magnética (figura 11). Para obtener más información sobre los métodos de microscopio, véase Hedlund, LW, *et al.*, (1991) *Fund Appl Toxicol* 16:787-797; Johnson, GA, *et al.*, (1992) in JC Gore, (Ed.), *Reviews of Magnetic Resonance in Medicine*, Vol. 4 (pp. 187-219) New York: Pergamon Press.

Las preparaciones purificadas de uricasas de origen natural y recombinantes por lo general contienen una mezcla de agregados de enzimas, además de tener la forma tetramérica (140 kDa). El porcentaje de cada preparado de uricasa que presenta la forma tetramérica varía por lo general entre aproximadamente el 20 % y el 90 %. A pesar de la evidencia que los agregados no PEGilados de otras proteínas son altamente inmunogénicas (véase, por ejemplo, Moore, WV, *et al.*, (1980) *J Clin Endocrinol Metab* 51:691-697), estudios anteriores de PEG-uricasa no describen ninguno de los esfuerzos para limitar el contenido de los agregados, lo que sugiere que la inmunogenia potencial de los agregados modificados-PEG no se consideraron. Con base en las observaciones de los inventores de la presente invención, parece que tales agregados estuvieron presentes en las preparaciones de enzimas utilizadas para la síntesis previas de PEG-uricasa. Su presencia puede hacer más difícil la tarea de preparar conjugados no inmunogénicos. Asimismo, parece que las grandes pérdidas de la actividad uricolítica observada en los esfuerzos anteriores para uricasa PEGilada se relacionaron con una gran cantidad de cadenas de PEG de bajo peso molecular que fueron combinadas. Por otro lado, los métodos de purificación de uricasa y PEGilación descritos en el presente permiten la incorporación covalente de casi 10 cadenas de PEG por subunidad mientras que se retiene más del 75 % de la actividad uricolítica, al menos para ciertas uricasas, *por ejemplo*, la uricasa química de cerdo-babuino y la enzima derivada de *A. flavus* (véase figuras 3A y 4A)

En otra realización preferente, sustancialmente todos los agregados de la forma tetramérica de la enzima puede eliminarse mediante la cromatografía de intercambio de iones o exclusión por tamaño en un pH entre 9 y 10,5, preferiblemente 10,2, previa a la conjugación con PEG del preparado de uricasa resultante, sustancialmente tetramérico. El peso molecular de la uricasa en cada fracción derivada de la columna de preparación puede supervisarse mediante cualquier técnica de análisis del tamaño, incluyendo, *por ejemplo*, HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño convencional, centrifugación, dispersión de la luz, electroforesis capilar o de gel en un tampón no desnaturizante. En el caso de la uricasa tetramérica aislada mediante la cromatografía de exclusión por tamaño, las fracciones que contienen sólo la forma de 140 kDa de la enzima pueden reunirse y utilizarse en la conjugación con PEG. En el caso de la uricasa tetramérica aislada mediante la cromatografía de intercambio de iones, las fracciones de la columna de intercambio de iones pueden analizarse en relación con el tamaño para determinar cuáles fracciones contienen cantidades importantes de la forma tetramérica sin agregados detectables. De la uricasa así reunida, por lo menos el 90 % puede tener la forma tetramérica; los agregados no aconsejables pueden de este modo representar aproximadamente el 10 %, 5 %, 2 % o menos del total de uricasa aislada.

Los resultados presentados aquí indican que las formas, aún cuando sean ampliamente PEGiladas, de uricasa PBC más grandes que el tetrámero son altamente inmunogénicas en los ratones (figura 12). Además, en ratones que recibieron una inyección de conjugados PEG de agregados de uricasa, la actividad uricolítica en inyecciones subsecuentes de tetrámeros PEGilado o agregados PEGilados se eliminó con rapidez de la circulación. Por el contrario, los conjugados preparados y derivados de uricasa que contenía menos del 5 % de agregados pudieron administrarse varias veces sin acelerar sus tasas de eliminación (figura 7) y sin la formación detectable de anticuerpos, según las mediciones arrojadas por un inmunoensayo sensible de enzimas acopladas. Además, el uso de uricasa tetramérica altamente purificada distingue los conjugados mejorados de la presente invención de las preparaciones de PEG-uricasa descritas con anterioridad. Por el contrario, la presencia de una proporción significativa (*por ejemplo* >10%) de agregados en las preparaciones de uricasa utilizadas por algunos otros investigadores pudo haberlo llevado a combinar grandes cantidades de cadenas de PEG a fin de suprimir la inmunogenia. En consecuencia, se redujo notablemente la actividad enzimática de los conjugados resultantes. En otras realizaciones, la presente descripción de manera expresa contempla la uricasa PEGilada de forma no tetramérica, como los dímeros de uricasa, en tanto que las preparaciones de dicha uricasa conjugada retienen por lo menos cerca del 75 % de su actividad uricolítica y son en esencia no inmunogénica.

En otra realización de la presente descripción, se abastece de una uricasa mutada de hígado de babuino de potencia inesperadamente aumentada, respecto a aquella de la enzima no modificada. Esta uricasa mejorada primaria se preparó utilizando las técnicas convencionales de ADN recombinantes. En particular no se esperaba que la sustitución de un residuo de aminoácido (tirosina por histidina en la posición 97) en la uricasa de babuino diera como resultado un aumento sustancial en la actividad específica enzimática. Cuando se expresó en *E. coli*, esta proteína mutada se encontró que tenía por lo menos 60 % más de actividad específica que la enzima recombinante de babuino de la cual se derivó.

En otra realización, la actividad específica se incrementó y/o la solubilidad la enzima no PEGilada se mejoró al expresar variantes truncadas de uricasas porcinas o de cerdo-babuino químicas de las cuales por lo menos los primeros seis

aminoácidos de los terminales de amino y/o por lo menos los últimos tres aminoácidos en el terminal carboxilo se eliminaron de las proteínas expresadas (véase figura 6). Las uricasas recombinantes con la truncación carboxilo-terminal pudo mejorar la solubilidad previa a la PEGilación debido a la eliminación de la secuencia del objetivo peroxisomal. Véase Miura, S, *et al.*, (1994) *Eur J Biochem* **223**:141-146.

5 Los conjugados de PEG-uricasa de la presente invención son de utilidad para reducir los niveles de ácido úrico en los fluidos y tejidos corporales de los mamíferos, preferentemente en seres humanos, y por lo tanto pueden ocuparse en el tratamiento de elevados niveles de ácido úrico relacionados con las condiciones que incluyen gota, tofos, insuficiencia renal, trasplante de órganos y enfermedades malignas. Los conjugados de PEG-uricasa pueden inyectarse a un mamífero con niveles elevados de ácido úrico por vía intravenosa, subcutánea, intradermal, intramuscular o intraperitoneal entre otras. Alternativamente, pueden ser convertido a un aerosol e inhaló. Véase Patton, JS, (1996) *Adv Drug Delivery Rev* **19**:3-36 y patente estadounidense 5,458,135. La dosis efectiva de PEG-uricasa de la presente invención dependerá del nivel de ácido úrico, así como del tamaño del individuo. En una realización de esta descripción, la PEG-uricasa se administra en un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad que va de casi 10 µg a 1 g. En una realización preferida, la cantidad administrada se encuentra entre 100 µg y 500 mg. Es aún más preferible que la cantidad administrada de uricasa sea entre 1 mg y 100 mg, *por ejemplo* 5 mg, 20 mg o 50 mg. Las masas determinadas para las cantidades de las dosis respecto a las realizaciones se refieren a la cantidad de la proteína contenida en el conjugado.

20 Las fórmulas farmacéuticas que contengan PEG-uricasa pueden prepararse utilizando técnicas convencionales, *por ejemplo*, como se describe en Gennaro, AR (Ed.) (1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Easton, PA: Mack Publishing Co. Entre los excipientes recomendados para la preparación de soluciones inyectables se encuentran: tampón salino de fosfato, solución lactada de Ringer, agua, polioles y glicerol. Las composiciones farmacéuticas para inyección parenteral contienen líquidos farmacéuticamente aceptables estériles acuosos o no acuosos, dispersiones, suspensiones o emulsiones así como polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones estériles inyectables justo antes de usarse. Estas formulaciones pueden contener componentes adicionales, como preservativos, solubilizadores, agentes humectantes, emulsificadores, tampones, antioxidantes y diluyentes.

30 Asimismo, la PEG-uricasa puede suministrarse como composiciones de liberación controlada para implantación en un individuo con el fin de controlar de manera constante los elevados niveles de ácido úrico en los fluidos corporales. *Por ejemplo*, el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, colágeno regenerado, poli-L-lisina, alginato de sodio, goma gelana, quitosana, agarosa, liposomas multilamelar y muchas otras formulaciones convencionales de depósito comprenden materiales bioerodible o biodegradable que pueden formularse con composiciones biológicamente activas. Estos materiales, ya sean implantados o inyectados, de manera progresiva se rompen y liberan el material activo en el tejido circundante. *Por ejemplo*, un método para encapsular la PEG-uricasa comprende el método descrito en la patente estadounidense 5,653,974. El uso de formulaciones bioerodible, biodegradables o de otro depósito se consideran de manera expresa en la presente descripción. Dentro del alcance de la presente descripción también radica el uso de bombas de infusión y sistemas matriciales de trampas para la liberación de PEG-uricasa. La PEG-uricasa también puede contenerse en micelas o liposomas. En el ámbito es muy conocida la tecnología para encapsular liposomas. Véase, *por ejemplo*, Lasic, D, *et al.*, (Eds.) (1995) *Stealth Liposomes*. Boca Raton, FL: CRC Press.

40 Las composiciones farmacéuticas de PEG-uricasa de la invención reducirán la necesidad de hemodiálisis en pacientes con alto riesgo de insuficiencia renal inducida por el urato, *por ejemplo*, en receptores de un trasplante de órgano (Venkateshan, VS, *et al.*, (1990) *Nephron* **56**:317-321) y los pacientes con ciertas enfermedades malignas. En pacientes con grandes acumulaciones de urato cristalino (tofos), tales composiciones farmacéuticas mejorarán la calidad de vida con mayor rapidez que los tratamientos con los que actualmente se cuentan.

45 Los siguientes ejemplos muestran los diversos aspectos que ya se mencionaron. Estos ejemplos describen las PEG-uricasas preparadas mediante la combinación de derivados de PEG activados (es decir, electrofílicos) de varios tamaños y composiciones con uricasas porcinas, fúngica o bacteriana de origen natural o con uricasa recombinante de soja, porcina o quimérica de cerdo-babuino. Se incluyen los resultados de la actividad, la solubilidad, la estabilidad, la farmacocinética, la farmacodinámica y los estudios inmunológicos. Los datos de las figuras 8-11 dan pruebas de la capacidad de la uricasa modificada-PEG PBC de esta invención para corregir la hiperuricemia y la hiperuricosuria, así como para conservar la estructura y función renal en un modelo animal que presenta hiperuricemia e hiperuricosuria, las cuales causan serios daños en el riñón (Wu, X, *et al.*, (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:742-746). Estos ejemplos ofrecen una guía para los expertos en la materia en lo que se refiere a la producción de conjugados no inmunogénicos de uricasa que retiene por lo menos casi el 75 % de la actividad uricolítica de la enzima no modificada.

Ejemplo 1

La purificación de la forma tetramérica de uricasa

La forma tetramérica de uricasa (peso molecular ca. 140 kDa) se purificó de una solución de uricasa de hígado porcino mediante una cromatografía preparativa de exclusión por tamaño o intercambio de iones, seguida por una cromatografía analítica de exclusión por tamaño. La uricasa de hígado porcino se obtuvo del Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, catálogo n.º U2350 o U3377; o Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.

