

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 357**

51 Int. Cl.:

C12N 9/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2006 E 06749889 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1871874**

54 Título: **Formas variantes de urato oxidasa y uso de las mismas**

30 Prioridad:

11.04.2005 US 670573 P

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

19.06.2015

73 Titular/es:

**CREALTA PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)
150 S Saunders Rd., Suite 130
Lake Forest, IL 60045, US**

72 Inventor/es:

**HARTMAN, JACOB y
MENDELOVITZ, SIMONA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 538 357 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

Formas variantes de urato oxidasa y uso de las mismas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica la prioridad o el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie: 60/670,573, presentada el 11 de abril de 2005 por referencia en el presente documento.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a proteínas con actividad ureolítica modificadas genéticamente. Más específicamente, la invención se refiere a proteínas que comprenden urato oxidasas truncadas y a procedimientos para su producción.

Antecedentes de la invención

10 Los términos urato oxidasa y uricasa se usan en el presente documento de manera intercambiable. Las urato oxidasas (uricasas; E.C. 1.7.3.3) son enzimas que catalizan la oxidación de ácido úrico en 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 para uricasa adquirido durante la evolución de los primates superiores. Wu, X, et ál., (1992) *J Mol Evol* 34:78-84.

15 Como consecuencia, en individuos propensos, las concentraciones excesivas de ácido úrico en la sangre (hiperuricemia) pueden conducir a artritis dolorosa (gota), depósitos de uratos desfigurantes (tofós) e insuficiencia renal. En algunos individuos afectados, los fármacos disponibles, tales como alopurinol (un inhibidor de la síntesis de ácido úrico), producen efectos adversos que limitan el tratamiento o no alivian adecuadamente estas dolencias. Hande, KR, et ál., (1984) *Am J Med* 76:47-56; Fam, AG, (1990) *Bailliere's Clin Rheumatol* 4:177-192.

20 Las inyecciones de uricasa pueden disminuir la hiperuricemia y hiperuricosuria, al menos de manera transitoria. Puesto que la uricasa es una proteína exógena en los seres humanos, incluso la primera inyección de la proteína no modificada a partir de *Aspergillus flavus* ha inducido reacciones anafilácticas en varios porcentajes de pacientes tratados (Pui, C-H, et ál., (1997) *Leukemia* 11:1813-1816, y las respuestas inmunológicas limitan su utilidad para el tratamiento crónico o intermitente. Donadio, D, et ál., (1981) *Nouv Presse Med* 10:711-712; Leautic, M, et ál., (1983) *Rev Rhum Mal Osteoartic* 50:553-554.

Se ha aceptado durante varias décadas el funcionamiento subóptimo de tratamientos disponibles para la hiperuricemia. Kissel, P, et ál., (1968) *Nature* 217:72-74.

30 De manera similar, se ha aceptado durante varios años la posibilidad de que ciertos grupos de pacientes con gota aguda se puedan beneficiar de una forma segura y eficaz de uricasa inyectable. Davis, FF, et ál., (1978) en GB Broun, et ál., (eds.) *Enzyme Engineering, Vol 4* (pp. 169-173) Nueva York, Plenum Press; Nishimura, H, et ál., (1979) *Enzyme* 24:261-264; Nishimura, H, et ál., (1981) *Enzyme* 26:49-53; Davis, S, et ál., (1981) *Lancet* 2(8241):281-283; Abuchowski, A, et ál., (1981) *J Pharmacol Exp Ther* 219:352-354; Chen, RH-L, et ál., (1981) *Biochim Biophys Acta* 660:293-298; Chua, CC, et ál., (1988) *Ann Int Med* 109:114-117; Greenberg, ML, et ál., (1989) *Anal Biochem* 176:290-293.

35 Las uricasas derivadas de órganos de animales son prácticamente insolubles en disolventes que son compatibles con una administración segura por inyección. Patente de EE. UU. n.º 3,616,231.

40 Ciertas uricasas derivadas de plantas o de microorganismos son más solubles en disolventes médicamente aceptables. Sin embargo, la inyección de las enzimas microbianas induce rápidamente respuestas inmunitarias que pueden conducir a reacciones alérgicas que comprometen la vida o a una inactivación y/o desaparición acelerada de la uricasa de la circulación. Donadio, et ál., (1981); Leautic, et ál., (1983). Las enzimas basadas en las secuencias de aminoácidos deducidas de uricasas a partir de mamíferos, incluyendo cerdo y babuino, o a partir de insectos, tales como, por ejemplo, *Drosophila melanogaster* o *Drosophila pseudoobscura* (Wallrath, LL, et ál., (1990) *Mol Cell Biol* 10:5114-5127), no han sido candidatas adecuadas para el uso clínico, debido a los problemas de inmunogenia e insolubilidad a un pH fisiológico.

45 Los investigadores han usado previamente uricasa inyectada para catalizar la conversión de ácido úrico en alantoína *in vivo*. Véase Pui, et ál., (1997). Esta es la base para el uso en Francia e Italia de uricasa a partir del hongo *Aspergillus flavus* (Uricozyme®) para prevenir o corregir temporalmente la hiperuricemia asociada con el tratamiento antineoplásico para neoplasias malignas y reducir de manera transitoria la hiperuricemia aguda en pacientes con gota. Potaux, L, et ál., (1975) *Nouv Presse Med* 4:1109-1112; Legoux, R, et ál., (1992) *J Biol Chem* 267:8565-8570; patentes de EE. UU. 5,382,518 y 5,541,098. A causa de su corta semivida en circulación, Uricozyme® requiere inyecciones diarias. Lo que es más, a causa de su inmunogenia, no es muy adecuada para el tratamiento a largo plazo.

Ciertas uricasas son muy útiles para preparar conjugados con poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno) (ambos denominados PEG) para producir formas terapéuticamente eficaces de uricasa que tengan semivida de proteína

incrementada e inmunogenia reducida. Patentes de EE. UU. 4,179,337, 4,766,106, 4,847,325, y 6,576,235; Publicación de solicitud de patente de EE. UU. US2003/0082786A1. También se han descrito conjugados de uricasa con polímeros distintos a PEG. Patente de EE. UU, 4,460,683.

5 En prácticamente todos los intentos evidenciados para PEGilar uricasa (es decir, unir covalentemente PEG a uricasa), en primer lugar el PEG se enlaza a los grupos amino, incluyendo el residuo amino terminal y los residuos de lisina disponibles. En las uricasas utilizadas habitualmente, el número total de lisinas en cada una de las cuatro subunidades idénticas está entre 25 (*Aspergillus flavus* (patente de EE. UU. 5,382,518)) y 29 (cerdo (Wu, X, et ál.,(1989) Proc Nati Acad Sci USA 86:9412-9416)). Algunas de las lisinas no están disponibles para la PEGilación en la conformación natural de la enzima. El planteamiento más habitual para reducir la inmunogenia de la uricasa ha sido unir grandes números de cadenas de PEG de bajo peso molecular. Esto ha dado como resultado grandes disminuciones en la actividad enzimática de los conjugados resultantes.

10 Una única inyección intravenosa de una preparación de uricasa de *Candida utilis* unida a PEG de 5 kDa redujo el urato sérico hasta niveles indetectables en cinco sujetos humanos, cuya concentración de urato sérico promedio previa a la inyección es de 6,2 mg/dl, que está dentro del intervalo normal. Davis, et ál., (1981). Cuatro semanas más tarde, se dio una inyección adicional a los sujetos, pero sus respuestas no se evidenciaron. No se detectaron anticuerpos frente a uricasa tras la segunda (y última) inyección, usando un ensayo de difusión en gel relativamente insensible. Esta referencia no evidenció resultados a partir de tratamientos crónicos o subcrónicos de pacientes humanos o animales de experimentación.

15 Se usó una preparación de uricasa a partir de *Arthrobacter protoformiae* unida a PEG de 5 kDa para controlar temporalmente la hiperuricemia en un único paciente con linfoma cuya concentración de urato sérico previa a la inyección es 15 mg/dl. Chua, et ál., (1988). A causa de la condición crítica del paciente y la corta duración de tratamiento (cuatro inyecciones durante 14 días), no es posible evaluar la eficacia o seguridad del conjugado a largo plazo.

20 Se posibilita la protección mejorada a partir de reconocimiento inmunitario modificando cada subunidad de uricasa con 2-10 cadenas de PEG de alto peso molecular (>5 kD-120 kD) Saifer, et ál. (Patente de EE. UU. 6,576,235; (1994) Adv Exp Med Biol 366:377-387).

Esta estrategia posibilitó la retención de >75 % de la actividad enzimática de uricasa a partir de varias especies, tras la PEGilación, aumentó la vida de circulación de uricasa, y posibilitó la inyección repetida de la enzima sin provocar anticuerpos en ratones y conejos.

25 Hershfield y Kelly (publicación de patente internacional WO 00/08196; solicitud de EE. UU. n.º 60/095,489) desarrollaron medios para proporcionar proteínas uricasas recombinantes de especies de mamífero con números óptimos de sitios de PEGilación. Usaron técnicas de PCR para incrementar el número de residuos de lisina disponibles en puntos seleccionados en la enzima, lo que está diseñado para posibilitar el reconocimiento reducido por el sistema inmunitario, después de subsiguiente PEGilación, mientras se retiene sustancialmente la actividad ureolítica de la enzima. Algunas de sus proteínas uricasas están truncadas en los extremos carboxílico y/o amino. No proporcionan la dirección de otras alteraciones específicas inducidas genéticamente en la proteína.

30 En la presente solicitud, el término "inmunogenia" se refiere a la inducción de una respuesta inmunitaria por una preparación inyectada de PEG-uricasa modificada o no modificada (el antígeno), mientras que "antigenicidad" se refiere a la reacción de un antígeno con anticuerpos preexistentes. Colectivamente, antigenicidad e inmunogenia se denominan "inmunorreactividad." En estudios previos de PEG-uricasa, se evalúa la inmunorreactividad mediante una variedad de procedimientos, que incluyen: 1) la reacción *in vitro* de PEG-uricasa con anticuerpos preformados; 2) mediciones de la síntesis de anticuerpos inducida; y 3) tasas de desaparición tras inyecciones repetidas.

35 Los intentos previos para eliminar la inmunogenia de uricasas a partir de varias fuentes uniendo diversos números de cadenas de PEG a través de diversos conectores se han encontrado con un éxito limitado. Las PEG-uricasas se dieron a conocer por primera vez por FF Davis y por Y Inada y sus colaboradores. Davis, et ál., (1978); patente de EE. UU. 4,179,337; Nishimura, et ál., (1979); patentes japonesas 55-99189 y 62-55079. El conjugado dado a conocer en la patente de EE. UU. 4,179,337 se sintetiza haciendo reaccionar uricasa de origen no especificado con un exceso molar de 2000 veces PEG de 750 dalton, lo que indica que es probable que un gran número de moléculas poliméricas se haya enlazado a cada subunidad de uricasa. La patente de EE. UU. 4,179,337 da a conocer la unión de tanto PEG o poli(propilenglicol) con pesos moleculares de 500 a 20 000 daltons, preferentemente de aproximadamente 500 a 5000 daltons, para proporcionar conjugados activos no inmunogénicos solubles en agua de diversas hormonas polipeptídicas y enzimas, incluyendo oxidorreductasas, de las que uricasa es una de los tres ejemplos. Además, la patente de EE. UU. 4,179,337 hace énfasis en la unión de 10 a 100 cadenas de polímeros por molécula de enzima, y la retención de al menos un 40 % de la actividad enzimática. No se evidenciaron los resultados de las pruebas para el grado de unión de PEG a los grupos amino de uricasa, la actividad ureolítica específica residual, o la inmunorreactividad del conjugado.

40 En publicaciones previas, se produjeron disminuciones significativas en la actividad ureolítica medida *in vitro* uniendo diversos números de cadenas de PEG a uricasa de *Candida utilis*. La unión de un gran número de cadenas de PEG de

5 kDa a uricasa de hígado porcino dio resultados similares, como se describe tanto en la publicación de Chen como en un informe del simposio por el mismo grupo. Chen, et ál., (1981); Davis, et ál., (1978).

5 En siete estudios previos, se evidencia que la inmunorreactividad de uricasa desciende por PEGilación y fue eliminada en otros cinco estudios. En tres de los últimos cinco estudios, la eliminación de inmunorreactividad se asocia con disminuciones profundas en la actividad ureolítica como máximo del 15 %, 28 %, o 45 % de la actividad inicial. Nishimura, et ál., (1979) (15 % de actividad); Chen, et ál., (1981) (28 % de actividad); Nishimura, et ál., (1981) (45 % de actividad). En el cuarto informe, se evidencia que PEG se une a un 6 % de los residuos de lisina disponibles, pero no se constata la actividad específica residual. Abuchowski, et ál., (1981). Sin embargo, un equipo de investigación, que incluyó a dos de los mismos científicos y usó los mismos procedimientos, evidenció que este grado de unión dejaba una actividad residual de solo un 23-28 %. Chen, et ál., (1981). Las publicaciones de 1981 de Abuchowski et ál., y Chen et ál., indican que, para reducir sustancialmente la inmunogenia de uricasa, el PEG debe unirse a aproximadamente un 60 % de los residuos de lisina disponibles. La quinta publicación en la que se evidencia haberse eliminado la inmunorreactividad de uricasa no da a conocer el grado de unión de PEG, la actividad ureolítica residual, o la naturaleza del enlace PEG-proteína. Veronese, FM, et ál., (1997) en JM Harris, et ál., (eds.), Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series 680 (pp. 182-192) Washington, DC: American Chemical Society.

20 La unión de PEG a una fracción más pequeña de los residuos de lisina en uricasa redujo, pero no eliminó su inmunorreactividad en animales de experimentación. Tsuji, J, et ál., (1985) Int J Immunopharmacol 7:725-730 (un 28-45 % de los grupos amino unidos); Yasuda, Y, et ál., (1990) Chem Pharm Bull 38:2053-2056. (Un 38 % de los grupos amino unidos). Las actividades ureolíticas residuales de los aductos correspondientes oscilaban desde <33 % (Tsuji, et ál.) a un 60 % (Yasuda, et ál.) de sus valores iniciales. Tsuji, et ál., sintetizaron conjugados de PEG-uricasa con PEG de 7,5 kDa y 10 kDa, además de PEG de 5 kDa. Todos los conjugados resultantes son algo inmunogénicos y antigénicos, mientras presentan actividades enzimáticas reducidas notablemente.

25 Una preparación PEGilada de uricasa de *Candida utilis* que se administra sin riesgo dos veces a cada uno de cinco seres humanos se evidencia haber retenido solo un 11 % de su actividad inicial. Davis, et ál., (1981). Varios años más tarde, se administró cuatro veces PEG-uricasa modificada de *Arthrobacter protoformiae* a un paciente con linfoma avanzado e hiperuricemia aguda. Chua, et ál., (1988). Mientras que no se medía la actividad residual de esta preparación enzimática, Chua, et ál., demostraron la ausencia de anticuerpos anti-uricasa en el suero del paciente 26 días después de la primera inyección de PEG-uricasa, usando un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

30 Los estudios previos de uricasa PEGilada muestran que la actividad catalítica se atenúa notablemente uniendo un número suficiente de cadenas de PEG para disminuir sustancialmente su inmunorreactividad. Lo que es más, la mayoría de las preparaciones previas de PEG-uricasa se sintetizan usando PEG activado con cloruro cianúrico, un derivado de triazina (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina) que ha mostrado haber introducido nuevos determinantes antigénicos e inducir la formación de anticuerpos en conejos. Tsuji, et ál. (1985).

35 La patente japonesa n.º 3-148298 de A Sano, et ál., da a conocer proteínas modificadas, incluyendo uricasa, derivatizadas con PEG que tienen un peso molecular de 1-12 kDa que muestran antigenicidad reducida y acción "mejorada prolongada", y procedimientos de preparación de tales péptidos derivatizados. Sin embargo, no hay divulgaciones en relación con los recuentos de cadenas, ensayos enzimáticos, pruebas biológicas o el significado de "mejorada prolongada". Las patentes japonesas 55-99189 y 62-55079, ambas de Y Inada, dan a conocer conjugados de uricasa preparados con PEG-triazina o bis-PEG-triazina (denotado como PEG₂), respectivamente. Véase Nishimura, et ál., (1979 y 1981). En el primer tipo de conjugado, los pesos moleculares de los PEG son 2 kDa y 5 kDa, mientras en el segundo, solo se usa PEG de 5 kDa. Nishimura, et ál., (1979) evidenciaron la recuperación de un 15 % de la actividad ureolítica después de la modificación de un 43 % de las lisinas disponibles con PEG lineal de 5 kDa, mientras Nishimura, et ál., (1981) evidenciaron la recuperación de un 31 % o 45 % de la actividad ureolítica después de la modificación de un 46 % o 36 % de las lisinas, respectivamente, con PEG₂.

