República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) **PI 9912974-4 B1**

BRPI9912974B1

(22) Data de Depósito: 02/08/1999

(45) Data da Concessão: 25/08/2015
(RPI 2329)

(54) Título: CONJUGADOS DE PEG-URATO OXIDASE E SEU USO

(51) Int.Cl.: A61K47/48; A61K38/44; C12N9/06

(30) Prioridade Unionista: 06/08/1998 US 09/130,392

(73) Titular(es): DUKE UNIVERSITY, Mountain View Pharmaceuticals, INC.

(72) Inventor(es): David L. Williams , Mark G. P. Saifer, Merry R. Sherman, Michael S. Hershfield, Susan J. Kelly

"CONJUGADOS DE PEG-URATO OXIDASE E SEU USO"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à modificação química das proteínas para prolongar as suas vidas médias em circulação e para reduzir a sua capacidade imunogênica. Mais especificamente, a invenção refere-se à conjugação de poli(etileno glicóis) ou de poli(óxidos de etileno) em urate oxidases, que elimina substancialmente a capacidade imunogênica da urate oxidase sem comprometer a sua atividade úricoolítica.

Fundamentos da Invenção

As indicações contidas nesta seção de fundamentos não constituem uma admissão da técnica anterior, mas ao invés disso refletem os próprios comentários subjetivos dos autores da invenção e as interpretações do estado da técnica no momento em que a invenção foi feita. Essas interpretações podem incluir deduções dos inventores pessoais até o momento não divulgadas, deduções essas que não faziam parte da técnica anterior.

As urate oxidases (uricases; E.C. 1.7.1.3) são enzimas que catalisam a oxidação do ácido úrico a um produto mais solúvel, a alantoina, um metabólito da purina que é excretado mais rapidamente. Os seres humanos não produzem a uricase enzimaticamente ativa, em conseqüência de diversas mutações no gene para a uricase adquiridas durante a evolução de primatas superiores. Wu, X, et al., (1992) J. Mol. Evol. 34:78-84. Consequentemente, em indivíduos suscetíveis, as concentrações excessivas

do ácido úrico no sangue (hiperuricemia) e na urina (hiperuricossuria) podem conduzir à artrite doloroso (gota), desfigurando depósitos de urate (cálculos artríticos), e à falha renal. Em alguns indivíduos afetados, as drogas disponíveis tais como o alopurinol (um inibidor da síntese de ácido úrico) produzem efeitos adversos limitadores do tratamento ou não aliviam essas condições adequadamente. Hande, KR, et al., (1984) Am. J. Med. 76:47-56; Fam, AG, (1990) Baillière's Clin. Rheumatol. 4:177-192. As injeções de uricase podem diminuir a hiperuricemia e o hiperuricossuria, pelo menos temporariamente. Uma vez que a uricase é uma proteína estranha nos seres humanos, entretanto, até mesmo a primeira injeção da proteína não modificada de Aspergillus flavus induz reações anafiláticas em várias porcentagens de pacientes tratados (Pui, C-H, et al., (1997) Leukemia 11:1813-1816), e as respostas imunológicas limitam a sua utilidade para o tratamento crônico ou intermitente. Donadio, D, et al., (1981) Nouv Presse Méd 10:711-712; Leaustic, M, et al., (1983) Rev Rhum Mal Osteoartic 50:553-5:54.

O desempenho sub-ótimo de tratamentos disponíveis para a hiperuricemia tem sido reconhecido por diversas décadas. Kissel, P, et al., (1968) Nature 217:72-74. Analogamente, a possibilidade de que determinados grupos de pacientes com gota grave possam se beneficiar de uma forma segura e eficaz da uricase injetável tem sido reconhecida por muitos anos. Davis, FF, et al., (1978) em GB Broun, et al., (Eds.) Enzyme Engineering, Vol. 4 (páginas 169-173) New York, Plenum Press; Nishimura, H, et al., (1979) Enzyme 24:261-264; Nishimura, H, et al., (1981) Enzyme 26:49-53; Davis, S, et al., (1981) Lancet 2(8241):281-283; Abuchowski, A, et al., (1981) J. Pharmacol. Exp. Ther. 219:352-354; Chen, RH-L, et al., (1981) Biochim. Biophys. Acta 660:293-298; Chua, CC, et al., (1988) Ann. Int. Med. 109:114-117; Greenberg, ML, et al., (1989)

Biochem. Anal. 176:290-293. As uricases derivadas dos órgãos de animais é quase insolúvel nos solventes que são compatíveis com a administração segura por meio de injeção. Patente Norte-americana 3.616.231. Determinadas uricases derivadas de plantas ou de microorganismos são mais solúveis em solventes medicamente aceitáveis. Entretanto, a injeção das enzimas microbianas induz rapidamente as respostas imunológicas que podem conduzir a reações alérgicas que ameaçam a vida ou à inativação e/ou ao afastamento acelerado da uricase de circulação. Donadio, et al., (1981); Leaustic, et al., (1983). As enzimas baseadas nas seqüências de aminoácidos deduzidas de uricases de mamíferos, incluindo o porco e o babuíno, ou de insetos, tais como, por exemplo, Drosophila melanogaster ou Drosophila pseudoobscura (Wallrath, LL, et al., (1990) Mol. Cell. Biol. 10:5114-5127), não têm sido candidatos apropriados para o uso clínico, devido aos problemas da capacidade imunogênica e da insolubilidade em pH fisiológico.

A modificação covalente das proteínas com poli(etileno glicol) ou óxido de poli(etileno) (ambos indicados como PEG), tem sido empregada para aumentar a vida útil da proteína e reduzir a capacidade imunogênica. Patentes Norte-americanas 4.179.337, 4.766.106. e 4.847.325; Saifer, MGP, et al., (1994) Adv. Exp. Med. Biol. 366:377-387. O acoplamento de PEG de peso molecular elevado para produzir conjugados com vidas médias em circulação prolongadas e/ou capacidade imunogênica diminuída, enquanto é conservada a atividade funcional, foi demonstrado anteriormente para uma outra enzima, a dismutase de superóxido (Somack, R, et al, (1991) Free Rad. Res. Commun. 12-13: 553-562; Patentes Norte-americanas 5.283.317 e 5.468.478) e para outros tipos de proteínas, por exemplo, citocinas (Saifer, MGP, et al., (1997) Polym. Preprints 38:576-577; Sherman, MR., et al., (1997) em JM Harris, et al., (Eds.), Poly(ethylene glycol) Chemistry and

Biological Applications. ACS Symposium Series 680 (páginas 155-169) Washington, D.C.: American Chemical Society). Os conjugados de uricase com polímeros com exceção de PEG também foram descritos. Patente Norte-americana 4.460.683.

Em quase todas as tentativas relatadas para PEGilar a uricase (isto é, para acoplar covalentemente a PEG à uricase), o PEG foi ligado primeiramente aos grupos amino, incluindo o resíduo do terminal amino e os resíduos de lisina disponíveis. Nas uricases normalmente utilizadas, o número total de lisinas em cada uma das quatro subunidades idênticas fica entre 25 (Aspergillus flavus (patente norte-americana 5.382.518)) e 29 (porco (Wu, X, et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9412-9416)). Algumas das lisinas são estão disponíveis para a PEGilação na conformação nativa da enzima. A abordagem mais comum para reduzir a capacidade imunogênica da uricase tem sido o acoplamento de grandes números de filamentos de PEG de baixo peso molecular. Isto resulta invariavelmente em grandes diminuições na atividade enzimática dos conjugados resultantes.

Os pesquisadores anteriores utilizaram a uricase injetado para catalisar a conversão do ácido úrico em alantoina in vivo. Veja Pui, et al., (1997). Esta é a base para o uso na França e na Itália da uricase do fungo Aspergillus flavus (Uricozyme®) para impedir ou corrigir temporariamente a hiperuricemia associada com a terapia citotóxica para malignidades hematológicas e reduzir temporariamente a hiperuricemia grave nos pacientes com gota. Potaux, L, et al., (1975) Nouv Presse Méd 4:1109-1112, Legoux, R, et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:8565-8570; Patentes Norte-americanas 5.382.518 e 5.541.098. Por causa de sua vida em circulação curta, a Uricozyme® requer injeções diárias. Além disso, não é

bem adequada para a terapia a longo prazo por causa de sua capacidade imunogênica.

Uma única injeção intravenosa de um preparado de uricase de Candida utilis acoplada a PEG de 5 kDa reduziu a urate do soro a níveis não detectáveis em cinco indivíduos humanos cuja concentração média da urate do soro da pre-injeção era de 6,2 mg/dl, que fica dentro da faixa normal. Davis, et al., (1981). Aos indivíduos foi aplicada uma injeção adicional quatro semanas mais tarde, mas sas uas respostas não foram relatadas. Nenhum anticorpo para a uricase foi detectado depois da segunda (e última) injeção, ao se empregar um ensaio de difusão de gel relativamente insensível. Esta referência não relatou nenhum resultado dos tratamentos crônicos ou subcrônicos de pacientes humanos ou de animais experimentais.

Um preparado da uricase de Arthrobacter protomorfiae acoplada a PEG de 5 kDa foi empregado para controlar temporariamente a hiperuricemia em um único paciente com linfoma cuja concentração da urate do soro da pre-injeção era de 15 mg/dl. Chua, et al., (1988). Por causa da condição crítica do paciente e da curta duração do tratamento (quatro injeções durante catorze dias), não foi possível avaliar a eficácia ou a segurança do conjugado a longo prazo.

No presente pedido, a expressão "capacidade imunogênica" refere-se à indução de uma resposta imunológica por um preparado injetado de uricase modificada por PEG ou não modificada (o antígeno), enquanto que "capacidade antigênica" refere-se à reação de um antígeno com anticorpos preexistentes. Coletivamente, a capacidade antigênica e a capacidade imunogênica são indicadas como "imunoreatividade". Em estudos precedentes da PEG-uricase, a imunoreatividade foi avaliada através de uma variedade de métodos, incluindo: 1) a reação in vitro de PEG-uricase com

anticorpos pré-formados; 2) medições da síntese de anticorpo induzida; e 3) taxas de afastamento aceleradas depois de injeções repetidas.

As tentativas precedentes de eliminar a capacidade imunogênica das uricases de diversas fontes mediante o acoplamento de vários números de filamentos de PEG com vários ligantes atingiram um sucesso limitado. As PEG-uricases foram apresentadas primeiramente por FF Davis e por Y Inada e seus colegas. Davis, et al., (1978); Patente Norte-americana 4.179.337; Nishimura et al., (1979); Patentes Japonêsas 55-99189 e 62-55079. O conjugado apresentado na patente '337 foi sintetizado ao se reagir a uricase de origem não especificada com um excesso molar de 2.000 vezes de PEG de 750 daltons, indicando que um grande número de moléculas de polímero foi provavelmente ligado a cada subunidade de uricase. A patente '337 apresenta o acoplamento de PEG ou de poli(propileno glicol) com pesos moleculares de 500 a 20.000 daltons, preferivelmente de aproximadamente 500 a 5.000 daltons, para se obteer conjugados ativos solúveis em água não imunogênicos de vários hormônios de polipeptídeos e enzimas incluindo as oxidareductases, das quais a uricase é um de três exemplos. Além disso, a patente '337 enfatiza o acoplamento de 10 a 100 filamentos de polímero por molécula de enzima, e a retenção de pelo menos 40% da atividade enzimática. Nenhum resultado de teste foi relatado para a extensão do acoplamento de PEG aos grupos amino disponíveis de uricase, a atividade uricolítica específica residual, ou a imunoreatividade do conjugado.

Os dados de 13 citações que se referem à PFGilação da uricase são resumidos na Tabela 1. Alguns destes resultados são apresentados também graficamente nas figuras 1A-2B. Sete dessas publicações descrevem diminuições significativas na atividade uricolítica medida in vitro causadas pelo acoplamento de vários números de filamentos de PEG à uricase de

Candida utilis. O acoplamento de um grande número de filamentos de PEG de 5 kDa à uricase do fígado de suíno acarretou resultados similares, tal como descrito na publicação de Chen e em um relatório de simpósio pelo mesmo grupo. Chen, et al., (1981); Davis, et al., (1978).

Entre os estudos resumidos na Tabela 1, a imunoreatividade da uricase foi relatada como sendo diminuída pela PEGilação em sete deles e eliminada em cinco deles. Em três dos últimos cinco estudos, a eliminação da imunoreatividade foi associada com as diminuições profundas na atividade uricolítica – até no máximo 15%, 28%, ou 45% da atividade inicial. Nishimura, et al, (1979) (atividade de 15%); Chen, et al., (1981) (atividade de 28%); Nishimura, et al., (1981) (atividade de 45%). No quarto relatório, o PEG foi relatado como sendo acoplado a 61% dos resíduos de lisina disponíveis, mas a atividade específica residual não foi indicada. Abuchowski, et al., (1981). Entretanto, uma equipe de pesquisa que incluía dois dos mesmos cientistas e utilizou os mesmos métodos relatou em outra parte que essa extensão do acoplamento deixou uma atividade residual de somente 23% a 28%. Chen, et al, (1981). As publicações de 1981 de Abuchowski et de al. e de Chen et al., indicam que, para reduzir substancialmente a capacidade imunogênica da uricase, o PEG deve ser acoplado a aproximadamente 60% dos resíduos de lisina disponíveis (Tabela 1). A quinta publicação em que o imunoreatividade da uricase foi relatada como tendo sido eliminado não divulga a extensão do acoplamento do PEG, a atividade uricolítica residual, ou a natureza da ligação de PEG-proteína. Veronese, FM, et al., (1997) em JM Harris, et al., (Eds.), Poli(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series 680 (páginas 182-192) Washington, D.C.: American Chemical Society.

A conjugação de PEG a uma fração menor dos resíduos de lisina em uricase reduziu mas não eliminou a sua imunoreatividade em animais experimentais. Tsuji, J, et al, (1985) Int. J. Imunopharmacol. 7:725-730 (28% a 45% dos grupos amino acoplados); Yasuda, Y, et al, (1990) Chem. Pharm. Bull. 38-2053-2056 (38% dos grupos amino acoplados). As atividades uricolíticas residuais dos adutos correspondentes variaram de <33% (Tsuji, et al.) a 60% (Yasuda, et al) de seus valores iniciais. Tsuji, et al. sintetizaram conjugados de PEG-uricase com PEGs de 7,5 kDa e 10 kDa, além de PEG de 5 kDa. Todos os conjugados resultantes eram um pouco imunogênicos e antigênicos, qneuanto que apresentavam atividades enzimáticas bastante reduzidas (Tabela 1; Figuras 1a-1b).

Um preparado de uricase PEGilada de Candida utilis que foi administrado com segurança duas vezes a cada um de cinco seres humanos foi relatado como tendo retido somente 11% de sua atividade inicial. Davis, et al., (1981). Diversos anos mais tarde, a uricase modificada com PEG de Arthrobacter protomorfiae foi administrada quatro vezes a um paciente com linfoma avançado e hiperuricemia grave. Chua, et al., (1988). Embora a atividade residual desse preparado de enzima não foi medida, Chua, et al., demonstraram a ausência de anticorpos antiuricase no soro do paciente 26 dias depois da primeira injeção de PEG-uricase, ao se empregar um ensaio de imunosorvente ligado por enzima (ELISA).

Conforme resumido na Tabela 1, os estudos precedentes da uricase PEGilada mostram que a atividade catalítica é bastante reduzida mediante o acoplamento de um número suficiente de filamentos de PEG para diminuir substancialmente a sua imunoreatividade. Além disso, a maioria dos preparados precedentes de PEG-uricase era sintetizada ao se utilizar PEG ativado com cloreto cianúrico, um derivado de triazina (2,4,6-tricloro-1,3,5-

triazina) que demostrou introduzir novas determinantes antigênicas e induzir a formação de anticorpos em coelhos. Tsuji, et al., (1985).

TABELA 1: Características de PEG-uricases dos Estudos Precedentes

Fonte de Uricase	Ligação de Acoplamento	Peso Molecular do PEG (kDa)	Porcentagem de Lisinas com PEG Ligado	Atividade Uricolítica Residual (%)	Capacidade antigênica ou imunogênica Comentários	Referência
Não relatada	Azida	0,7 (diol)	Não relatada	Não relatada	Não relatada	Patente Norte-americana 4.179.337
Candida utilis	Triazina (cloreto cianúrico)	5	% de "98": 20 26 43 48	31 21 15 5	Capacidade antigênica com soro de coelho (% daquela da enzima não	Nishimura, et al., 1979

					modifica da) 70% 6% 0 0	
Candida utilis	PEG2 triazina	2 x 5	22 25 36 46 50	87 70 45 31 27	86% 49% 0 0 0	Nishimu ra, et al., 1981
Candida utilis	Triazina	5	71	11	Cinco homens toleraram duas injeções em trinta dias.	Abuchow ski, et al., 1981
Candida utilis	Triazina de acordo com Chen, et al., 1981	5	49 61	Não relatada Não relatada	Capacida de imunogê nica em aves à uricase nativa – Capacida de imunogê nica	Chen, et al., 1981

					negativa	
Fígado de suíno	Triazina	5	37 47 58	60 45 28	Afasta mento acelerado em camon dongos " " vida média de aprox. oito horas	Chen, et al., 1981
Candida utilis	Triazina	5	57	23	Afasta mento constante (vida média de aprox. oito horas	
Candida utilis	Triazina de acordo com Chen, et al., 1981	5	35 70	Não relatada Não relatada	O PEG reduziu a capacida de imunogê nica em coelhos	Savoka, KV, et al., (1984) Int Arch Allergy Appl

					" "	Immunol 75:58-67
Candida utilis	Triazina	5	Não relatada	Não relatada	A PEG-uricase foi adminis trada oralment e a frangos em lipossom as (uma vez)	Nishida, Y, et al., (1984) J Pharm Pharma col 36:354-355
Candida utilis	Triazina	5 7,5 10	44 45 28 37 41 45	9,4 7,8 32 11 3 7,3	Capacida de imunogê nica reduzida, mas positiva em coelhos. (Anticor pos não para a uricase; eles	Tsuji, et al., 1985

					reagem bilateralmente com dismutase de PEG-superóxido). A capacidade antigênica testada com anticorpos de porquinhos da Índia foi reduzida.	
Arthrobacter protoformiae	Não relatada	5	Não relatada	Não relatada	Nenhum anticorpo foi detectado por ELISA 26 dias	Chua. Et al., 1988

					depois da primeira de quatro injeções de PEG-uricase.	
Candida utilis	PEG2 triazina	2 x 5	10 12 15 21 38	90 89 80 70 60	Não relatada Não relatada Não relatada Não relatada A capacida de antigêni ca testada com soro de coelho foi reduzida em 75%.	Yasuda, et al., 1990
Candida utilis	PEG2 triazina	2 x 5	22	68	Uma só injeção. O PEG	Fujita, et al., 1991

					aumentou a vida média de aprox. uma hora para aprox. oito horas em camondongos. O PEG bloqueou o afastamento pelo fígado, baço e rim (duração do estudo de 24 horas)	
Não relatada	PEG PEG2 Ligação não declarada	Não relatada	Não relatada Relatada como a mesma	Não relatada Não relatada	A capacidade imunogênica em	Veronese, et el., 1997

			que para o PEG		camon dongos foi reduzida em 98% (PEG) ou 100% (PEG2).	

