

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1999.08.02	(73) Titular(es): MOUNTAIN VIEW PHARMACEUTICALS, INC. 3475-S EDISON WAY MENLO PARK, CA 94025-1813 DUKE UNIVERSITY	US US
(30) Prioridade(s): 1998.08.06 US 219318 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.10.26		
(45) Data e BPI da concessão: 2011.02.16 100/2011	(72) Inventor(es): MICHAEL S. HERSHFIELD SUSAN J. KELLY MERRY R. SHERMAN MARK G. P. SAIFER DAVID L. WILLIAMS	US US US US US
	(74) Mandatário: LUISA MARIA FERREIRA GUERREIRO PRACETA FERNANDO NAMORA, N° 7, 3º ESQ. 2820-598 CHARNECA DA CAPARICA	PT

(54) Epígrafe: **CONJUGADOS DE PEG-URATO OXIDASE E SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:
UMA OXIDASE DE URATO DE OCORRÊNCIA NATURAL OU RECOMBINANTE (URICASE) COVALENTEMENTE LIGADA A POLI (ETILENO GLICOL) OU POLI (ÓXIDO DE ETILENO) (AMBOS REFERIDOS COMO PEG), EM QUE UMA MÉDIA DE 2 A 10 FIOS DE PEG SÃO CONJUGADOS PARA CADA SUBUNIDADE DE URICASE E OS PEG TEM UM PESO MOLECULAR MÉDIO ENTRE CERCA DE 5 KDA E 100 KDA. OS CONJUGADOS DE PEGURICASE RESULTANTES SÃO SUBSTANCIALMENTE NÃO IMUNOGÊNICOS E RETÉM PELO MENOS 75% DA ACTIVIDADE URICOLÍTICA DA ENZIMA INALTERADA.

DESCRIÇÃO

CONJUGADOS DE PEG-URATO OXIDASE E SUA UTILIZAÇÃO

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 imunogénica. Mais especificamente, a invenção refere-se à conjugação de poli(etileno glicóis) ou de poli(etileno óxidos) em urate oxidases, que elimina substancialmente a capacidade imunogénica da urate oxidase sem comprometer a sua actividade uricolítica.

Fundamentos da Invenção

As indicações contidas nesta secção de fundamentos não constituem uma admissão da técnica anterior, mas, pelo contrário, reflectem os próprios comentários subjectivos dos autores da invenção e as interpretações do estado da técnica no momento em que a invenção foi feita. Essas interpretações podem incluir deduções pessoais dos inventores até ao momento não divulgadas, deduções essas que não faziam parte da arte anterior.

As urate oxidases (uricases; E.C. 1.7.3.3) são enzimas que catalisam a oxidação do ácido úrico num produto mais solúvel, a alantoína, um metabolito da purina que é excretado mais rapidamente. Os seres humanos não produzem a uricase enzimaticamente activa, em consequência 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 susceptíveis, as concentrações excessivas do ácido úrico no sangue (hiperuricemia) e na urina (hiperuricosúria) podem conduzir à artrite doloroso (gota), desfigurando depósitos de urate (cálculos artríticos), e à falha renal. Em alguns indivíduos afectados, 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 hiperuricosúria, pelo menos temporariamente. Uma vez que a uricase é uma proteína estranha nos seres humanos, até mesmo a primeira injeção da proteína não modificada de *Aspergillus flavus* pode induzir reacções anafiláticas em várias percentagens de pacientes tratados (Pui, C-H, et al., (1997) *Leukemia* **11**:1813-1816), e as respostas imunológicas limitam a sua utilidade para o tratamento crónico ou intermitente. Donadio, D, et al., (1981) *Nouv Presse Méd* **10**:711-712; Leaustic, M, et al., (1983) *Rev Rhum Mal Osteoartic* **50**:553-554.

O desempenho sub-óptimo de tratamentos disponíveis para a hiperuricemia é reconhecido há diversas décadas. Kissel, P, et al., (1968) *Nature* **217**:72-74. Analogamente, a possibilidade de que determinados grupos de pacientes com gota grave possam beneficiar de uma forma segura e eficaz da uricase injectável tem sido reconhecida ao longo de muitos anos. Davis, FF, et al., (1978) in GB Broun, et al., (Eds.) *Enzyme Engineering, Vol. 4* (pp. 169-173) New York, Plenum Press; Nishimura, H, et al., (1979) *Enzyme* **24**:261-264; Nishimura, H, et al., (1981) *Enzyme* **26**:49-53; Davis, S, et al., (1981) *Lancet* **2**(8241):281-283; Abuchowski, A, et al., (1981) *J Pharmacol Exp Ther* **219**:352-354; Chen, RH-L, et al., (1981) *Biochim Biophys Acta* **660**:293-298; Chua, CC, et al., (1988) *Ann Int Med* **109**:114-117; Greenberg, ML, et al., (1989) *Anal Biochem* **176**:290-293. As uricases derivadas dos órgãos de animais são quase insolúveis nos solventes que são compatíveis com a administração segura por meio de injeção. Patente Estados Unidos 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 reacções alérgicas que ameaçam a vida ou à inactivação e/ou ao aclaramento acelerado da uricase de circulação. Donadio, et al., (1981); Leaustic, et al., (1983). As enzimas baseadas nas sequências de aminoácidos deduzidas de uricases de mamíferos, incluindo o porco e o babuíno, ou de insectos,