El documento WO0008196 describe proteínas urato oxidasas (uricasas) y moléculas de ácidos nucleicos que codifican las mismas, que son útiles como intermedios para preparar proteínas uricasas modificadas mejoradas con inmunogenia reducida y biodisponibilidad incrementada.

50 El documento WO0007629 describe una urato oxidasa (uricasa) de origen natural o recombinante unida covalentemente a poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno), en la que se conjugan un promedio de 2 a 10 cadenas de PEG a cada subunidad de uricasa, y el PEG tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 5 kDa y 100 kDa. Se afirma que los conjugados de PEG-uricasa resultantes son no inmunogénicos y retienen al menos un 75 % de la actividad ureolítica de la enzima no modificada.

55 Las proteínas uricasas estudiadas previamente fueron tanto proteínas naturales como recombinantes. Sin embargo, los estudios que usan técnicas SDS-PAGE y/o Western revelaron la presencia de péptidos no esperados de bajo peso molecular que parecen ser productos de degradación y se incrementan en frecuencia a lo largo del tiempo. La presente invención se refiere a proteínas uricasas recombinantes mutantes que tienen truncamientos y estabilidad estructural aumentada.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una uricasa de mamífero truncada aislada de acuerdo con la reivindicación 1 en el presente documento.

5 La uricasa de la invención objeto comprende sustituciones en los aminoácidos 7,46, 291, y 301. También, como parte de la invención, se contemplan mutaciones conservadoras en cualquier parte en el péptido.

Los truncamientos están en o alrededor de los extremos de secuencia, de tal modo que la proteína puede contener los últimos aminoácidos. Estas mutaciones y truncamientos pueden aumentar la estabilidad de la proteína que comprende tales mutaciones.

10 La actividad ureolítica se usan en el presente documento para hacer referencia a la conversión enzimática de ácido úrico en alantoina.

La invención objeto proporciona adicionalmente una célula huésped aislada de acuerdo con la reivindicación 17 en el presente documento.

En realizaciones particulares, la uricasa comprende un aminoácido aminoterminal, en la que el aminoácido aminoterminal es alanina, glicina, prolina, serina, o treonina.

15 En una realización, la uricasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8. En una realización, la uricasa se conjuga con un polímero para formar, por ejemplo, un conjugado de polietilenglicol-uricasa. En realizaciones particulares, los conjugados de polietilenglicol-uricasa comprenden de 2 a 12 moléculas de polietilenglicol en cada subunidad de uricasa, preferentemente de 3 a 10 moléculas de polietilenglicol por subunidad de uricasa. En realizaciones particulares, cada molécula de polietilenglicol del conjugado de polietilenglicol-uricasa tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1 kD y 100 kD; aproximadamente 1 kD y 50 kD; aproximadamente 5 kD y 20 kD; o aproximadamente 10 kD. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la uricasa de la invención, incluyendo el conjugado de polietilenglicol-uricasa. En una realización, la composición farmacéutica es adecuada para la administración repetida.

20 También, se proporciona una composición de la invención para su uso en la reducción de los niveles de ácido úrico en un fluido biológico de un sujeto.

En una realización particular, el fluido biológico es sangre.

En una realización, la proteína uricasa comprende una metionina N-terminal. En una realización particular, la uricasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7.

30 También, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una uricasa de la invención, por ejemplo, uricasas que tienen o que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8. En una realización, el ácido nucleico aislado está ligado funcionalmente a un promotor heterólogo, por ejemplo, el promotor *osmB*. También, se proporcionan vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican uricasa, y células huésped que comprenden tales vectores. En una realización, el ácido nucleico tiene la secuencia de SEQ ID NO. 7. También, se proporciona un procedimiento para producir una uricasa que comprende las etapas de cultivar dicha célula huésped de la invención en condiciones tales que la uricasa se expresa mediante la célula huésped y aislar la uricasa expresada.

Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 ilustra la estructura de plásmido pOUR-P- Δ N-ks-1. Los números al lado de sitios de restricción indican la posición nucleotídica, relativa al sitio *Hae*III, designado como 1. Los sitios de restricción que se pierden durante la clonación aparecen señalados entre paréntesis.

45 La figura 2 representa el ADN y las secuencias de aminoácidos deducidas de uricasa Pig-KS- Δ N (SEQ ID NO. 9 y SEQ ID NO. 7, respectivamente). La numeración de aminoácidos en la figura 2 es relativa a la secuencia de uricasa de cerdo completa. Tras el residuo de metionina iniciador, una treonina reemplaza a ácido aspártico 7 de la secuencia de uricasa de cerdo. Se indican los sitios de restricción que se usan para las diversas etapas de subclonación. La secuencia sin traducir 3' se muestra en letras minúsculas. El codón de terminación de la traducción se indica mediante un asterisco.

50 La figura 3 muestra alineación relativa de las secuencias de aminoácidos deducidas de las diversas secuencias de uricasa recombinante Pig (SEQ ID NO. 11), PBC- Δ NC (SEQ ID NO. 12), y Pig-KS- Δ N (SEQ ID NO. 7). Los asteriscos indican las posiciones en las que hay diferencias en aminoácidos en la Pig-KS- Δ N en comparación con la secuencia de uricasa de cerdo publicada; los círculos indican las posiciones en las que hay diferencias en aminoácidos en la Pig-KS- Δ N en comparación con PBC- Δ N. Las líneas discontinuas indican la delección de aminoácidos.

La figura 4 representa la SDS-PAGE de uricasa de cerdo y las variantes de uricasa altamente purificadas producidas de acuerdo con los ejemplos 1-3. La fecha de producción (mes/año) y el número de carril pertinente para cada muestra

se indica en la simbología a continuación. El eje Y axis está marcado con los pesos de marcadores de peso molecular, y la parte superior de la figura está marcada con los números de carril. Los carriles son como sigue: carril 1-marcadores de peso molecular; carril 2-Pig KS-ΔN (7/98); carril 3-Pig (9/98); carril 4-Pig KS (6/99); carril 5-Pig KS (6/99); carril 6-Pig-ΔN (6/99); carril 7-Pig KS-ΔN (7/99); carril 8-Pig KS-ΔN (8/99).

5 La figura 5 representa los perfiles farmacocinéticos de uricasa Pig-KS-ΔN PEGilada (9x10 kD) en ratas tras inyecciones IM (intramuscular), SC (subcutánea), e IV (intravenosa), determinados mediante supervisión de la actividad enzimática en muestras de sangre. La actividad de uricasa en muestras de plasma, que se obtienen en los puntos de tiempo indicados, se determina usando el ensayo colorimétrico. Los valores de actividad (mUA=mili-unidades de absorbancia) representan la tasa de reacción enzimática por 1 μl de muestra de plasma. La biodisponibilidad (cantidad de fármaco que alcanza la circulación relativa a una inyección IV) de uricasa inyectada se calculó a partir del área bajo la curva del gráfico.

15 La figura 6 representa los perfiles farmacocinéticos de uricasa Pig-KS-ΔN PEGilada (9x10 kD) en conejos tras inyecciones IM (intramuscular), SC (subcutánea), e IV (intravenosa), determinados mediante supervisión de la actividad enzimática en muestras de sangre. La actividad de uricasa en muestras de plasma, que se obtienen en los puntos de tiempo indicados, se determina usando el ensayo colorimétrico. Los valores de actividad (mUA=mili-unidades de absorbancia) representan la tasa de reacción enzimática por 1 μl de muestra de plasma. La biodisponibilidad (cantidad de fármaco que alcanza la circulación relativa a una inyección IV) de uricasa inyectada se calculó a partir del área bajo la curva del gráfico.

20 La figura 7 representa los perfiles farmacocinéticos de uricasa Pig-KS-ΔN PEGilada (9x10 kD) en perros tras inyecciones IM (intramuscular), SC (subcutánea), e IV (intravenosa), determinados mediante supervisión de la actividad enzimática en muestras de sangre. La actividad de uricasa en muestras de plasma, que se obtienen en los puntos de tiempo indicados, se determina usando el ensayo colorimétrico. Los valores de actividad (mUA=mili-unidades de absorbancia) representan la tasa de reacción enzimática por 1 μl de muestra de plasma. La biodisponibilidad (cantidad de fármaco que alcanza la circulación relativa a una inyección IV) de uricasa inyectada se calculó a partir del área bajo la curva del gráfico.

25 La figura 8 representa los perfiles farmacocinéticos de uricasa Pig-KS-ΔN PEGilada (9x10 kD) en cerdos tras inyecciones IM (intramuscular), SC (subcutánea), e IV (intravenosa), determinados mediante supervisión de la actividad enzimática en muestras de sangre. La actividad de uricasa en muestras de plasma, que se obtienen en los puntos de tiempo indicados, se determina usando el ensayo colorimétrico. Los valores de actividad (mUA=mili-unidades de absorbancia) representan la tasa de reacción enzimática por 1 μl de muestra de plasma. La biodisponibilidad (cantidad de fármaco que alcanza la circulación relativa a una inyección IV) de uricasa inyectada se calculó a partir del área bajo la curva del gráfico.

Descripción detallada de la invención

35 Los estudios previos enseñan que cuando se logra una reducción significativa en la inmunogenia y/o antigenicidad de uricasa por PEGilación, se asocia invariablemente con una pérdida sustancial de actividad ureolítica. La seguridad, conveniencia y rentabilidad de biofármacos se están viendo adversamente afectadas por disminuciones en sus potencias y la consecuente necesidad de incrementar la dosis administrada. Por lo tanto, existe la necesidad de un medio alternativo seguro y eficaz para reducir los niveles elevados de ácido úrico en fluidos corporales, incluyendo la sangre. La presente invención proporciona una uricasa de mamífero truncada aislada de acuerdo con la reivindicación 1 en el presente documento.

La uricasa, como se usa en el presente documento, incluye subunidades individuales, así como el tetrámero, a menos que se indique de otro modo.

La uricasa mutada, como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de uricasa que tienen aminoácidos que se han intercambiado con otros aminoácidos.

45 Una mutación conservadora, como se usa en el presente documento, es una mutación de uno o más aminoácidos, en o alrededor de una posición, que no altera sustancialmente el comportamiento de la proteína. En una realización preferente, la uricasa que comprende al menos una mutación conservadora tiene la misma actividad de uricasa que la uricasa sin tal mutación. En realizaciones alternativas, la uricasa que comprende al menos una mutación conservadora tiene sustancialmente la misma actividad de uricasa, dentro de un 5 % de la actividad, dentro de un 10 % de la actividad, o dentro de un 30 % de la actividad de uricasa sin tal mutación.

50 Una sustitución de aminoácidos conservadora se define como un cambio en la composición de aminoácidos cambiando aminoácidos de un péptido, polipéptido o proteína, o fragmento del mismo. En realizaciones particulares, la uricasa tiene una, dos, tres o cuatro mutaciones conservadoras. La sustitución es generalmente de aminoácidos con propiedades similares (por ejemplo, ácido, básico, aromático, tamaño, cargados positiva o negativamente, polar, no polar) de tal modo que las sustituciones no alteran sustancialmente las características (por ejemplo, carga, IEF, afinidad, avidez, conformación, solubilidad) o actividad del péptido, polipéptido o proteína. Las sustituciones típicas que se pueden realizar para tal sustitución de aminoácidos conservadora pueden estar entre los grupos de aminoácidos como sigue:

glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L) e isoleucina (I)

ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E)

alanina (A), serina (S) y treonina (T)

histidina (H), lisina (K) y arginina (R)

5 asparagina (N) y glutamina (Q)

fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W)

La proteína que tiene una o más sustituciones conservadoras retiene su estabilidad estructural y puede catalizar una reacción a pesar de que su secuencia de ADN no es la misma que la proteína original.

10 La uricasa truncada, como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de uricasa que tienen secuencias de aminoácidos primarias acortadas. Entre los truncamientos posibles están los truncamientos en o alrededor de los extremos amino y/o carboxílico. Los truncamientos específicos de este tipo pueden ser de tal modo que los últimos aminoácidos (aquellos del extremo amino y/o carboxílico) de la proteína de origen natural están presentes en la proteína truncada. Los truncamientos aminoterminales pueden comenzar en la posición 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferentemente, los truncamientos aminoterminales comienzan en la posición 2, dejando, de esta manera, la metionina aminoterminal. Esta metionina se puede eliminar mediante modificación postraducciona. En realizaciones particulares, la metionina aminoterminal se elimina después de que se produce la uricasa. En una realización particular, la metionina se elimina mediante aminopeptidasa bacteriana endógena.

20 Una uricasa truncada, con respecto a la secuencia de longitud completa, tiene excluidas una o más secuencias de aminoácidos. Una proteína que comprende una uricasa truncada puede incluir cualquier secuencia de aminoácidos además de la secuencia de uricasa truncada, pero no incluye una proteína que comprende una secuencia de uricasa que contiene cualquier secuencia de aminoácidos natural secuencial adicional. En otras palabras, una proteína que comprende una uricasa truncada en la que el truncamiento comienza en la posición 6 (es decir, la uricasa truncada comienza en la posición 7) no tiene, de manera inmediata en dirección 5' de la uricasa truncada, cualquier aminoácido que la uricasa natural tiene en la posición 6.

25 A menos que se indique de otro modo por referencia específica a otra secuencia o una SEQ ID NO. particular, se hace referencia a las posiciones numeradas de los aminoácidos de las uricasas descritas en el presente documento con respecto a la numeración de los aminoácidos de la secuencia de uricasa de cerdo. La secuencia de aminoácidos de uricasa de cerdo y las posiciones numeradas de los aminoácidos que comprenden esta secuencia se pueden encontrar en la figura 3. Como se usa en el presente documento, la referencia a los aminoácidos o ácidos nucleicos "desde la posición X hasta la posición Y" quiere decir la secuencia contigua que comienza la posición X y que finaliza en la posición Y, incluyendo los aminoácidos o ácidos nucleicos en ambas posiciones X e Y.

30 Se han identificado genes y proteínas uricasa en varias especies de mamíferos, por ejemplo, cerdo, babuino, rata, conejo, ratón, y macaco de la India. Las secuencias de diversas proteínas uricasas se describen en el presente documento por referencia a sus números de acceso de la base de datos pública, como sigue:

[gi|50403728|sp|P25689](#); [gi|20513634|dbj|BAB91555.1](#); [gi|176610|gb|AAA35395.1](#);

[gi|20513654|dbj|BAB91557.1](#); [gi|47523606|ref|NP_999435.1](#); [gi|6678509|ref|NP_033500.1](#);

[gi|57463|emb|CAA31490.1](#); [gi|20127395|ref|NP_446220.1](#); [gi|137107|sp|P11645](#);

[gi|51458661|ref|XP_497688.1](#); [gi|207619|gb|AAA42318.1](#); [gi|26340770|dbj|BAC34047.1](#); y

[gi|57459|emb|CAA30378.1](#).

35 Cada una de estas secuencias y sus anotaciones en las bases de datos públicas es accesible a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

40 En una realización de la invención, la uricasa está truncada por 6 aminoácidos en su extremo amino. En una realización de la invención, la uricasa está truncada por 6 aminoácidos en su extremo carboxílico. En una realización de la invención, la uricasa está truncada por 6 aminoácidos en ambos de sus extremos amino y carboxílico.

En una realización particular, la proteína uricasa comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 13 hasta la posición 292 de la secuencia de aminoácidos de uricasa de cerdo (SEQ ID NO. 11). En una realización particular, la proteína uricasa comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 8 hasta la posición 287 de la secuencia de aminoácidos de PBC- Δ NC (SEQ ID NO. 12). En una realización particular, la proteína uricasa comprende la secuencia

de aminoácidos desde la posición 8 hasta la posición 287 de la secuencia de aminoácidos de Pig-KS-ΔN (SEQ ID NO. 7).