A patente japonesa 3-148298, concedida a A. Sano, et al., apresenta proteínas modificadas, incluindo a uricase, derivatizadas com PEG que tem um peso molecular de 1-12 kDa que mostramumao capacidade antigênica reduzida e uma ação "prolongada melhorada", e métodos de produção de tais peptídeos derivatizados. Entretanto, não há nenhuma descrição a respeito das contagens de filamentos, ensaios de enzima, testes biológicos ou o significado de "prolongada melhorada". As patentes japonêsas 55-99189 e 62-55079, ambas concedidas a Y Inada, apresentam conjugados de uricase preparados com PEG-triazina ou bis-PEG-triazina (indicado como PEG_2 na Tabela 1), respectivamente. Veja Nishimura, et al., (1979 e 1981). No primeiro tipo de conjugado, os pesos moleculares dos PEGS eram de 2 kDa e 5 kDa, enquanto que no segundo apenas o PEG de 5 kDa foi utilizado. Nishimura, et al., (1979) relataram a recuperação de 15% da atividade uricolítica após a modificação de 43% das lisinas disponíveis com o PEG linear de 5 kDa, enquanto que Nishimura, et al. (1981) relataram a recuperação de 31% ou 45% da atividade uricolítica após a modificação de 46% ou de 36% das lisinas, respectivamente, com PEG_2.

Sumário da Invenção

Os estudos precedentes ensinam que, quando uma redução significativa na capacidade imunogênica e/ou na capacidade antigênica da

uricase é obtida por meio da PEGilação, ela é associada invariavelmente com uma perda substancial da atividade uricolítica. A segurança, a conveniência e a economia dos produtos biofarmacêuticos são todas impactadas adversamente por diminuições em suas potências e pela necessidade resultante de aumentar o dose administrada. Desse modo, há uma necessidade quanto a um meio seguro e eficaz alternativo para baixar os níveis elevados de ácido úrico nos fluidos corpóreos, incluindo o sangue e a urina. A presente invenção apresenta uma PEG-uricase substancialmente não imunogênica que retém toda ou quase toda a atividade uricolítica da enzima não modificada.

Uma realização da presente invenção é um conjugado de urate oxidase (uricase) que retém pelo menos aproximadamente 75% da atividade uricolítica de uricase não conjugada e tem uma capacidade imunogênica substancialmente reduzida. Essa realização inclui uma uricase purificada na qual cada subunidade pode ser covalentemente ligada a uma média de dois a dez filamentos de PEG, que podem ser lineares ou ramificados, sendo que cada molécula de PEG pode ter um peso molecular entre aproximadamente 5 kDa e 100 kDa. A uricase deste aspecto da invenção pode ser recombinante. Quer seja recombinante ou não, a uricase pode ser de origem de mamíferos. Em um aspecto desta realização, a uricase pode ser uricase de fígado de suínos, bovinos ou ovinos. Em um outro aspecto desta realização, a uricase pode ser quimérica. A uricase quimérica pode conter partes da uricase de fígado de suíno e/ou de fígado de babuíno. Por exemplo, a uricase quimérica pode ser uricase quimérica de porco-babuíno (uricase de PBC) ou uricase de suíno que contém as mutações R291K e T301S (uricase de PKS) (veja as seqüências na figura 6 e os resultados dos estudos fisiológicos e imunológicos nas figuras 7-12). Alternativamente, o uricase pode ser uricase de fígado de babuíno onde a tirosina 97 foi

substituída pela histidina, por meio do que a atividade específica da uricase pode ser aumentada em pelo menos aproximadamente 60%. A uricase da invenção, qualquer que seja a origem, também pode estar em uma forma que seja truncada, no terminal amino ou no terminal carboxila, ou em ambos os terminais. Analogamente, a uricase pode ser uricase fúngica ou microbiana. Em um aspecto desta realização, a uricase fúngica ou microbiaana pode ser uma forma natural ou recombinante da uricase de Aspergillus flavus, Arthrobacter globiformis ou Candida utilis. Alternativamente, a uricase pode ser uma uricase de invertebrado tal como, por exemplo, uma forma natural ou recombinante da uricase de Drosophila melanogaster ou Drosophila pseudobscura. A uricase da invenção também pode ser uma uricase de planta, por exemplo, uma forma natural ou recombinante da uricase do nódulo da raiz de soja (Glycine max). O PEG pode ter um peso molecular médio entre aproximadamente 5 kDa e 100 kDa; preferivelmente, o PEG pode ter um peso molecular médio entre aproximadamente 10 kDa e 60 kDa; mais preferivelmente, o PEG pode ter um peso molecular médio entre aproximadamente 20 kDa e aproximadamente 40 kDa tal como, por exemplo, 30 kDa. O número médio de filamentos covalentemente ligados do PEG pode ser de dois a dez filamentos por subunidade de uricase; preferivelmente, o número médio de filamentos covalentemente ligados pode ser de três a oito por subunidade; mais preferivelmente, o número médio dos filamentos do PEG pode ser de quatro a seis por subunidade. Em um aspecto desta realização, a uricase pode ser tetramérica. Os filamentos de PEG podem ser covalentemente ligados à uricase através das ligações uretano (carbamato), ligações amina secundária, e/ou ligações amida. Quando a uricase é uma forma recombinante de qualquer das uricases aqui mencionadas, a forma

recombinante pode ter substancialmente a seqüência da forma de ocorrência natural.

Uma outra realização da presente invenção é uma composição farmacêutica para baixar os níveis de ácido úrico nos fluidos corpóreos, contendo qualquer um dos conjugados de PEG-uricase descritos acima e um veículo farmaceuticamente aceitável. A composição pode ser estabilizada através de liofilização, e também pode dissolver imediatamente com a reconstituição para que se obtenha soluções apropriadas para a administração parenteral.

A presente invenção também apresenta um método para baixar os níveis de ácido úrico nos fluidos corpóreos e tecidos de um mamífero. O método inclui a administração, a um mamífero, de uma quantidade redutora de ácido úrico eficaz de PEG-uricase. A PEG-uricase pode ser uma uricase purificada de duas ou mais subunidades na qual cada subunidade pode ser covalentemente ligada a uma média de dois a dez filamentos de PEG linear ou ramificado, sendo que cada molécula de PEG pode ter um peso molecular entre aproximadamente 5 kDa e 100 kDa, em um veículo farmaceuticamente aceitável. O mamífero pode ser um ser humano. A etapa da administração pode ser, por exemplo, injeção por via intravenosa, intradermal, subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, ou pela inalação de um preparado aerossolizado. Os níveis de ácido úrico elevados podem estar no sangue, na urine e/ou em outros fluidos corpóreos e tecidos, e podem ser associados com a gota, cálculos artríticos, a insuficiência renal, o transplante de órgãos ou uma doença maligna.

Outras realizações da presente invenção incluem um método para isolar uma forma tetramérica da uricase de uma solução que contém formas múltiplas da uricase, e o produto desse método. Inicialmente, a solução pode conter uricase tetramérica e agregados de uricase. O método pode

incluir as etapas de: aplicação da solução a pelo menos uma coluna de separação a um pH entre aproximadamente 9 e 10,5 tal como, por exemplo, 10,2; a recuperação das frações do eluato e a identificação daqueles que podem conter uricase tetramérica isolada, sendo que as frações são substancialmente livres de agregados de uricase; e o agrupamento das frações da uricase tetramérica isolada. A coluna de separação pode ser baseada na troca de íons, na exclusão de tamanho, ou em qualquer outra propriedade de separação eficaz. O método também pode incluir a análise das frações para determinar a presença de uricase tetramérica e/ou da ausência de agregados de uricase. Por exemplo, essa análise pode incluir a chromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), outros métodos cromatográficos, dispersão luminosa, centrifugação e/ou eletroforese. Em um aspecto desta realização, a uricase tetramérica purificada pode conter menos de aproximadamente 10% de agregados de uricase.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1A mostra a retenção da atividade pela uricase PEGilada de Candida utilis em função do número de filamentos de PEG acoplados por subunidade.

A figura 1B mostra a retenção da atividade pela uricase PEGilada de Candida utilis em função da massa total de PEG acoplada por subunidade.

A figura 2A mostra a retenção da atividade pela uricase PEGilada do fígado de suíno em função do número de filamentos de PEG acoplados por subunidade.

A figura 2B mostra a retenção da atividade pela uricase PEGilada do fígado de suíno em função da massa total de PEG acoplada por subunidade.

A figura 3A mostra a retenção da atividade pela uricase quimérica de porco-babuíno (PBC) PEGilada em função do número de filamentos acoplados por subunidade.

A figura 3B mostra a retenção da atividade pela uricase de PBC PEGilada em função da massa total de PEG acoplada por subunidade.

A figura 4A mostra a retenção da telha da atividade pela uricase PEGilada de Aspergillus flavus em função do número de filamentos de PEG acoplados por subunidade.

A figura 4B mostra a retenção da atividade pela uricase PEGilada de Aspergillus flavus em função da massa total de PEG acoplada por subunidade.

A figura 5A mostra a retenção da atividade pela uricase de nódulo de raiz de soja recombinante PEGilada em função do número de filamentos de PEG acoplados por subunidade.

A figura 5B mostra a retenção da atividade pela uricase de nódulo de raiz de soja recombinante PEGilada em função da massa total de PEG acoplada por subunidade.

A Figura 6 mostra as seqüências de aminoácidos deduzidas da uricase quimérica de porco-babuíno (uricase de PBC), da uricase de PBC que é truncada nos terminais amino e carboxila (PBC-NT-CT) e da uricase de suíno que contém as mutações R291K e T301S (uricase de PKS), comparadas com as seqüências de suíno e babuíno.

A Figura 7 mostra a atividade da uricase no soro de camondongo 24 horas depois de cada uma entre quatro ou cinco injeções intraperitoneais de uricase de PBC modificada com PEG, em relação ao valor 24 horas depois da primeira injeção.

A Figura 8 mostra a relação inversa entre a atividade da uricase de PBC modificada com PEG injetada no soro de um camondongo com deficiência de uricase e as concentrações de ácido úrico no soro e na urina.

A Figura 9 mostra a gravidade decrescente de um defeito de concentração na urina em camondongos com deificência em uricase (uox -/-) que foram tratados com uricase de PBC modificada com PEG.

A Figura 10 mostra a gravidade decrescente de diabetes insipidus nefrogênica em camondongos deficiência de uricase (uox -/-) que foram tratados com uricase de PBC modificada com PEG.

A Figura 11 mostra a gravidade decrescente da nefropatia induzida por ácido úrico, tal como visualizada pela microscopia de ressonância magnética, em camondongos com deficiência em uricase (uox -/-) que foram tratados com uricase de PBC modificada com PEG.

A Figura 12 mostra o afastamento acelerado da circulação de camondongos BALB/c do octâmero de uricase de PBC injetado, comparado com o tetrâmero, quando ambos foram acoplados a cinco a seis filamentos de PEG de 10 kDa por subunidade.

Descrição Detalhada das Realizações Preferidas

A presente invenção apresenta conjugados aperfeiçoados de polímeros, preferivelmente de poli(etioleno glicóis) ou de poli(óxidos de etileno) sulúveis em água, com uricases. A invenção também apresenta composições farmacêuticas dos conjugados aperfeiçoados. Esses conjugados são substancialmente não imunogênicos e retêm pelo menos 75%, preferivelmente 85%, e mais preferivelmente 95% ou mais, da atividade uricolítica da enzima não modificada. As uricases apropriadas para a conjugação em polímeros solúveis em água incluem as urate oxidases naturais isoladas de bactérias, fungos e tecidos das plantas e animais, vertebrados e invertebrados, assim como as formas recombinantes de uricase, incluindo as variantes mutadas, híbridas, e/ou truncadas enzimaticamente ativas da uricase. Os polímeros solúveis em água apropriados para o uso na presente invenção incluem poli(etileno glicóis) ou

poli(óxidos de etileno) lineares e ramificados, todos geralmente conhecidos como PEGS. Os exemplos de PEG ramificado são o objeto da Patente Norte-americana 5.643.575. Um exemplo preferido de PEG linear é monometóxi-PEG, de estrutura geral CH_3O-$(CH_2CH_2O)_nH$, onde n varia de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.300.

Uma uricase de mamífero preferida é a uricase quimérica de porco-babuíno recombinante, composta por partes das seqüências de uricase de fígado de porco e fígado de babuíno, ambas as quais foram determinadas primeiramente por Wu, et al., (1989). Um exemplo dessa uricase quimérica contém os primeiros 225 aminoácidos da seqüência de uricase de suíno (SEQ ID NO.: 1) e os últimos 79 aminoácidos da seqüência de uricase de babuíno (SEQ ID NO.: 2) (uricase de porco-babuíno, ou uricase de PBC; veja a figura 6). Um outro exemplo dessa uricase quimérica contém os resíduos 7-225 da seqüência de suíno (SEQ ID NO.: 1) e os resíduos 226-301 da seqüência de babuíno (SEQ ID NO.: 2); isto é equivalente à uricase de PBC que é truncada nos terminais amino e carboxila (PBC-NT-CT; veja a figura 6). Um outro exemplo dessa uricase quimérica contém os primeiros 288 aminoácidos da seqüência de suíno (SEQ ID NO.: 1) e os últimos 16 aminoácidos da seqüência de babuíno (SEQ ID NO.: 2). Uma vez que a última seqüência difere da seqüência de suíno em somente duas posições, tendo uma lisina (K) no lugar da arginina no resíduo 291 e uma serina (S) no lugar da treonina no resíduo 301, este mutante é indicado como uricase de porco-K-S ou PKS. Cada uma das uricases de PKS, PBC e PBC-NT-CT tem mais um resíduo de lisina e, desse modo, um sítio mais potencial de PEGilação do que a seqüência de suíno ou de babuíno.

Os DNAS para várias uricases de mamíferos, incluindo a uricase de PBC, a uricase de PKS e uma do tipo de babuíno recombinante, foram subclonados, e as condições ótimas foram determinadas para a expressão

em E. coli, ao se empregar métodos padrão. Veja Erlich, HA, (Ed.) (1989) PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press; Sambrook, J, et al., (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Segunda Edição, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. As uricases recombinantes foram extraídas, purificadas, e as suas estabilidade e atividade foram avaliadas ao se empregar uma modificação de ensaios padrão. Veja Fridovich, I, (1965) J. Biol. Chem. 240:2491-2494; Nishimura, et al., (1979), e o Exemplo 1.

Em uma realização da invenção, a uricase pode ser conjugada através de uma ligação covalente atóxica biologicamente estável a um número relativamente pequeno de filamentos de PEG. Essas ligações podem incluir ligações uretano (carbamato), ligações amina secundára, e ligações amido. Vários PEGs ativados apropriados para essa conjugação estão disponíveis comercialmente junto à Shearwater Polymers, Huntsville, AL.

Por exemplo, as ligações uretano para a uricase podem ser formadas mediante a incubação da uricase na presença do derivado de carbonato de succinimidila (SC) ou de carbonato 4-nitrofenila (NPC) de PEG. A SC-PEG pode sintetizada ao se empregar o procedimento descrito na patente norte-americana 5.612.460, que está aqui incorporada a título de referência. A NPC-PEG pode ser sintetizada ao se reagir o PEG com cloroformato de 4-nitrofenila de acordo com os métodos descritos em Veronese, FM, et al., (1985) Appl. Biochem. Biotechnol. 11:141-152, e na patente norte-americana 5.286.637, que está aqui incorporada a título de referência. Os métodos descritos na patente '637 são adaptados a PEGs de um peso molecular mais elevado mediante o ajuste das concentrações dos reagentes para manter uma estequiometria semelhante. Um método alternativo da síntese de NPC-PEG é descrito por Büttner, W., et al., Relatório Descritivo de Patente Alemã 279 486 A1.

As ligações amido para a uricase podem ser obtidas ao se empregar um éster de N-hidróxi succinimida de um derivado de ácido carboxílico de PEG (Shearwater POlymers). As ligações amina secundária podem ser formadas ao se empregar 2,2,2-trifluoro etano sulfonil PEG (tresil PEG; Shearwater Polymers) ou mediante a alquilação redutiva ao se empregar o aldeído de PEG (Shearwater Polymers) e cianoboridreto de sódio.