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 imunogénica e da insolubilidade em pH fisiológico.

A modificação covalente das proteínas com poli(etileno glicol) ou poli(etileno óxido) (ambos indicados como PEG), tem sido empregada para aumentar a semi-vida da proteína e reduzir a capacidade imunogénica. Patentes Estados Unidos 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 em circulação prolongadas e/ou capacidade imunogénica diminuída, embora conservando a actividade 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 Estados Unidos 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) in JM Harris, et al., (Eds.), *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications*. ACS Symposium Series 680 (pp. 155-169) Washington, D.C.: American Chemical Society). Os conjugados de uricase com polímeros com excepção de PEG também foram descritos. Patente Estados Unidos 4.460.683.

[0006] 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 sub-unidades idênticas fica entre 25 (*Aspergillus flavus* (Patente Estados Unidos 5.382.518)) e 29 (porco (Wu, X, et al., (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:9412-9416)). Algumas das lisinas não estão disponíveis para a PEGilação na conformação nativa da enzima. A abordagem mais comum para reduzir a capacidade imunogénica da uricase tem sido o acoplamento de grandes números de filamentos de PEG de baixo peso molecular. Isto resulta invariavelmente em grandes diminuições na actividade enzimática dos conjugados resultantes.

Os pesquisadores anteriores utilizaram a uricase injectada para catalisar a conversão do ácido úrico em alantoína *in vivo*. Veja Pui, et al., (1997). Esta é a base para o uso, em 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 Estados Unidos 5.382.518 e 5.541.098. Por causa da sua vida em circulação curta, a Uricozyme® requer injeções diárias. Além disso, não se adequa bem a terapia a longo prazo por causa da sua capacidade imunogénica.

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 pré-injeção era de 6,2 mg/dL , que está dentro da faixa normal. Davis, et al., (1981). Aos indivíduos foi aplicada uma injeção adicional quatro semanas mais tarde, mas as suas respostas não foram relatadas. Não foi detectado nenhum anticorpo para a uricase depois da segunda (e última) injeção, quando se fez um ensaio de difusão de gel relativamente insensível. Esta referência não relatou nenhum resultado dos tratamentos crónicos ou subcrónicos de pacientes humanos ou de animais experimentais.

Um preparado da uricase de *Arthrobacter protomorfiae* acoplada a PEG de 5 kDa foi usado para controlar temporariamente a hiperuricemia num único paciente com linfoma, cuja concentração da urate do soro da pré-injeção era de 15 mg/dL . Chua, et al., (1988). Devido à condição crítica do paciente e à 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 imunogénica" refere-se à indução de uma resposta imunológica por um preparado injectado de uricase modificada por PEG ou não modificada (o antígeno), ao passo que "capacidade antigénica" refere-se à reacção de um antígeno com

anticorpos pré-existent. Colectivamente, a capacidade antigénica e a capacidade imunogénica são indicadas como "imunoreactividade". Em estudos precedentes da PEG-uricase, a imunoreactividade foi avaliada através de uma variedade de métodos, incluindo: 1) a reacção *in vitro* de PEG-uricase com anticorpos pré-formados; 2) medições da síntese de anticorpo induzida; e 3) taxas de aclaramento aceleradas depois de injeções repetidas.

As tentativas precedentes de eliminar a capacidade imunogénica 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 Estados Unidos 4.179.337; Nishimura *et al.*, (1979); Patentes Japonêsas 55-99189 e 62-55079. O conjugado apresentado na patente '337 foi sintetizado ao fazer 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 sub-unidade de uricase. A patente '337 apresenta o acoplamento de PEG ou de poli(propileno glicol) com pesos moleculares de 500 a 20.000 daltons, de preferência de aproximadamente 500 a 5.000 daltons, para se obter conjugados activos solúveis em água não imunogénicos de vários hormónios 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 actividade enzimática. Nenhum resultado de teste foi relatado para a extensão do acoplamento de PEG aos grupos amino disponíveis de uricase, a actividade uricolítica específica residual, ou a imunoreactividade do conjugado.