Las cromatografías preparativa y analítica de exclusión por tamaño se realizaron con un pH de 10-10,5, preferiblemente 10,2, en un tampón de carbonato de sodio de 10 mM que contiene NaCl 0.1 M, en columnas Superdex 200 que fueron previamente calibradas con proteínas de peso molecular conocido. Se obtuvo Superdex de Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ. Puede utilizarse cualquier tampón que tenga la capacidad de mantener el pH deseado y que sea compatible con la química que va utilizarse para la copulación PEG. Tales tampones son muy conocidos en el ámbito. La absorbancia ultravioleta del eluato derivado de la columna de preparación se supervisó a 280 nm, en tanto que las porciones con eluato de uricasa que corresponden al peso molecular de la forma tetramérica deseada, pero libre de especies de peso molecular elevado, se recolectaron para utilizarse en la PEG-uricasa no inmunogénica como se describe en el ejemplo 2. Opcionalmente, las formas tetraméricas de uricasa pueden aislarse utilizando otro medio de exclusión por tamaño como Superose 12 (Amersham Pharmacia) o cualquier otro medio que sea compatible con soluciones ligeramente alcalinas y que tenga un intervalo adecuado de fraccionación por tamaño. Dichos medios se consiguen sin problemas, además son muy conocidos en el ámbito.

La cromatografía de intercambio de iones se llevó a cabo con un pH de 10-10,5, preferiblemente 10,2, en las columnas Mono Q (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) que se equilibró con tampón de carbonato de sodio de 0,1 M. Es posible utilizar cualquier tampón que sea compatible con la química de acoplamiento de PEG y cuente con la capacidad de mantener el pH deseado, en la concentración de iones suficientemente baja para permitir la absorción de uricasa a la columna. Tales tampones son muy conocidos en el ámbito. La absorbancia ultravioleta del eluato se controló en 280 nm durante la elución de la uricasa derivada de la resina de intercambio de iones al aumentar la concentración de iones de la solución tampón aplicada, *por ejemplo* por un gradiente lineal de 0 a 0,5 M NaCl en el tampón de carbonato de sodio. Luego, se utilizó la HPLC de exclusión por tamaño a fin de identificar las fracciones del eluato que contenga la forma tetramérica deseada de uricasa, sin los agregados detectables, para la síntesis de PEG-uricasa sustancialmente no inmunogénica. De manera opcional, la forma tetramérica de uricasa puede aislarse utilizando otro medio de intercambio de iones, como Q-Sepharose (Amersham Pharmacia) o cualquier otro medio que sea compatible con soluciones ligeramente alcalinas. Dichos medios se consiguen sin problemas, además son muy conocidos en el ámbito.

La actividad de uricasa se ensayó utilizando una modificación de los métodos estándar. Véase, *por ejemplo*, Fridovich (1965); Nishimura, *et al.*, (1979). Las soluciones de ácido úrico se prepararon todos los días en un tampón de borato de sodio de 50 mM, pH 9,2, para dar concentraciones finales en el ensayo de 6-10 µM. Las preparaciones de uricasa se diluyeron en este tampón de borato que contenía albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, catálogo n.º A-7030), de modo que la concentración final de albúmina en el ensayo fue de 0.1 mgr/mL. Después de mezclar varias diluciones de la enzima con el sustrato en una placa de microtitulación para un lector de microplacas, la tasa de eliminación de ácido úrico en 25 °C se supervisó en 292 nm cada cuatro segundos durante 3 minutos. De las muestras en las que entre el 10 % y el 40 % del sustrato se consumió en un periodo de tres minutos, por lo menos 20 puntos de datos se utilizaron para calcular la tasa máxima de reducción en la absorción por minuto. Una unidad internacional (IU, *international unit*) de actividad de uricasa se definió respecto a la cantidad de enzima que consume un micromol de ácido úrico por minuto; las actividades específicas se expresan como proteína IU/mg. Algunos de los datos en relación con las actividades de uricasa relativas de las figuras 1A-5B se obtuvieron utilizando ácido úrico de 100 µM en el ensayo. Otros resultados en relación con la velocidad en el ácido úrico de 100 µM (V_{100}) se calcularon a partir de los valores de la constante de Michaelis (K_M) y la velocidad máxima ($V_{máx}$) para las respectivas preparaciones de enzima, utilizando la fórmula:

$$V_{100} = 100 \times V_{máx} / (K_M + 100)$$

Donde K_M se expresa en micromol.

Ejemplo 2

Copulación de PEG para uricasa tetramérica porcina

Para una solución de uricasa tetramérica en un tampón de carbonato de sodio de 0,1 M, pH 10,2, 10-200 moles de un derivado activado de monometoxiPEG, *por ejemplo*, el carbonato de 4-nitrofenil (NPC-PEG), de varios tamaños (5 kDa a 30 kDa) se agregaron por cada mol de subunidad de uricasa (peso molecular 35 kDa). Estos y otros PEG activados recomendados se pueden obtener en Shearwater Polymers. Las instrucciones para acoplar estos PEG con las proteínas

se incluyen en el catálogo de Shearwater Polymer que puede encontrarse en su sitio de Internet, www.swpolymers.com, y en JM Harris, *et al.*, (Eds.) (1997) *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series 680*, Washington, DC: American Chemical Society. La reacción de acoplamiento se permitió a fin de proceder en 0-8 °C hasta que el acoplamiento de PEG no cambiase de manera significativa con el tiempo. Luego, el PEG no reaccionado se eliminó del producto de la reacción mediante cromatografía y/o ultrafiltración.

El número de cadenas de PEG acoplado por subunidad de uricasa se determinó gracias a una adaptación de métodos descritos Kunitani, M, *et al.*, (1991) *J Chromatogr* **588**:125-137; Saifer, *et al.*, (1997) y Sherman, *et al.*, (1997). En resumen, las alícuotas de las mezclas o fracciones de la reacción de la PEGilación derivada de las columnas de preparación de intercambio de iones o exclusión por tamaño se caracterizaron por la HPLC de análisis de exclusión por tamaño en una columna TSK 5,000 PW_{XL} a temperatura ambiente en un tampón de carbonato de sodio de 10 mM, pH 10,2, que contenía NaCl 0,1 M. La columna de la HPLC se obtuvo de TosoHaas (Montgomeryville, PA). Las proteínas y PEG se controlaron mediante absorbencia ultravioleta y detectores de índice refractivo. El volumen proteico de los conjugados se calculó a partir de la absorbencia ultravioleta en comparación con la del estándar adecuado de uricasa no modificada. La cantidad de PEG del conjugado se calculó a partir del área del punto máximo del índice de refracción, corregido para la contribución de la proteína para el índice de refracción, en relación con el área del punto máximo del índice de refracción del estándar adecuado de PEG.

La figura 2A muestra la retención de la actividad mediante la uricasa PEGilada de hígado porcino como una función de la cantidad de cadenas de PEG acopladas por subunidad. Los datos de los autores de la presente invención (▲, □) se comparan con los de Chen, *et al.*, (1981). El punto de datos dentro de un círculo grande denota un conjugado que Chen, *et al.*, (1981) describió como no inmunorreactivo. Como se muestra en la figura 2A, los conjugados de la uricasa tetramérica porcino con hasta 6 cadenas de PEG de 30 kDa por subunidad o hasta 7 cadenas de PEG de 5 kDa por subunidad retuvieron por lo menos el 75 % de la actividad de la enzima no modificada. El aparente aumento de la actividad específica con una cantidad creciente de cadenas de PEG de 5 kDa o 30 kDa (hasta casi 4 cadenas por subunidad) puede reflejar la insolubilidad o inestabilidad relativa de la enzima no modificada en comparación con los conjugados. Tal y como se muestra en la figura 2B, los conjugados de uricasa porcina con un promedio de más de 3 cadenas de PEG 30 kDa por subunidad contienen una masa mayor de PEG que la que Chen, *et al.*, (1981) consideró suficiente para descartar la inmunorreactividad.

Ejemplo 3

Propiedades de los conjugados PEG de PBC-uricasa recombinante tetramérica

La uricasa recombinante quimérica de cerdo-babuino (PBC) cADN se subclonó en el vector de expresión pET3d (Novagen, Madison, WI) y el constructo resultante de plásmido se transformó y expresó en una copia de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen). Estos procedimientos se realizaron utilizando métodos muy conocidos en el ámbito de la biología molecular. Véase Erlich (1989); Sambrook, *et al.*, (1989); Ausubel, F, *et al.*, (Eds.), (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.

La figura 6 muestra la secuencia deducida de aminoácidos de uricasa PBC (aminoácidos 1-225 de SEQ ID NO:1) y aminoácidos 226-304 de SEQ ID NO:2), en comparación con las secuencias porcina (SEQ ID NO:1) y de babuino (SEQ ID NO: 2). Los residuos en la secuencia que difieren de aquellos en la secuencia porcina se destacan en negrita. Wu, *et al.*, (1989) determinaron por primera vez las secuencias porcina y de babuino, algo que ha sido confirmado por los autores de la presente invención. La SEQ ID NO. 1 es idéntica a la Adhesión n.º p16164 de GenBank, salvo por la ausencia del residuo inicial de metionilo en la secuencia. La SEQ ID NO. 2 es idéntica a la Adhesión n.º p25689 de GenBank, salvo por la ausencia del residuo inicial de metionilo y un cambio de treonina a histidina en el residuo 153 en la secuencia GenBank (residuo 154 de la figura 6)

La forma tetramérica de la uricasa PBC se separó y acopló a PEG de distintos pesos moleculares tal y como se señala en los ejemplos 1 y 2. Los conjugados preparados con PEG de 5 kDa, 10 kDa o 30 kDa contenían hasta 10 cadenas de PEG por subunidad. Los preparados con PEG de por lo menos 10 kDa retuvieron más del 95 % de la actividad específica inicial de la uricasa recombinante (figuras 3A-3B).

Las siguientes propiedades de un conjugado de uricasa PBC tetramérica con aproximadamente 6 cadenas de PEG de 10 kDa por subunidad se indicaron en las figuras señaladas: la falta de inmunogenia (figura 7) y la eficacia en los ratones carentes de uricasa para 1) corregir hiperuricemia e hiperuricosuria (figuras 8); 2) reducir la gravedad de un defecto concentrante en la orina (figura 9); y 3) disminuir la gravedad de la diabetes insípida nefrogénica. Además, esta PEG-uricasa disminuye la gravedad de los daños en el riñón ocasionados por el ácido úrico, como se observó mediante el microscopio de resonancia magnética (figura 11).

La figura 7 muestra la actividad de la uricasa PBC en suero de ratón 24 horas después de cada una de las cuatro o cinco inyecciones intraperitoneales de PEG-uricasa en relación con el valor 24 horas después de la primera inyección. Los

conjugados PEG se elaboraron a partir de tres diferentes preparaciones de uricasa PBC utilizando dos diferentes técnicas para la activación de PEG. Se probó un preparado (●) en ratones carentes de uricasa (*uox*^{-/-}); las otras dos (Δ, ■) se probaron en ratones normales BALB/C. El preparado más inmunoreactivo (Δ) se elaboró a partir de la uricasa PBC purificada que contenía una cantidad desconocida de agregados de uricasa acoplados a un promedio de 7 cadenas de PEG de 5 kDa por subunidad, utilizando el derivado de carbonato de succinimidilo de PEG (SC-PEG). Zalipsky, patente estadounidense 5,612,460, que se incorpora a la presente por referencia. El preparado moderadamente inmunorreactivo (■) se preparó mediante el acoplamiento de un preparado de uricasa PBC que contenía 11 % de agregados a un promedio de 2 cadenas de PEG de 19 kDa por subunidad, utilizando un derivado de carbonato de 4-nitrofenilo de PEG (NPC-PEG). Sherman, *et al.*, (1997). El conjugado menos inmunorreactivo (●) se preparó mediante el acoplamiento de un promedio de 6 cadenas de NPC-PEG de 10 kDa por subunidad para un preparado de uricasa PBC que contenía <5 % de agregados de uricasa.