Nos conjugados que contêm PEGs com pesos moleculares entre 5 kDa e 30 kDa, o número máximo de filamentos do PEG que foram acopladas por subunidade, ao reter pelo menos 75% da atividade uricolítica da enzima não modificada, variou de uma média de dois filamentos para a uricase de soja a mais de dez filamentos para a uricase de PBC (veja as condições do ensaio no Exemplo 1 e os resultados nas figuras 1A-5B). A última extensão de PEGilação corresponde a aproximadamente um terço dos grupos amino totais. Em uma realização da invenção, o número médio de filamentos de PEG acoplados por subunidade de uricase fica entre dois e dez. Em uma realização preferida, o número médio de filamentos de PEG acoplados por subunidade de uricase fica entre três e oito. Em uma realização mais preferida, o número médio de filamentos covalentemente ligados de PEG por subunidade de uricase fica entre quatro e seis. Em uma outra realização, o peso molecular do PEG utilizado para a reação de acoplamento fica entre 5 kDa e 100 kDa, preferivelmente entre 10 kDa e 60 kDa, e mais preferivelmente entre 20 kDa e 40 kDa tal como, por exemplo, 30 kDa.

Há diversos fatores que podem afetar a escolha do peso molecular e o número ótimo de filamentos de PEG para acoplar a uma determinada forma de uricase. Geralmente, a redução ou a eliminação da capacidade imunogênica sem perda substancial da atividade uricolítica pode requerer o acoplamento de relativamente mais filamentos de PEG com um peso

molecular mais baixo, em comparação a relativamente poucos filamentos de PEG com um peso molecular mais elevado. Por exemplo, seis filamentos de PEG de 20 kDa por subunidade ou quatro filamentos de PEG de 30 kDa por subunidade puderam ser otimamente eficazes. Do mesmo modo, cada forma diferente de uricase pode ter um valor ótimo diferente com respeito ao tamanho e ao número de filamentos. Veja as Figuras 1a-5b.

A conjugação de PEG tornou todas as uricases testadas solúveis e estáveis nos tampões ao pH fisiológico, sem a adição de um análogo ou inibidor de substrato, tal como a 8-azaxantina, que é utilizada como um estabilizante na uricase fúngica (Uricozyme®) vendida pela Sanofi Winthrop na França e na Itália. Dois conjugados diferentes de uricase de PBC, um contendo aproximadamente seis filamentos de PEG de 10 kDa por subunidade e o outro contendo aproximadamente dois filamentos de PEG de 19 kDa por subunidade, retiveram uma atividade significativa após a incubação em soro de camondongo por mais de um mês a 37°C. Além disso, diversos dos conjugados da presente invenção tiveram uma vida média em circulação nos camondongos que eram maiores do que dois dias, ao contrário das vidas médias de aproximadamente oito horas ou 24 horas previamente relatadas para as uricases de mamíferos e microbianas modificadas com PEG. Chen, et al., (1981); Fuertges, F, et al., (1990) J. Contr. Release .11:139-148; Fujita, T, et al., (1991) J. Pharmacobiodyn. 14:623-629. Vidas médias mais longas de drogas injetadas de proteína as tornam mais econômicas e podem levar a uma melhor compatibilidade com o paciente. A vida média prolongada é também indicativa de produtos que são melhor tolerados pelo corpo.

Quando os conjugados de PEG da uricase de PBC foram preparados a partir da forma tetramérica purificada da enzima (quatro subunidades de 35 kDa), eles apresentaram uma capacidade imunogênica profundamente

reduzida em camondongos (figura 7), ao contrário da capacidade imunogênica moderada dos conjugados de PEG de formas maiores de enzima (por exemplo, octâmeros da subunidade de 35 kDa; veja a figura 12), e a capacidade imunogênica muito elevada da enzima não modificada. As injeções repetidas de camondongos com deficiência em uricase com a PEG-uricase da presente invenção eliminaram a sua hiperuricemia por mais de dois meses e protegeram a estrutura e a função de seus rins contra os danos relacionados com o ácido úrico (figuras 8-11).

As injeções de conjugados inteiramente ativos da uricase de PBC com o PEG de 10 kDa (figuras 3A – 3B) reduziram drasticamente a hiperuricemia de camondongos com deficiência de uricase homozigóticos (figura 8). Os níveis de ácidos úrico na urine foram reduzidos também drasticamente em todos os camondongos com deficiência em uricase tratados com a uricase de PBC modificada com PEG. Os camondongos com deficiência em uricase receberam uma série de injeções com um preparado de PEG-uricase semelhante àquele utiliado para obter os dados na figura 8. Esse tratamento reduziu a gravidade de um defeito de concentração na urina, tal como demonstrado por medições da osmolalidade da urina sob condições normais e após um período de doze horas sem água (figura 9) e pelo seu consumo de água e saída na urina (figura 10), em comparação com as mediçõess correspondentes em camondongos geneticamente semelhantes não testados. Também foi demonstrado que dez semanas de tratamento, começando dentro dos primeiros dez dias de vida, de camondongos "de queda" com deficiência em uricase homozigóticos (uox -/-) com uma PEG-uricase da presente invenção diminuíram a gravidade do rompimento induzido por urate da arquitetura renal, tal como visualizado pela microscopia de ressonância magnética (figura 11). Para os métodos de microscopia, veja Hedlund, LW, et al., (1991) Fund. Appl. Toxicol. 16:787-

797; Johnson, GA, et al., (1992) em JC Gore, (Ed.), Reviews of Magnetic Resonance in Medicine, Vol. 4 (páginas 187-219) New York: Pergamon Press.

Os preparados purificados de uricases naturais e recombinantes contêm geralmente uma mistura de agregados de enzima, além da forma (140 kDa) tetramérica. A porcentagem de cada preparado de uricase que está na forma tetramérica varia geralmente de aproximadamente 20% a 90%. Apesar da evidência que os agregados não PEGilados de diversas outras proteínas são altamente imunogênicos (veja, por exemplo, Moore, WV, et al., (1980) J. Clin. Endocrinol. Metab. 51:691-697), os estudos precedentes de PEG-uricase não descrevem nenhum esforço para limitar o teor dos agregados, sugerindo que a capacidade imunogênica potencial dos agregados modificados com PEG não foi levada em consideração. Com base nas observações dos autores da presente invenção, parece provável que esses agregados estavam presentes nos preparados de enzima utilizados para as sínteses precedentes de PEG-uricase. A sua presença pode ter dificultado a tarefa de preparar conjugados não imunogênicos. Também parece que as grandes perdas da atividade uricolítica observadas em esforços precedentes para PEGilar a uricase estavam relacionadas ao grande número de filamentos de PEG de baixo peso molecular que foram acoplados. Por outro lado, os métodos de purificação e PEGilação da uricase aqui descritos permitem a ligação covalente do até dez filamentos de PEG por subunidade enquanto que retém mais de 75% da atividade uricolítica, pelo menos para determinadas uricases, por exemplo, a uricase quimérica de porco-babuíno e o enzima de A. flavus (veja as figuras 3A e 4A).

Em uma outra realização preferida, substancialmente todos os agregados da forma tetramérica da enzima podem ser removidos através de cromatografia de troca de íons ou de exclusão de tamanho a um pH entre

aproximadamente 9 e 10,5, preferivelmente de 10,2, antes da conjugation do preparado de uricase substancialmente tetramérico resultante. O peso molecular da uricase em cada fração da coluna preparativa pode ser monitorado por qualquer técnica analítica dependente de tamanho, incluindo, por exemplo, a HPLC, a cromatografia de exclusão de tamanho convencional, a centrifugação, a dispersão luminosa, a eletroforese capilar ou a eletroforese com gel em um tampão não desnaturante. Para a uricase tetramérica isolada ao se empregar a cromatografia de exclusão de tamanho, as frações que contêm somente a forma de 140 kDa da enzima podem ser agrupadas e utilizadas para a conjugação em PEG. Para a uricase tetramérica isolada ao se empregar a cromatografia de troca de íons, as frações da coluna de troca de íons podem ser analisadas com respeito ao tamanho para se determinar quais frações contêm quantidades substanciais da forma tetramérica sem agregados detectáveis. Da uricase agrupada dessa maneira, pelo menos 90% podem estar na forma tetramérica; os agregados indesejáveis podem desse modo constituir tão pouco quanto aproximadamente 10%, 5%, 2%, ou menos, da uricase isolada total.

Os resultados aqui apresentados indicam que, mesmo quando extensivamente PEGiladas, as formas da uricase de PBC maiores do que o tetrâmero são altamente imunogênicas nos camondongos (figura 12). Além disso, nos camondongos de tinham sido injetados uma vez com os conjugados de PEG de agregados de uricase, a atividade uricolítica nas injeções subseqüentes tanto de tetrâmeros PEGilados quanto de agregados PEGilados foi retirada rapidamente de circulação. Por outro lado, os conjugados preparados a partir de uricase contendo menos de 5% de agregados poderiam ser reinjetados muitas vezes sem nenhuma aceleração de suas taxas de afastamento (figura 7) e sem a formação detectável de anticorpos, conforme medido por um imunoensaio ligado por enzima

sensível. O emprego de uricase tetramérica altamente purificada distingue ainda mais os conjugados aperfeiçoados da presente invenção dos preparados de PEG-uricase descritos anteriormente. Por outro lado, a presença de uma proporção significativa (por exemplo, > 10%) dos agregados nos preparados de uricase utilizados por alguns pesuisadores precedentes pode ter conduzido ao acoplamento de um grande número de filamentos de PEG nos esforços para suprimir a capacidade imunogênica. Conseqüentemente, a atividade enzimática dos conjugados resultantes foi diminuída substancialmente. Em outras realizações, a presente invenção contempla expressa a uricase PEGilada na forma não tetramérica, tais como, por exemplo, dímeros de uricase, contanto que os preparados de tal uricase conjugada retenham pelo menos aproximadamente 75% de sua atividade uricolítica e seja substancialmente não imunogênica.

Em uma outra realização da presente invenção, é apresentada uma uricase de fígado de babuíno mutada de potência inesperadamente aumentada, em relação à da enzima não mutada. Essa uricase de primata aperfeiçoada foi preparada através de técnicas de DNA recombinante convencionais. Foi particularmente inesperado que a substituição de um único resíduo de aminoácido (histidina em lugar de tirosina na posição 97) na uricase de babuíno resultaria em um aumento substancial na atividade enzimática específica. Quando expressada em E. coli, foi verificado que essa proteína mutante arpesenta pelo menos uma atividade específica 60% mais elevada do que a enzima de babuíno recombinante da qual ela foi derivada.

Em uma outra realização, a atividade específica é aumentada e/ou a solubilidade da enzima não PEGilada é aumentada mediante a expressão de variantes truncadas das uricases quiméricas de suíno ou de de suíno-babuíno das quais pelo menos os primeiros seis aminoácidos no terminal amino e/ou

pelo menos os últimos três aminoácidos no terminal carboxila são suprimidos das proteínas expressadas (veja a figura 6). As uricases recombinantes com o truncamento do terminal carboxila podem ter uma melhor solubilidade antes da PEGilação por causa da remoção da seqüência alvo peroxisomal. Veja Miura, S, et al., (1994) Eur. J. Biochem. 223:141-146.

Os conjugados de PEG-uricase da presente invenção são úteis para baixar os níveis de ácido úrico nos fluidos corpóreos e tecidos dos mamíferos, preferivelmente dos seres humanos, e desse modo podem ser utilizados para o tratamento dos níveis elevados de ácidos úrico associados com as condições que incluem a gota, cálculso artríticos, a insuficiância renal, o transplante de órgãos e a doença maligna. Os conjugados de PEG-uricase podem ser injetados em um mamífero que tem níveis de ácido úrico excessivos por qualquer via dentre um número de vias, incluindo as vias intravenosa, subcutânea, intradermal, intramuscular e intraperitoneal. Alternativamente, eles podem ser aerrosolizados e inalados. Veja Patton, JS, (1996) Adv. Drug Delivery Rev. 19:3-36 e a patente norte-americana 5.458.135. A dose eficaz de PEG-uricase da presente invenção vai depender do nível de ácido úrico e do tamanho do indivíduo. Em uma realização deste aspecto da invenção, a PEG-uricase é administrada em um excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável em uma quantidade que varia de aproximadamente 10 μg a aproximadamente 1 g. Em uma realização preferida, a quantidade administrada fica entre aproximadamente 100 μg e 500 mg. Mais preferivelmente, a uricase conjugada é administrada em uma quantidade entre 1 mg e 100 mg tal como, por exemplo, 5 mg, 20 mg ou 50 mg. As massas fornecidas para as quantidades de dosagem das realizações se referem à quantidade de proteína no conjugado.

As formulações farmacêuticas que contêm PEG-uricase podem ser preparadas através de técnicas convencionais, por exemplo, conforme descritos em Gennaro, AR (Ed.) (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição Easton, PA: Mack Publishing Co. Os excipientes apropriados para a preparação de soluções injetáveis incluem, por exemplo, soro fisiológico tamponado com fosfato, solução de Ringer lactada, água, polióis e glicerol. As composições farmacêuticas para a injeção parenteral compreendem líquidos aquosos e não aquosos estéreis, dispersões, suspensões, ou emulsões farmaceuticamente aceitáveis, bem como pós estéreis para a reconstituição em soluções ou dispersões injetáveis estéreis imediatamente antes do uso. Essas formulações podem conter componentes adicionais tais como, por exemplo, conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes umectantes, emulsificantes, tampões, antioxidantes e diluentes.

A PEG-uricase pode também ser empregada como composições de liberação controlada para o implante em um indivíduo, para controlar continuamente os níveis de ácido úrico elevados nos fluidos corpóreos. Por exemplo, o ácido polilático, ácido poliglicólico, colágeno regenerado, poli-L-lisina, alginato de sódio, goma de gelana, quitosana, agarose, lipossomas multilamelares e muitas outras formulações de armazenagem convencionais compreendem materiais bioerodíveis ou biodegradáveis que podem ser formulados com composições biologicamente ativas. Estes materiais, quando implantados ou injetados, rompem e liberam gradualmente o material ativo no tecido circunvizinho. Por exemplo, um método de encapsulação de PEG-uricase compreende o método apresentado na patente norte-americana 5.653.974, que está aqui incorporada a título de referência. O emprego de formulações bioerodíveis, biodegradáveis e outras de armazenagem é contemplado expressamente na presente invenção. O uso

de bombas de infusão e de sistemas de captura de matriz para a administração de PEG-uricase também é englobado dentro do âmbito da presente invenção. A PEG-uricase também pode ser vantajosamente incluída nas micelas ou nos lipossomas. A tecnologia de encapsulação de lipossoma é bem conhecida no estado da técnica. Veja, por exemplo, Lasic, D, et al., (Eds.) (1995) Stealth Liposomes. Boca Raton, Fl: CRC Press.

As composições farmacêuticas de PEG-uricase da invenção irão diminuir a necessidade de hemodiálise nos pacientes com risco elevado de falha renal induzida por urate, por exemplo, os receptores de transplantes de órgãos (veja Venkataseshan, VS, et al., (1990) Nephron. 56:317-321) e os pacientes com algumas doenças malignas. Nos pacientes com grandes acúmulos de urate cristalino (cálculos artríticos), essas composições farmacêuticas irão melhorar a qualidade de vida mais rapidamente do que os tratamentos atualmente disponíveis.

Os seguintes exemplos, que não devem ser interpretados como limitadores da invenção de nenhuma maneira, ilustram os vários aspectos apresentados acima. Estes exemplos descrevem PEG-uricases preparadas através do acoplamento de derivados de PEG (ou seja, eletrofílicos) de diversos tamanhos e composições com as uricases de suíno, fúngicas ou bacterianas de ocorrência natural, ou com as uricases quiméricas de soja, suíno ou porco-babuíno recombinantes. Os resultados dos estudos da atividade, da solubilidade, da estabilidade, farmacocinéticos, farmacodinâmicos e imunológicos são incluídos. Os dados nas figuras 8-11 fornecem a evidência da capacidade da uricase de PBC modificada com PEG da presente invenção corrigir a hiperuricemia e a hiperuricosuria e preservar a estrutura e a função renal em um modelo animal em que a hiperuricemia e a hiperuricosuria ocorrem e causam graves danos renais. Wu, X, et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:742-746. Estes

exemplos fornecem a orientação a um elemento versado na técnica para a produção dos conjugados substancialmente não imunogênicos de uricase que retêm pelo menos aproximadamente 75% da atividade uricolítica da enzima não modificada.

EXEMPLO 1

Purificação da forma tetramérica de uricase

A forma tetramérica de uricase (peso molecular de aproximadamente 140 kDa) foi purificada a partir de uma solução de uricase de fígado de suíno, através de cromatografia preparatória de exclusão de tamanho ou de troca iônica, seguida por cromatografia analítica de exclusão de tamanho. A uricase de fígado de suíno foi obtida junto à Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, catálogo número U2350 ou U3377; ou junto à Boebringer Mancheim, Indianopolis, IN.