Os dados de 13 citações que se referem à PEGilação 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 actividade 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 num relatório de simpósio pelo mesmo grupo. Chen, et al., (1981); Davis, et al., (1978).

Entre os estudos resumidos na Tabela 1, a imunoreactividade 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 imunoreactividade foi associada às diminuições profundas na actividade uricolítica - até no máximo 15%, 28%, ou 45% da actividade inicial. Nishimura, et al., (1979) (15% actividade); Chen, et al., (1981) (28% actividade); Nishimura, et al., (1981) (45% actividade). No quarto relatório, o PEG foi relatado como sendo acoplado a 61% dos resíduos de lisina disponíveis, mas a actividade 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 noutra parte que essa extensão do acoplamento deixou uma actividade residual de somente 23% a 28%. Chen, et al, (1981). As publicações de 1981 de Abuchowski et al. e de Chen et al., indicam que, para reduzir substancialmente a capacidade imunogénica da uricase, o PEG deve ser acoplado a aproximadamente 60% dos resíduos de lisina disponíveis (Tabela 1). A quinta publicação em que a imunoreactividade da uricase foi relatada como tendo sido eliminado, não divulga a extensão do acoplamento do PEG, a actividade uricolítica residual, ou a natureza da ligação de PEG-proteína. Veronese, FM, et al., (1997) in JM Harris, et al., (Eds.), *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications*. ACS Symposium Series 680 (pp. 182-192) Washington, DC: American Chemical Society.

A conjugação de PEG a uma fracção menor dos resíduos de lisina em uricase reduziu, mas não eliminou, a sua imunoreactividade em animais experimentais. Tsuji, J, et al, (1985) *Int J Immunopharmacol*. 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 actividades uricolíticas residuais dos adutos correspondentes variaram de <33% (Tsuji, et al.) a 60% (Yasuda, et al) dos 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 imunogénicos e antigénicos, ao mesmo tempo que apresentavam actividades 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 actividade 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 actividade residual desse preparado de enzima não tenha sido medida, Chua, et al., demonstraram a ausência de anticorpos antiuricase no soro do paciente, 26 dias depois da primeira injeção de PEG-uricase, num ensaio de imunosorvente ligado por enzima (ELISA).

Conforme resumido na Tabela 1, os estudos precedentes da uricase PEGilada mostram que a actividade catalítica é bastante reduzida mediante o acoplamento de um número suficiente de filamentos de PEG, de modo a diminuir substancialmente a sua imunoreactividade. Além disso, a maioria dos preparados precedentes de PEG-uricase era sintetizada ao utilizar-se PEG activado com cloreto cianúrico, um derivado de triazina (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina) que demonstrou introduzir novas determinantes antigénicas 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	Actividade Uricolítica Residual (%)	Capacidade antigénica ou imunogénica <i>Comentários</i>	Referência
Não relatada	Azida	0,7 (diol)	Não relatada	Não relatada	Não relatada	Patente Estados Unidos 4.179.337
<i>Candida utilis</i>	Triazina (cloreto cianúrico)	5	% de "98" 20 26 43 48	 31 21 15 5	Capacidade antigénica com soro de coelho (% da enzima não modificada) 70% 6% 0 0	Nishimu, H, et al., 1979
<i>Candida utilis</i>	PEG ₂ Triazina	2 x 5	22 25 36 46 50	87 70 45 31 27	86% 49% 0 0 0	Nishimura, H, et al., 1981
<i>Candida utilis</i>	Triazina	5	71	11	<i>Cinco homens toleraram duas injeções em trinta dias.</i>	Davis, S, et al., 1981

<i>Candida utilis</i>	Triazina de acordo com Chen, R H-L, et al., 1981	5	49 61	Não relatada Não relatada	Capacidade imunogénica similar à uricase nativa, em aves Capacidade imunogénica negativa	Abuchowski, A, et al., 1981
Fígado de suíno	Triazina	5	37 47 58	60 45 28	Aclaramento acelerado em camundongos Aclaramento acelerado em camundongos Aclaramento constante (semi-vida de aprox. 8 horas)	Chen, R H-L, et al., 1981
<i>Candida utilis</i>	Triazina	5	57	23	Aclaramento constante (semi-vida de aprox. 8 horas)	
<i>Candida utilis</i>	Triazina de acordo com Chen, R H-L, et al., 1981	5	35 70	Não relatada Não relatada	O PEG reduziu a capacidade imunogénica em coelhos O PEG reduziu a capacidade imuno-génica em coelhos	Savoca, KV, et al., (1984) <i>Int Arch Allergy Appl Immunol</i> 75 :58-67