5 En otra realización, la proteína uricasa comprende la secuencia de aminoácidos desde la posición 44 hasta la posición 56 de Pig-KS-ΔN (SEQ ID NO. 14). Esta región de uricasa tiene homología con secuencias dentro del dominio de uricasa de pliegue en túnel (pliegue en T), y dentro tiene una mutación en la posición 46 con respecto a la secuencia de uricasa de cerdo natural. De manera sorprendente, esta mutación no altera significativamente la actividad de uricasa de la proteína.

La uricasa de la invención objeto comprende sustituciones en los aminoácidos 7, 46, y 291, y 301.

10 En realizaciones particulares, la proteína esta codificada por un ácido nucleico que codifica una metionina N-terminal. Preferentemente, la metionina N-terminal está seguida de un codón que permite la eliminación de esta metionina N-terminal mediante metionina aminopeptidasa (MAP) bacteriana. (Ben-Bassat y Bauer (1987) Nature 326:315).

Los aminoácidos que permiten la eliminación más completa de la metionina N-terminal son alanina, glicina, prolina, serina, y treonina.

15 De manera sorprendente, la actividad enzimática de uricasas truncadas, donde, los aminoácidos en o alrededor de las posiciones 7 y/o 46 están sustituidos con treonina, es similar a la de la enzima no truncada. Las sustituciones de aminoácidos comprenden treonina, treonina, lisina, y serina, en las posiciones 7,46, 291, y 301, respectivamente.

20 Las uricasas de mamífero truncadas dadas a conocer en el presente documento pueden comprender adicionalmente una metionina en el extremo amino. El penúltimo aminoácido puede ser uno que permite la eliminación de la metionina N-terminal mediante metionina aminopeptidasa bacteriana (MAP). Los aminoácidos que permiten la eliminación más completa de la metionina N-terminal son alanina, glicina, prolina, serina, y treonina. En una realización particular, la uricasa engloba dos aminoácidos aminoterminales, en la que los dos aminoácidos aminoterminales son una metionina seguida de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, glicina, prolina, serina, y treonina.

En una realización de la invención, la uricasa de mamífero engloba la secuencia de uricasa de hígado porcino, bovino, ovino o de babuino.

25 En una realización de la invención, la uricasa es una uricasa quimérica de dos o más uricasas de mamífero.

En una realización de la invención, las uricasas de mamífero se seleccionan de uricasa de hígado porcino, bovino, ovino o de babuino.

En una realización de la invención, la uricasa comprende la secuencia de SEQ ID NO. 8.

30 La invención objeto proporciona ácidos nucleicos que codifican uricasa que comprenden la secuencia de SEQ ID NO. 10.

La invención objeto proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la uricasa.

La invención objeto proporciona un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos.

En una realización particular, la uricasa está purificada. En realizaciones particulares, la uricasa está aislada y purificada.

35 La invención objeto proporciona una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la invención.

40 La secuencia de ácidos nucleicos se puede producir mediante un procedimiento que comprende modificación por técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una uricasa no truncada. Un experto en la técnica sabe que una secuencia de ácidos nucleicos deseada se prepara mediante PCR a través de cebadores de oligonucleótidos sintéticos, que son complementarios a regiones del ADN diana (uno para cada cadena) que se va a amplificar. Los cebadores se añaden al ADN diana (que no es necesario que sea puro), en presencia de un exceso de desoxirribonucleótidos y Taq polimerasa, una ADN polimerasa estable frente al calor. En una serie (típicamente 30) de ciclos de temperatura, el ADN diana se desnaturaliza repetidamente (alrededor de 90 °C), se fusiona a los cebadores (típicamente a 50-60 °C) y una cadena derivada extendida de los cebadores (72 °C). Puesto que las cadenas derivadas actúan por sí mismas como moldes para ciclos subsiguientes, los fragmentos de ADN que se emparejan a ambos cebadores están amplificados exponencialmente, en vez de linealmente.

La invención objeto proporciona un procedimiento para producir una uricasa de acuerdo con la reivindicación 18 en el presente documento. Por ejemplo, la uricasa se puede preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en la publicación de patente internacional n.º WO 00/08196.

50 La uricasa puede estar aislada y/o purificada mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Los polipéptidos expresados de la presente invención están generalmente aislados en forma sustancialmente

- 5 pura. Preferentemente, los polipéptidos se aíslan hasta una pureza de al menos un 80 % en peso, más preferentemente hasta una pureza de al menos un 95 % en peso, y lo más preferentemente hasta una pureza de al menos un 99 % en peso. En general, tal purificación se puede lograr usando, por ejemplo, las técnicas estándar de fraccionamiento con sulfato de amonio, electroforesis SDS-PAGE y cromatografía de afinidad. La uricasa se aísla preferentemente usando un tensioactivo catiónico, por ejemplo, cloruro de cetilpiridinio (CPC) de acuerdo con el procedimiento descrito en la solicitud de patente de EE. UU. pendiente de trámite presentada el 11 de abril de 2005, que tiene n.º de solicitud 60/670,520 y número de expediente del apoderado 103864.146644, titulada "Purificación de proteínas con tensioactivo catiónico".
- 10 En una realización preferente, la célula huésped se trata a fin de producir la expresión de la uricasa recombinante mutante. Un experto en la técnica sabe que la transfección de células con un vector se consigue habitualmente usando ADN precipitado con iones de calcio, aunque se puede usar una variedad de procedimientos diferentes (por ejemplo, electroporación).
- 15 En una realización de la invención, el vector está bajo el control de un promotor sensible a la presión osmótica. Un promotor es una región de ADN a la que se une la ARN polimerasa antes de iniciar la transcripción de ADN en ARN. Un promotor sensible a la presión osmótica inicia la transcripción como resultado de la presión osmótica incrementada, según se percibe por la célula.
- En una realización de la invención, el promotor es un promotor osmB modificado.
- En realizaciones particulares, la uricasa de la invención es una uricasa conjugada con un polímero.
- 20 En una realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la uricasa. En una realización, la composición es una solución de uricasa. En una realización preferente, la solución es estéril y adecuada para inyección. En una realización, tal composición comprende uricasa como una solución en solución salina tamponada con fosfato. En una realización, la composición se proporciona en un vial, que tiene opcionalmente un tapón de goma de inyección. En realizaciones particulares, la composición comprende uricasa en solución a una concentración de desde 2 hasta 16 miligramos de uricasa por mililitro de solución, desde 4 hasta 12 miligramos por mililitro o desde 6 hasta 10 miligramos por mililitro. En una realización preferente, la composición comprende uricasa a una concentración de 8 miligramos por mililitro. Preferentemente, la masa de uricasa se mide con respecto a la masa de proteínas.
- 25 Las pautas de administración eficaz de las composiciones de la invención se pueden determinar por un experto en la técnica. Los indicadores adecuados para evaluar la eficacia de una pauta dada son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de tales indicadores incluyen normalización o reducción de los niveles de ácido úrico en plasma (PUA) y reducción o mantenimiento de PUA hasta 6,8 mg/dl o menos, preferentemente 6 mg/dl o menos. En una realización preferente, el sujeto que está siendo tratado con la composición de la invención tiene un PUA de 6 mg/ml o menos durante al menos el 70 %, al menos el 80 %, o al menos el 90 % del periodo de tratamiento total. Por ejemplo, durante un periodo de tratamiento de 24 semanas, el sujeto tiene preferentemente un PUA de 6 mg/ml o menos durante al menos el 80 % del periodo de tratamiento de 24 semanas, es decir, durante al menos un tiempo igual a la cantidad de tiempo en 134,4 días (24 semanas x 7 días/semana x 0,8=134,4 días).
- 30 Se pueden administrar de 0,5 a 24 mg de uricasa en solución una vez cada 2 a 4 semanas. La uricasa se puede administrar en cualquier forma apropiada conocida por un experto en la técnica, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía subcutánea. Preferentemente, cuando la administración es intravenosa, se administran de 0,5 mg a 12 mg de uricasa. Preferentemente, cuando la administración es subcutánea, se administran de 4 a 24 mg de uricasa. La uricasa se puede administrar por infusión intravenosa a lo largo de un periodo de 30 a 240 minutos. Se pueden administrar 8mg de uricasa una vez cada dos semanas. Se pueden realizar la infusión usando de 100 a 500 ml de solución salina. Se pueden administrar 8 mg de uricasa en solución a lo largo de un periodo de 120 minutos una vez cada 2 semanas o una vez cada 4 semanas; preferentemente la uricasa se disuelve en 250 ml de solución salina para infusión. Las administraciones de uricasa pueden tener lugar a lo largo de un periodo de tratamiento de 3 meses, 6 meses, 8 meses o 12 meses.
- 35 El periodo de tratamiento puede ser de 12 semanas, 24 semanas, 36 semanas o 48 semanas. El periodo de tratamiento puede ser durante un periodo extendido de tiempo, por ejemplo, 2 años o más largo, durante toda la vida del sujeto que está siendo tratado. Además, se pueden utilizar múltiples periodos de tratamiento intercalados con tiempos de no tratamiento, por ejemplo, 6 meses de tratamiento seguidos de 3 meses sin tratamiento, seguidos de 6 meses adicionales de tratamiento, etc.
- 40 Los compuestos antiinflamatorios se pueden administrar profilácticamente para eliminar o reducir la apariencia de reacciones de infusión debido a la administración de uricasa. Se pueden administrar al menos un corticoesteroide, al menos un antihistamínico, al menos un AINE, o combinaciones de los mismos. Los corticoesteroides útiles incluyen betametasona, budesónida, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona. Los AINE útiles incluyen ibuprofeno, indometacina, naproxeno, aspirina, paracetamol, celecoxib y valdecoxib. Los antihistamínicos útiles incluyen azatadina, bromfeniramina, cetirizina, clorfenamina, clemastina,
- 45
- 50
- 55

ciproheptadina, desloratadina, dexclorfeniramina, dimenhidrinato, difenhidramina, doxilamina, fexofenadina, hidroxizina, loratadina y fenindamina.

5 En una realización preferente, el antihistamínico es fexofenadina, el AINE es paracetamol y el corticoesteroide es hidrocortisona y/o prednisona. Preferentemente, se administra una combinación de los tres (no necesariamente de manera concomitante) antes de la infusión de la solución de uricasa. En una realización preferente, el AINE y antihistamínico se administran por vía oral de 1 a 4 horas antes de la infusión de uricasa. Una dosis adecuada de fexofenadina incluye aproximadamente de 30 a aproximadamente 180 mg, aproximadamente de 40 a aproximadamente 150 mg, aproximadamente de 50 a aproximadamente 120 mg, aproximadamente de 60 a aproximadamente 90 mg, aproximadamente 60 mg, preferentemente 60 mg. Una dosis adecuada de paracetamol incluye aproximadamente de 500 a aproximadamente 1500 mg, aproximadamente de 700 a aproximadamente 1200 mg, aproximadamente de 800 a aproximadamente 1100 mg, aproximadamente de 1000 mg, preferentemente 1000 mg. Una dosis adecuada de hidrocortisona incluye aproximadamente de 100 a aproximadamente 500 mg, aproximadamente de 150 a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 200 mg, preferentemente 200 mg. En una realización, el antihistamínico no es difenhidramina. En otra realización, el AINE no es paracetamol. En una realización preferente, se administran por vía oral 60 mg de fexofenadina la noche anterior a la infusión de uricasa; en la mañana siguiente se administran por vía oral 60 mg de fexofenadina y 1000 mg de paracetamol, y finalmente, se administran 200 mg de hidrocortisona justo antes de la infusión de la solución de uricasa. En una realización, se administra prednisona durante el día, preferentemente por la tarde, antes de la administración de uricasa. Una dosificación apropiada de prednisona incluye de 5 a 50 mg, preferentemente 20 mg. En ciertas realizaciones, se utilizan estos tratamientos profilácticos para eliminar o reducir la aparición de reacciones de infusión para sujetos que reciben o están pendientes de recibir uricasa, incluyendo uricasa PEGilada y uricasa no PEGilada. En realizaciones particulares, se utilizan estos tratamientos profilácticos para sujetos que reciben o están pendientes de recibir péptidos terapéuticos distintos a uricasa, en los que los otros péptidos terapéuticos están PEGilados o no PEGilados.

25 En una realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 20 en el presente documento.

En una realización particular, los conjugados de polímero-uricasa se preparan como se describe en publicación de patente internacional n.º WO 01/59078 y la solicitud de EE. UU. n.º 09/501730 (en la actualidad patente de EE. UU. n.º 6,783,965).

30 En una realización de la invención, el polímero se selecciona del grupo que comprende polietilenglicol, dextrano, polipropilenglicol, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y alcohol polivinílico.

En una realización de la invención, la composición comprende 2-12 moléculas poliméricas en cada subunidad de uricasa, preferentemente de 3 a 10 moléculas poliméricas por subunidad de uricasa.

En una realización de la invención, cada molécula polimérica tiene un peso molecular entre aproximadamente 1 kD y aproximadamente 100 kD.

35 En otra realización de la invención, cada molécula polimérica tiene un peso molecular entre aproximadamente 1 kD y aproximadamente 50 kD. En una realización preferente de la invención, cada molécula polimérica tiene un peso molecular de entre aproximadamente 5 kD y aproximadamente 20 kD, aproximadamente 8 kD y aproximadamente 15 kD, aproximadamente 10 kD y 12 kD, preferentemente aproximadamente 10 kD. En una realización preferente, cada molécula polimérica tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kD o aproximadamente 20 kD. En una realización especialmente preferente de la invención, cada molécula polimérica tiene un peso molecular de 10 kD. También se contemplan mezclas de moléculas de peso diferente. En una realización de la invención, la composición es adecuada para la administración repetida de la composición.

En una realización particular, la conjugación de la uricasa con el polímero engloba enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces de uretano, enlaces de amina secundaria, enlaces de amida.

45 La invención objeto proporciona un uso de una composición de la uricasa de acuerdo con la invención para reducir los niveles de ácido úrico en un fluido biológico.

En una realización de la invención, la composición de uricasa de la invención se usa para reducir ácido úrico en un fluido biológico que comprende sangre.

50 También, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos noveles que codifican polipéptidos de uricasa de la invención. Las manipulaciones que resultan en su producción son bien conocidas para un experto en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos de uricasa se pueden modificar mediante cualquiera de las numerosas estrategias conocidas en la técnica (Maniatis, T., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.º ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). La secuencia se puede escindir en sitios apropiados con endonucleasa(s) de restricción, si se desea seguido de modificación enzimática adicional, y aislar y fijar *in vitro*. Se debe llevar cuidado en la producción del gen que codifica a uricasa para garantizar que el gen modificado permanezca dentro del marco de lectura traslacional apropiado, ininterrumpido por señales de terminación traslacionales. Adicionalmente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica uricasa se puede mutar *in vitro* o *in vivo*, para crear y/o

destruir secuencias de traducción, iniciación y/o terminación, o para crear variaciones en regiones codificantes y/o formar nuevos sitios para endonucleasas de restricción o destruir los preexistentes, para facilitar adicionalmente la modificación *in vitro*. Se puede usar cualquier técnica para mutagénesis conocida en la técnica, incluyendo, pero sin estar limitada a, mutagénesis dirigida a sitio *in vitro* (Hutchinson, C, et ál., 1978, J. Biol. Chem 253:6551), uso de conectores TAB® (Pharmacia), etc.

La secuencia de nucleótidos que codifica una proteína uricasa se puede insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica la proteína insertada. Se pueden utilizar una variedad de sistemas huésped-vector para expresar la secuencia que codifica la proteína. Estos incluyen, pero no están limitados a sistemas de células de mamífero infectadas con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levaduras o bacterias transformadas con ADN bacteriófago, ADN plasmídico, o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de estos vectores varían en sus puntos fuertes y especificidades. Dependiendo del sistema huésped-vector utilizado, se puede usar uno cualquiera de un número de elementos de transcripción y traducción adecuados.