As cromatografias preparatória e analítica de exclusão de tamanho foram realizadas a um pH de 10-10,5, de preferência de 10,2, em 10 mM de tampão de carbonato de sódio contendo NaCl 0,1M em colunas Superdex 200, as quais foram calibradas previamente com proteínas de peso molecular conhecido. As Superdex foram obtidas junto à Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ. Qualquer tampão pode ser utilizado, desde que seja capaz de manter o pH desejado e seja compatível com a química a ser utilizada para o acoplamento subseqüente de PEG. Tais tampões são bem conhecidos no estado da técnica. A absorbância ultravioleta do eluato proveniente da coluna preparatória foi monitorada a 280 nm, e porções contendo uricase do eluato correspondente ao peso molecular da forma tetramérica desejada, mas sem uma espécie de peso molecular mais elevado, foram coletadas para o uso na síntese de PEG-uricase substancialmente não imunogênica, conforme descrição no Exemplo 2. Alternativamente, as formas tetraméricas de uricase podem ser isoladas através do uso de outros

meios de exclusão de tamanho tais como, por exemplo, Superose 12 (Amersham Pharmacia) ou algum outro meio que seja compatível com soluções moderadamente alcalinas e que tenha uma capacidade apropriada de fracionamento de tamanho. Tais meios são de disponibilidade imediata e são bem conhecidos no estado da técnica.

A cromatografia de troca iônica foi executada a um pH de 10-10,5, de preferência de 10,2, em colunas Mono Q (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), as quais foram equilibradas com tampão de carbonato de sódio 0,1 M. Qualquer tampão que seja compatível com a química do acoplamento de PEG e que seja capaz de manter o pH desejado pode ser utilizado a uma intensidade iônica suficientemente baixa para permitir o adsorção de uricase à coluna. Tais tampões são bem conhecidos no estado da técnica. A absorbância ultravioleta do eluato foi monitorada a 280 nm, durante a eluição de uricase da resina de troca iônica, pelo aumento da força iônica da solução de tampão aplicada, como por exemplo, por um gradiente linear de 0 a 0,5 M NaCl no tampão de carbonato de sódio. A HPLC por exclusão de tamanho foi então utilizada para identificar as frações do eluato que contêm a forma tetramérica desejada de uricase, sem agregados detectáveis, para a síntese de uricase–PEG substancialmente não imunogênica. Alternativamente, a forma tetramérica de uricase pode ser isolada através do uso de outros meios de troca iônica, tal como Q-Sepharose (Amersham Pharmacia) ou qualquer outro meio que seja compatível com soluções moderadamente alcalinas. Tais meios são de disponibilidade imediata e são bem conhecidos no estado da técnica.

A atividade de uricase foi analisada através do uso de uma modificação de métodos-padrão. Vide, por exemplo, Fridovich (1965); Nishimura, et al., (1979). As soluções de ácido úrico foram preparadas na hora, diariamente, em tampão de borato de sódio 50 mM, a um pH de 92,

para se obter concentrações finais na análise de 6-150 M. Os preparados de uricase foram diluídos neste tampão de borato, o qual contém albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, catálogo No. A-7030), de modo que a concentração final de albumina na análise ficou sendo de 0,1 mg/ml. Após a mistura de várias diluições da enzima com o substrato nas cavidades de uma placa de microtitulação em um leitor de microplacas, a taxa de desaparecimento do ácido úrico a 25°C foi monitorada a 292 nm, a cada quatro segundos, durante três minutos. Das amostras, entre as quais 10% e 40% do substrato foram consumidos dentro de três minutos, pelo menos 20 pontos de dados foram utilizados para calcular a taxa máxima de diminuição na absorbância por minuto. Uma unidade internacional (IU) da atividade da uricase é definida como a quantidade de enzima que consome um micromole de ácido úrico por minuto; as atividades específicas são expressadas como IU/mg de proteína. Alguns dos dados para as atividades relativas de uricase das Figuras 1A-5B foram obtidos através do uso de 100 M de ácidoúrico na análise. Outros resultados para a velocidade em 100 M de ácido úrico (V_{100}) foram calculados a partir dos valores da constante de Michaelis (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) para as respectivas preparações da enzima, através do uso da fórmula:

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

onde K_M é expressado em unidades micromolares.

EXEMPLO 2

Acoplamento de PEG à uricase tetramérica de suíno

A uma solução de uricase tetramérica em tampão de carbonato de sódio 0,1 M, a um pH de 10,2, de 10 a 200 moles de um derivado ativo de monometóxi PEG, como por exemplo, o carbonato 4-nitrofenil (NPC-PEG), de vários tamanhos (de 5 kDa a 30 kDa), foi adicionado para cada mole de subunidade de uricase (peso molecular de 35 kDa). Estes e outros PEGs

ativos apropriados estão disponíveis junto à Shearwater Polymers. As instruções para acoplar estes PEGs às proteínas são fornecidas no catálogo da Searwater Polymers, no endereço da Internet www.swpolymers.com, e por JM Harris, et al., (Eds.) (1997), em Poly(ethylene) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series 680, Washington, DC: American Chemical Society. A reação do acoplamento foi continuada a 0-8°C, até a extensão do acoplamento de PEG que não mudou mais de forma significativa com o tempo. O PEG que não reagiu foi então removido do produto da reação por meio de cromatografia e/ou de ultrafiltração.

O número de filamentos de PEG acoplado por subunidade de uricase foi determinado através de uma adaptação dos métodos descritos por Kunitani, M, et al., (1991) J. Chromatogr. 588:125-137; Saifer, et al., (1997) e Sherman et al., (1997). Em suma, as alíquotas das misturas da reação de PEGilação ou frações das colunas preparatórias de troca iônica ou por exclusão de tamanho foram caracterizadas por meio de HPLC analítica por exclusão de tamanho em uma coluna de TSK 5.000 PW_{XL} à temperatura ambiente, em tampão de carbonato de sódio 10 mM, a um pH de 10,2, contendo NaCl 0,1M. A coluna da HPLC foi obtida junto à TosoHaas, Montgomeryville, PA. As proteínas e os PEGs foram monitorados por detectores de índice de refração e de absorbância de radiação ultravioleta. A quantidade de proteína no conjugado foi calculada a partir da absorbância de radiação ultravioleta em relação àquela da uricase padrão não modificada apropriada. A quantidade de PEG no conjugado foi então calculada, a partir da área do pico do índice de refração, corrigida para a contribuição da proteína no índice de refração, em relação à área do pico do índice de refração padrão apropriado de PEG.

A figura 2A mostra a retenção de atividade pela uricase de fígado de suíno PEGilada, como uma função do número de filamentos de PEG

acoplado por subunidade. Os dados dos autores da presente invenção (,) são comparados com aqueles de Chen, et al., (1981). O ponto de dados dentro de um círculo grande denota um conjugado relatado para ser não imunorreativo, por Chen, et al., (1981). Conforme mostrado na Figura A, os conjugados de uricase tetramérica de suíno com até seis filamentos de PEG de 30 kDa por subunidade ou até sete filamentos de PEG de 5 kDa por subunidade retiveram pelo menos 75% da atividade da enzima não modificada. O aumento aparente na atividade específica, com um número crescente de filamentos de PEG de 5 kDa ou de 30 kDa (até aproximadamente quatro filamentos por subunidade) pode refletir a insolubilidade ou a instabilidade relativa da enzima não modificada, em comparação com os conjugados. Conforme mostrado na Figura 2B, os conjugados de uricase de suíno com uma média de mais de três filamentos de PEG de 30 kDa por subunidade contêm uma massa maior de PEG do que foi considerado suficiente para impossibilitar a capacidade reativa, por Chen, et al. (1981).

EXEMPLO 3

Propriedades dos conjugados de PEG de uricase de PBC tetramérica recombinante

O DNA da uricase quimérica de porco babuíno (PBC) foi subclonado no vetor de expressão pET3d (Novagen, Madison, WI) e a construção resultante de plasmídeo foi transformada e expressada em um filamento de Escherichia coli BL21(DE3)pLysS (Novagen). Estes procedimentos foram realizados através do uso de métodos bem conhecidos no estado da técnica da biologia molecular. Vide Erlich (1989); Sambrook, et al., (1989); AuSubel, F. et al., (Eds.), (1997) Short Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons.

A Figura 6 mostra a seqüência de aminoácidos deduzida de uricase

de PBC (aminoácidos 1-225 da SEQ. ID. No.: 1 e aminoácidos 226-304 da SEQ. ID. No.: 2), em comparação com as seqüências de suíno (SEQ. ID. No.: 1) e de babuíno (SEQ. ID. No.: 2). Os resíduos na seqüência de babuíno que diferem daqueles na seqüência de suíno são mostrados em negrito. As seqüências de suíno e de babuíno foram primeiramente determinadas por Wu, et al., (1989) e confirmadas pelos autores da presente invenção. A SEQ. ID. No. 1 é idêntica ao Número de Acesso p16164 do GenBank, com exceção da ausência do resíduo inicial de metionila na seqüência do GenBank. A SEQ. ID. No. 2 é idêntica ao Número de Acesso p25689 do GenBank, com exceção da ausência do resíduo inicial de metionila e de uma substituição de histidina por treonina, no resíduo 153 na seqüência do GenBank (resíduo 154, na Figura 6).

A forma tetramérica de uricase de PBC foi isolada e acoplada aos PEGs de vários pesos moleculares, conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. Os conjugados preparados com o PEG de 5 kDa, de 10 kDA, de 19 kDa ou de 30 kDa continham até dez filamentos de PEG, por subunidade. Aqueles preparados com os PEGs de pelo menos 10 kDa retiveram mais do que 95% da atividade específica inicial da uricase recombinante (Figuras 3A-3B).

As seguintes propriedades de um conjugado de uricase tetramérica de PBC com aproximadamente seis filamentos de PEG de 10 kDa por subunidade são ilustradas nas figuras indicadas: a falta do capacidade imunogênica (Figura 7) e a eficácia em camundongos com deficiência de uricase em: 1) correção de hiperuricemia e hiperuricosúria (Figura 8); 2) diminuição da gravidade de um defeito de concentração de urina (Figura 9), e 3) diminuição da gravidade de diabetes insipidus nefrogênico (Figura 10). Adicionalmente, essa PEG-uricase diminuiu a gravidade dos danos renais relacionados com o ácido úrico, conforme visualização por microscopia por ressonância magnética (Figura 11).

A Figura 7 mostra a atividade de uricase de PBC no soro de camundongo, 24 horas após cada uma das quatro ou cinco injeções intraperitoneais de PEG-uricase, em relação ao valor de 24 horas após a primeira injeção. Os conjugados de PEG foram preparados a partir de três preparados diferentes de uricase de PBC, através do uso de duas técnicas diferentes para a ativação de PEG. Um preparado ( ) foi testado em camundongos com deficiência de uricase (uox -/-); os outros dois (,) foram testados em camundongos normais BALB/c. O preparado mais imunorreativo ( ) foi preparado a partir de uricase purificada de PBC, que contém uma quantidade desconhecida de agregados de uricase, acoplada a uma média de sete filamentos de PEG de 5 kDa por subunidade, através do uso do derivado do carbonato de succinimidila de PEG (SC-PEG). Zalipsky, patente norte-americana 5.612.460, aqui incorporada a título de referência. O preparado moderadamente imunorreativo ( ) foi preparadopor meio do acoplamento de um preparado de uricase de PBC que contém 11% dos agregados em uma média de dois filamentos de PEG de 19 kDa por subunidade, através do uso de um derivado de carbonato de 4-nitrofenila de PEG (NPC-PEG). Sherman et al., (1997). O conjugado menos imunorreativo ( ) foi preparadopor meio do acoplamento de uma média de seis filamentos NPC-PEG de 10 kDa por subunidade, em uma preparação de uricase de PBC, que contém a uricase agregada inferior a 5%.

A Figura 8 mostra a relação inversa entre as concentrações do ácido úrico no soro e na urina e a atividade de PEG-uricase injetada no soro (uox -/-) de um camundongo com deficiência de uricase. Injeções no tempo zero e depois de 72 horas continham 0,43 IU de uricase de PBC conjugado a uma média de seis filamentos de PEG de 10 kDa por subunidade da enzima.

A Figura 9 mostra que o tratamento de camundongos com deficiência de uricase com a uricase de PBC modificado por PEG diminuiu

a gravidade de um defeito de concentração de urina. O desvio médio e padrão dos dados para a osmolalidade da urina é mostrado para dois camundongos, que contêm uma cópia do gene de uricase de murino normal (uox +/-), seis camundongos com deficiência de uricase homozigóticos não tratados (uox -/-) e seis camundongos com deficiência de uricase homozigóticos que foram injetados dez vezes, entre o terceiro e o septuagésimo segundo (72º) dia de vida, ou com 95 ou 190 mIU de PEG-uricase. Os camundongos de cada base genética ou receberam água ad libitum (barras sólidas) ou foram privados de água durante doze horas (barras hachuriadas) antes da coleta de sua urina.

A Figura 10 mostra que o tratamento de camundongos com deficiência de uricase com a uricase de PBC modificada por PEG diminuiu a gravidade de diabetes insipidus nefrogênico, caracterizada pelo consumo anormalmente elevado de água e pela saída anormalmente elevada de urina. Os conteúdos genéticos dos camundongos e o protocolo de tratamento foram os mesmos que aqueles da Figura 9. O desvio médio e padrão de consumo diário de água (barras sólidas) e a saída de urina (barras hachuriadas) são mostrados para três grupos de seis camundongos.

A Figura 11 mostra que o tratamento de camundongos com deficiência de uricase de PBC modificada por PEG diminuiu a gravidade da nefropatia induzida por ácido úrico, conforme visualização por microscopia por ressonância magnética. Os conteúdos genéticos dos três grupos de camundongos e o protocolo de tratamento foram os mesmos que aqueles da Figuras 9 e 10. A microscopia por ressonância magnética foi executada no Centro para Microscopia in vivo, Duke University Medical Center, Durtham, Carolina do Norte.

Além dos resultados sumarizados nas Figuras de 8 a 11, foi demonstrado que os níveis de ácido úrico na urina de todos os camundongos

com deficiência de uricase diminuíram drasticamente, após o tratamento com a uricase de PBC modificada por PEG. Finalmente, a Figura 12 mostra que, ao contrário da forma tetramérica de uricase de PBC modificada por PEG, a forma octamérica (peso molecular = 280 kDa), mesmo quando extensivamente PEGilada, é imunogênica em camundongos. Esta propriedade é refletida no afastamento acelerado do octâmero modificado por PEG, dentro de cinco dias após uma única injeção intraperitoneal. Os mesmos camundongos foram novamente injetados com a mesma dose dos mesmos preparados de PEG-uricase, no oitavo e no décimo quinto dia. Vinte e quatro horas após a segunda e a terceira injeções, a atividade uricolítica não foi detectável nos soros dos camundongos injetados com o octâmero PEGilado, mas foi detectada prontamente nos soros daqueles injetados com o tetrâmero PEGilados. Estes resultados, em combinação com o afastamento acelerado do octâmero PEGilado, observado após a primeira injeção (Figura 12), confirmam a utilidade da remoção de todas as formas de uricase maiores do que o tetrâmero, antes da PEGilação da enzima.

EXEMPLO 4

Conjugação de PEG da uricase de Candida utilis

A uricase de Candida utilis foi obtida junto à Sigma-Aldrich (St. Louis MO; catálogo No. U1878) ou junto à Worthington Biochemical Corporation (Freehold, NJ; catálogo No. URYW). Através do mesmo procedimento, conforme descrição nos Exemplos 1 e 2, a forma tetramérica foi isolada e os conjugados de PEG foram sintetizados com o PEG de 5 kDa, de 10 kDa ou de 30 kDa (Figuras 1A-1B). A Figura 1A mostra a retenção da atividade pela uricase PEGilada de Candida utilis em função do número de filamentos de PEG acoplados por subunidade. Os dados dos autores da presente invenção (, ,) são comparados com aqueles de

Nishimura, et al., (1979); Nishimura, et al., (1981); Chen, et al., (1981); Davis, et al,. (1981); Tsuji, et al., (1985); Yasuda, et al., (1990), e Fujita, et al., (1991). Os pontos de dados dentro dos círculos grandes denotam os conjugados relatados como sendo não antigênicos, por Nishimura, et al., (1979 ou 1981) ou não imunorreativos, por Chen, et al., (1981).

A figura 1B mostra a retenção da atividade pela uricase PEGilada de Candida utilis em função da massa total de PEG acoplado por subunidade. Os dados dos autores da presente invenção (, ,) são comparados com aqueles dos mesmos relatórios, conforme a Figura 1A. Os pontos de dados dentro dos círculos grandes têm o mesmo significado que na Figura 1A.

Conforme mostrado nas figuras 1A e 1B, os conjugados com uma média de até seis filamentos de PEG de 5 kDa ou de 30 kDa ou de nove filamentos de PEG de 10 kDa por subunidade retiveram pelo menos 75% da atividade da enzima não modificada. O aumento aparente na atividade específica quando um número crescente de filamentos de PEG de 30 kDa é ligado (até cinco ou seis filamentos por subunidade) pode refletir a insolubilidade ou a instabilidade relativa da enzima não modificada, em comparação com os conjugados.

EXEMPLO 5

Conjugação de PEG de uricase de Aspergillus flavus

A uricase de Aspergillus flavus foi obtida junto à Sanofi Winthrop (Gentilly Cédex, França). Através do mesmo procedimento, conforme descrição no Exemplo 2, os conjugados com os PEGs de vários pesos moleculares foram sintetizados (Figuras 4A-4B). Os conjugados preparados pelo acoplamento da enzima de A. flavus, com uma média de até doze filamentos de PEG de 5 kDa ou de até sete filamentos de PEG de 30 kDa por subunidade, retiveram pelo menos 75% da atividade específica inicial dessa uricase fúngica.