La figura 8 muestra la relación inversa entre las concentraciones de ácido úrico en el suero y orina, así como la actividad de PEG-uricasa inyectada en el suero de un ratón carente de uricasa (*uox*^{-/-}). Las inyecciones en tiempo cero y después de 72 horas contenían 0,43 IU de uricasa PBC conjugada con un promedio de 6 cadenas de PEG de 10 kDa por subunidad de enzima.

La figura 9 muestra que el tratamiento de ratones carentes de uricasa con uricasa modificada-PEG PBC disminuyó la gravedad de un defecto concentrante en la orina. El promedio y la desviación estándar de los datos en relación con la osmolalidad de orina se muestran en dos ratones que tenían una copia del gen normal de uricasa murino (*uox*^{+/-}), seis ratones no tratados homocigotos carentes de uricasa (*uox*^{-/-}) y seis ratones homocigotos carentes de uricasa que recibieron 10 inyecciones entre el tercer y 72^o día de vida con 95 o 190 mIU de PEG-uricasa. Los ratones de cada uno de los grupos genéticos recibieron agua *ad libitum* (*barras sólidas*) o se les privó de agua por un periodo de 12 horas (*barras urdidas*) antes de la recolección de su orina.

La figura 10 muestra que el tratamiento de los ratones carentes de uricasa con uricasa modificada-PEG PBC redujo la gravedad de diabetes insípida nefrogénica, que se caracteriza por un consumo inusualmente elevado de agua y salida de orina inusualmente elevada. Los antecedentes genéticos de los ratones y el protocolo del tratamiento fueron los mismos que en la figura 9. Se muestran el promedio y la desviación estándar del consumo de agua diario (*barras sólidas*) y la salida de orina (*barras urdidas*) para tres grupos de seis ratones.

La figura 11 muestra que el tratamiento de ratones carentes de uricasa con uricasa modificada-PEG PBC disminuyó la gravedad de la nefropatía inducida por el ácido úrico, como se apreció a través del microscopio de resonancia magnética. Los antecedentes genéticos de los tres grupos de ratones y el protocolo de tratamiento fueron los mismos que se utilizaron en las figuras 9 y 10. El estudio con microscopio de resonancia magnética se realizó en el Center for in vivo Microscopy, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina.

Además de los resultados resumidos en la figuras 8-11, se demostró que los niveles de ácido úrico en la orina de todos los ratones carentes de uricasa disminuyeron de forma dramática después del tratamiento con uricasa modificada-PEG PBC. Por último, la figura 12 muestra que, a diferencia de la forma tetramérica modificada-PEG de uricasa PBC, la forma octamérica (peso molecular = 280 kDa), aún si es ampliamente PEGilada, es inmunogénica en los ratones. Esta propiedad se refleja en la eliminación acelerada del octámero modificado-PEG durante un periodo de 5 días tras una sola inyección intraperitoneal. Los mismos ratones recibieron otra inyección con la misma dosis de las mismas preparaciones de PEG-uricasa en los días 8 y 15. Veinte cuatro horas después de la segunda y tercera inyección, la actividad uricolítica no fue detectable en los sueros de ratones inyectados con el octámero PEGilado, pero fue más fácil de detectar en los sueros de los ratones inyectados con el tetrámero PEGilado. Estos hallazgos, en combinación con la eliminación acelerada del octámero PEGilado que se observó después de la primera inyección (figura 12), apoyan la utilidad de eliminar todas las formas de uricasa mayores del tetrámero antes de la PEGilación de la enzima.

Ejemplo 4

Conjugación PEG de la uricasa derivada de *Candida utilis*

La uricasa derivada de *Candida utilis* se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; catálogo n.º U1878) o Worthington Biochemical Corporation (Freehold, NJ; catálogo n.º URYW). Procediendo según lo descrito en los ejemplos 1 y 2, la forma tetramérica se aisló y los conjugados PEG se sintetizaron con PEG 5 kDa, 10 kDa o 30 kDa (figuras 1A-1B). La figura 1A muestra la retención de actividad gracias a la uricasa PEGilada derivada de *Candida utilis* como una función del número de cadenas de PEG acopladas por subunidad. Los datos de los autores de la presente invención (▲, ●, □) se compararon con los de Nishimura, *et al.*, (1979); Nishimura, *et al.*, (1981); Chen, *et al.*, (1981); Davis, *et al.*, (1981); Tsuji, *et al.*, (1985); Yasuda, *et al.*, (1990) y Fujita, *et al.*, (1991). Los datos ilustrados por los círculos grandes denotan conjugados que Nishimura, *et al.*, (1979 o 1981) informaron como no antigénicos o que Chen, *et al.*, (1981) reportó como no inmunoreactivos.

La figura 1B muestra la retención de la actividad mediante la uricasa PEGilada derivada de *Candida utilis* como una función de la masa total de PEG acoplada por subunidad. Los datos de los autores de la presente invención (▲, ●, □) se comparan con los que aparecen en los informes de la figura 1A. Los datos ilustrados por los círculos grandes tienen el mismo significado que en la figura 1A.

5 Como aparece en la figura 1A y 1B, los conjugados con un promedio de hasta 6 cadenas de PEG de 5 kDa o 30 kDa, o 9 cadenas de PEG de 10 kDa por subunidad retuvieron por lo menos el 75 % de la actividad de la enzima no modificada. El aparente aumento en la actividad específica cuando se incorpora un número creciente de cadenas de PEG de 30 kDa se incorpora (hasta 5 o 6 cadenas por subunidad) puede reflejar la relativa insolubilidad o inestabilidad de la enzima no modificada en comparación con los conjugados.

10 **Ejemplo 5**

Conjugación PEG de uricasa derivada de *Aspergillus flavus*

La uricasa derivada de *Aspergillus flavus* se obtuvo de Sanofi Winthrop (Gentilly Cédex, France). Procediendo según lo descrito en el ejemplo 2, los conjugados con PEGs de varios pesos moleculares fueron sintetizados (figuras 4A-4B). Los conjugados elaborados mediante el acoplamiento de enzima derivada de *A. flavus* con un promedio de hasta 12 cadenas de PEG de 5 kDa o hasta 7 cadenas de PEG de 30 kDa por subunidad retuvieron por lo menos el 75 % de la actividad específica inicial de la uricasa fúngica.

Ejemplo 6

Conjugación PEG de uricasa derivada de soja

20 La uricasa recombinante derivada del nódulo de la raíz de la soja (también conocido como nodulin 35) se preparó y purificó según el procedimiento de Kahn y Tipton (Kahn, K, *et al.*, (1997) *Biochemistry* 36:4731-4738) y el Dr. Tipton (University of Missouri, Columbia, MO) lo abasteció. Procediendo según lo descrito en los ejemplos 1 y 2, la forma tetramérica se aisló y los conjugados se prepararon con PEG de diversos pesos moleculares (figuras 5A-5B). A diferencia de la uricasa derivada de *Candida utilis* (figura 1A), la uricasa porcina (figura 2A), la uricasa química de cerdo-babuino (figura 3A) y la uricasa derivada de *Aspergillus flavus* (figura 4A), la enzima de soja toleró el acoplamiento de sólo aproximadamente 2 cadenas de PEG de 5 kDa o 30 kDa por subunidad con retención del 75 %, como mínimo, de la actividad inicial uricolítica.

Ejemplo 7

Conjugación PEG de uricasa derivada de *Anthrobacter globiformis*

30 La uricasa derivada de *Anthrobacter globiformis* se obtuvo de Sigma-Aldrich (catálogo n.º U7128). Véase patente japonesa 9-154581. Procediendo según lo descrito en los ejemplos 1 y 2, se aisló la forma tetramérica y se prepararon los conjugados con PEG de 5 kDa y 30 kDa. Si bien los conjugados con un promedio de más de 3 cadenas de PEG de 5 kDa por subunidad retuvieron menos del 60 % de la actividad específica inicial, los conjugados con un promedio de aproximadamente 2 cadenas de PEG de 30 kDa por subunidad retuvieron por lo menos el 85 % de la actividad específica inicial.

35 **Ejemplo 8**

Conjugación PEG de uricasas porcina y PBC truncadas por el terminal de amino

40 Las uricasas porcinas y PBC recombinantes derivadas de las cuales se eliminaron los primeros seis aminoácidos en el terminal de amino se expresaron en *E. Coli* y se purificaron en el mismo por medio de las técnicas estándar, según se ha descrito en el ejemplo 3. Procediendo tal y como se describe en los ejemplos 1 y 2, los conjugados PEG de uricasas truncadas en amino se sintetizan para producir conjugados sustancialmente no inmunogénicos que retengan por lo menos el 75 % de la actividad específica inicial.

Ejemplo 9

Conjugación PEG de uricasas porcina y PBC truncadas en el terminal de carboxilo o en terminales de amino y carboxilo

45 Las uricasas porcina y PBC recombinante derivadas de las cuales se eliminaron los últimos tres aminoácidos en el terminal de carboxilo se expresaron en *E. coli* y purificaron en el mismo por medio de las técnicas estándar, tal y como se ha descrito en el ejemplo 3. La eliminación del terminal de carboxilo puede aumentar la solubilidad de las enzimas no modificadas, ya que elimina la señal del objetivo peroxisomal. Véase Miura, *et al.*, (1994). Procediendo tal y como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, los conjugados PEG de uricasas truncadas en carboxilos se sintetizan para producir

5 conjugados sustancialmente no inmunogénicos que retengan por lo menos el 75 % de la actividad específica inicial. En la figura 6 se describe la secuencia de uricasa PBC recombinante truncada por seis residuos en el terminal de amino y tres residuos en el terminal de carboxilo (PBC-NT-CT). Esta uricasa fue expresada, purificada y PEGilada como se describe en los ejemplos 1, 2 y 3 para producir conjugados sustancialmente no inmunogénicos que retengan por lo menos el 75 % de la actividad específica inicial.

Ejemplo 10

Conjugación PEG de mutantes de uricasa porcina que contienen un mayor número de puntos de fijación de PEG

10 Las uricasas porcinas recombinantes se prepararon de acuerdo con el ejemplo 3, en las cuales el número potencial de puntos de fijación de PEG se aumentó al reemplazar uno o más residuos de arginina con lisina. Véase Hershfield, MS, *et al.*, (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:7185-7189. En la figura 6 se muestra la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de un mutante (uricasa PKS), en el que la arginina en el residuo 291 se sustituye por lisina y la treonina en el residuo 301, por serina. Procediendo tal y como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, se conjugó el PEG con esta uricasa para producir conjugados sustancialmente no inmunogénicos que retengan por lo menos el 75 % de la actividad específica inicial de la uricasa recombinante.

15 Ejemplo 11

Conjugación PEG de un mutante de uricasa de babuino recombinante

20 Mediante el uso de métodos estándar de biología molecular, como en el ejemplo 3, la uricasa de babuino recombinante se construye teniendo una sustitución de aminoácido (histidina por tirosina) en la posición 97 (véase secuencia de babuino en la figura 6). Procediendo tal y como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, los conjugados PEG de forma tetramérica del mutante de uricasa de babuino recombinante se sintetizan para producir conjugados de inmunogenia sustancialmente reducida que retienen por lo menos el 75 % de la actividad específica inicial de la uricasa recombinante.

Ejemplo 12

Inmunogenicidad de conjugados PEG derivados de *Candida utilis*, *Aspergillus flavus* y *Arthrobacter globiformis*

25 Las uricasas de *Candida utilis*, *Aspergillus flavus* y *Arthrobacter globiformis* se obtuvieron como se describió en los ejemplos 4, 5 y 7, respectivamente. Procediendo tal y como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, los conjugados PEG se sintetizan con PEG de 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa o 30 kDa. La inmunogenia de estos conjugados se reduce significativamente o se elimina.

Se describen a continuación realizaciones preferidas de la presente descripción y se designan como realización E1 a realización E8.

30 E1. Un conjugado que comprende uricasa conjugada a PEG, donde el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 Daltons, y donde la uricasa retiene al menos aproximadamente 75% de la actividad uricolítica de la uricasa no conjugada, y donde la inmunogenicidad de la uricasa se reduce sustancialmente.