Cualquiera de los procedimientos conocidos para la inserción de fragmentos de ADN en un vector se puede usar para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico que consista en señales de control transcripcionales/traduccionales apropiadas y las secuencias que codifican la proteína. Estos procedimientos pueden incluir técnicas sintéticas y de ADN recombinante *in vitro* y recombinaciones *in vivo* (recombinación genética). La expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína uricasa se puede regular mediante una segunda secuencia de ácidos nucleicos, de modo que la proteína uricasa se expresa en un huésped transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de uricasa se puede controlar mediante cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica. Los promotores que se pueden usar para controlar la expresión de uricasa incluyen, pero no están limitados a, la región del promotor temprano del SV40 (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et ál., 1980, Cell 22:787-797), el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner et ál., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 78:144-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et ál., 1982, Nature 296:39-42); vectores de expresión procarióticos, tales como el promotor de β lactamasa (Villa-Kamaroff, et ál., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 75:3727-3731), el promotor tac (DeBoer, et ál., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80:21-25), y el promotor osmB. En realizaciones particulares, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la uricasa ligada funcionalmente a un promotor heterólogo.

Una vez que se prepara y aísla una molécula de ADN recombinante particular que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica, se pueden usar varios procedimientos conocidos en la técnica para propagarla. Una vez que se establecen un sistema huésped adecuado y condiciones de crecimiento, los vectores de expresión recombinantes se pueden propagar y preparar en cantidad. Como se ha explicado previamente, los vectores de expresión que se pueden usar incluyen, pero no están limitados a, los vectores siguientes o sus derivados: virus humanos o animales tales como virus vaccinia o adenovirus; virus de insectos tales como baculovirus; vectores de levaduras; vectores bacteriófagos (por ejemplo, lambda), y vectores de ADN plasmídico y cosmídico, por nombrar, solo unos pocos.

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. La expresión de ciertos promotores se puede elevar en presencia de ciertos inductores; por lo tanto, se puede controlar la expresión de la proteína uricasa genomanipulada. Lo que es más, células huésped diferentes tienen características y mecanismos específicos para el procesado traduccional y postraduccional y la modificación (por ejemplo, glucosilación, escisión) de proteínas. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesado deseados de la proteína exógena expresada. Diferentes sistemas de expresión vector/huésped pueden afectar a las reacciones de procesado, tales como escisiones proteolíticas en varios grados.

En realizaciones particulares de la invención, la expresión de uricasa in *E. coli* se realiza preferentemente usando vectores que comprenden el promotor osmB.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de gen y plásmido de expresión para la expresión de uricasa

La uricasa porcina recombinante (urato oxidasa), Pig-KS- Δ N (proteína uricasa de cerdo truncada en el extremo amino que reemplaza a los aminoácidos 291 y 301 por lisina y serina, respectivamente) se expresó en la cepa *E. coli* K-12 W3110 F-. Se contruyó una serie de plásmidos que culminaron en pOUR-P- Δ N-ks-1, que, al transformar células huésped de *E. coli*, fue capaz de dirigir una expresión de uricasa eficiente.

Aislamiento y subclonación de ADNc de uricasa a partir de hígado de cerdo y babuino

Los ADNc de uricasa se prepararon a partir de hígados de cerdo y babuino mediante aislamiento y subclonación del ARN pertinente. El ARN celular total se extrajo a partir de hígados de cerdo y babuino (Erlich, H. A. (1989). PCR Technology; Principles and Application for DNA Amplification; Sambrook, J., et ál. (1989). Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, 2.º edición; Ausubel, F. M. et ál. (1998). (Current protocols in molecular Biology), luego se sometió a transcripción inversa usando el kit de síntesis de la primera cadena de ADNc (Pharmacia Biotech). La amplificación por PCR se realizó usando Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Life Technologies).

- 5 Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos usados para la amplificación por PCR de urato oxidasas de cerdo y babuino (uricasa) se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores para amplificación por PCR de ADNc de uricasa

<u>Uricasa de hígado de cerdo:</u>	
sentido	5' ggcgcaattccATGGCTCATTACCGTAATGACTACA 3'
(SEQ ID NO. 1)	
antisentido	5' ggcgctctagaagcttccatggTCACAGCCTTGAAGTCAGC 3'
(SEQ ID NO. 2)	
<u>Uricasa de hígado de babuino (D3H)</u>	
sentido	5' ggcgcaattccATGGCCCACTACCATAACA ACTAT 3'
(SEQ ID NO. 3)	
antisentido	5' ggcgccatggtctagaTCACAGTCTTGAAGACA ACTTCCT 3'
(SEQ ID NO. 4)	

- 10 Las secuencias de enzimas de restricción, introducidas en los límites de los cebadores y mostradas en letras minúsculas en la tabla 1, fueron EcoRI y NcoI (cerdo y babuino) sentido y NcoI, HindIII y XbaI (cerdo), XbaI y NcoI (babuino) antisentido. En el cebador sentido de babuino, el tercer codón GAC (ácido aspártico) presente en la uricasa de babuino se reemplazó por CAC (histidina), el codón que está presente en esta posición en la secuencia codificante del seudogén de urato oxidasas humana. La construcción de uricasa de babuino recombinante generada usando estos cebadores se nombra uricasa de babuino D3H.

- 15 El producto de PCR de uricasa de cerdo se digirió con EcoRI y HindIII y se clonó en pUC18 para crear pUC18-uricasa de cerdo. El producto de PCR de uricasa de babuino D3H se clonó directamente en el vector pCRTMII, usando TA CloningTM (Invitrogen, Carlsbad, CA), creando pCRTMII-uricasa de babuino D3H.

- 20 Se usaron los ADNc fijados para transformar la cepa *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA). El ADN plasmídico que contiene ADNc de uricasa clonado se preparó, y se eligieron y aislaron los clones que poseen las secuencias que codifican ADN de uricasa (salvo por la sustitución D3H en uricasa de babuino, mostrada en la tabla 1). En el clon pCRTMII-uricasa de babuino D3H elegido, las secuencias de pCRTMII estaban al lado del codón de terminación de uricasa, que resulta de la delección de secuencias introducidas mediante PCR. Como consecuencia, se eliminaron los sitios de restricción de XbaI y NcoI a partir de la región sin traducir 3', permitiendo, por lo tanto, una clonación direccional usando NcoI en el límite 5' del producto de PCR y BamHI que deriva del vector pCRTMII.

Subclonación de ADNc de uricasa en vectores de expresión pET

- 25 Subclonación de uricasa de babuino

El ADNc de babuino D3Hc que contiene secuencia codificante de uricasa de longitud completa se introdujo en el vector de expresión pET-3d (Novagen, Madison, WI). El pCRTMII-uricasa de babuino D3H se digirió con NcoI y BamHI, y se aisló el fragmento de 960 pb. El plásmido de expresión pET-3d se digirió con NcoI y BamHI, y se aisló el fragmento de 4600 pb. Los dos fragmentos se fijaron para crear pET-3d-babuino D3H.

- 30 Subclonación de uricasa quimera de cerdo-babuino

- 35 Se construyó la uricasa quimera de cerdo-babuino (PBC) al objeto de ganar expresión, estabilidad, y actividad más altas del gen recombinante. La PBC se construyó aislando el fragmento NcoI-ApaI de 4936 pb del clon pET-3d-babuino D3H y fijando el fragmento aislado al fragmento NcoI-ApaI de 624 pb aislado a partir de pUC18-uricasa de cerdo, dando como resultado la formación de pET-3d-PBC. El ADNc de uricasa PBC consiste en los codones de uricasa de cerdo 1-225 asociados en marco a los codones 226-304 de uricasa de babuino.

Subclonación de uricasa Pig-KS

5 Se construyó la uricasa Pig-KS al objeto de añadir un residuo de lisina, que puede proporcionar un sitio de PEGilación adicional. KS se refiere a la inserción del aminoácido lisina en una uricasa de cerdo, en la posición 291, en el lugar de arginina (R291K). Además, la treonina en la posición 301 se reemplazó por serina (T301S). El plásmido de uricasa PigKS se construyó aislando el fragmento NcoI-NdeI de 4696 pb de pET-3d-babuino D3H, y luego se fijó al fragmento NcoI-NdeI de 864 pb aislado de pUC18-uricasa de cerdo, dando como resultado la formación de pET-3d-PigKS. La secuencia de uricasa PigKS resultante consiste en los codones de uricasa de cerdo 1-288 asociados en marco a los codones 289-304 de uricasa de babuino.

Subclonación de la secuencia de uricasa bajo la regulación del promotor osmB

10 Se subclonó el gen de uricasa en un vector de expresión que contiene el promotor osmB (siguiendo las enseñanzas de la patente de EE. UU.n.º 5,795,776, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad). Este vector permitió la expresión de proteínas en respuesta a la alta presión osmótica o envejecimiento del medio de cultivo. El plásmido de expresión pMFOA-18 contenía el promotor osmB, a una secuencia de sitios de unión a ribosoma (rbs) y una secuencia de terminador transcripcional (ter). Confiere resistencia a ampicilina (AmpR) y expresa la acetilcolina esterasa humana recombinante (AChE).

15

Subclonación de uricasa de babuino D3H

El plásmido pMFOA-18 se digirió con NcoI y BamHI, y se aisló el fragmento grande. La construcción pET-3d-babuino D3H se digirió con NcoI y BamHI y se aisló el fragmento de 960 pb, que incluía el gen de uricasa de babuino D3H. Estos dos fragmentos se fijaron para crear pMFOU18.

20 El plásmido de expresión pMFXT133 contenía el promotor osmB, un rbs (operón deo de *E. coli*), ter (*E. coli* TrypA), el polipéptido inhibidor del factor recombinante Xa (FxaI), y confería el gen de resistencia a tetraciclina (TetR). El gen de uricasa de babuino se insertó en este plásmido al objeto de intercambiar los genes con resistencia a antibióticos. El plásmido pMFOU18 se digirió con NcoI, se rellenó, luego se digirió con XhoI, y se aisló un fragmento de 1030 pb. El plásmido pMFXT133 se digirió con NdeI, se rellenó, luego se digirió con XhoI, y se aisló un fragmento grande. Los dos fragmentos se fijaron para crear el vector de expresión de uricasa de babuino, pURBA16.

25

Subclonación de la uricasa quimera de cerdo-babuino

30 El plásmido pURBA16 se digirió con ApaI y AlwNI, y se aisló el fragmento de 2320 pb. El plásmido pMFXT133 se digirió con NdeI, se rellenó, luego se digirió con AlwNI, y se aisló el fragmento de 620 pb. La construcción pET-3d-PBC se digirió con XbaI, se rellenó, luego se digirió con ApaI, y se aisló el fragmento de 710 pb. Los tres fragmentos se fijaron para crear pUR-PB, un plásmido que expresó uricasa PBC bajo el control del promotor osmB y rbs, así como rbs T7, que derivó del vector pET-3d.

35 Se cortó el rbs T7 en una etapa adicional. pUR-PB se digirió con NcoI, se rellenó, luego se digirió con AlwNI, y se aisló el fragmento de 3000 pb. El plásmido pMFXT133 se digirió con NdeI, se rellenó y luego se digirió con AlwNI, y se aisló el fragmento de 620 pb. Los dos fragmentos se fijaron para formar pDUR-PB, que expresa PBC bajo el control del promotor osmB.

Construcción de pOUR-PB-ΔNC

40 Se introdujeron varios cambios en el ADNc de uricasa, que dieron como resultado un incremento sustancial de la estabilidad de la enzima recombinante. Se construyó el plásmido pOUR-PBC-ΔNC, en el que se eliminaron el péptido de maduración con seis residuos N-terminales y el tripéptido en el extremo C, que funcionan *in vivo* como señales diana peroxisomales. Esto se llevó a cabo utilizando la secuencia de PBC en el plásmido pDUR-PB los cebadores de oligonucleótidos específicos enumerados en la tabla 2, usando amplificación por PCR.

Tabla 2. Cebadores para amplificación por PCR de uricasa PBC-ΔNC

Uricasa PBC-ΔNC
Sentido
5' gcgcat ATGACTTACAAAAAGAATGATGAGGTAGAG 3' (SEQ ID NO. 5)
Antisentido
5' ccgtctaga TTAAGACA ACTTCCTCTTGACTGTACCAGTAATTTTCCGTATGG 3'
(SEQ ID NO. 6)

En la tabla 2, las secuencias de enzimas de restricción introducidas en los límites de los cebadores se muestran en negrita y las regiones no codificantes se muestran en letras minúsculas. NdeI es sentido y XbaI es antisentido. El cebador antisentido también se usó para eliminar un sitio de NdeI interno introduciendo una mutación puntual (subrayada) que no afectó a la secuencia de aminoácidos, y, por lo tanto, facilitó la subclonación usando NdeI.

5 El fragmento de 900 pares de bases generado por amplificación por PCR de pDUR-PB se escindió con NdeI y XbaI y se aisló. El fragmento obtenido luego se insertó en un plásmido de expresión deo pDBAST-RAT-N, que alberga el promotor PIP2 deo y rbs derivados de *E. coli* y de manera constitutiva expresa precursor de insulina humana recombinante. El plásmido se digirió con NdeI y XbaI y el fragmento de 4035 pb se aisló y fijó al producto de PCR de uricasa PBC. La construcción resultante, pDUR-PB- Δ NC, se usó para transformar *E. coli* K-12 ϕ 733 (F- cytR strA) que
10 expresó un alto nivel de uricasa truncada activa.

La secuencia de PBC- Δ NC truncada doblemente también se expresó bajo el control del promotor osmB. El plásmido pDUR-PB- Δ NC se digirió con AlwNI-NdeI, y se aisló el fragmento de 3459 pb. El plásmido pMFXT133, descrito anteriormente, se digirió con NdeI-AlwNI, y se aisló el fragmento de 660 pb. Los fragmentos se fijaron luego para crear pOUR-PB- pOUR NC, que se introdujo en cepa *E. coli* K-12 W3110 F' y expresó un alto nivel de uricasa truncada
15 activa.

Construcción del plásmido de expresión de uricasa pOUR-P- Δ N-ks-1

Este plásmido se construyó al objeto de mejorar la actividad y estabilidad de la enzima recombinante. La uricasa Pig-KS- Δ N solo se truncó en el extremo N (Δ N), donde se ha eliminado el péptido de maduración con seis residuos N-terminales, y contenía las mutaciones S46T, R291K y T301S. En la posición 46, había un residuo de treonina en
20 lugar de serina debido a una mutación conservadora que se produjo durante la amplificación por PCR y clonación. En la posición 291, lisina reemplazó arginina, y en la posición 301, se insertó serina en lugar de treonina. Ambas derivaron de la secuencia de uricasa de babuino. Las modificaciones de R291K y T301S se designan como KS, y se analizan anteriormente. El residuo de lisina añadido proporcionó un sitio de PEGilación potencial adicional.

Para construir pOUR-P- Δ N-ks-1 (Figura 1), el plásmido pOUR-PB- Δ NC se digirió con ApaI-XbaI, y se aisló el fragmento
25 de 3873 pb. El plásmido pET-3d-PKS (construcción mostrada en la figura 4) se digirió con ApaI-SpeI, y se aisló el fragmento de 270 pb. La escisión con SpeI dejó una extensión 5' CTAG que se fijó eficientemente a fragmentos de ADN generados por XbaI. Los dos fragmentos se fijaron para crear pOUR-P- Δ N-ks-1. Después de la fijación, se perdieron los sitios de reconocimiento SpeI y XbaI (su sitio está mostrado entre paréntesis en la figura 9). La construcción pOUR-P- Δ N-ks-1 se introdujo en una cepa de *E. coli* K-12 W3110 F", fototrópica, ATCC n.º 27325. La uricasa Pig-KS- Δ N resultante, expresada bajo el control del promotor osmB, produjo altos niveles de enzima recombinante que tiene actividad y estabilidad superiores.
30

La figura 1 ilustra la estructura de plásmido pOUR-P- Δ N-ks-1. Los números al lado de sitios de restricción indican la posición nucleotídica, relativa al sitio Haell, designado como 1; los sitios de restricción que se perdieron durante la clonación aparecen señalados entre paréntesis. EL plásmido pOUR-P- Δ N-ks-1, que codifica uricasa Pig-KS- Δ N es de
35 4143 pares de bases (pb) de largo y comprende los siguientes elementos:

1. Un fragmento de ADN, de 113 pb de largo, que se extiende desde el nucleótido número 1 al sitio NdeI (en la posición 113), que incluye el promotor osmB y el sitio de unión a ribosoma (rbs).
2. Un fragmento de ADN, de 932 pb de largo, que se extiende desde NdeI (en la posición 113) hasta la intersección SpeI/XbaI (en la posición 1045), que incluye: 900 pb de la región codificante de Pig-KS- Δ N' (secuencia de ácidos nucleicos de la proteína uricasa de cerdo truncada en el extremo amino en la que se reemplazan los aminoácidos 291 y 301 por lisina y serina, respectivamente) y la secuencia flanqueante de 32 pb derivada de pCR™ II, desde el sitio de clonación TA en dirección 5' hasta el sitio de restricción SpeI/XbaI.
3. Una secuencia de sitios de clonación múltiples (MCS) de 25 pb desde la intersección SpeI/XbaI (en la posición 1045) hasta HindIII (en la posición 1070).
- 45 4. Un oligonucleótido de 40 pb sintético que contiene el terminador transcripcional TrpA (ter) con los límites HindIII (en la posición 1070) y AatII (en la posición 1110).
5. Un fragmento de ADN, de 1519 pb de largo que se extiende desde AatII (en la posición 1110) hasta los sitios MscI/Scal (en la posición 2629) en pBR322 que incluye el gen con resistencia a tetraciclina (TetR).
- 50 6. Un fragmento de ADN, de 1514 pb de largo, que se extiende desde los sitios Seal (en la posición 2629) hasta Haell (en la posición 4143) en pBR322 que incluye el origen de replicación del ADN.