EXEMPLO 6

Conjugação de PEG de uricase de soja

A uricase recombinante do nódulo da raiz da soja (chamado também de nodulin 35) foi preparada e purificada, conforme descrição por Kahn e Tipton (Kahn, K, et al., (1997) Biochemistry 36:4731-4738), e foi apresentada pelo Dr. Tipton (University of Missouri, Columbia, MO). Através do mesmo procedimento, conforme descrição nos Exemplos 1 e 2, a forma tetramérica foi isolada e os conjugados foram preparados com os PEGs de vários pesos moleculares (Figuras 5A-5B). Ao contrário da uricase de Candida utilis (Figura 1A), da uricase de suíno (Figura 2A), da uricase quimérica de porco-babuíno (Figura 3A) e da uricase de Aspergillus flavus (Figura 4A), a enzima de soja tolerou o acoplamento de somente cerca de dois filamentos de PEG de 5 kDa ou de 30 kDa por subunidade, com retenção pelo menos de 75% da atividade uricolítica inicial.

EXEMPLO 7

Conjugação de PEG de uricase de Arthrobacter globiformis

A uricase de Arthrobacter globiformis foi obtida junto à Sigma-Aldrich (catálogo No. U7128). Vide a Patente Japonesa 9-154581. Através do mesmo procedimento, conforme descrição nos Exemplos 1 e 2, a forma tetramérica foi isolada e os conjugados com 5 kDa e o PEG de 30 kDa foram preparados. Enquanto que os conjugados com uma média de mais de três filamentos de PEG de 5 kDa por subunidade retiveram menos do que 60% da atividade específica inicial, os conjugados com uma média de aproximadamente dois filamentos de PEG de 30 kDa por subunidade retiveram pelo menos 85% da atividade específica inicial.

EXEMPLO 8

Conjugação de PEG de uricases de PBC e de suíno truncadas por amino

As uricases recombinantes de suíno e de PBC, a partir das quais os primeiros seis aminoácidos no terminal de carboxila são suprimidos, são

expressas e purificadas de E. coli, por técnicas padrão, conforme descrição no Exemplo 3. Através do mesmo procedimento, conforme descrição nos Exemplos 1 e 2, conjugados de PEG de uricases de PBC truncadas por amino foram sintetizados para produzir os conjugados substancialmente não imunogênicos, os quais retêm pelo menos 75% da atividade específica inicial.

EXEMPLO 9

Conjugação de PEG de uricases de PBC e de suíno truncadas no terminal carboxila ou em ambos os terminais carboxila e amino

As uricases recombinantes de suíno e de PBC, a partir das quais os últimos três aminoácidos no terminal carboxila são eliminados, são expressadas e purificadas de E. coli por técnicas padrão, conforme descrição no Exemplo 3. Esta remoção do terminal carboxila pode aumentar a solubilidade das enzimas não modificadas, uma vez que remove o sinal alvo peroxisomal. Vide Miura, et al., (1994). Através do mesmo procedimento, conforme descrição nos Exemplos 1 e 2, os conjugados de PEG de uricases truncadas de carboxila são sintetizados para produzir os conjugados substancialmente não imunogênicos, os quais retêm pelo menos 75% da atividade específica inicial. A seqüência de uricase recombinante de PBC truncada por seis resíduos no terminal amino e por três resíduos no terminal carboxila (PBC-NT-CT) é mostrada na Figura 6. Esta uricase é expressada, purificada e PEGilizada, conforme descrição nos Exemplos 1, 2 e 3, para produzir os conjugados substancialmente não imunogênicos, os quais retêm pelo menos 75% da atividade específica inicial.

EXEMPLO 10

Conjugação de PEG de mutantes de uricase de suíno que contém um número elevado de pontos de ligação de PEG

As uricases de suíno recombinantes são preparadas conforme

descrito no exemplo 3, no qual o número potencial de pontos de ligação de PEG é aumentado pela substituição de um ou mais resíduos de arginina por lisina. Vide Hershfield, MS, et al., (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:7185-7189. A seqüência de aminoácidos de um exemplo da tal mutante (uricase de PKS), em que a arginina no resíduo 291 é substituída por lisina e a treonina no resíduo 301 é substituída por serina, é mostrada na Figura 6. Através do mesmo procedimento, conforme descrito nos Exemplos 1 e 2, o PEG é conjugado a esta uricase para produzir os conjugados substancialmente não imunogênicos, os quais retêm pelo menos 75% da atividade específica inicial de uricase recombinante.

EXEMPLO 11

Conjugação de PEG de um mutante de uricase de babuíno recombinante

Através do uso de métodos padrão da biologia molecular, tal como no Exemplo 3, a uricase de babuíno recombinante é construída por intermédio de uma substituição de aminoácidos (histidina em lugar de tirosina) na posição 97 (vide a seqüência de babuíno na Figura 6). Através do mesmo procedimento, conforme descrito nos Exemplos 1 e 2, os conjugados de PEG da forma tetramérica do mutante de uricase de babuíno recombinante foram sintetizados para produzir os conjugados de capacidade imunogênica substancialmente reduzida, os quais retêm pelo menos 75% da atividade específica inicial de uricase recombinante.

EXEMPLO 12

Capacidade imunogênica dos conjugados de PEG provenientes de Candida utilis, Aspergilllus flavus e Arthrobacter globiformis

A uricase de Candida utilis, Aspergillus flavus e Arthrobacter globiformis é obtida conforme descrito nos Exemplos 4, 5 e 7, respectivamente. Através do mesmo procedimento, de acordo com a descrição nos exemplos 1 e 2, os conjugados de PEG foram sintetizados com o PEG de 5 kDa, de 10 kDa, de

20 kDa ou de 30 kDa. A capacidade imunogênica destes conjugados é substancialmente reduzida ou eliminada.

SEQUENCE LISTING

<110> Williams, L. David
Hershfield, Michael S.
Kelly, Susan J.
Saifer, Mark G.P.
Sherman, Merry R.

<120> PEG-URATE OXIDASE CONJUGATES AND USE THEREOF

<130> MVIEW.001VPC

<140>
<141>

<150> 09/130,392
<151> 1998 08-06

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 304
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 304
<212> PRT
<213> Papio hamadryas

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

31

10 -31-

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado de uricase compreendendo uricase isolada ligada covalentemente a poli(etileno glicol), caracterizado por mais de 90% da dita uricase se encontrar na forma tetramérica, onde uma média de 2 a 10 cordões do dito poli(etileno glicol) estão covalentemente ligados a cada subunidade da dita uricase isolada, onde dito poli(etileno glicol) tem um peso molecular médio entre 10 kDa e 60 kDa, onde dito conjugado exibe capacidade imunogênica reduzida, onde os conjugados de uricase na composição retêm pelo menos 75% da atividade uricolítica da uricase não conjugada.

2. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dita uricase ser uricase de mamífero.

3. Conjugado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por dita uricase ser uricase de fígado de suíno, uricase de fígado de bovino ou uricase de fígado de ovino.

4. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dita uricase ser recombinante.

5. Conjugado, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por dita uricase ter a seqüência da uricase de fígado de suíno, uricase do fígado de bovino, uricase do fígado de ovino ou uricase do fígado de babuíno.

6. Conjugado, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por dita uricase ser quimérica.

7. Conjugado, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por dita uricase quimérica conter partes da uricase de fígado de suíno e partes da uricase de fígado de babuíno.

8. Conjugado, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por dita uricase quimérica ser uricase quimérica de porco-babuíno (uricase PBC).

9. Conjugado, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por dita uricase quimérica ser uricase suína na qual o resíduo de arginina 291 da SEQ ID NO:1 foi substituída por lisina (R291K) e resíduo de treonina 301 da SEQ ID NO:1

foi substituída por serina (T301S) (uricase de PKS).

10. Conjugado, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por dita uricase ter a sequência de amino ácidos da uricase de fígado de babuíno (SEQ ID NO:2) na qual a tirosina 97 foi substituída por histidina (Y97H).

11. Conjugado, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por dita uricase compreender um término amino e um término carboxila, e onde a uricase é truncada em um término ou em ambos os términos.

12. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dita uricase ser um uricase fúngica ou microbiana.

13. Conjugado, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por dita uricase fúngica ou microbiana ser isolada de *Aspergillus flavus, Arthrobacter globiformis* ou *Candida utilis*, ou ser uma enzima recombinante que tem a seqüência de uma dessas uricases.

14. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dita uricase ser uma uricase de invertebrado.

15. Conjugado, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por dita uricase de invertebrado ser isolada de *Drosophila melanogaster* ou *Drosophila pseudoobscura*, ou ser uma enzima recombinante que tem a seqüência de uma destas uricases.

16. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dita uricase ser uma uricase de planta.

17. Conjugado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por dita uricase de planta ser isolada dos nódulos da raiz de *Glycine max* ou ser um enzima recombinante que tem a seqüência desta uricase.

18. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dito poli(etileno glicol) ter um peso molecular médio entre aproximadamente 10 kDa e 60 kDa.

19. Conjugado, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por dito poli(etileno glicol) ter um peso molecular médio entre aproximadamente 20 kDa e

40 kDa.

20. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo número médio de cordões covalentemente acoplados do poli(etileno glicol) ser de três a oito cordões por subunidade de uricase.

21. Conjugado, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo número médio de cordões covalentemente acoplados do poli(etileno glicol) ser de quatro a seis cordões por subunidade de uricase.

22. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelos cordões de poli(etileno glicol) serem acoplados covalentemente à uricase por meio das ligações selecionadas do grupo que consiste de ligações uretano, ligações amina secundárias, e ligações amida.

23. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dito poli(etileno glicol) ser linear.

24. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dito poli(etileno glicol) ser ramificado.

25. Composição farmacêutica para baixar os níveis de ácido úrico em um fluido corpóreo ou tecido, caracterizada por compreender o conjugado da reivindicação 1 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

26. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada por dita composição ser estabilizada pela liofilização e se dissolver rapidamente com a reconstituição para se obter as soluções apropriadas para a administração parenteral.

27. Uso do conjugado da reivindicação 1, caracterizado por ser na preparação de um medicamento, para baixar os níveis elevados de ácido úrico em um fluido corpóreo ou tecido de um mamífero.

28. Uso de um conjugado de uricase, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o dito mamífero é um ser humano.

29. Uso de um conjugado de uricase, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por dito conjugado ser usado para abaixar os níveis de ácido úrico

elevados associados com uma condição selecionada do grupo que consiste em gota, tofos, insuficiência renal, transplante de órgãos e doença maligna.

30. Uso de um conjugado de uricase, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por dito poli(etileno glicol) ser linear.

31. Uso de um conjugado de uricase, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por dito poli(etileno glicol) ser ramificado.