E2. El conjugado de E1, donde dicho PEG es poli(etilenglicol).

35 E3. El conjugado de E2, donde dicho poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20.000 Daltons.

E4. El conjugado de E2, donde dicho poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 Daltons.

40 E5. El conjugado de E2, donde dicho poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30.000 Daltons.

E6. El conjugado de E1, donde la uricasa es tetramérica.

E7. Una composición farmacéutica para disminuir los niveles de ácido úrico en un fluido corporal o tejido, que comprende el conjugado de E1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 E8. Un método para aislar una forma tetramérica de uricasa de una disolución de uricasa, comprendiendo dicha disolución uricasa tetramérica y agregados de uricasa, comprendiendo las etapas de:

aplicar dicha disolución a al menos una columna de separación a un pH entre aproximadamente 9,0 y 10,5; y

recuperar de dicha columna una o más fracciones que contienen uricasa tetramérica aislada, donde dicha uno o más fracciones están sustancialmente exentas de agregados de uricasa.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> WILLIAMS, L. DAVID
HERSHFIELD, MICHAEL S.
KELLY, SUSAN J.
5 SAIFER, MARK G. P.
SHERMAN, MERRY R.
- <120> CONJUGADOS DE PEG-OXIDASA DE URATO Y SU USO
- <130> MVIEW.001VPC
- <140>
- 10 <141>
- <150> 09/130,392
- <151> 1998 08-06
- <160> 2
- <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- 15 <210> 1
- <211> 304
- <212> PRT
- <213> Sus scrofa
- <400> 1

```

Met Ala His Tyr Arg Asn Asp Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe
 1      5      10
Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln
 20      25      30
Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
 35      40      45
Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
 50      55      60
Val Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys
 65      70      75      80
Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu
 85      90      95
His Phe Leu Ser Ser Phe Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
 100     105     110
Glu Glu Val Pro Trp Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
 115     120     125
His Ala Phe Ile Tyr Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu
 130     135     140
Gln Ile Arg Asn 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
Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln
 180     185     190
Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu
 195     200     205
Ala Thr Trp Asp Thr Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly
 210     215     220
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

Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Leu Asn Ile Asp Met Ser Lys
 260     265     270
Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro
 275     280     285
Tyr Gly Arg Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Thr Ser Arg Leu
 290     295     300

```

- <210> 2
- <211> 304
- <212> PRT
- 5 <213> Papio hamadryas
- <400> 2

Met Ala Asp Tyr His Asn Asn Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Leu Glu Phe
 1 5 10 15
 Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile Gln
 20 25 30
 Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
 35 40 45
 Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
 50 55 60
 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
 Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
 100 105 110
 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 Cys Glu Val Glu
 130 135 140
 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
 Gln Phe Thr Thr Lys Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln
 180 185 190
 Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Glu
 195 200 205
 Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu Glu Lys Phe Ala Gly
 210 215 220
 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 Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met
 245 250 255
 Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys
 260 265 270
 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

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende una uricasa purificada conjugada a poli(etilenglicol) (PEG), donde al menos 90% de dicha uricasa está en una forma tetramérica y donde dicho PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 60.000 Daltons.
- 5 2. El conjugado de la reivindicación 1, donde dicho PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30.000 Daltons.
3. El conjugado de la reivindicación 1, donde dicho PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20.000 Daltons.
- 10 4. El conjugado de la reivindicación 1, donde dicho PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 Daltons.
5. El conjugado de la reivindicación 1, donde un promedio de 2 a 10 cadenas de PEG están enlazadas covalentemente a cada subunidad de dicha uricasa.
6. Una composición farmacéutica adecuada para disminuir los niveles de ácido úrico en un fluido corporal o tejido, que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