La figura 2 muestra el ADN y las secuencias de aminoácidos deducidas de uricasa Pig-KS- Δ N. En esta figura, la numeración de aminoácidos es de acuerdo con la secuencia de uricasa de cerdo completa. Tras el residuo de metionina iniciador, se insertó una treonina en el lugar del ácido aspártico de la secuencia de uricasa de cerdo. Este residuo de treonina permitió la eliminación de metionina mediante aminopeptidasa bacteriana. El hueco en la secuencia de aminoácidos ilustra el péptido de maduración N-terminal delecionado. Se indican los sitios de restricción
55

que se usaron para las diversas etapas de subclonación de las diferentes secuencias de uricasa (Apal, NdeI, BamHI, EcoRI y SpeI). La secuencia sin traducir 3', mostrada en letras minúsculas, derivó de la secuencia de pCR™II. El codón de terminación de la traducción se indica mediante un asterisco.

5 La figura 3 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de las diversas secuencias de uricasa recombinante. La línea superior representa la uricasa de cerdo, que incluía la secuencia de aminoácidos completa. La segunda línea es la secuencia de la uricasa quimera de cerdo-babuino (PBC-ΔNC) truncada doblemente. La tercera línea muestra la secuencia de uricasa Pig-KS-ΔN, que solo está truncada en el extremo N y contenía las mutaciones S46T y los cambios en los aminoácidos R291K y T301S, reflejando ambos el origen de babuino del extremo carboxílico de la secuencia codificante de uricasa. Los asteriscos indican las posiciones en las que hay diferencias en aminoácidos en la Pig-KS-ΔN en comparación con la secuencia de uricasa de cerdo publicada; los círculos indican las posiciones en las que hay diferencias en aminoácidos en la Pig-KS-ΔN en comparación con PBC-ΔN, la quimera de cerdo-babuino; y las líneas discontinuas indican la delección de aminoácidos.

15 El ADNc para uricasa natural de babuino, cerdo y conejo con la mutación Y97H, y la quimera de cerdo/babuino (PBC), se construyeron para la clonación en *E. coli*. Los clones que expresan altos niveles de las variantes de uricasa se construyeron y seleccionaron de tal modo que todos son *E. coli* W3110 F, y la expresión se regula mediante osmB. Se aislaron los ADN plasmídicos, se verificaron mediante secuenciación de ADN y análisis mediante enzima de restricción, y se cultivaron las células.

20 La construcción de las uricasas truncadas, incluyendo pig-ΔN y Pig-KS-ΔN se hizo mediante fijación cruzada entre PBC-ΔNC y Pig-KS, tras escisión con las endonucleasas de restricción Apal y XbaI, y Apal más SpeI, respectivamente. Es lógico que estos mutantes truncados retengan la actividad, puesto que los seis residuos N-terminales, el "péptido de maduración" (1-2), y el tripéptido C-terminal, "señal diana peroxisomal" (3-5), no tienen funciones que afectan significativamente a la actividad enzimática, y es posible que estas secuencias puedan ser inmunogénicas. Se seleccionaron los clones que expresan muy altos niveles de variantes de uricasa.

Ejemplo 2. Transformación del plásmido de expresión en una célula huésped bacteriana

25 El plásmido de expresión, pOUR-P-ΔN-ks-1, se introdujo en una cepa *E. coli* K-12 W3110 F. Las células bacterianas que se prepararon para la transformación, implicaron hacerlas crecer hasta la fase semilogarítmica en caldo Luria (LB), luego las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron en agua fría y suspendieron en glicerol, al 10 %, en agua, a una concentración de aproximadamente 3×10^{10} células por ml. Las células se almacenaron en partes alícuotas, a -70 °C. El ADN plasmídico se precipitó en etanol y se disolvió en agua.

30 Las células bacterianas y ADN plasmídico se mezclaron, y la transformación se hizo mediante el procedimiento de electroporación de alto voltaje usando Gene Pulser II de BIO-RAD (Trevors et ál. (1992). La electrotransformación de bacterias mediante ADN plasmídico, en Guide to Electroporation and Electrofusion (D.C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders and A. E. Sowers, eds.), pp. 265-290, Academic Press Inc., San Diego, Hanahan et ál. (1991) Meth. Enzymol., 204, 63-113). Las células transformadas se suspendieron en medio SOC (triptona al 2 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM), se incubaron a 37 °C durante 1 hora y se seleccionaron frente a su resistencia a tetraciclina. Se seleccionó un clon alta expresividad.

Ejemplo 3. Preparación de uricasa recombinante

Las bacterias, tales como las transformadas (véase anteriormente) se cultivaron en medio que contenía glucosa; se mantuvo el pH a $7,2 \pm 0,2$, a aproximadamente 37 °C.

40 Hacia las últimas 5-6 horas de cultivo, se complementó el medio con KCl hasta una concentración final de 0,3 M. Se prolongó el cultivo para permitir la acumulación de uricasa.

La uricasa recombinante se acumuló dentro de las células bacterianas como un precipitado insoluble similar a los cuerpos de inclusión (IB). La suspensión celular se lavó mediante centrifugación y se suspendió en tampón Tris 50 mM, pH 8,0 y EDTA 10 mM y se llevó hasta un volumen final de aproximadamente 40 veces el peso celular seco.

45 Los IB que contienen uricasa recombinante se aislaron mediante centrifugación tras la disociación de las células bacterianas usando lisocima y presión alta. El tratamiento con lisocima (2000-3000 unidades/ml) se hizo durante 16-20 horas a pH 8,0 y 7 ± 3 °C, mientras se mezclaba. El sedimento se lavó con agua y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

50 Los IB enriquecidos se procesaron adicionalmente después de suspensión en tampón de NaHCO₃ 50 mM, pH 10,3+0,1. La suspensión se incubó durante la noche, a temperatura ambiente, para permitir una solubilización de la uricasa derivada de IB, y posteriormente se clarificó mediante centrifugación.

55 La uricasa se purificó adicionalmente mediante varias etapas cromatográficas. Inicialmente, la cromatografía se hizo sobre una columna Q-Sepharose FF. La columna cargada se lavó con tampón bicarbonato que contenía NaCl 150 mM, y la uricasa se eluyó con tampón bicarbonato, que contenía NaCl 250 mM. Luego se usó resina xantina-agarosa (Sigma) para eliminar impurezas secundarias de la preparación de uricasa. El eluato de Q-Sepharose

FF se diluyó con tampón glicina 50 mM, pH 10,3±0,1, hasta una concentración proteica de aproximadamente 0,25 mg/ml y se cargó. La columna se lavó con tampón bicarbonato, pH 10,3±0,1, que contenía NaCl 100 mM, y la uricasa se eluyó con el mismo tampón complementado con xantina 60 µM. En esta etapa, la uricasa se volvió a purificar mediante cromatografía Q-Sepharose para eliminar las formas agregadas.

- 5 La pureza de cada preparación de uricasa es mayor de un 95 %, determinada mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se detectan menos de un 0,5 % de las formas agregadas en cada preparación usando una columna Superdex.

La tabla 3 resume la purificación de uricasa Pig-KSΔN a partir de los IB derivados del caldo de fermentación de 25 l.

Tabla 3. Purificación de uricasa Pig-KSΔN

Etapa de purificación	Proteína (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)
Disolución de IB	12 748	47 226	3,7
Solución clarificada	11 045	44 858	4,1
Reserva principal de Q-Sepharose I	7 590	32 316	4,3
Reserva principal de xantina agarosa	4 860	26 361	5,4
Reserva principal de Q-Sepahrose II	4 438	22 982	5,2
Retenido de UF de 30 kD	4 262	27 556	6,5

10

Ejemplo 4. Características de las uricasas recombinantes

SDS-PAGE

15 El análisis SDS-PAGE de las variantes de uricasa altamente purificadas (figura 4) reveló un patrón bastante característico. Las muestras se almacenaron a 4 °C, en tampón carbonato, pH 10,3, durante unos meses. Las variantes de longitud completa, Pig, Pig-KS, y PBC, muestran acumulación de dos productos de degradación predominantes que tienen pesos moleculares de aproximadamente 20 y 15 kD. Esta observación sugiere que al menos una única muesca rompe la molécula de subunidad de uricasa. Se detecta un patrón de degradación diferente en los clones acortados aminoterminales y también en la uricasa de conejo, pero en una proporción más baja. El extremo amino del conejo se asemeja al de los clones acortados. Se determinaron las secuencias aminoterminales de los fragmentos de uricasa generados durante la purificación y almacenamiento.

20

Secuenciación peptídica

25 La secuenciación N-terminal de las preparaciones de uricasa en masa se hizo usando el procedimiento de degradación de Edman. Se realizaron diez ciclos. La uricasa de cerdo recombinante (clon de longitud completa) generó una mayor abundancia de fragmentos de degradación en comparación con Pig-KS-ΔN. Los sitios de escisión deducidos que conducen a los fragmentos de degradación son como sigue:

25

- 1) Sitio predominante en la posición 168 que tiene la secuencia:

--QSG ↓ FEGFI--

- 2) Sitio secundario en la posición 142 que tiene la secuencia:

--IRN ↓- GPPVI--

30 Las secuencias anteriores no sugieren ninguna escisión proteolítica conocida. No obstante, la escisión podría surgir a partir de tanto proteólisis como de alguna reacción química. De manera sorprendente, las uricasas truncadas en el extremo amino son más estables que las uricasas no truncadas en el extremo amino. PBC-ΔNC también tenía una estabilidad similar a las otras moléculas ΔN y menos de PBC no truncada en el extremo amino.

30

Potencia

35 La actividad de uricasa se midió mediante un procedimiento por UV. La tasa de reacción enzimática se determinó midiendo la disminución en absorbancia a 292 nm que resulta de la oxidación de ácido úrico en alantoina. Una unidad de actividad se define como la cantidad de uricasa requerida para oxidar un µmol de ácido úrico por minuto, a 25 °C, en las condiciones específicas. La potencia de uricasa se expresa en unidades de actividad por mg de proteína (U/mg).

35

El coeficiente de extinción de ácido úrico 1 mM a 292 nm es $12,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por lo tanto, la oxidación de 1 μmol de ácido úrico por ml de mezcla de reacción dio como resultado una disminución en absorbancia de $12,2 \text{ mA}_{292}$. El cambio en absorbancia con el tiempo (AA_{292} por minuto) derivó de la porción lineal de la curva

5 La concentración proteica se determinó usando un procedimiento de Bradford modificado (Macart and Gerbaut (1982) Clin Chim Acta 122:93-101). La actividad específica (potencia) de uricasa se calculó dividiendo la actividad en U/ml con la concentración proteica en mg/ml. Los resultados de la actividad enzimática de las diversas uricasas recombinantes se suman en la tabla 4. En esta tabla, se incluyen los resultados de preparaciones comerciales como valores de referencia. A partir de estos resultados, es aparente que el truncamiento de proteínas uricasas no tiene un efecto significativo sobre su actividad enzimática.

10 Tabla 4. Sumario de los parámetros cinéticos de uricasas naturales y recombinantes

Uricasas	Concentración ⁽¹⁾ de solución madre (mg/ml)	Actividad específica (U/mg) ⁽²⁾	Km ⁽⁴⁾ (μM de ácido úrico)	Kcat ⁽⁵⁾ (l/min)
Recombinantes				
Cerdo	0,49	7,41	4,39	905
Pig- ΔN	0,54	7,68	4,04	822
Pig-KS	0,33	7,16	5,27	1085
Pig-KS- ΔN	1,14	6,20	3,98	972
PBC	0,76	3,86	4,87	662
PBC- ΔNC	0,55	3,85	4,3	580
Conejo	0,44	3,07	4,14	522
Natural				
Cerdo (Sigma)	2,70	3,26 ⁽³⁾	5,85	901
A. flavus (Merck)	1,95	0,97 ⁽³⁾	23,54	671

Anotaciones de la tabla 4:

(1) La concentración proteica se determinó mediante absorbancia medida a 278 nm, usando un coeficiente de extinción de 11,3 para una solución de uricasa de 10 mg/ml (Mahler, 1963).

15 (2) 1 unidad de actividad de uricasa se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de ácido úrico en alantoína por minuto, a 25 °C.

(3) Los valores de actividad específica derivaron de los diagramas de Lineweaver-Burk, a una concentración de sustrato equivalente a 60 μM .

(4) Las mezclas de reacción estuvieron compuestas por diversas combinaciones de las soluciones madre siguientes

20 tampón borato de sodio 100 mM, pH 9,2

ácido úrico 300 μM en tampón borato de sodio 50 mM, pH 9,2

1 mg/ml de BSA en tampón borato de sodio 50 mM, pH 9,2

25 (5) K_{cat} se calculó dividiendo el V_{max} (calculado a partir de los diagramas de Lineweaver-Burk respectivos) mediante la concentración de uricasa en mezcla de reacción (expresada en equivalentes molares, basada en los pesos moleculares tetraméricos de las uricasas).

Ejemplo 5. Conjugación de uricasa con m-PEG (PEGilación)

30 La uricasa Pig-KS- ΔN se conjugó usando m-PEG-NPC (monometoxi-poli(etilenglicol)-carbonato de nitrofenilo). Se establecieron las condiciones que dieron como resultado 2-12 cadenas de PEG de 5, 10, o 20 kD por subunidad de uricasa. Se añadió gradualmente m-PEG-NPC a la solución proteica. Después de que concluyó la adición de PEG, la mezcla de reacción de uricasa/m-PEG-NPC se incubó luego a 2-8 °C durante 16-18 horas, hasta que el número máximo de cadenas de m-PEG no unidas se conjugaron a uricasa.

El número de cadenas de PEG por monómero de PEG-uricasa se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) Superose 6, usando patrones de PEG y uricasa. El número de cadenas unidas de PEG por subunidad se determinó mediante la ecuación siguiente:

$$\text{PEG cadenas/subunidad} = \frac{3,42 \times \text{cantidad de PEG en muestra inyectada } (\mu\text{g})}{\text{Cantidad de proteínas en muestra inyectada } (\mu\text{g})}$$

5 La concentración de PEG y restos proteínicos en la muestra de PEG-uricasa se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando detectores de índice de refracción (PJ) y ultravioleta (UV) dispuestos en serie (desarrollados por Kunitani, et ál., 1991). Se generan tres curvas de calibración: una curva de proteínas (absorción medida a 220 nm); una curva de proteínas (medida mediante RI); y curva PEG (medida mediante RI). Luego, se analizaron las muestras de PEG-uricasa usando el mismo sistema. Los valores resultantes del área de pico de UV y RI
10 de las mezclas de experimentación se usaron para calcular las concentraciones del PEG y proteína relativos a las curvas de calibración. El índice de 3,42 es la proporción entre el peso molecular de monómero de uricasa (34 192 daltons) con respecto al PEG de 10 kD.