Figure 1A: Retenção de Atividade por Uricase e Candida PEGilada

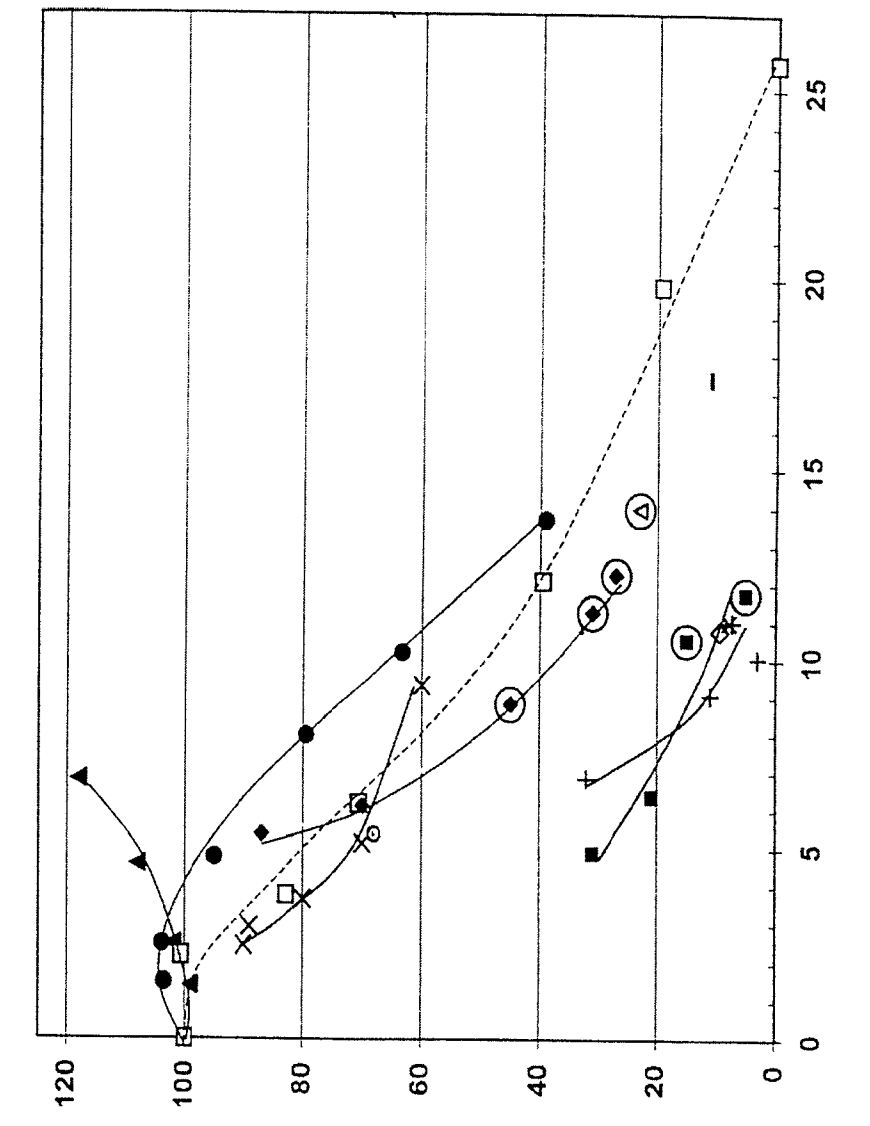


Figure 1B: Retenção de Atividade por Uricase e Candida PEGilada

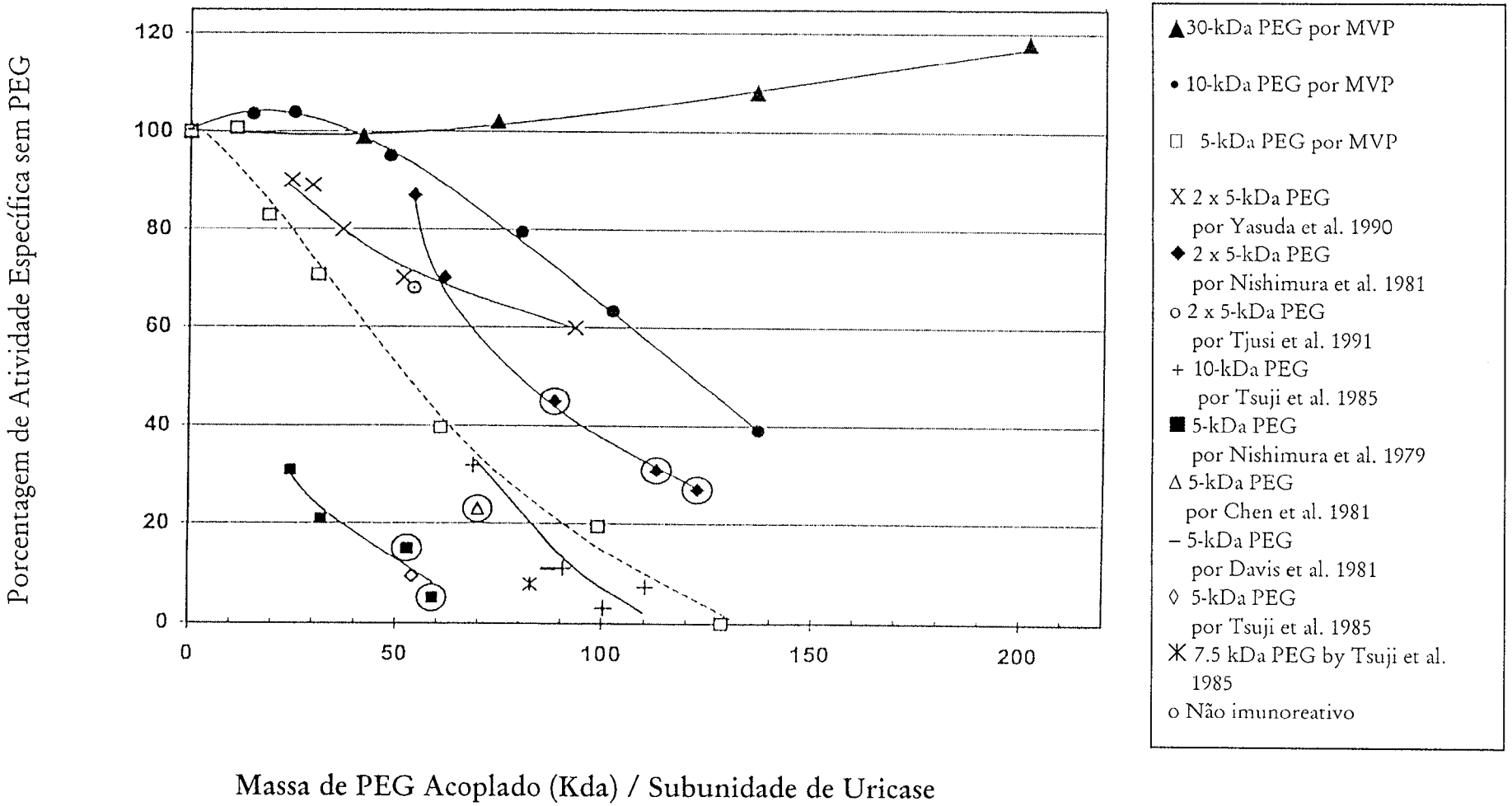


Figure 2A: Retenção de Atividade por Uricase de Suíno PEGilada

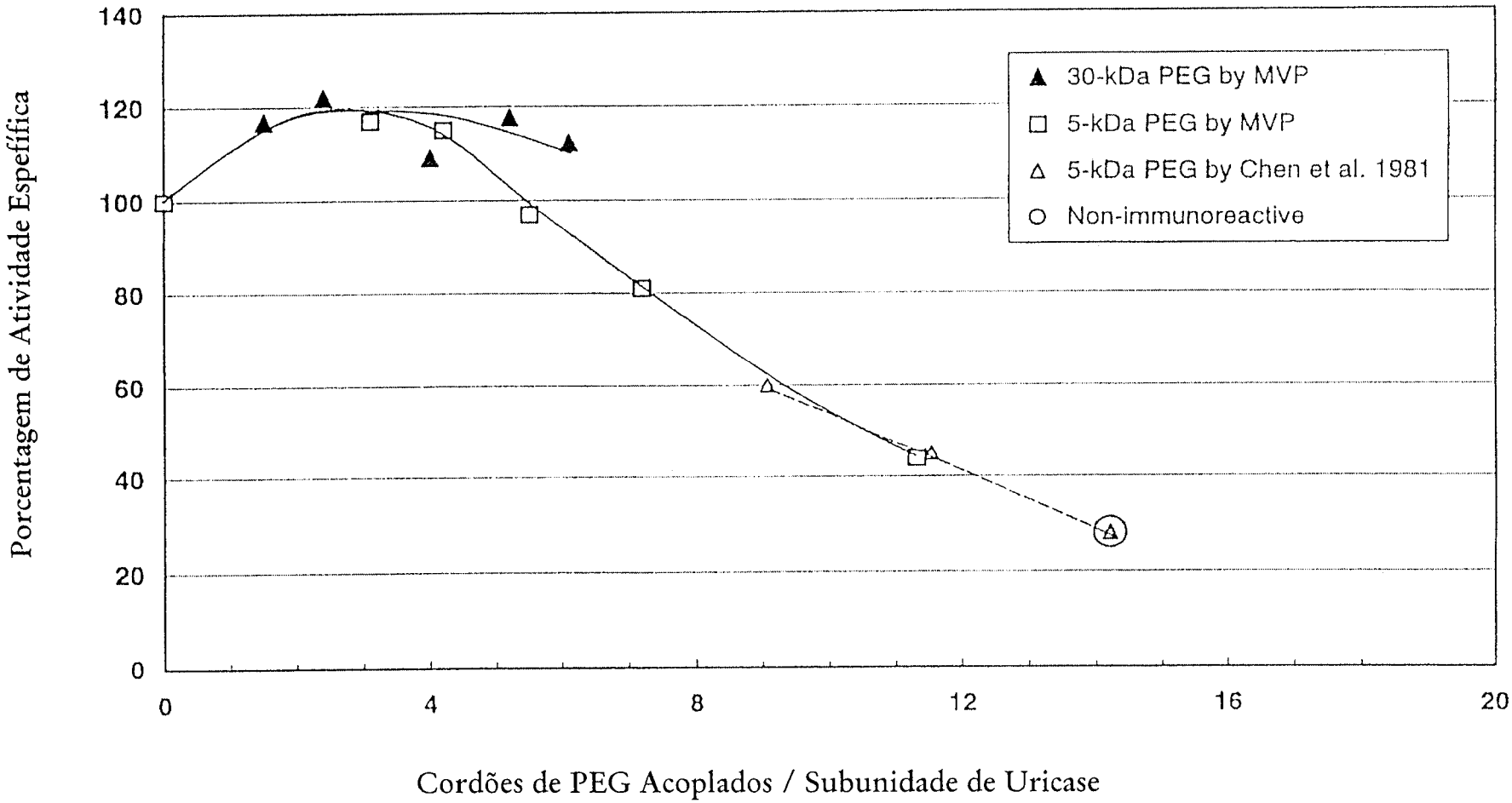
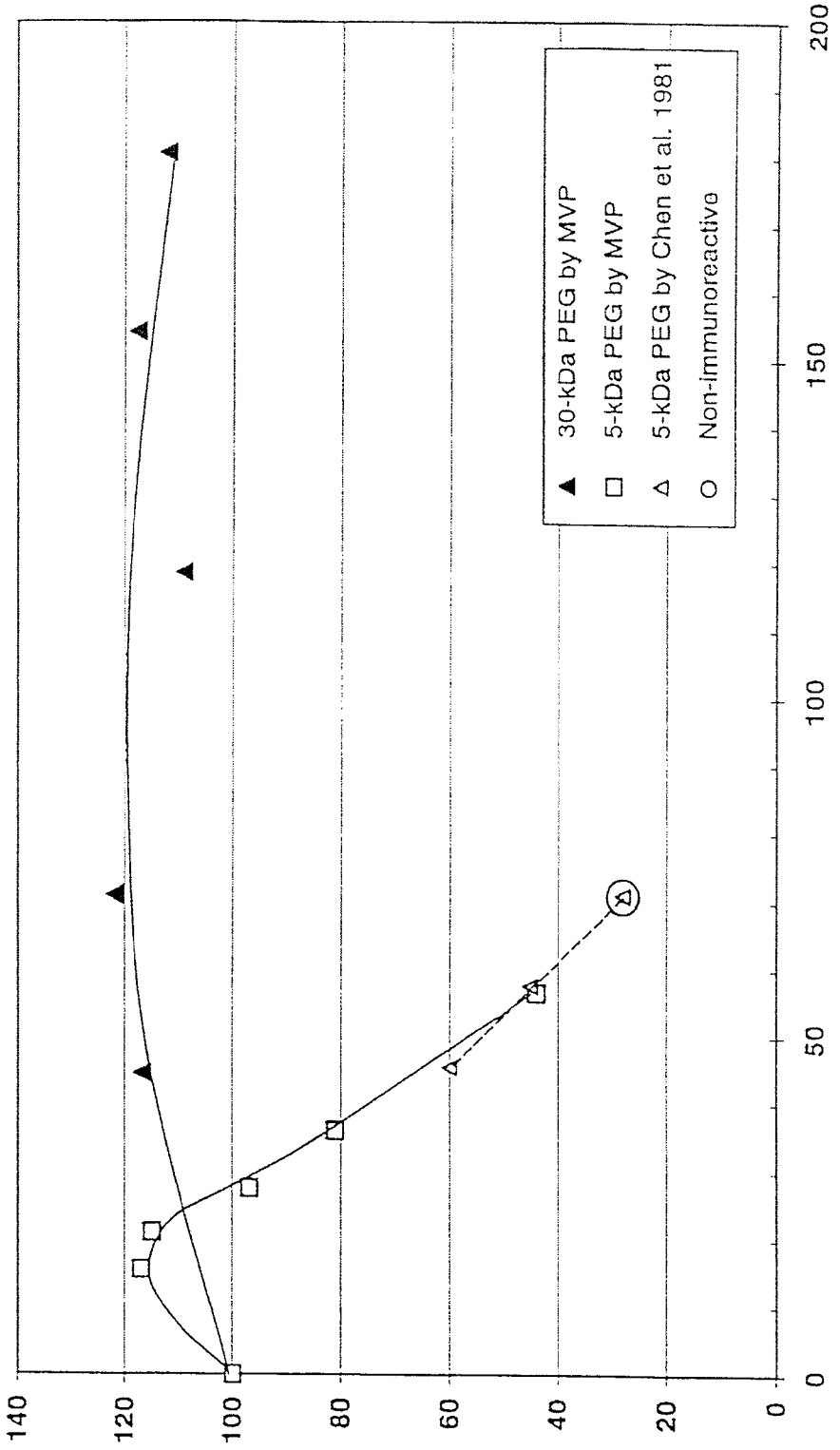


Figure 2B: Retenção de Atividade por Uricase de Suíno PEGilada



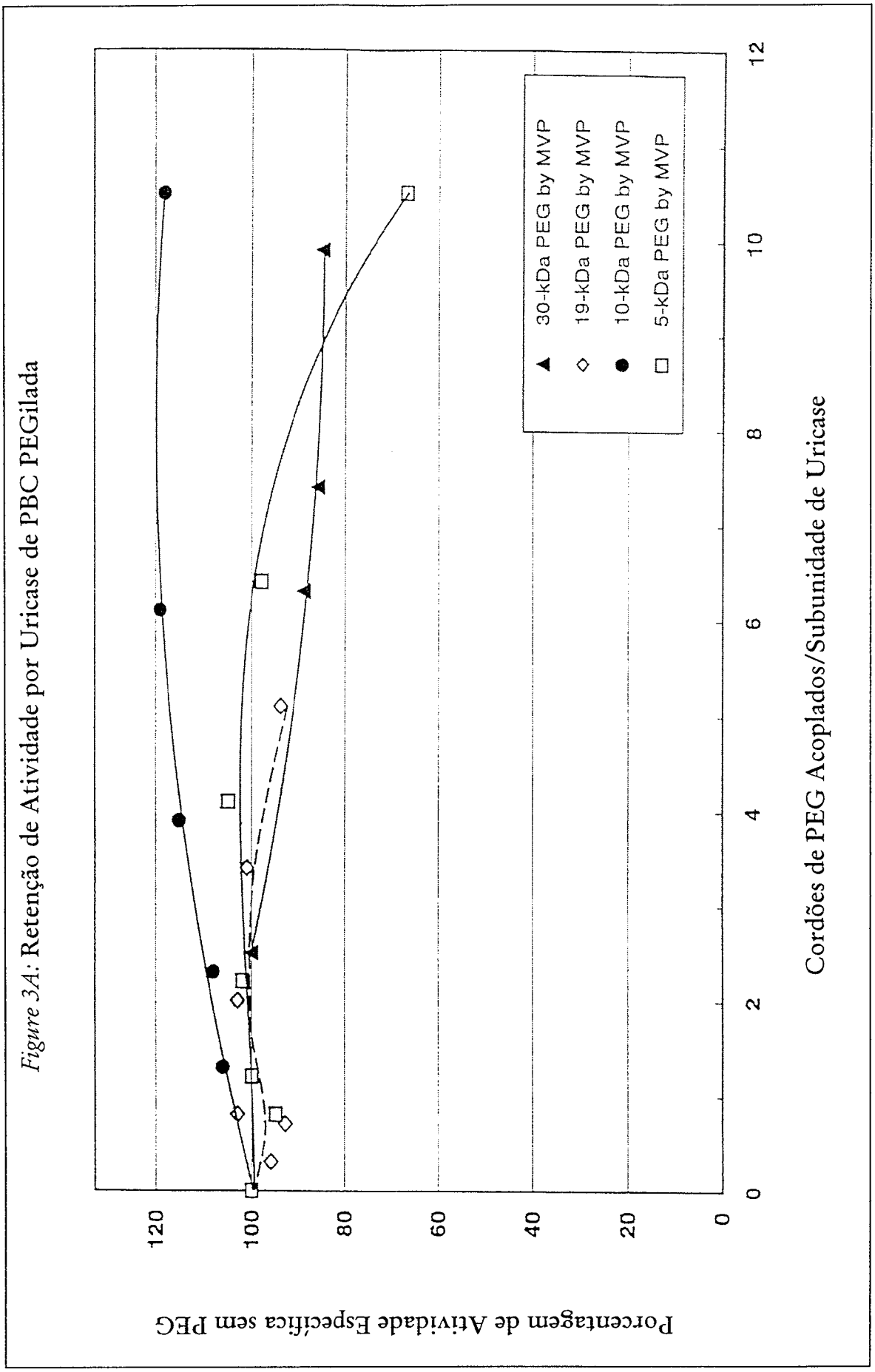


Figure 3A: Retenção de Atividade por Uricase de PBC PEGilada

Figure 3B: Retenção de Atividade por Uricase de PBC PEGilada

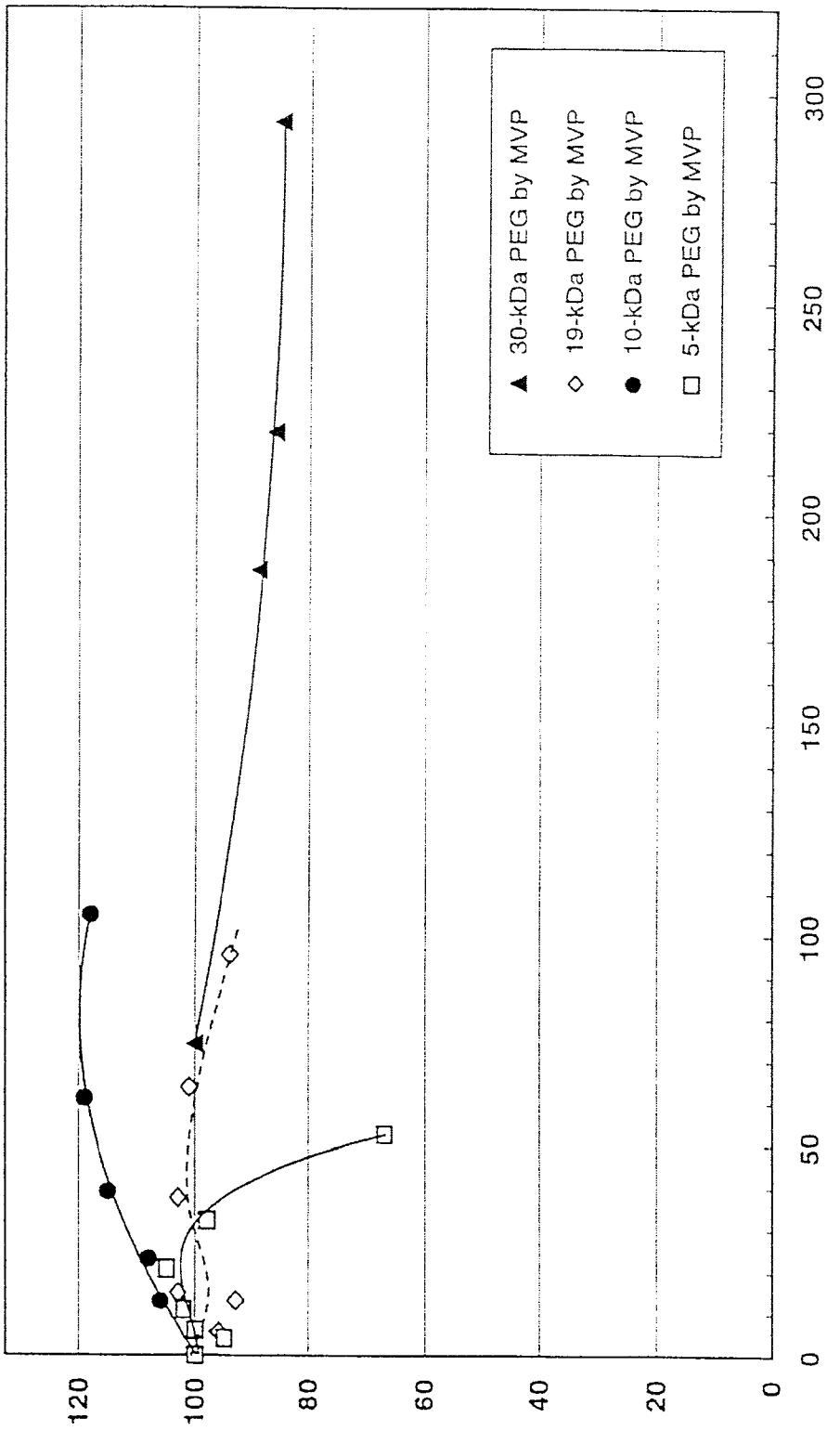


Figure 4A:

Retenção de Atividade por Uricozume® (Uricase de A. flavus)