15

Figura 1A: Mantenimiento de la actividad con *Uricasa Candida* PEGilada

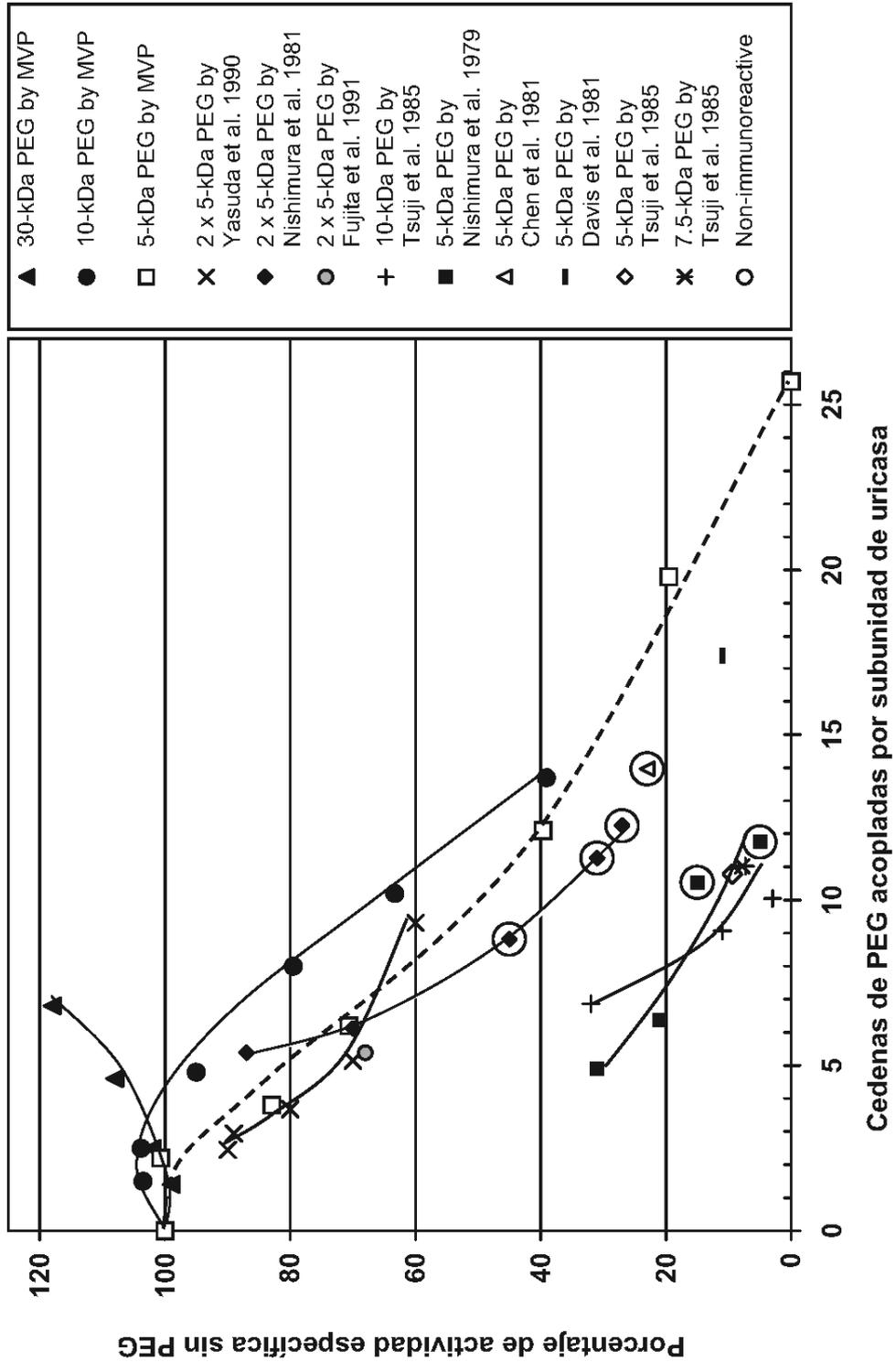


Figura 1B: Mantenimiento de la actividad con uricasa *Candida* PEGilada

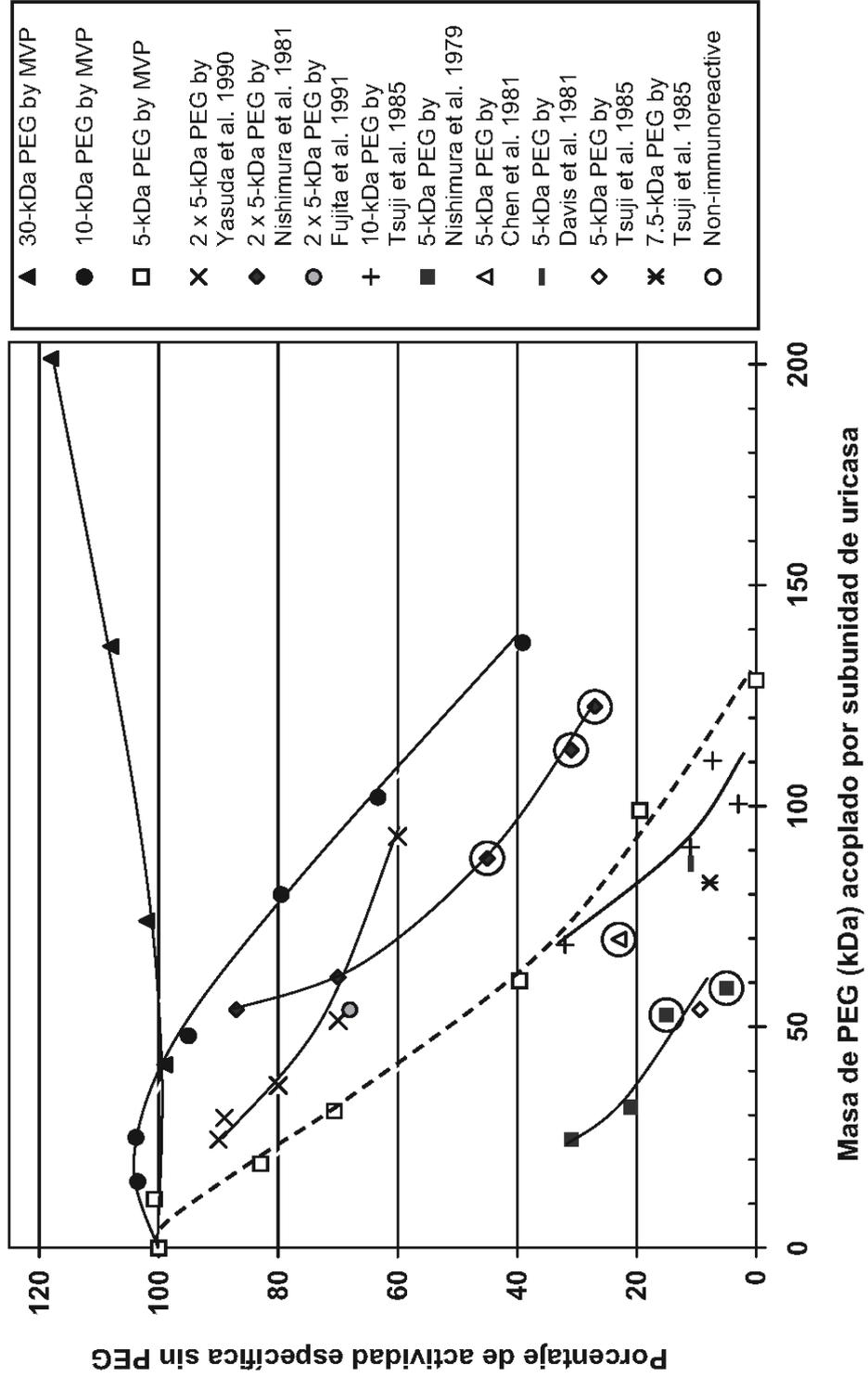


Figura 2A: Mantenimiento de la actividad con uricasa porcina PEGilada

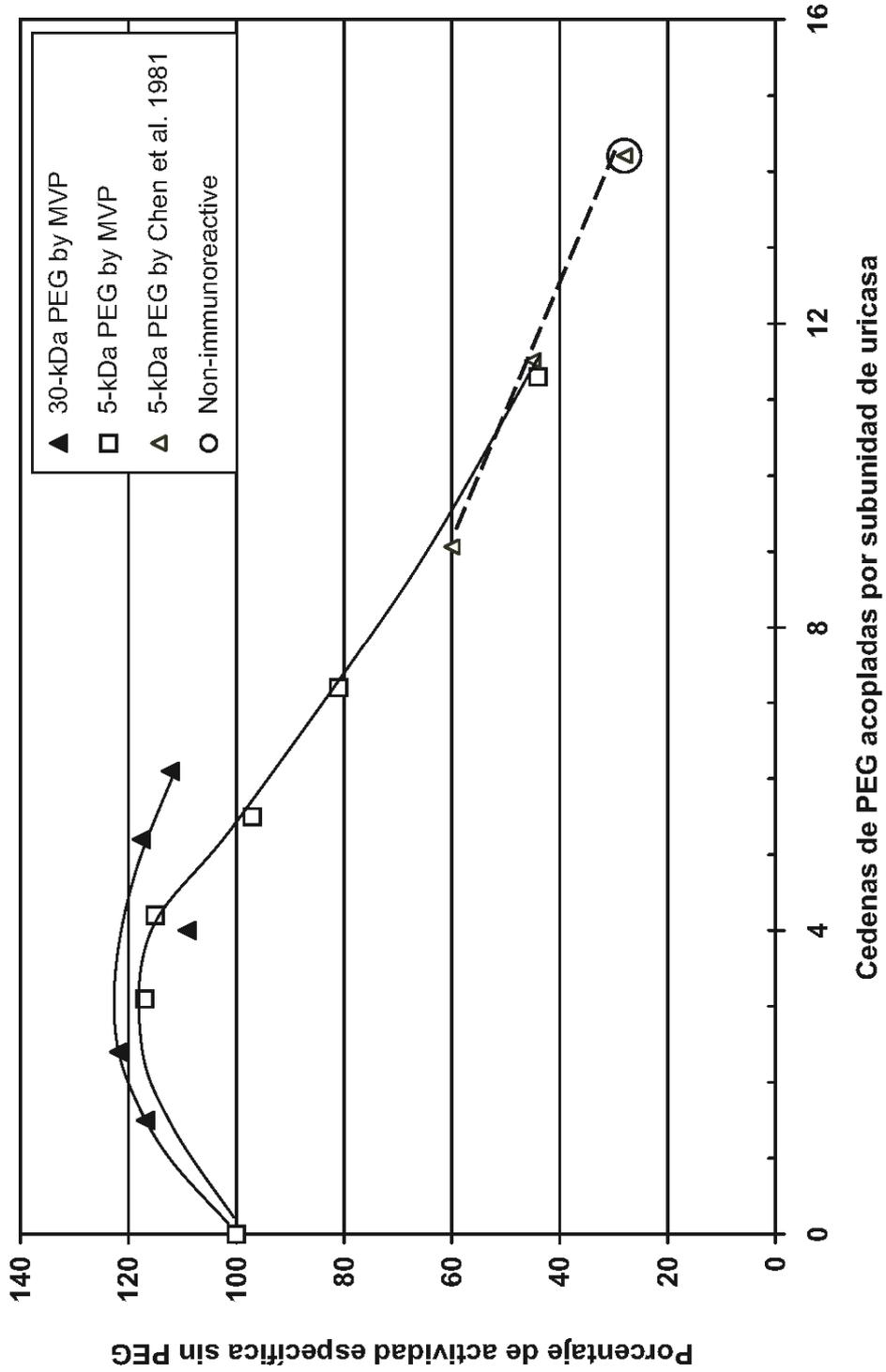


Figura 2B: Mantenimiento de la actividad con uricasa porcina PEGilada

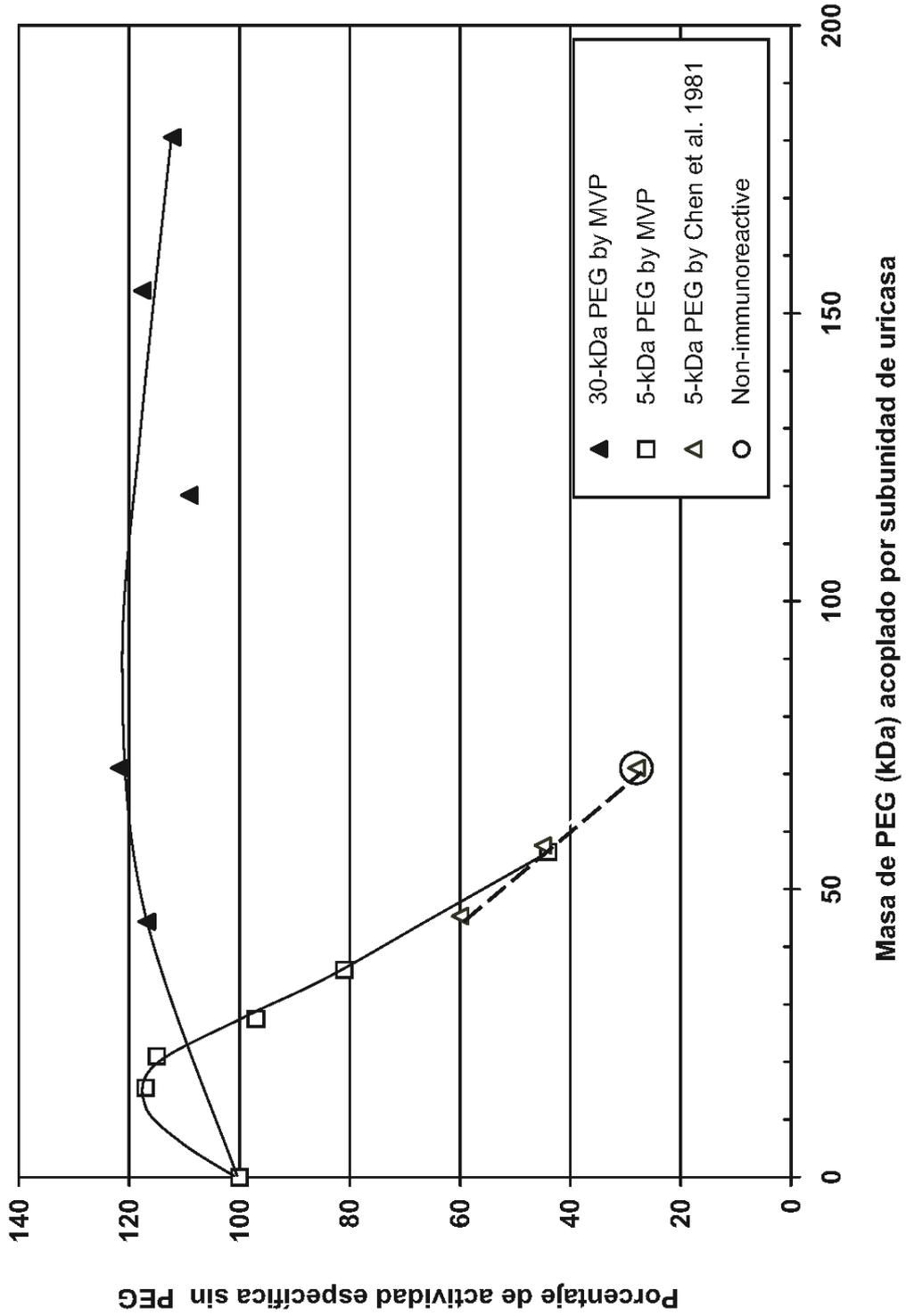


Figura 3A: Mantenimiento de la actividad con uricasa química de cerdo-babuino PEGilada

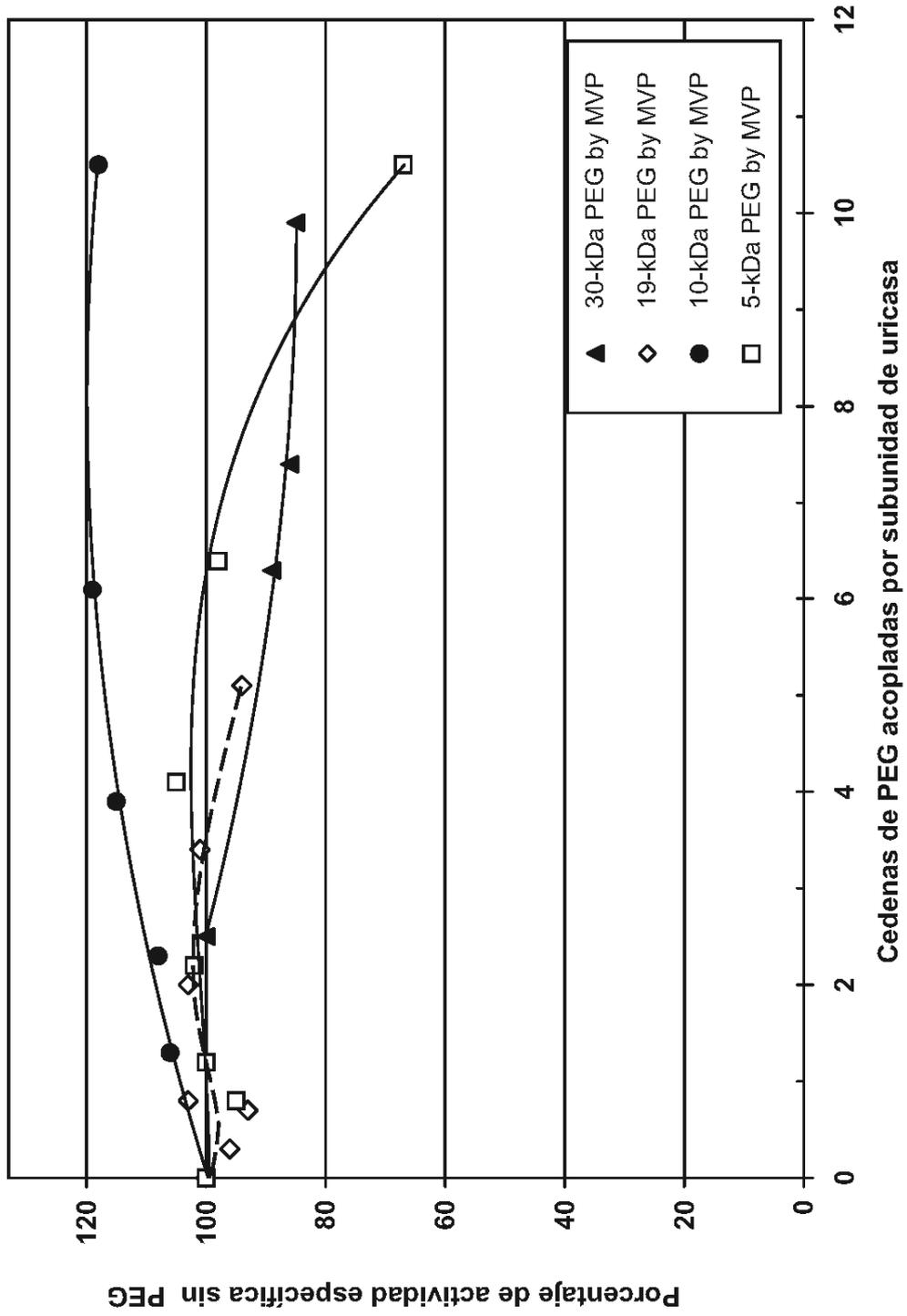


Figura 3B: Mantenimiento de la actividad con uricasa química de cerdo-babuino PEGilada