El PEG enlazado mejoró la solubilidad de uricasa en soluciones que tienen valores de pH fisiológico. La tabla 5 proporciona una indicación de la variabilidad entre lotes de producto de uricasa Pig-KS-ΔN PEGilada. En general, hay
15 una relación inversa entre el número de cadenas de PEG enlazadas y la actividad específica retenida (AE) de la enzima.

Tabla 5. Actividad enzimática de conjugados de uricasa Pig-KS-ΔN PEGilada

Lotes de conjugados	PM de PEG (kD)	Cadenas de PEG por subunidad de uricasa	AE de uricasa (U/mg)	Porcentaje de AE de control
ΔN-Pig-KS	-	-	8,2	100
1-17 n.º	5	9,7	5,8	70,4
LP-17	10	2,3	7,8	94,6
1-15 n.º	10	5,1	6,4	77,9
13 n.º	10	6,4	6,3	76,9
14 n.º	10	6,5	6,4	77,5
5-15 n.º	10	8,8	5,4	65,3
5-17 n.º	10	11,3	4,5	55,3
4-17 n.º	10	11,8	4,4	53,9
1-18 n.º	20	11,5	4,5	54,4

Ejemplo 6. PEGilación de uricasa con PEG de 1000 D y 100 000 D

20 La uricasa Pig-KS-ΔN se conjugó usando m-PEG-NPC de 1000 D y 100 000 D, como se describe en el ejemplo 5. Se usaron las condiciones que dan como resultado 2-11 cadenas de PEG por subunidad de uricasa. Después de que concluyó la adición de PEG, la mezcla de reacción de uricasa/m-PEG-NPC se incubó luego a 2-8 °C durante 16-18 horas, hasta que el número máximo de cadenas de m-PEG no unidas se conjugaron a uricasa.

El número de cadenas de PEG por monómero de PEG-uricasa se determinó como se describe anteriormente.

25 El PEG enlazado mejoró la solubilidad de uricasa en soluciones que tienen valores de pH fisiológico.

Ejemplo 7. Farmacocinética de uricasa Pig-KS-ΔN conjugada con PEG

Los experimentos biológicos se realizaron al objeto de determinar el grado y tamaño óptimos de PEGilación necesarios para proporcionar un beneficio terapéutico.

30 Los estudios farmacocinéticos en ratas, usando inyecciones i.v. de 0,4 mg (2U) por kg peso corporal de uricasa no modificada, administrada en el día 1 y día 8, produjo una semivida de circulación de aproximadamente 10 minutos. Sin embargo, los estudios de la tasa de desaparición en ratas con 2-11x10 kD de PEG-uricasa Pig-KS-ΔN, después de tantas inyecciones como 9 inyecciones semanales, indicaron que la desaparición no dependía del número de cadenas de PEG (dentro de este intervalo) y permaneció relativamente constante a lo largo del periodo de estudio (véase la tabla 6; con a una semivida de aproximadamente 30 horas). Las diferencias semana a semana están dentro del error
35 experimental. Este mismo patrón es aparente después de nueve inyecciones de los conjugados de 10x5 kD de PEG, y

10x20 kD de PEG-uricasa. Los resultados indicaron que, independientemente del grado de PEGilación de uricasa, en este intervalo, se observaron efectos biológicos similares en el modelo de rata.

Tabla 6. Semividas de preparaciones de uricasa Pig-KS-ΔN PEGilada en ratas

Semana	Grados de modificación (cadenas de PEG por subunidad de uricasa)						
	PEG de 5 kD	PEG de 10 kD					PEG de 20 kD
	10x	2x	5x	7x	9x	11x	10x
1	25,7±1,7 (5)	29,4±3,4 (5)	37,7±3,1 (5)	37,6±3,9 (5)	36,9±4,3 (5)	31,4±4,3 (5)	21,6±1,5 (5)
2	-	-	-	26,7±3,0(5)	28,4±1,6 (5)		
3	27,5±3,8 (5)	29,0±2,6 (5)	29,9±11,7 (5)	32,7±11,1 (5)	26,3±4,7 (5)	11,8±3,3 (5)	14,5±2,7 (5)
4			27,1±5,3 (5)	18,4±2,2 (4)	19,7±5,6 (4)		
5	28,6±1,7 (5)	22,5±2,7 (5)	34,3±3,9 (4)	37,3±3,0 (5)	30,4±3,6 (5)	30,5±1,3 (5)	19,3±2,5 (5)
6			35,4±3,1 (14)	27,1±3,6 (13)	30,7±2,9 (13)		
7	16,5 ±4,9 (5)	32,5 ±4,3 (5)	-	-	-	16,12±2,7 (5)	25,8±2,5 (5)
8	-	-	-	-	-	-	-
9	36,8±4,0 (15)	28,7±2,7 (15)	34,0±2,4 (13)	24,2±3,4 (13)	31,0±2,6 (13)	29,3±1,4 (15)	26,7±0,5 (15)

5 Anotaciones de la tabla 6: Los resultados se indican en horas±error estándar de la media. Los números entre paréntesis indican el número de animales sometidos a prueba.

10 Las ratas recibieron semanalmente inyecciones i.v. de 0,4 mg por kilogramo de peso corporal de uricasa Pig-KS-ΔN modificada como se indica en la tabla. Cada grupo inicialmente comprendía 15 ratas, de las que se extrajo sangre de forma alternativa en subgrupos de 5. Varias ratas murieron durante el estudio debido a la anestesia. Se determinaron las semividas midiendo la actividad de uricasa (ensayo colorimétrico) en muestras de plasma obtenidas a los 5 minutos, y 6, 24 y 48 horas después de la inyección.

La tabla 5 describe los lotes de uricasa PEGilada usados en el estudio.

15 Los estudios de biodisponibilidad con 6x5 kD de PEG-uricasa Pig-KS-ΔN en conejos indican que, después de la primera inyección, la semivida en circulación es 98,2±1,8 horas (i.v.), y la biodisponibilidad después de las inyecciones i.m. y subcutánea (s.c.) fue de un 71 % y un 52 %, respectivamente. Sin embargo, se detectaron valores de anticuerpos anti-uricasa significativos después de las segundas inyecciones i.m. y s.c., en todos los conejos, y se aceleró la desaparición tras las inyecciones subsiguientes. Las inyecciones de ratas con el mismo conjugado dieron como resultado una semivida de 26±1,6 horas (i.v.), y la biodisponibilidad después de las inyecciones i.m. y s.c. fue de un 33 % y un 22 %, respectivamente.

20 Los estudios en ratas, con 9x10 kD de PEG- uricasa Pig-KS-ΔN indican que la semivida en circulación después de la primera inyección es 42,4 horas (i.v.), y la biodisponibilidad, después de las inyecciones i.m. y s.c., fue de un 28,9 % y

un 14,5 %, respectivamente (véase la figura 5 y tabla 7). Después de la cuarta inyección, la semivida en circulación fue 32,1±2,4 horas y la biodisponibilidad, después de las inyecciones i.m. y s.c. fue de un 26,1 % y un 14,9 %, respectivamente.

- 5 Los estudios farmacocinéticos similares en conejos, con 9x10 kD de PEG-uricasa Pig-KS-ΔN, indican que no se observó desaparición acelerada tras la inyección de este conjugado (se administraron 4 inyecciones bisemanales). En estos animales, la semivida en circulación después de la primera inyección fue 88,5 horas (i.v.), y la biodisponibilidad, después de las inyecciones i.m. y s.c., fue de un 98,3 % y un 84,4 %, respectivamente (véase la figura 6 y tabla 7). Después de la cuarta inyección, la semivida en circulación fue 141,1±15,4 horas y la biodisponibilidad, después de las inyecciones i.m. y s.c. fue de un 85 % y un 83 %, respectivamente.
- 10 Se hicieron estudios similares con 9x10 kD de PEG-Pig-KS-ΔN para evaluar la biodisponibilidad en beagles (2 machos y 2 hembras en cada grupo). Se registró una semivida en circulación de 70±11,7 horas después de la primera inyección i.v., y la biodisponibilidad, después de las inyecciones i.m. y s.c. fue de un 69,5 % y un 50,4 %, respectivamente (véase la figura 7 y tabla 7).
- 15 Los estudios con las preparaciones de 9x10 kD de PEG-Pig-KS-ΔN se hicieron usando cerdos. Se usaron tres animales por grupo para la administración a través de las rutas i.v., s.c. e i.m. Se registró una semivida en circulación de 178±24 horas después de la primera inyección i.v., y la biodisponibilidad, después de las inyecciones i.m. y s.c. fue de un 71,6 % y un 76,8 %, respectivamente (véase la figura 8 y tabla 7).

Tabla 7. Estudios farmacocinéticos con 9x10 kD de PEG-uricasa Pig-KS-ΔN

Inyección n.º	Semivida (horas)	Biodisponibilidad	
		i.v.	i.m.
Ratas			
1	42,4±4,3	28,9 %	14,5 %
2	24,1±5,0	28,9 %	14,5 %
4	32,1±2,4	26,1 %	14,9 %
Conejos			
1	88,5±8,9	98,3 %	84,4 %
2	45,7±40,6	100 %	100 %
4	141,1±15,4	85 %>	83 %
Perros			
1	70,0±11,7	69,5 %	50,4 %
Cerdos			
1	178±24	71,6 %	76,8 %

- 20 Los estudios de absorción, distribución, metabolismo, y excreción (ADME) se hicieron después de yodinación de 9x10 kD de PEG-uricasa Pig-KS-ΔN mediante el procedimiento de Bolton & Hunter con ¹²⁵I. El conjugado marcado se inyectó en 7 grupos de 4 ratas cada uno (2 machos y 2 hembras). Se analizó la distribución de radioactividad después de 1 hora y cada 24 horas durante 7 días (excepto el día 5). Cada grupo, a su vez, se sacrificó y se extirparon y analizaron los diferentes órganos. El séptimo grupo se mantuvo en jaulas metabólicas, a partir de la que se obtuvieron la orina y heces. La distribución del material a través del cuerpo del animal se evaluó midiendo radioactividad total en cada órgano, y la fracción de recuentos (riñón, hígado, pulmón, y bazo) que estaban disponibles para la precipitación con TCA (es decir, unión a proteína, normalizada al tamaño del órgano). De los órganos que se extirparon, ninguno tenía una radioactividad específica más alta que los otros, por lo tanto, no se vio acumulación significativa, por ejemplo, en el hígado o riñón. Un 70 % de la radioactividad se excretó en el día 7.
- 25
- 30 **Ejemplo 8. Resultados de los ensayos clínicos**
- Se realizó un estudio aleatorio multicentro en abierto con grupos paralelos para evaluar la respuesta de urato, y los perfiles farmacocinéticos y de seguridad de PEG-uricasa (Puricase®, Savient Pharmaceuticals) en pacientes humanos con hiperuricemia y gota aguda que fueron resistentes o intolerantes al tratamiento convencional. La duración media de la enfermedad fue de 14 años y un 70 por ciento de la población de estudio tuvo uno o más tofos.
- 35 En el estudio, 41 pacientes (edad media de 58,1 años) se distribuyeron aleatoriamente en 12 semanas de tratamiento con PEG-uricasa intravenosa en una de cuatro pautas de dosificación: 4 mg cada dos semanas (7 pacientes); 8 mg cada dos semanas (8 pacientes); 8 mg cada cuatro semanas (13 pacientes); o 12 mg cada cuatro semanas (13 pacientes). La actividad de uricasa en plasma y los niveles de urato se midieron en intervalos definidos. Los

parámetros farmacocinéticos, la concentración media de urato en plasma y el porcentaje de tiempo que el urato en plasma fue menos de o igual a 6 mg/dl se derivaron de los análisis de las actividades de uricasa y niveles de urato.

5 Los pacientes que recibieron 8 mg de PEG-uricasa cada dos semanas tuvieron la mayor reducción en PUA con niveles por debajo de 6 mg/dl, un 92 por ciento del tiempo de tratamiento (urato en plasma previo al tratamiento de 9,1 mg/dl versus urato en plasma medio de 1,4 mg/dl a lo largo de 12 semanas).

10 También se observaron niveles de urato en plasma sustancial y sostenidamente más bajos en los otros grupos de dosificación con tratamiento de PEG-uricasa: PUA por debajo de 6 mg/ml, 86 por ciento del tiempo de tratamiento en el grupo de 8 mg cada cuatro semanas (urato en plasma previo al tratamiento de 9,1 mg/dl versus urato en plasma medio de 2,6mg/dl a lo largo de 12 semanas); PUA por debajo de 6 mg/ml, 84 por ciento del tiempo de tratamiento en el grupo de 12 mg cada cuatro semanas (urato en plasma previo al tratamiento de 8,5 mg/dl versus urato en plasma medio de 2,6 mg/dl a lo largo de 12 semanas); y PUA por debajo de 6 mg/ml, 73 por ciento del tiempo de tratamiento en el grupo de 4 mg cada dos semanas (urato en plasma previo al tratamiento de 7,6 mg/dl versus urato en plasma medio de 4,2 mg/dl a lo largo de 12 semanas).

15 El máximo porcentaje de disminución en ácido a partir de un valor de referencia dentro de las primeras 24 horas de dosificación de PEG-uricasa fue de un 72 % para los sujetos que reciben 4 mg/2 semanas (p igual a 0,0002); un 94 % para los sujetos que reciben 8 mg/2 semanas (p menos de 0,0001); un 87 % para los sujetos que reciben 8 mg/4 semanas (p menos de 0,0001); y un 93 % para los sujetos que reciben 12 mg/4 semanas (p menos de 0,0001).

20 El porcentaje de disminución en ácido úrico en plasma a partir de un valor de referencia a lo largo del periodo de tratamiento de 12 semanas fue de un 38 % para los sujetos que reciben 4 mg/2 semanas (p igual a 0,0002); un 86 % para los sujetos que reciben 8 mg/2 semanas (p menos de 0,0001); un 58 % para los sujetos que reciben 8 mg/4 semanas (p igual a 0,0003); y un 67 % para los sujetos que reciben 12 mg/4 semanas (p menos de 0,0001).

De manera sorprendente, algunos sujetos que recibieron PEG-uricasa experimentaron un episodio adverso relacionado con la infusión, es decir, una reacción de infusión. Estas reacciones se produjeron en un 14 % de las infusiones totales.