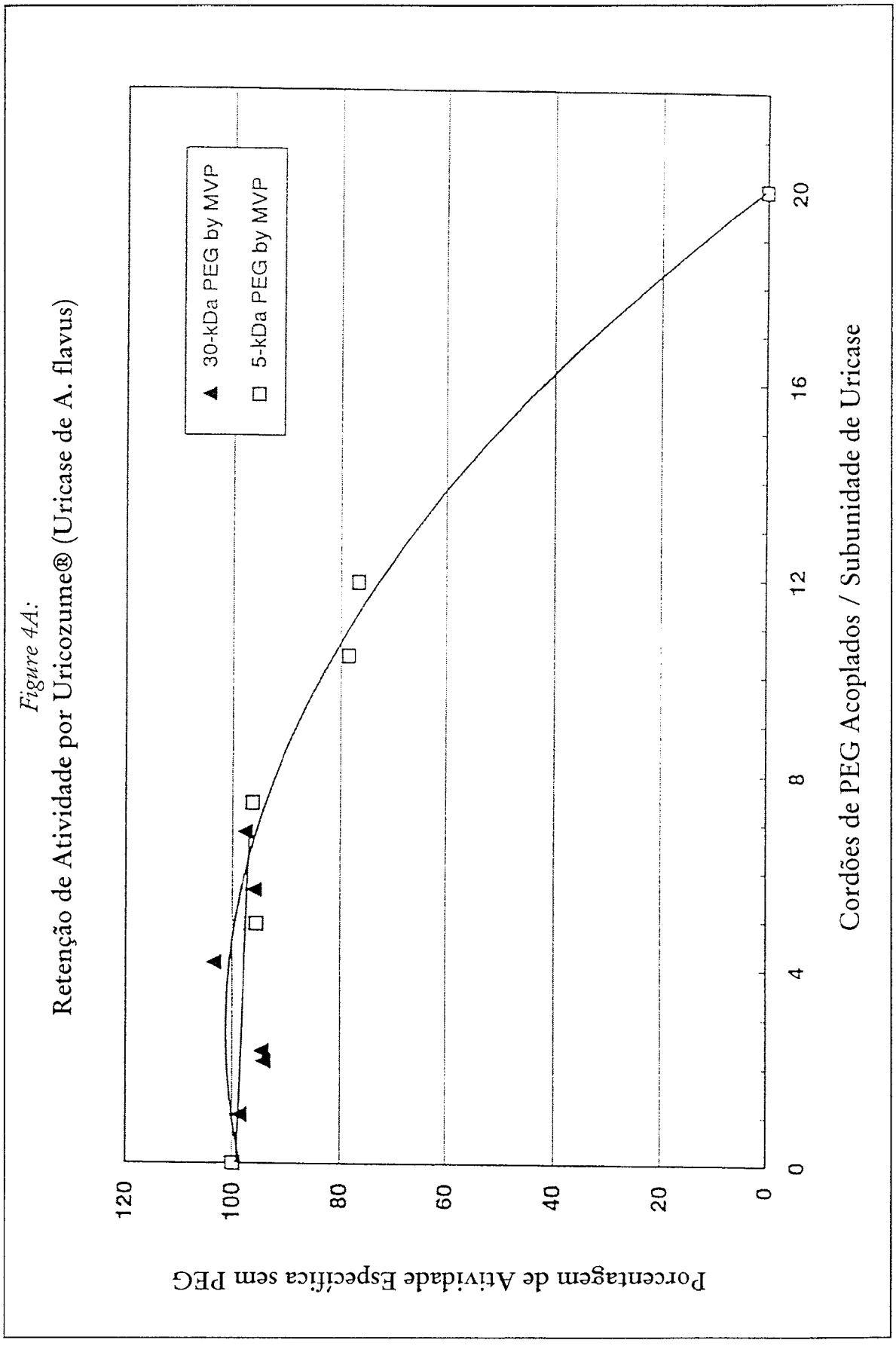


Figure 4B:
Retenção de Atividade por Uricozyme^{R} (Uricase A. flavus) PEGilada

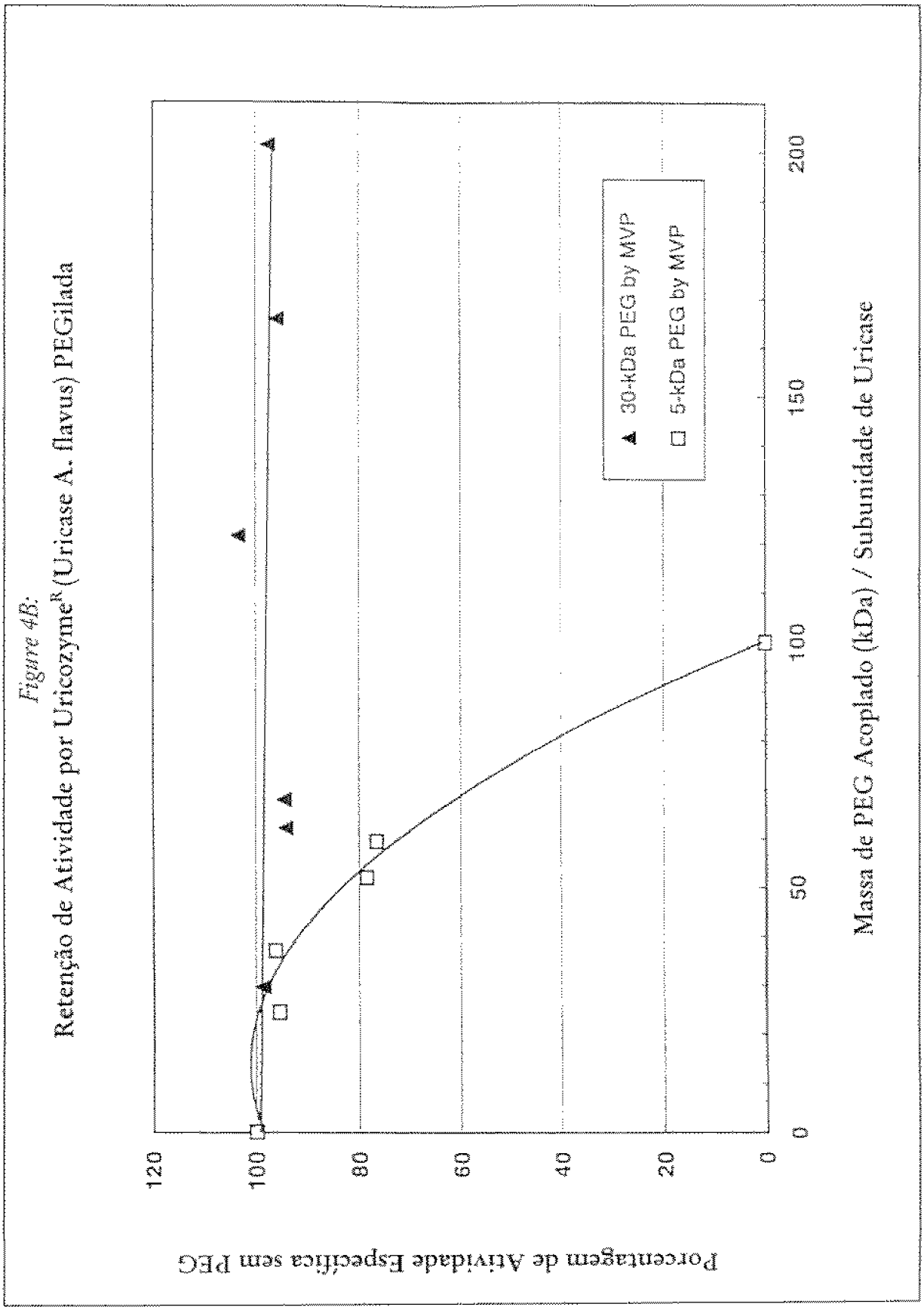
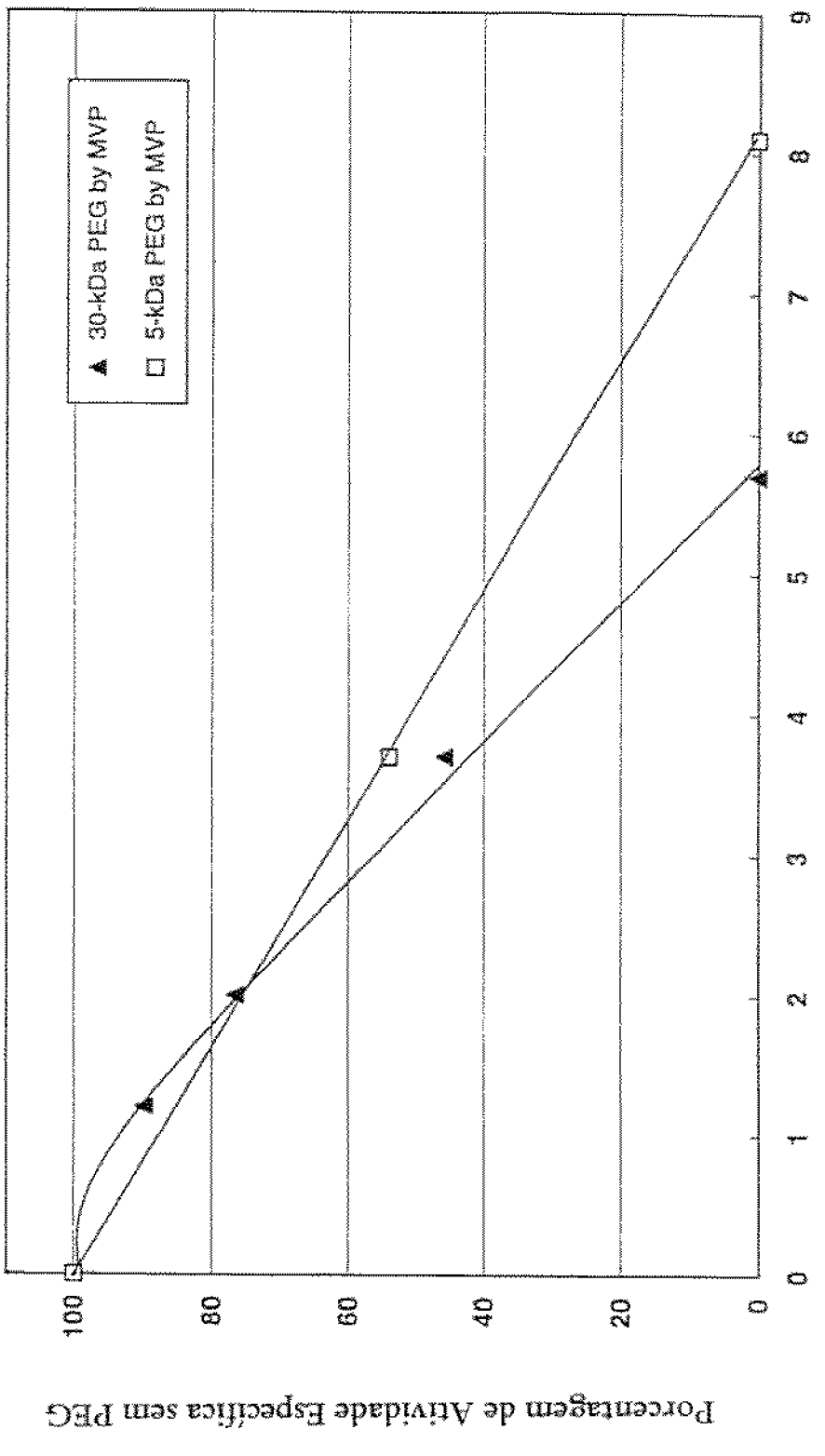


Figure 5A: Retenção de Atividade por Uricase de Soja PEGilada



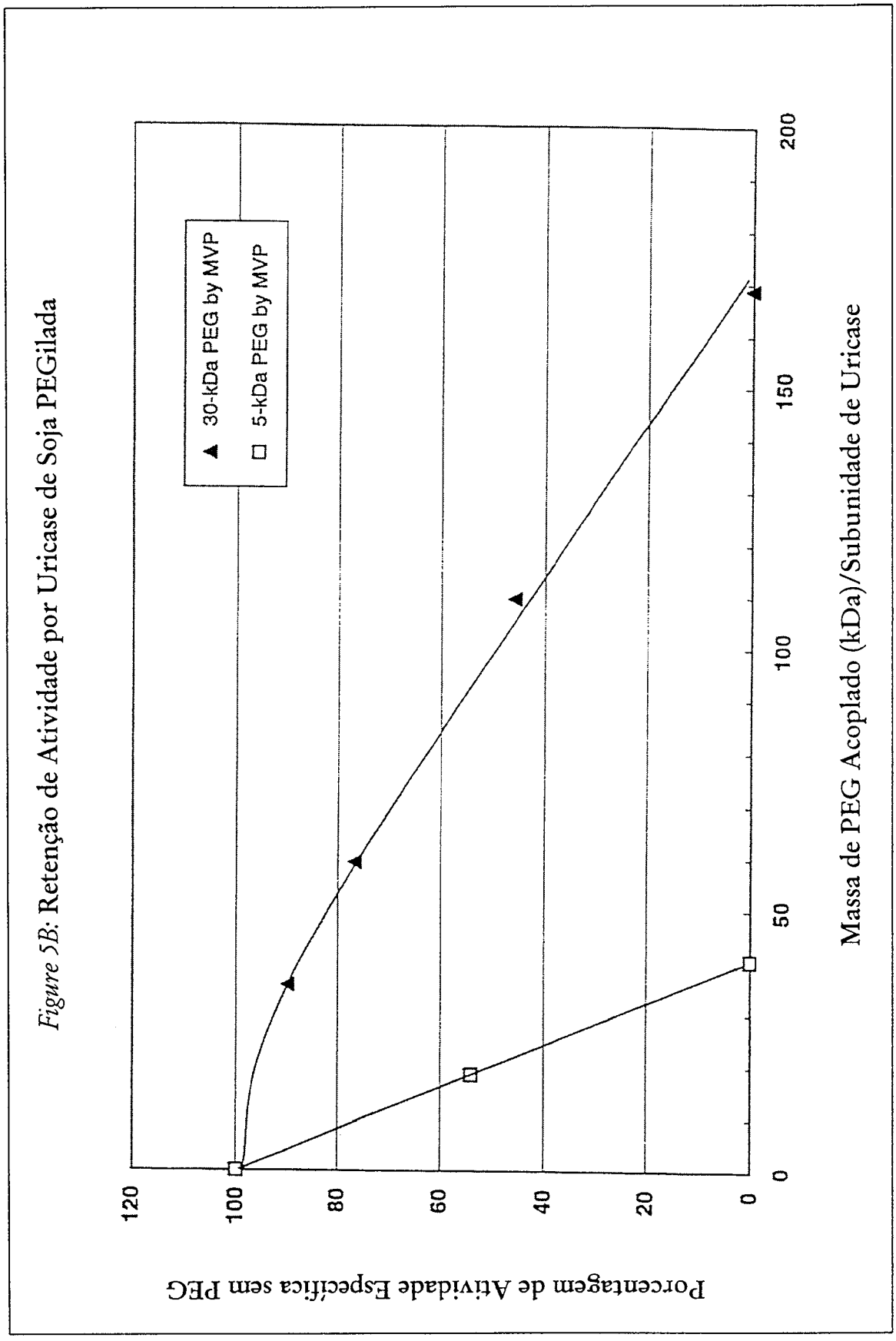


Figure 5B: Retenção de Atividade por Uricase de Soja PEGilada

Figura 6: Sequências de aminoácido deduzidas de uricase quimérica de porco-babuíno (PBC), uricase PBC que é truncada nos terminais amina e carboxila (PBC-NT-CT) e uricase suína contendo as mutações R291K e T301S (uricase PKS), comparada com a sequência suína (SEQ ID NO:1) e a sequência de babuíno (SEQ ID NO: 2).

Suíno	MAHYRNDYKK NDEVEFVRTG YGKDMIKVLH IQRDGKYHSI	40
PBC	sequência suína *1-225* →	40
PBC-NT-CT	sequência suína 1-219 →	34
PKS	sequência suína *1-288* →	40
Babuíno	MADYHNNYKK NDELEFVRTG YGKDMVKVLH IQRDGKYHSI	40
Suíno	KEVATSVQLT LSSKKDYLHG DNSDVIPTDT IKNTVNVLAK	80
PBC	sequência suína →	80
PBC-NT-CT	sequência suína →	74
PKS	sequência suína →	80
Babuíno	KEVATSVQLT LSSKKDYLHG DNSDIIPTDT IKNTVHVLAK	80
Suíno	FKGIKSIETF AVTICEHFLS SFKHVIRAQV YVEEVPWKRF	120
PBC	sequência suína →	120
PBC-NT-CT	sequência suína →	114
PKS	sequência suína →	120
Babuíno	FKGIKSIEAF GVNICEYFLS SFNHVIRAQV YVEEIPWKRL	120
Suíno	EKNGVKHVHA FIYTPTGTHF CEVEQIRNGP PVIHSGIKDL	160
PBC	sequência suína →	160
PBC-NT-CT	sequência suína →	154
PKS	sequência suína →	160
Babuíno	EKNGVKHVHA FIHTPTGTHF CEVEQLRSGP PVIHSGIKDL	160
Suíno	KVLKTTQSGF EGFIKDQFTT LPEVKDRCFA TQVYCKWRYH	200
PBC	sequência suína →	200
PBC-NT-CT	sequência suína →	194
PKS	sequência suína →	200
Babuíno	KVLKTTQSGF EGFIKDQFTT LPEVKDRCFA TQVYCKWRYH	200
Suíno	QGRDVDFEAT WDTVRSIVLQ KFAGPYDKGE YSPSVQKTLY	240
PBC	sequência suína → | ← sequência de babuíno	240
PBC-NT-CT	sequência suína → | ← sequência de babuíno	234
PKS	sequência suína →	240
Babuíno	QCRDVDFEAT WGTIRDLVLE KFAGPYDKGE YSPSVQKTLY	240
Suíno	DIQVLTLGQV PEIEDMEISL PNIHYLNIDM SKMGLINKEE	280
PBC	sequência de babuíno →	280
PBC-NT-CT	sequência de babuíno →	274
PKS	sequência suína →	280
Babuíno	DIQVLSLSRV PEIEDMEISL PNIHYFNIDM SKMGLINKEE	280
Suíno	VLLPLDNPYG RITGTVKRKL TSRL	304
PBC	sequência de babuíno →	304
PBC-NT-CT	sequência de babuíno →	295
PKS	suíno | ← babuíno →	304
Babuíno	VLLPLDNPYG RITGTVKRKL SSRL	304