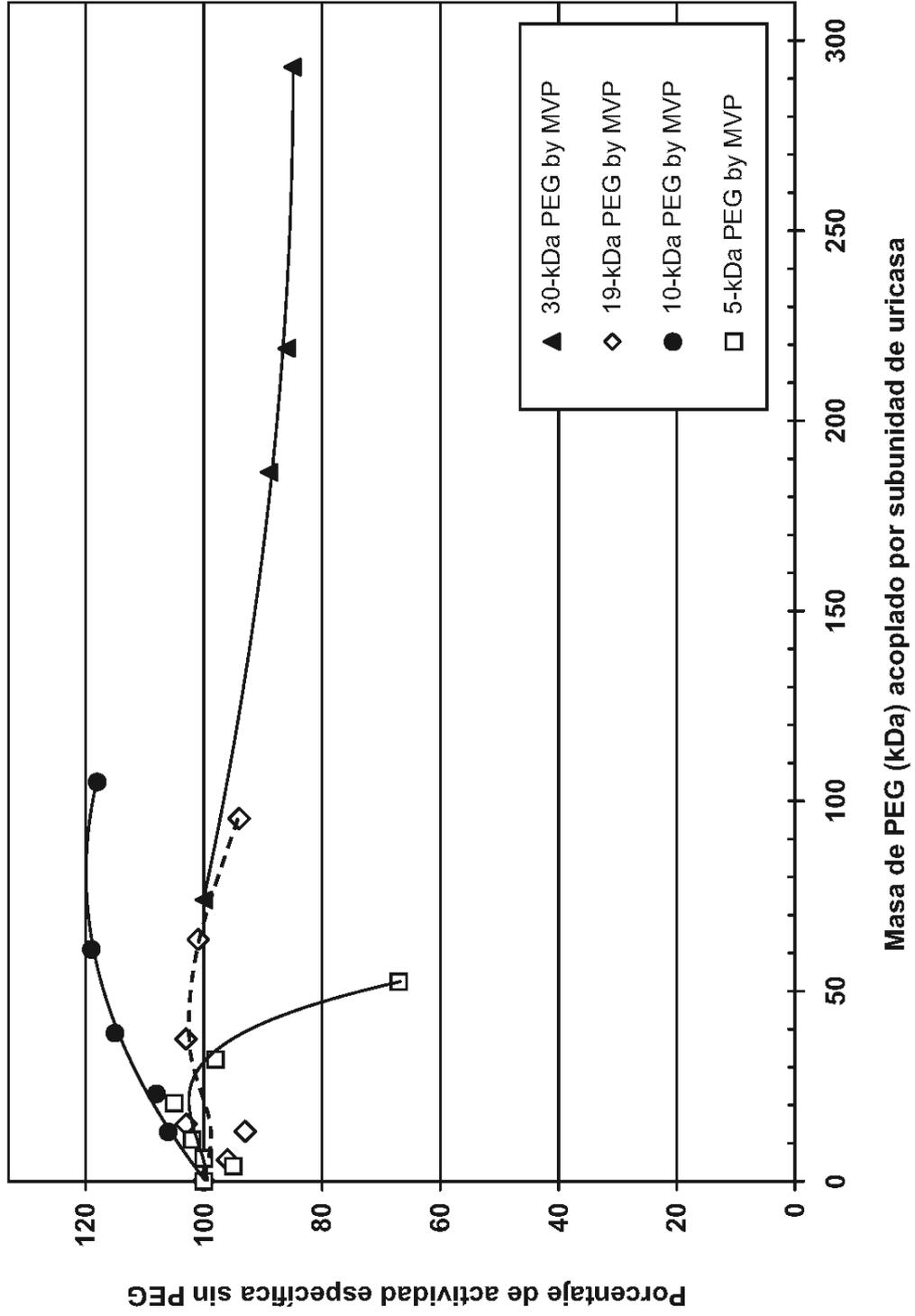


Figura 4A: Mantenimiento de la actividad con Uricozyme® PEGilado (Uricasa A. flavus)

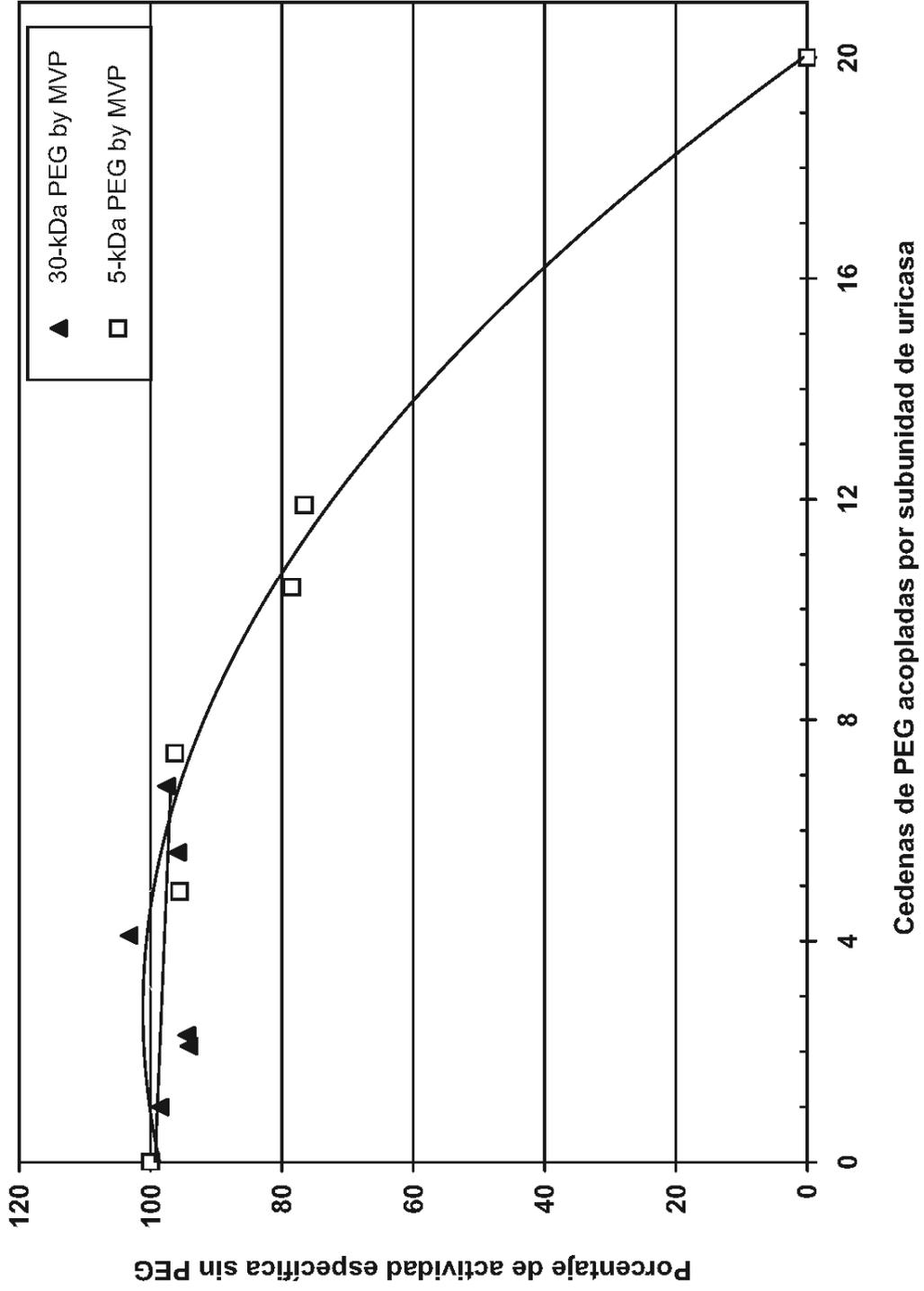


Figura 4B: Mantenimiento de la actividad con Uricozyme® PEGilado (Uricasa A. flavus)