25 Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones de la presente invención sin apartarse de su alcance, como será aparente para los expertos en la técnica. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento solo se facilitan a modo de ejemplo, y la invención solo ha de estar limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

30 <110> Savient Pharmaceuticals Inc.; Hartman, Jacob; Mendelovitz, Simona

<120> FORMAS VARIANTES DE URATO OXIDASA Y USO DE LAS MISMAS

<130> 103864-146638

<150> US 60/670,573

35 <151> 11-04-2005

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

40 <210> 1

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Uricasa de hígado de cerdo (sentido)

	<400> 1		
		gcgcggaattc catggctcat taccgtaatg actaca	36
	<210> 2		
5	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Uricasa de hígado de cerdo (antisentido)		
	<400> 2		
		gcgctctaga agcttccatg gtcacagcct tgaagtcagc	40
	<210> 3		
15	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> Uricasa de hígado de babuino (D3H) (sentido)		
	<400> 3		
		gcgcggaattc catggccac taccataaca actat	35
	<210> 4		
25	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Uricasa de hígado de babuino (D3H) (antisentido)		
	<400> 4		
		gcgcccatgg tctagatcac agtcttgaag acaacttcct	40
	<210> 5		
35	<211> 36		

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> PBC-uricasa DeltaNC (sentido)

<400> 5

gcgcatatga cttacaaaaa gaatgatgag gtagag

36

<210> 6

10 <211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> PBC-uricasa DeltaNC (antisentido)

<400> 6

ccgtctagat taagacaact tcctcttgac tgtaccagta atttttccgt atgg

54

<210> 7

20 <211> 299

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Pig-KS-DeltaN

<400> 7

ES 2 538 357 T3

Met Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr
 1 5 10 15
 Gly Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr
 20 25 30
 His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser
 35 40 45
 Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp
 50 55 60
 Thr Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys Phe Lys Gly Ile Lys
 65 70 75 80
 Ser Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser
 85 90 95
 Phe Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Val Pro Trp
 100 105 110

ES 2 538 357 T3

Lys Arg **Phe** Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala **Phe** Ile Tyr
 115 120 125

Thr Pro Thr Gly Thr His **Phe** Cys Glu Val Glu Gln Ile Arg Asn Gly
 130 135 140

Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr
 145 150 155 160

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

Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys **Phe** Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp
 180 185 190

Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp **Phe** Glu Ala Thr Trp Asp Thr
 195 200 205

Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys **Phe** Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly
 210 215 220

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

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

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

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

Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
 290 295

<210> 8

<211> 298

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Pig-KS-DeltaN sin Met inicial

10 <400> 8

Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu **Phe** Val Arg Thr Gly Tyr Gly
 1 5 10 15

ES 2 538 357 T3

Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His
 20 25 30
 Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys
 35 40 45
 Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp Thr
 50 55 60
 Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys Phe Lys Gly Ile Lys Ser
 65 70 75 80
 Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe
 85 90 95
 Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Val Pro Trp Lys
 100 105 110
 Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile Tyr Thr
 115 120 125
 Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Ile Arg Asn Gly Pro
 130 135 140
 Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro
 165 170 175
 Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg
 180 185 190
 Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr Val
 195 200 205
 Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu
 210 215 220
 Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu Thr
 225 230 235 240
 Leu Gly Gln Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn
 245 250 255
 Ile His Tyr Leu Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys
 260 265 270
 Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly
 275 280 285
 Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
 290 295

ES 2 538 357 T3

<210> 9

<211> 897

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Pig-KS-DeltaNΔ

<400> 9

```

atgacttaca aaaagaatga tgaggtagag tttgtccgaa ctggctatgg gaaggatatg      60
ataaaaagttc tccatattca gcgagatgga aaatatcaca gcattaaaga ggtggcaact     120
acagtgcaac tgactttgag ctccaaaaaa gattacctgc atggagacaa ttcagatgtc     180
atccctacag acaccatcaa gaacacagtt aatgtcctgg cgaagttcaa aggcacataa     240
agcatagaaa cttttgctgt gactatctgt gagcatttcc tttcttcctt caagcatgtc     300
atcagagctc aagtctatgt ggaagaagtt ccttgggaagc gttttgaaaa gaatggagtt     360
aagcatgtcc atgcatttat ttatactcct actggaacgc acttctgtga ggttgaacag     420
ataaggaatg gacctccagt cttcattctt ggaatcaaag acctaaaagt cttgaaaaca     480
accagtcctg gctttgaagg attcatcaag gaccagttca ccacctccc tgaggatgaag     540
gaccggtgct ttgccacca agtgtactgc aaatggcgct accaccaggg cagagatgtg     600
gactttgagg ccacctggga cactgttagg agcattgtcc tgcagaaatt tgctgggccc     660
tatgacaaag gcgagtactc gccctctgtc cagaagacac tctatgacat ccaggtgctc     720
accctgggcc aggttcctga gatagaagat atggaaatca gcctgccaaa tattcactac     780
ttaaacatag acatgtccaa aatgggactg atcaacaagg aagaggtctt gctaccttta     840
gacaatccat atggaaaaat tactggtaca gtcaagagga agttgtcttc aagactg      897

```

10

<210> 10

<211> 894

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Pig-KS-DeltaN sin ATG inicial

<400> 10

```

acttacaaaa agaatgatga ggtagagttt gtccgaactg gctatgggaa ggatatgata      60
aaagttctcc atattcagcg agatggaaaa taccacagca ttaaagaggt ggcaactaca     120
gtgcaactga ctttgagctc caaaaaagat tacctgcatg gagacaattc agatgtcatc     180

```

20

ES 2 538 357 T3

cctacagaca ccatcaagaa cacagttaat gtcctggcga agttcaaagg catcaaaagc 240
 atagaaactt ttgctgtgac tatctgtgag catttccttt cttccttcaa gcatgtcatc 300
 agagctcaag tctatgtgga agaagttcct tgggaagcgtt ttgaaaagaa tggagttaag 360
 catgtccatg catttatitaa tactcctact ggaacgcact tctgtgaggt tgaacagata 420
 aggaatggac ctccagtcac tcattctgga atcaaagacc taaaagtctt gaaaacaacc 480
 cagtctggct ttgaaggatt catcaaggac cagttcacca ccctccctga ggtgaaggac 540
 cggtgctttg ccaccaagt gtactgcaaa tggcgctacc accagggcag agatgtggac 600
 tttgaggcca cctgggacac tgtaggagc attgtcctgc agaaatttgc tgggccctat 660
 gacaaaggcg agtactgcc ctctgtccag aagacactct atgacatcca ggtgctcacc 720
 ctgggcccagg ttctgagat agaagatat gaaatcagcc tgccaaatat tcaactactta 780
 aacatagaca tgtccaaaat gggactgac aacaaggaag aggtcttgct accttagac 840
 aatccatag gaaaaattac tggtacagtc aagaggaagt tgtcttcaag actg 894

<210> 11

<211> 304

<212> PRT

5 <213> Sus scrofa

<400> 11

Met Ala His Tyr Arg Asn Asp Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe
 1 5 10 15
 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

ES 2 538 357 T3

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> 12

<211> 296

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PBC-DeltaNC

10 <400> 12

ES 2 538 357 T3

Met Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr
 1 5 10 15
 Gly Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr
 20 25 30
 His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser
 35 40 45
 Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp
 50 55 60
 Thr Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys Phe Lys Gly Ile Lys
 65 70 75 80
 Ser Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser
 85 90 95
 Phe Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Val Pro Trp
 100 105 110
 Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile Tyr
 115 120 125
 Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Ile Arg Asn Gly
 130 135 140
 Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr
 145 150 155 160
 Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu
 165 170 175
 Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp
 180 185 190
 Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr
 195 200 205
 Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly
 210 215 220
 Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro
 245 250 255
 Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn
 260 265 270
 Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr
 275 280 285

ES 2 538 357 T3

Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser
 290 295

<210> 13

<211> 295

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PBC-DeltaNC sin Met inicial

10 <400> 13

Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly
 1 5 10 15

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

Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys
 35 40 45

Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp Thr
 50 55 60

Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys Phe Lys Gly Ile Lys Ser
 65 70 75 80

Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe
 85 90 95

Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Val Pro Trp Lys
 100 105 110

Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile Tyr Thr
 115 120 125

Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Ile Arg Asn Gly Pro
 130 135 140

Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr
 145 150 155 160

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

Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg
 180 185 190

ES 2 538 357 T3

Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr Val
 195 200 205

Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu
 210 215 220

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

Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn
 245 250 255

Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys
 260 265 270

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

Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser
 290 295

<210> 14

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PBC-DeltaNC (fragmento 44-56 de PBC-DeltaNC)

10 <400> 14

<210> 15

<211> 936

<212> ADN

15 <213> Papio hamadryas (babuino hamadryas)

<400> 15

ES 2 538 357 T3

ccagaagaaa atggccgact accataacaa ctataaaaag aatgatgaat tggagtttgt 60
 ccgaactggc tatgggaagg atatggtaaa agttctccat attcagcgag atggaaaata 120
 tcacagcatt aaagaggtgg caacttcagt gcaacttact ctgagttcca aaaaagatta 180
 cctgcatgga gataattcag atatcatccc tacagacacc atcaagaaca cagttcatgt 240
 cttggcaaag ttttaaggaa tcaaaagcat agaagccttt ggtgtgaata tttgtgagta 300
 ttttctttct tcttttaacc atgtaatccg agctcaagtc tacgtggaag aaatcccttg 360
 gaagcgtctt gaaaagaatg gagttaagca tgtccatgca tttattcaca ctcccactgg 420

 aacacacttc tgtgaagttg aacaactgag aagtggacc cccgtcatta cttctggaat 480
 caaagacctc aaggcttga aaacaacaca gtctggattt gaaggtttca tcaaggacca 540
 gttcaccacc ctccctgagg tgaaggaccg atgctttgcc acccaagtggt actgcaagtg 600
 gcgctaccac cagtgcaggg atgtggactt cgaggctacc tggggcacca ttcgggacct 660
 tgtcctggag aaatttgctg ggccctatga caaaggcgag tactcaccct ctgtgcagaa 720
 gaccctctat gatatccagg tgctctccct gagccgagtt cctgagatag aagatagga 780
 aatcagcctg ccaaacttc actacttcaa tatagacatg tccaaaatgg gtctgatcaa 840
 caaggaagag gtcttgctgc cattagacaa tccatatgga aaaattactg gtacagtcaa 900
 gaggaagttg tcttcaagac tgtgacattg tggcca 936

<210> 16

<211> 304

5 <212> PRT

<213> Papio hamadryas (babuino hamadryas)

<400> 16

ES 2 538 357 T3

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 Thr Ser Gly Ile Lys Asp Leu

ES 2 538 357 T3

145					150					155					160
Lys	Val	Leu	Lys	Thr 165	Thr	Gln	Ser	Gly	Phe 170	Glu	Gly	Phe	Ile	Lys 175	Asp
Gln	Phe	Thr	Thr 180	Leu	Pro	Glu	Val	Lys 185	Asp	Arg	Cys	Phe	Ala 190	Thr	Gln
Val	Tyr	Cys 195	Lys	Trp	Arg	Tyr	His 200	Gln	Cys	Arg	Asp	Val 205	Asp	Phe	Glu
Ala	Thr 210	Trp	Gly	Thr	Ile	Arg 215	Asp	Leu	Val	Leu	Glu 220	Lys	Phe	Ala	Gly
Pro 225	Tyr	Asp	Lys	Gly	Glu 230	Tyr	Ser	Pro	Ser	Val 235	Gln	Lys	Thr	Leu	Tyr 240
Asp	Ile	Gln	Val	Leu 245	Ser	Leu	Ser	Arg	Val 250	Pro	Glu	Ile	Glu	Asp 255	Met
Glu	Ile	Ser	Leu 260	Pro	Asn	Ile	His	Tyr 265	Phe	Asn	Ile	Asp	Met 270	Ser	Lys
Met	Gly	Leu 275	Ile	Asn	Lys	Glu	Glu 280	Val	Leu	Leu	Pro	Leu 285	Asp	Asn	Pro
Tyr	Gly 290	Lys	Ile	Thr	Gly	Thr 295	Val	Lys	Arg	Lys	Leu 300	Ser	Ser	Arg	Leu

REIVINDICACIONES

1. Una uricasa de mamífero truncada aislada que comprende una secuencia de aminoácidos de uricasa de mamífero truncada en el extremo amino, o el extremo carboxílico, o ambos de los extremos amino y carboxílico por 6 aminoácidos; y que comprende adicionalmente una sustitución aminoacídica con treonina en la posición 7 (D7T), una sustitución aminoacídica con treonina en la posición 46 (S46T), una sustitución aminoacídica con lisina en la posición 291 (R291K) y una sustitución aminoacídica con serina en la posición 301 (T301S), siendo dichos truncamiento y sustitución aminoacídica relativos a una uricasa de cerdo de origen natural que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
2. La uricasa de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un aminoácido aminoterminal, en la que el aminoácido aminoterminal es alanina, glicina, prolina, serina, o treonina.
3. La uricasa de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8.
4. La uricasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la uricasa se conjuga con un polímero.
5. Un conjugado de polietilenglicol-uricasa que comprende la uricasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
6. El conjugado de la reivindicación 5, que comprende de 2 a 12 moléculas de polietilenglicol en cada subunidad de uricasa.
7. El conjugado de la reivindicación 5, en el que cada molécula de polietilenglicol tiene un peso molecular entre aproximadamente 1 kD y 100 kD.
8. Una composición farmacéutica que comprende una uricasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
9. La proteína uricasa de mamífero truncada aislada de la reivindicación 1, en la que el aminoácido N-terminal es metionina.
10. La uricasa de la reivindicación 9, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7.
11. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la uricasa de la reivindicación 1, reivindicación 2, reivindicación 9 o reivindicación 10.
12. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una uricasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8.
13. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 12, en el que la secuencia de ácidos nucleicos comprende las SEQ ID NO. 9 o SEQ ID NO. 10.
14. El ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 11 o 12, en el que la secuencia de ácidos nucleicos está ligada funcionalmente a un promotor heterólogo.
15. El ácido nucleico de la reivindicación 14, en el que el promotor es el promotor osmB.
16. Un vector de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 14.
17. Una célula huésped aislada que comprende el vector de la reivindicación 16.
18. Un procedimiento para producir una uricasa que comprende las etapas de cultivar una célula huésped de la reivindicación 17 en condiciones tales que la secuencia de ácidos nucleicos se expresa mediante la célula huésped y aislar la uricasa expresada.
19. La uricasa de la reivindicación 10, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7.
20. Un conjugado de polietilenglicol-uricasa que comprende la uricasa de la reivindicación 19.
21. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de las reivindicaciones 5 o 20.
22. La composición de las reivindicaciones 8 o 21, adecuada para administración a largo plazo.
23. Una composición de las reivindicaciones 8, 21 o 22 para su uso en la reducción de los niveles de ácido úrico en un fluido biológico de un sujeto.
24. La composición para su uso en la reducción de los niveles de ácido úrico en un fluido biológico de un sujeto de acuerdo con la reivindicación 23, en la que el fluido biológico es sangre.

25. La uricasa de la reivindicación 1, en la que la uricasa comprende una uricasa de hígado porcino, bovino, ovino o de babuino, o una quimera de las mismas.
26. El conjugado de la reivindicación 7, en el que cada molécula de polietilenglicol tiene un peso molecular entre aproximadamente 1 kD y 50 kD.
- 5 27. El conjugado de la reivindicación 26, en el que cada molécula de polietilenglicol tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kD y 20 kD.
28. El conjugado de la reivindicación 27, en el que cada molécula de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kD.

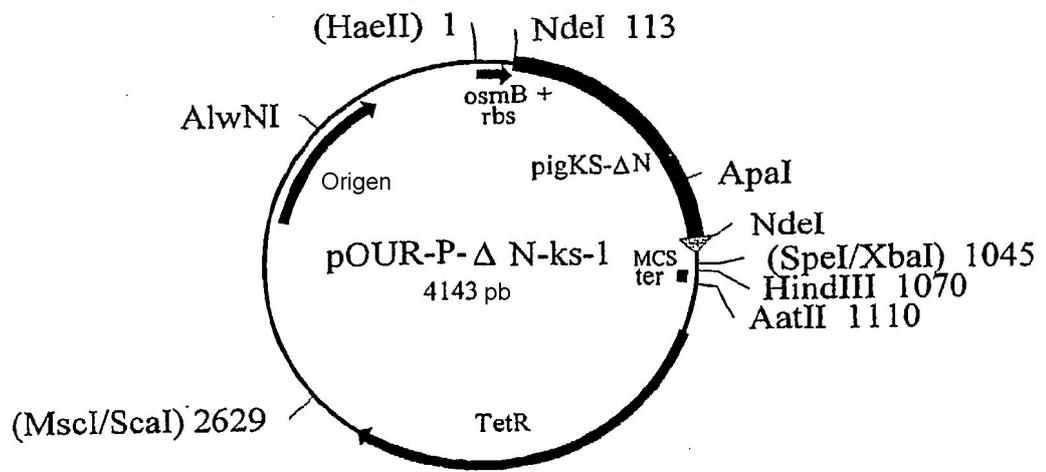


Figura 1

```

1      ATG-----ACTTACAAAAAGAATGATGAGGTAGAGTTTGTCCGAACTGGC
1      M - - - - T Y K K N D E V E F V R T G
61     TATGGGAAGGATATGATAAAAGTTCTCCATATTCAGCGAGATGGAAAATATCACAGCATT
21     Y G K D M I K V L H I Q R D G K Y H S I
121    AAAGAGGTGGCAACTACAGTGC AACTGACTTTGAGCTCCAAAAAGATTACCTGCATGGA
41     K E V A T T V Q L T L S S K K D Y L H G
181    GACAATTCAGATGTCATCCCTACAGACACCATCAAGAACACAGTTAATGTCCTGGCGAAG
61     D N S D V I P T D T I K N T V N V L A K
241    TTCAAAGGCATCAAAGCATAGAACTTTTGCTGTGACTATCTGTGAGCATTTCCTTTCT
81     F K G I K S I E T F A V T I C E H F L S
301    TCCTTCAAGCATGTCATCAGAGCTCAAGTCTATGTGGAAGAAGTTCCTTGGAAGCGTTTT
101    S F K H V I R A Q V Y V E E V P W K R F
361    GAAAAGAATGGAGTTAAGCATGTCCATGCATTTATTTATACTCCTACTGGAACGCACCTTC
121    E K N G V K H V H A F I Y T P T G T H F
421    TGTGAGGTTGAACAGATAAGGAATGGACCTCCAGTCATTCTGGAATCAAAGACCTA
141    C E V E Q I R N G P P V I H S G I K D L
481    AAAGTCTTGAAAACAACCCAGTCTGGCTTTGAAGGATT'CATCAAGGACCAGTTCACCACC
161    K V L K T T Q S G F E G F I K D Q F T T
541    CTCCTGAGGTGAAGGACCGGTGCTTTGCCACCCAAGTGTACTGCAAATGGCGCTACCAC
181    L P E V K D R C F A T Q V Y C K W R Y H
601    CAGGGCAGAGATGTGGACTTTGAGGCCACCTGGGACACTGTTAGGAGCATTGTCTCTGCAG
201    Q G R D V D F E A T W D T V R S I V L Q
      ApaI
      |
661    AAATTTGCTGGGCCCTATGACAAAGGCGAGTACTCGCCCTCTGTCCAGAAGACACTCTAT
221    K F A G P Y D K G E Y S P S V Q K T L Y
721    GACATCCAGGTGCTCACCCCTGGGCCAGGTTCCCTGAGATAGAAGATATGGAAATCAGCCTG
241    D I Q V L T L G Q V P E I E D M E I S L
781    CCAAATATTCACTACTTAAACATAGACATGTCCAAAATGGGACTGATCAACAAGGAAGAG
261    P N I H Y L N I D M S K M G L I N K E E
      NdeI
      |
841    GTCTTGCTACCTTTAGACAATCCATATGGAAAATTAAGTGGTACAGTCAAGAGGAAGTTG
281    V L L P L D N P Y G K I T G T V K R K L
      EcoRI                               SpeI BamHI
      |                                   |   |
901    TCTTCAAGACTGTGAaagccgaattccagcacactggcgccggttactagtggatcc
301    S S R L *