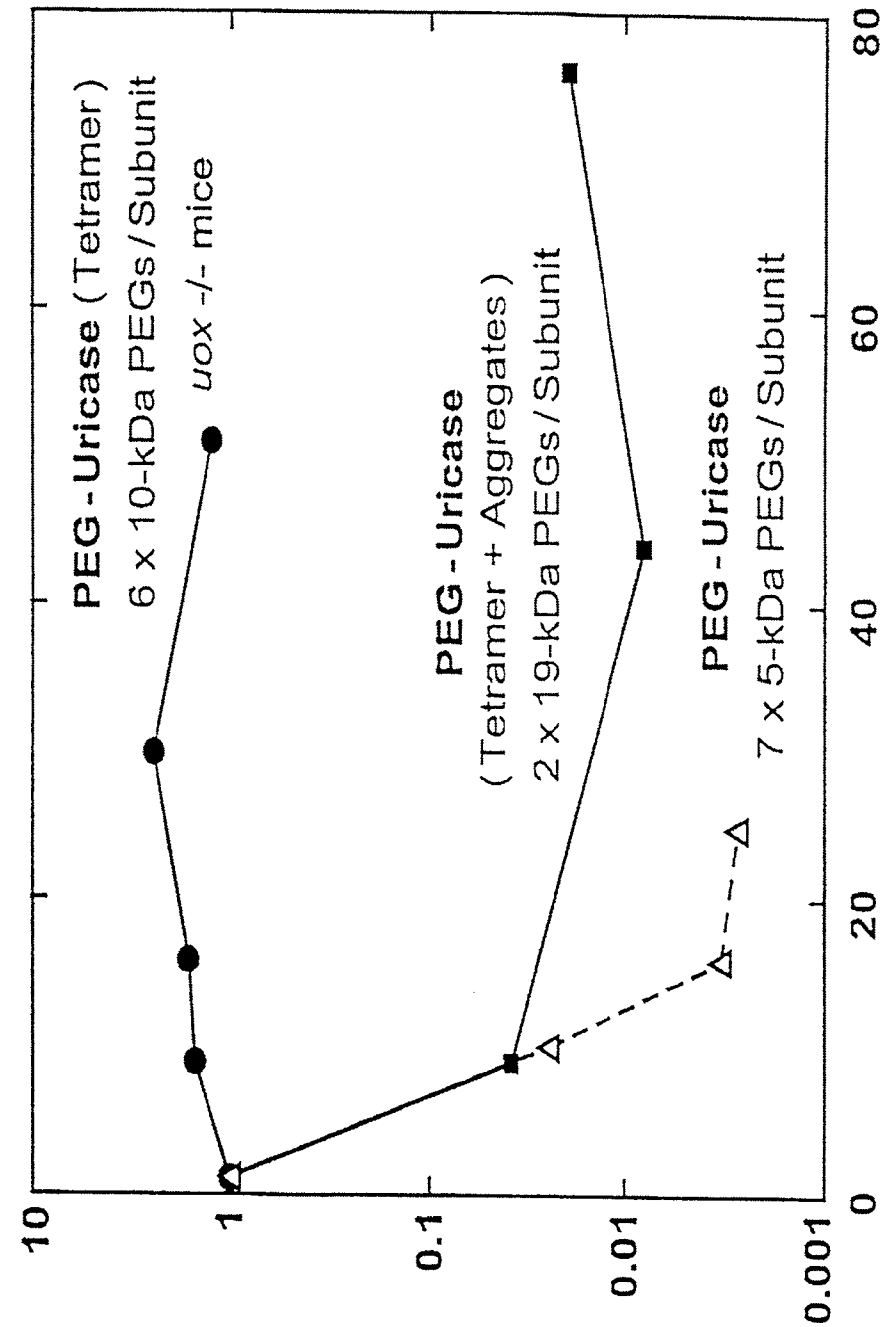


Figure 7: Atividade de Uricase de Soro 24 Horas Depois de Cada Injeção de PEG - Uricase, em Relação à Primeira Injeção

Figure 8: Relação Inversa entre a Atividade de PEG-Uricase de Soro e os Níveis de Ácido Úrico no Soro e na Urina de um Camondongo com Deficiência de Uricase

Figure 9: Gravidade Reduzida de Defeito de Concentração de Urina em Camondongos com Deficiência de Uricase Tratados com PEG-Uricase

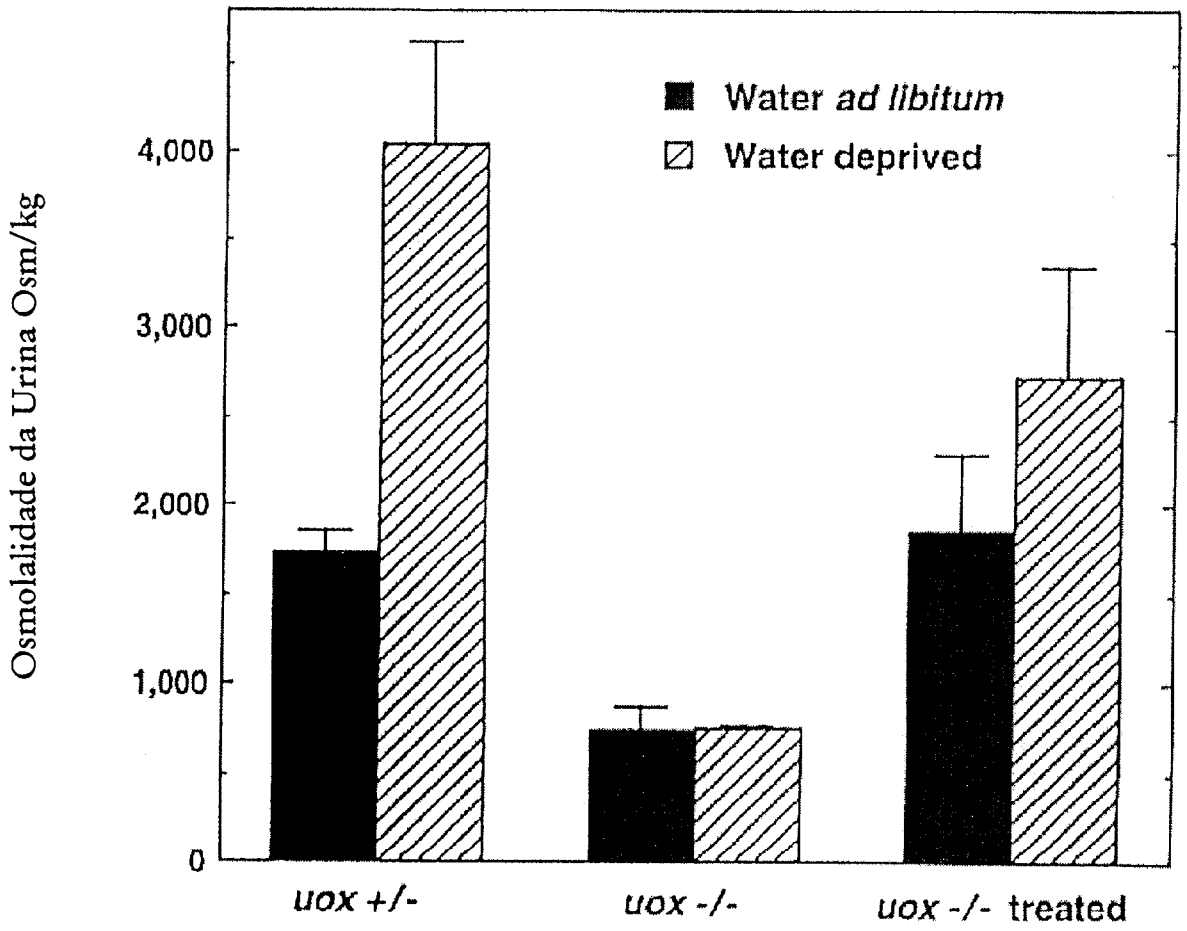


Figure 10: Gravidade Reduzida de Diabetes Insipidus Nefrogênico em Camondongos com Deficiência de Uricase Tratados com PEG-Uricase

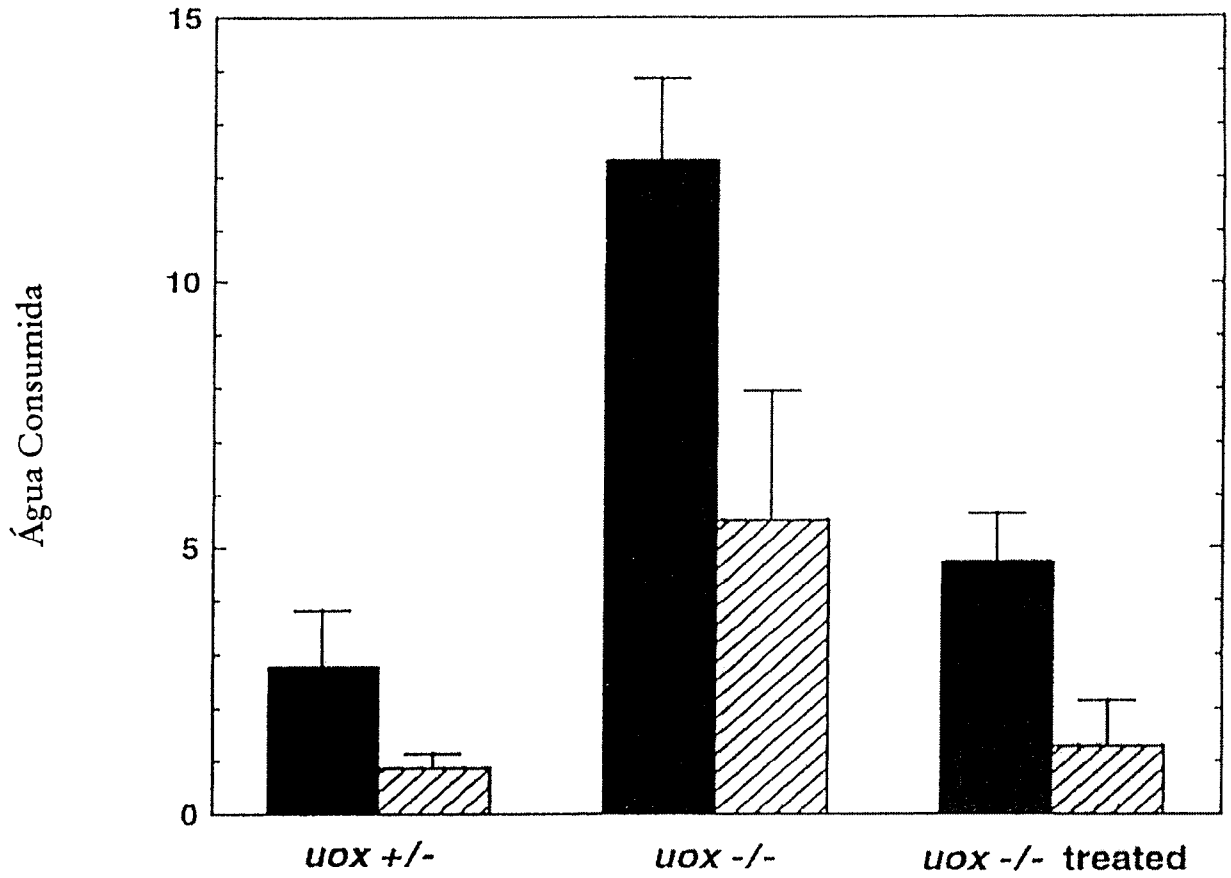


Figure 11:

Gravidade Reduzida de Defeito de Nefropatia Induzida por Ácido Úrico depois do Tratamento com PEG-Uricase, conforme visualizado por Microscopia de Ressonância Magnética

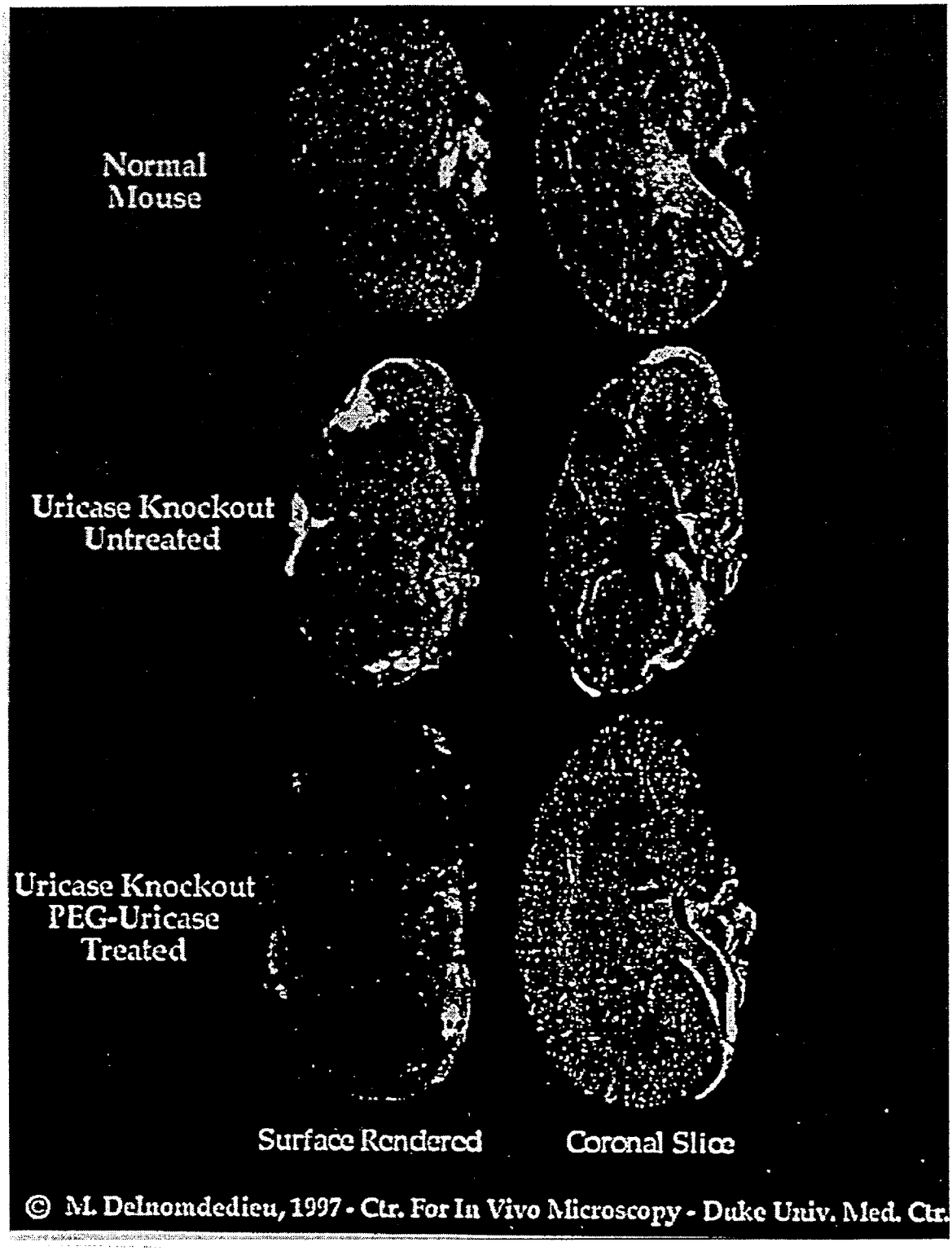
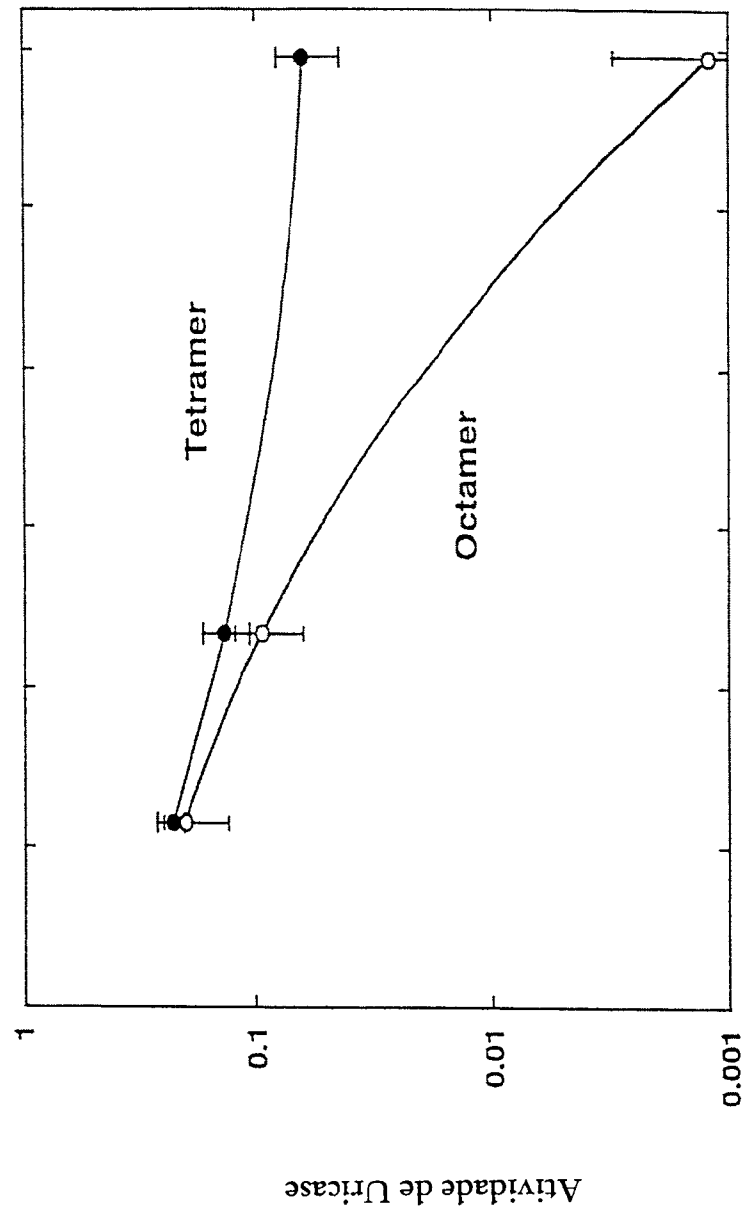


Figure 12: Espaçamento da Circulação de Camondongos BALB/c de Tetrâno e Octâmero de Uricase de PBC Acoplados a 5-6 Cordões de PEG/Subunidade de 10kDa



" CONJUGADOS DE PEG-URATO OXIDASE E SEU USO "

RESUMO

A presente invenção diz respeito à modificação química das proteínas de modo a prolongar as suas vidas médias em circulação e reduzir a sua capacidade imunogênica e, mais especificamente, a invenção diz respeito à conjugação de poli(etileno glicóis) ou de poli(óxidos de etileno) em urato oxidases, de modo a eliminar substancialmente a capacidade imunogênica do urato oxidase sem com isso comprometer a sua atividade uricoolítica.