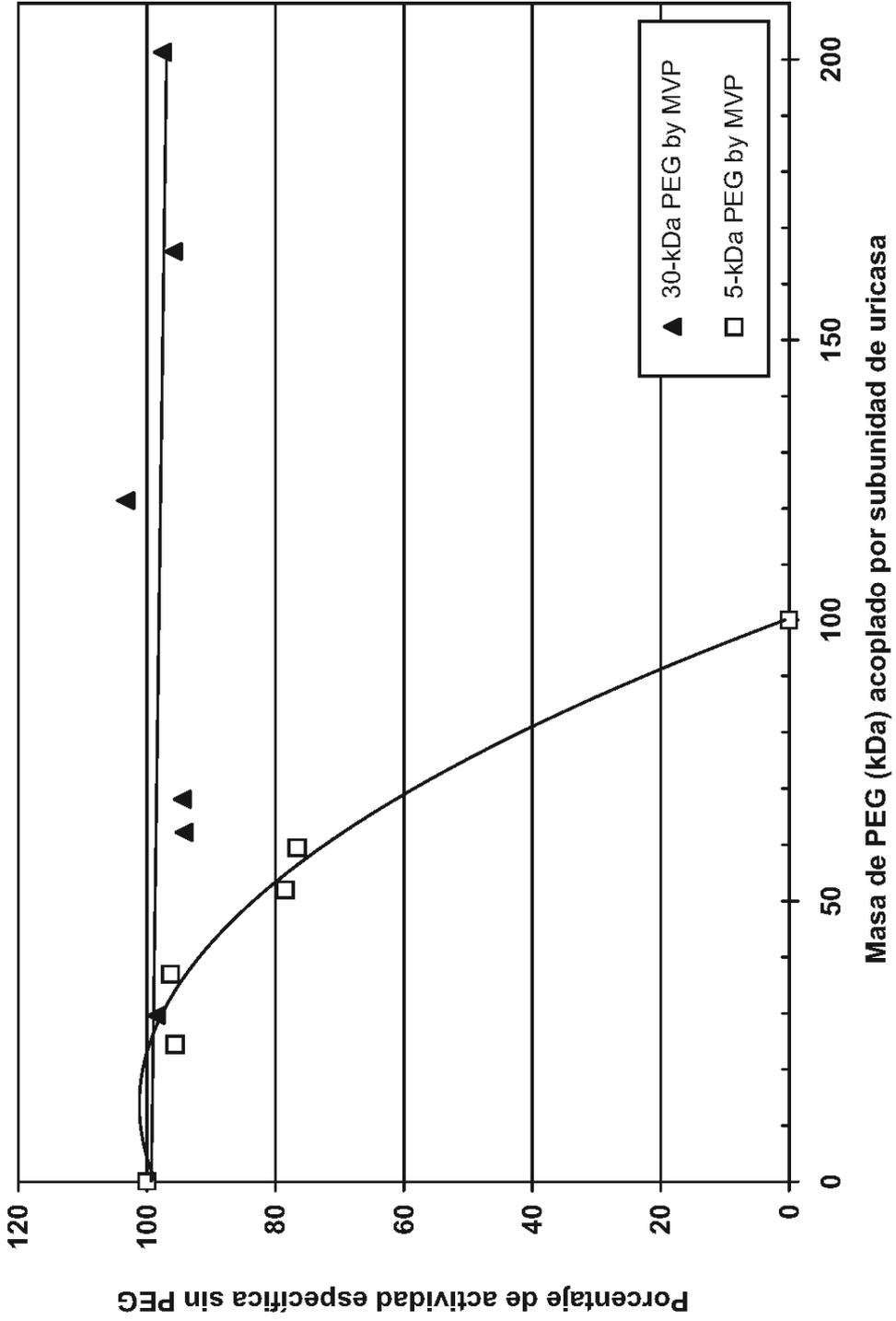


Figura 5A: Mantenimiento de la actividad con uricasa de soja PEGilada

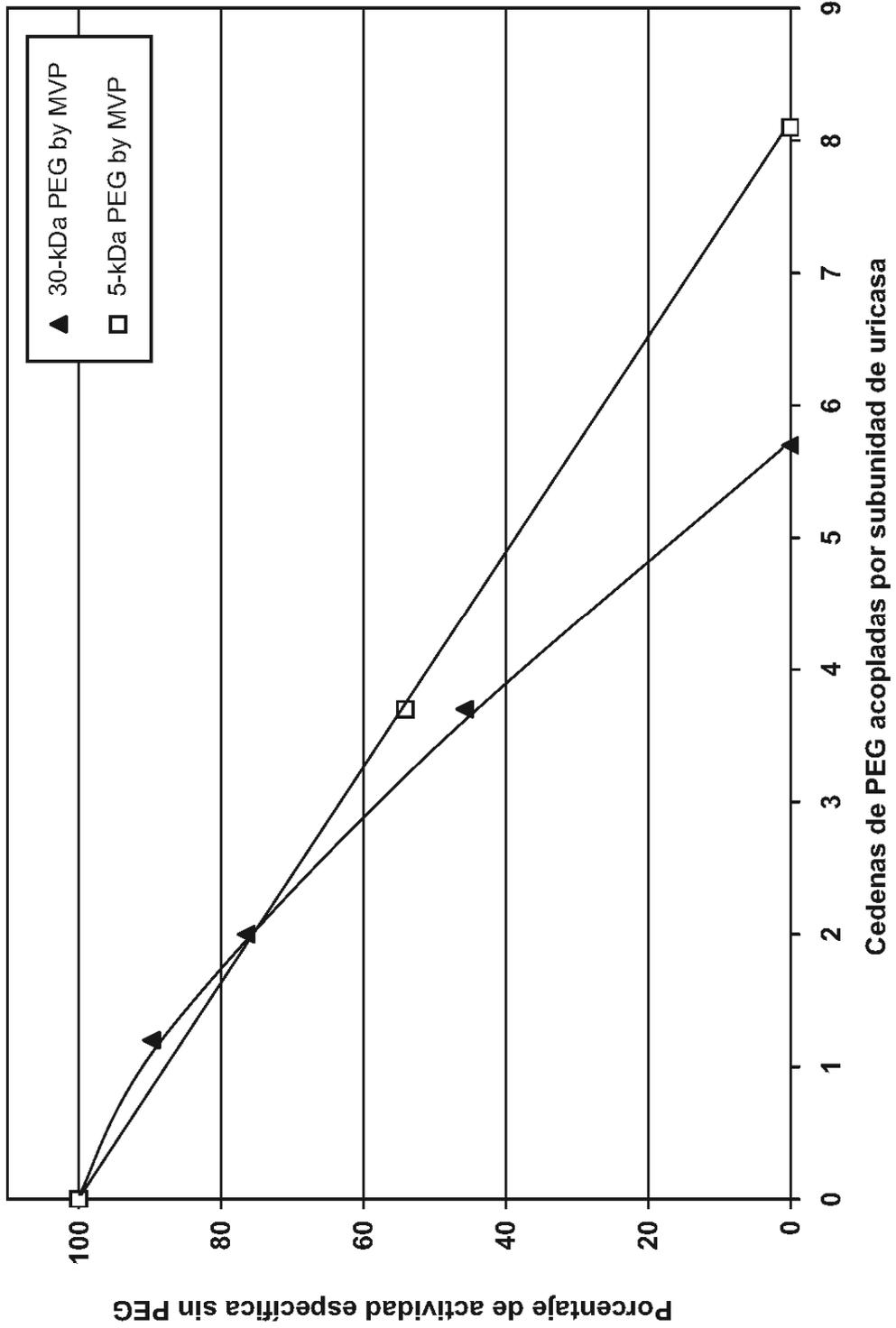


Figura 5B: Mantenimiento de la actividad con uricasa de soja PEGilada

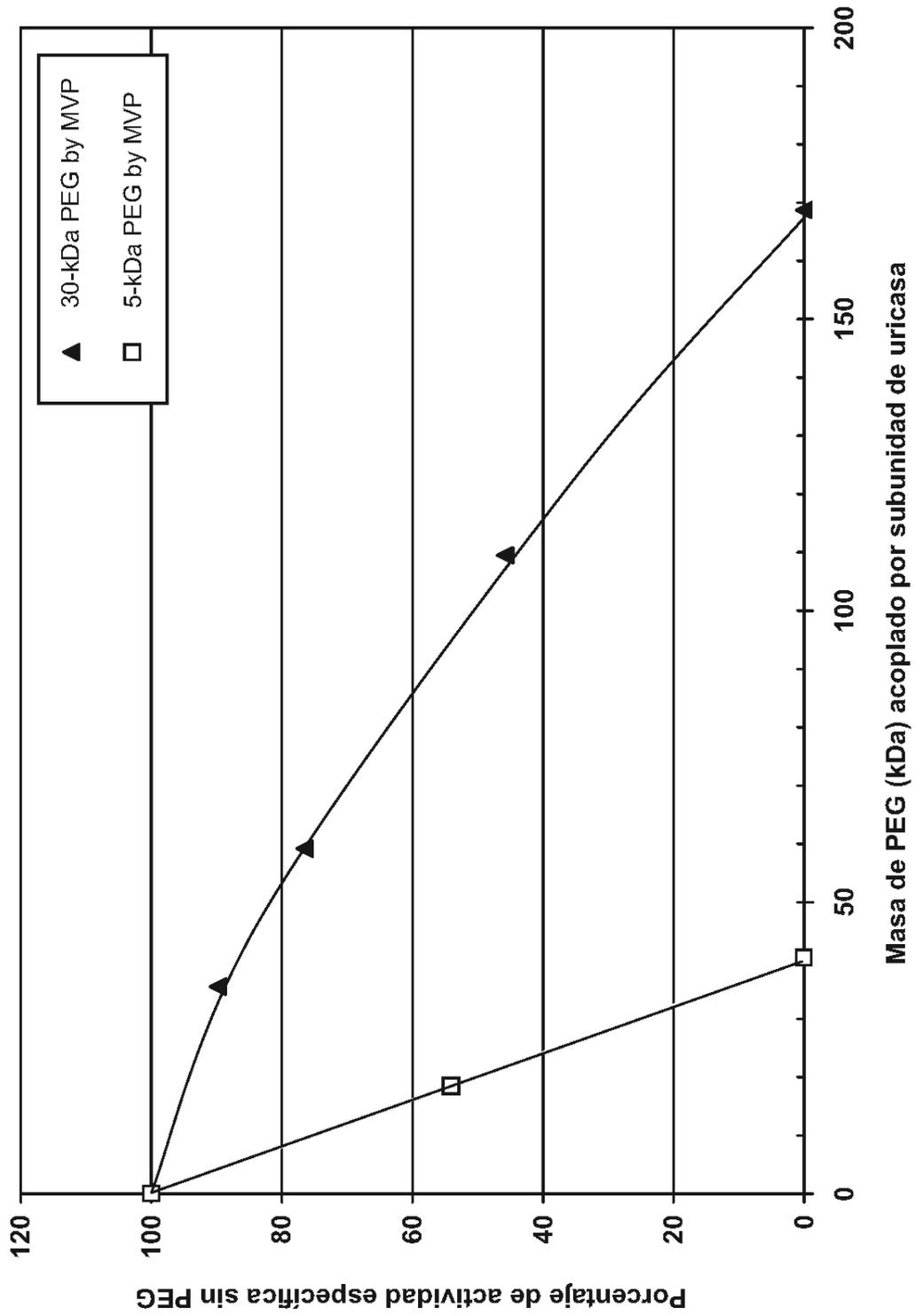


Figura 6: Secuencias de aminoácidos deducidas de uricasa quimérica de cerdo-Babuino (**PBC**, por sus siglas en inglés), uricasa PBC que se trunca en los terminales amino y carboxilo (**PBC-NT-CT**) y uricasa Porcina que contiene las mutaciones R291K y T301S (uricasa **PKS**), en comparación con la secuencia de porcino (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de babuino (SEQ ID NO: 2).

Porcine	MAHYRNDYKK	NDEVEFVRTG	YGKDMIKVLH	IQRDGKYHSI	40
PBC	<i>secuencia de porcino 1-225</i> →				40
PBC-NT-CT	<i>secuencia de porcino 1-219</i> →				34
PKS	<i>secuencia de porcino 1-288</i> →				40
Baboon	MADYHNNYKK	NDELEFVRTG	YGKDMVKVLH	IQRDGKYHSI	40
Porcine	KEVATSVQLT	LSSKKDYLHG	DNSDVIPTDT	IKNTVNVLAK	80
PBC	<i>secuencia de porcino</i> →				80
PBC-NT-CT	<i>secuencia de porcino</i> →				74
PKS	<i>secuencia de porcino</i> →				80
Baboon	KEVATSVQLT	LSSKKDYLHG	DNSDIIPTDT	IKNTVHVLAKE	80
Porcine	FKGIKSIETF	AVTICEHFLS	SFKHVIRAQV	YVEEVPWKRF	120
PBC	<i>secuencia de porcino</i> →				120
PBC-NT-CT	<i>secuencia de porcino</i> →				114
PKS	<i>secuencia de porcino</i> →				120
Baboon	FKGIKSIEAF	GVNICEYFLS	SFNHVIRAQV	YVEEIPWKRL	120
Porcine	EKNGVKHVHA	FIYPTGTGTHF	CEVEQIRNGP	PVIHSGIKDL	160
PBC	<i>secuencia de porcino</i> →				160
PBC-NT-CT	<i>secuencia de porcino</i> →				154
PKS	<i>secuencia de porcino</i> →				160
Baboon	EKNGVKHVHA	FIHTPTGTHF	CEVEQLRSGP	PVIHSGIKDL	160
Porcine	KVLKTTQSGF	EGFIKDQFTT	LPEVKDRCFA	TQVYCKWRYH	200
PBC	<i>secuencia de porcino</i> →				200
PBC-NT-CT	<i>secuencia de porcino</i> →				194
PKS	<i>secuencia de porcino</i> →				200
Baboon	KVLKTTQSGF	EGFIKDQFTT	LPEVKDRCFA	TQVYCKWRYH	200
Porcine	QGRDVFDEAT	WDTVRSIVLQ	KFAGPYDKGE	YSPSVQKTLY	240
PBC	<i>secuencia de porcino</i> →				240
PBC-NT-CT	<i>secuencia de porcino</i> →				234
PKS	<i>secuencia de porcino</i> →				240
Baboon	QCRDVFDEAT	WGTIRDLVLE	KFAGPYDKGE	YSPSVQKTLY	240
Porcine	DIQVLTGQV	PEIEDMEISL	PNIHYLNIDM	SKMGLINKEE	280
PBC	<i>secuencia de babuino</i> →				280
PBC-NT-CT	<i>secuencia de babuino</i> →				274
PKS	<i>secuencia de porcino</i> →				280
Baboon	DIQVLSLSRV	PEIEDMEISL	PNIHYFNIDM	SKMGLINKEE	280
Porcine	VLLPLDNPYG	RITGTVKRKL	TSRL	304	
PBC	<i>secuencia de babuino</i> →				304
PBC-NT-CT	<i>secuencia de babuino</i> →				295
PKS	<i>porcino</i> ← <i>sec. de babuino</i> →				304
Baboon	VLLPLDNPYG	KITGTVKRKL	SSRL	304	

Figura 7: Actividad de la uricasa sérica 24 horas después de cada inyección de PEG-uricasa en relación con la primera inyección