```

Figura 2

ES 2 538 357 T3

	20	40	60
Pig	MAHYRNDYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLHIQRDGYHSIKEVATSVQLTLSSKKDYLHG		
PBC-ΔNC	M-----TYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLHIQRDGYHSIKEVATTVQLTLSSKKDYLHG		
Pig-KS-ΔN	M-----TYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLHIQRDGYHSIKEVATTVQLTLSSKKDYLHG		
	*		*
	80	100	120
Pig	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGIKSIETFAVTICEHFLSSFHKHVIRAQVYVEEVPWKRF		
PBC-ΔNC	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGIKSIETFAVTICEHFLSSFHKHVIRAQVYVEEVPWKRF		
Pig-KS-ΔN	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGIKSIETFAVTICEHFLSSFHKHVIRAQVYVEEVPWKRF		
	140	160	180
Pig	EKNGVKHVHAFIYTPGTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT		
PBC-ΔNC	EKNGVKHVHAFIYTPGTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT		
Pig-KS-ΔN	EKNGVKHVHAFIYTPGTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT		
	200	220	240
Pig	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVFDEATWDTVRSIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTLY		
PBC-ΔNC	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVFDEATWDTVRSIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTLY		
Pig-KS-ΔN	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVFDEATWDTVRSIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTLY		
	260	280	300
Pig	DIQVLTGQVPEIEDMEISLPNIHYLNIDMSKMGLINKEEVLLPLDNPYGRITGTVKRKL		
PBC-ΔNC	DIQVLSLSRVPEIEDMEISLPNIHYFNIDMSKMGLINKEEVLLPLDNPYGKITGTVKRKL		
Pig-KS-ΔN	DIQVLTGQVPEIEDMEISLPNIHYLNIDMSKMGLINKEEVLLPLDNPYGKITGTVKRKL		
	° ° °	°	*
Pig	TSRL		
PBC-ΔNC	S---		
Pig-KS-ΔN	SSRL		
	*		

Figura 3

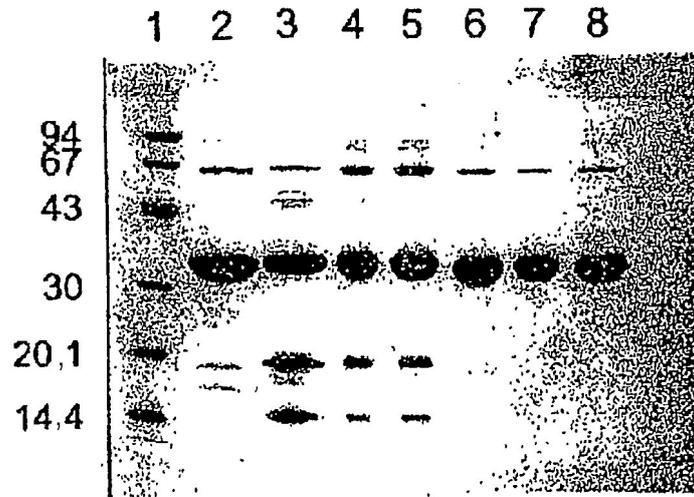


Figura 4

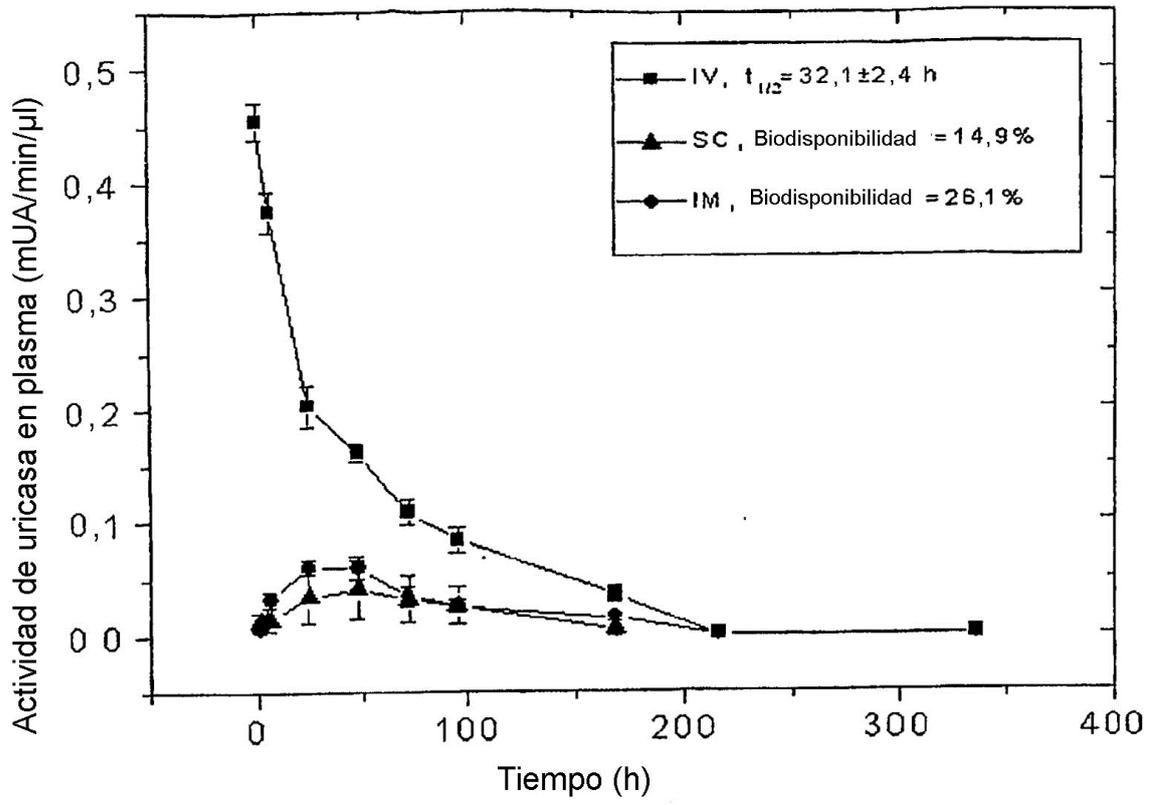


Figura 5

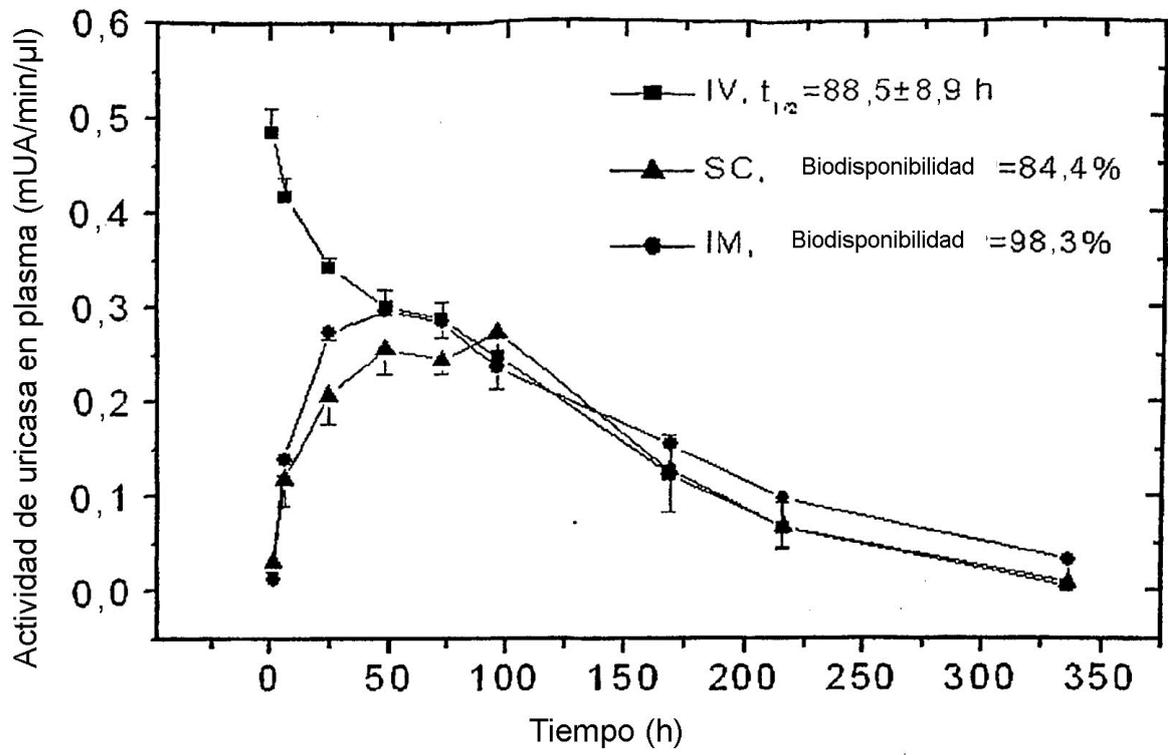


Figura 6

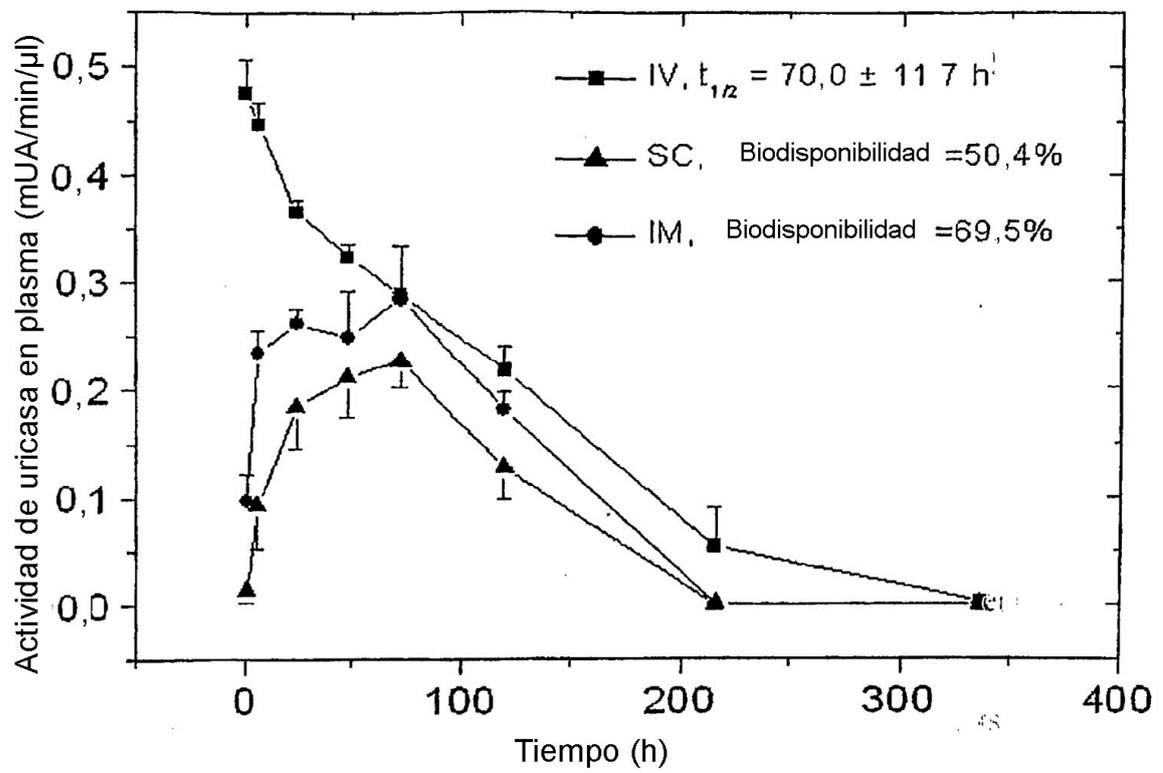


Figura 7

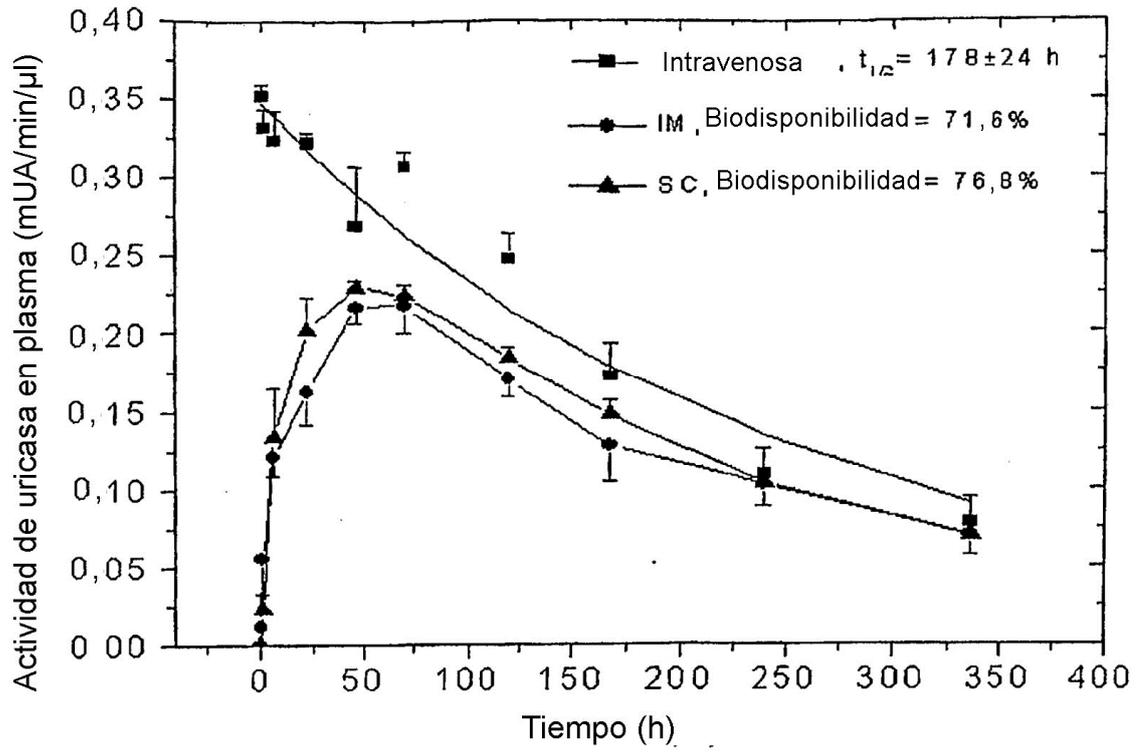


Figura 8