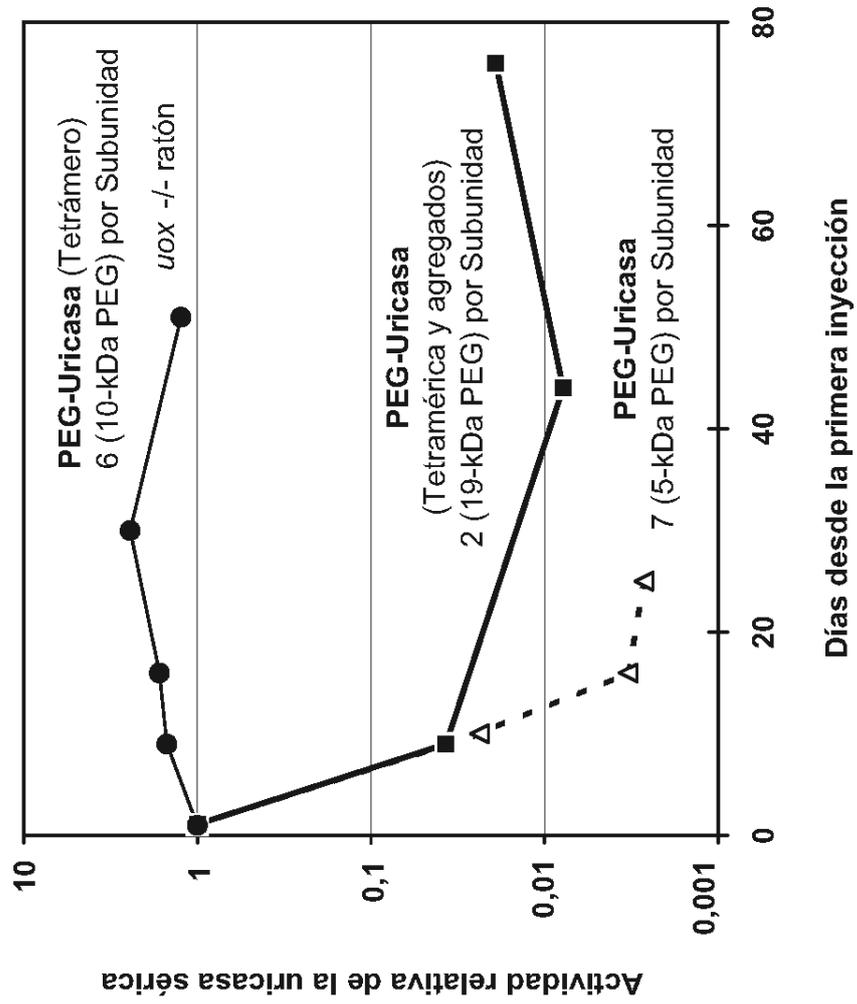


Figura 8: Relación inversa entre la actividad de la PEG-uricasa sérica y los niveles de ácido úrico en el suero y la orina de un ratón con deficiencia de uricasa

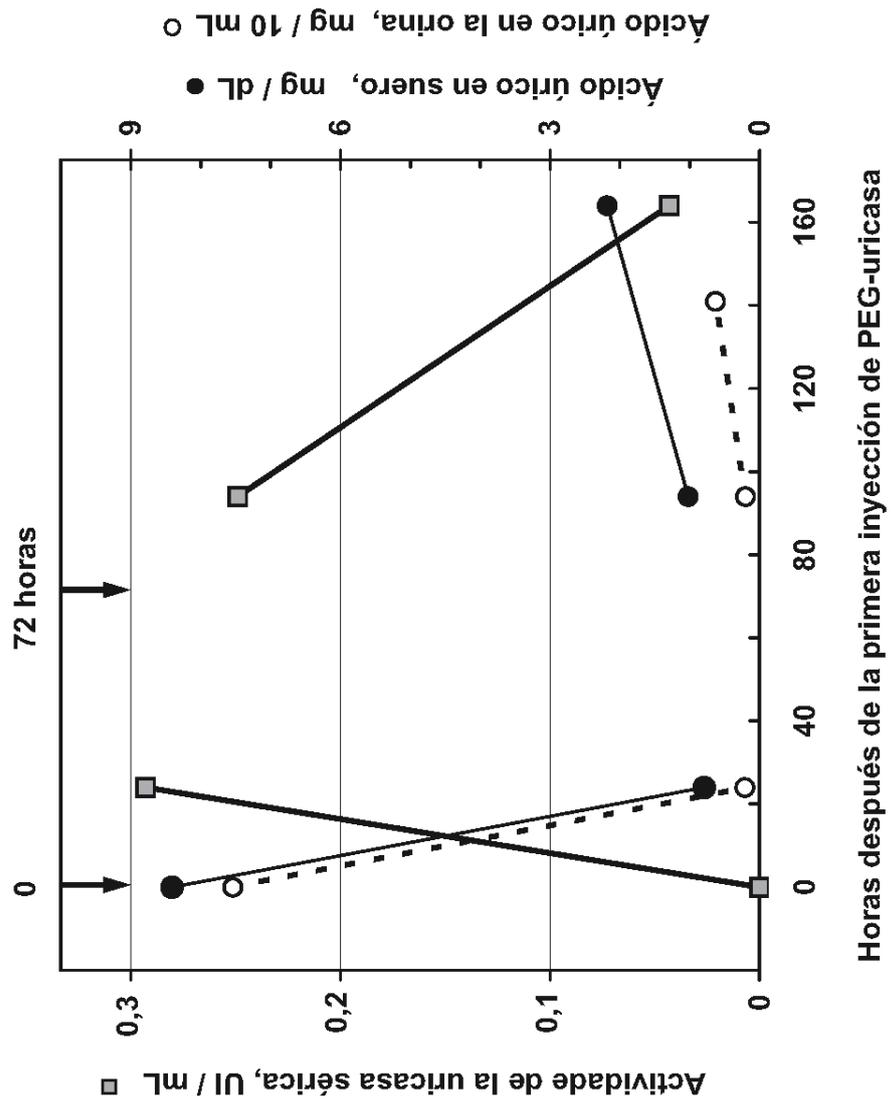


Figura 9: Disminución de la gravedad del defecto de concentración de la orina en ratones con deficiencia de uricasa tratados con PEG-Uricasa

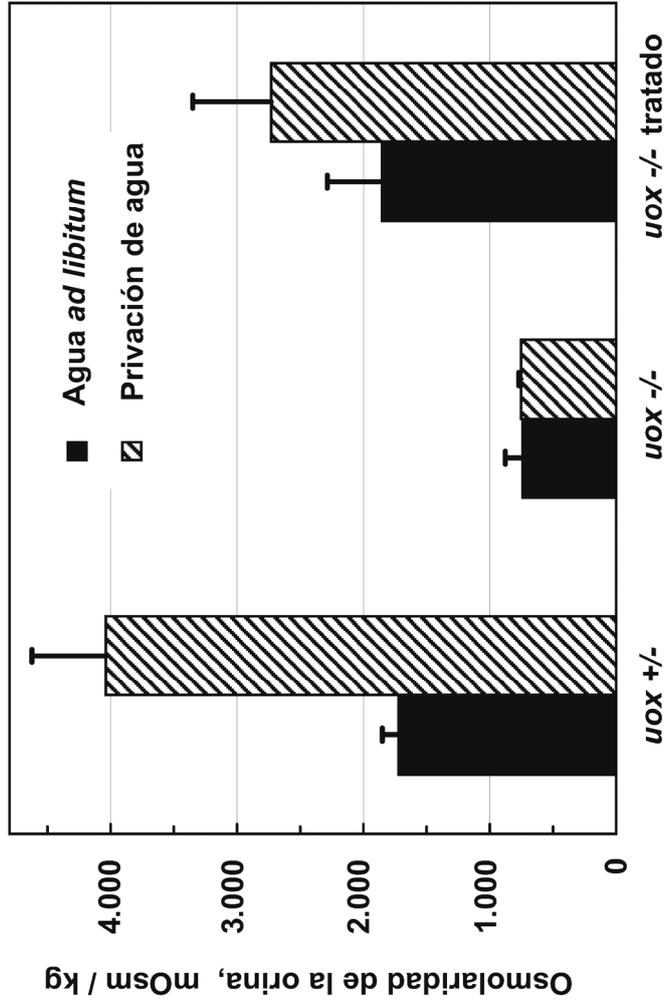


Figura 10: Disminución de la gravedad de diabetes insípida nefrogénica en ratones con deficiencia de uricasa y tratados con PEG-uricasa

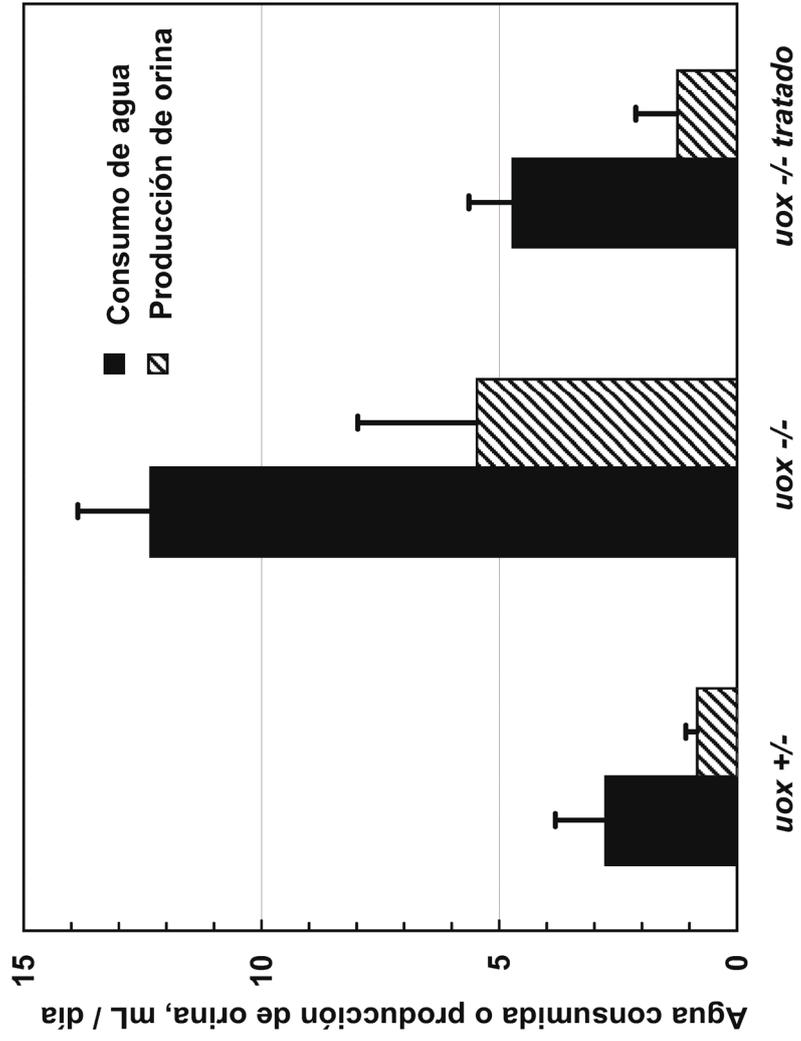


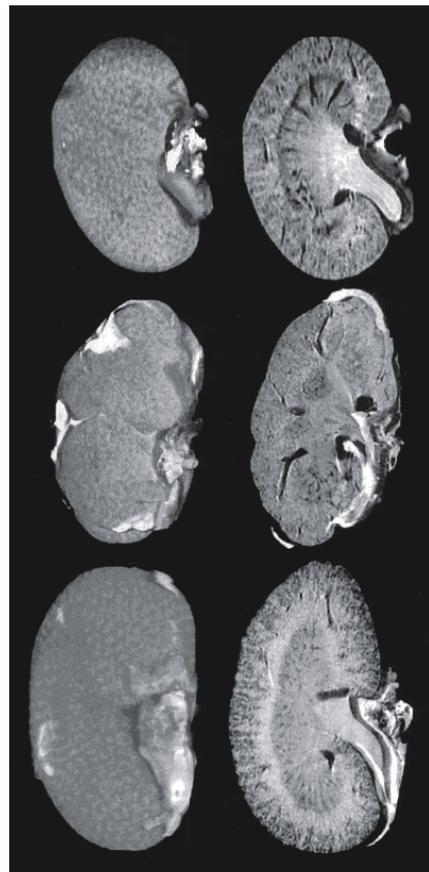
Figura 11:

Menor gravedad de la nefropatía inducida por ácido úrico tras el tratamiento con PEG-uricasa según la visualización microscópica por resonancia magnética

Riñón de un ratón normal

Riñón de un ratón *knockout* y no tratado con PEG-uricasa

Riñón de un ratón *knockout* y tratado con PEG-uricasa



Superficie representada

Corte coronal

Figura 12: Eliminación de la circulación de ratones BALB/c del tetrámero y octámero de uricasa PBC acoplados con 5 - 6 cadenas de 10-kDa PEG por subunidad