TABELA 1: (continuação)

Características de PEG-uricases dos Estudos Precedentes						
Fonte de Uricase	Ligação de Acoplamento	Peso Molecular do PEG (kDa)	Porcentagem de Lisinas com PEG Ligado	Actividade Uricolítica Residual (%)	Capacidade antigénica ou imunogénica <i>Comentários</i>	Referência
<i>Candida utilis</i>	Triazina	5	Não relatada	Não relatada	A PEG-uricase foi administrada oralmente a frangos, em lipossomas (uma vez)	Nishida, Y, et al., (1984) <i>J Pharm Pharmacol</i> 36 :354-355
<i>Candida utilis</i>	Triazina	5 7,5 10	44 45 28 37 41 45	9,4 7,8 32 11 3 7,3	Capacidade imunogénica reduzida, mas positiva em coelhos. (Anticorpos não para a uricase; eles reagem bilateralmente com PEG-dismutase de superóxido). A capacidade antigénica testada com anticorpos de porquinhos da Índia foi reduzida.	Tsuji, J, et al., 1985
<i>Arthrobacter protoformiae</i>	Não relatada	5	Não relatada	Não relatada	Nenhum anticorpo foi	Chua, CC, et al.,

					detectado por ELISA 26 dias depois da primeira de quatro injeções de PEG-uricase.	1988
<i>Candida utilis</i>	PEG ₂ triazina	2 x 5	10 12 15 21 38	90 89 80 70 60	Não relatada Não relatada Não relatada Não relatada A capacidade antigénica testada com soro de coelho foi reduzida em 75%.	Yasuda, Y, et al., 1990
<i>Candida utilis</i>	PEG ₂ triazina	2 x 5	22	68	Uma só injeção. O PEG aumentou a semi-vida de aprox. uma hora para aprox. oito horas em camundongos. O PEG bloqueou o aclaramento pelo fígado, baço e rim (duração do estudo de 24 horas)	Fujita, T, et al., 1991

TABELA 1: (continuação)

Características de PEG-uricases dos Estudos Precedentes						
Fonte de Uricase	Ligação de Acoplamento	Peso Molecular do PEG (kDa)	Porcentagem de Lisinas com PEG Ligado	Actividade Uricolítica Residual (%)	Capacidade antigénica ou imunogénica <i>Comentários</i>	Referência
Não relatada	PEG PEG ₂ Ligação não declarada	Não relatada	Não relatada Relatada como a mesma que para o PEG	Não relatada Não relatada	A capacidade imunogénica em camundongos foi reduzida em 98% (PEG) ou 100% (PEG ₂) .	Veronese, FM, <i>et al.</i> , 1997

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 mostra uma capacidade antigénica reduzida e uma acção "prolongada e 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 sobre o significado de "prolongada e melhorada". As patentes japonesas 55-99189 e 62-55079, ambas concedidas a Y Inada, apresentam conjugados de uricase preparados com PEG-triazina ou *bis*-PEG-triazina (indicado como PEG₂ 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, ao passo que no segundo apenas o PEG de 5 kDa foi utilizado. Nishimura, *et al.*, (1979) relataram a recuperação de 15% da actividade uricolítica após a modificação de 43% das lisinas disponíveis com o PEG linear de 5 kDa, ao passo que Nishimura, *et al.* (1981) relataram a recuperação de 31% ou 45% da actividade uricolítica após a

modificação de 46% ou de 36% das lisinas, respectivamente, com PEG₂.

Sumário da Invenção

Os estudos precedentes ensinam que, quando uma redução significativa na capacidade imunogénica e/ou na capacidade antigénica da uricase é obtida por meio da PEGilação, ela é associada invariavelmente a uma perda substancial da actividade uricolítica. A segurança, a conveniência e a economia dos produtos biofarmacêuticos são adversamente afectadas por diminuições das suas potências e pela consequente necessidade de aumentar a dose administrada. Assim, há necessidade de encontrar um meio seguro e eficaz alternativo para baixar os níveis elevados de ácido úrico nos fluidos corpóreos, incluindo o sangue e a urina.

Reference D1, Chen et al. ("Chen"), apresenta PEGilação usando PEG com 5 kDa. A actividade uricolítica retida da uricase PEGilada assinalada por Chen situa-se numa faixa de 23% a 60%

Reference D2, Davis et al. ("Davis"), apresenta PEGilação geral da uricase usando PEG com 5 kDa. Conforme explicitamente afirmado em Davis, a uricase-PEG resultante reteve apenas cerca de 11% de actividade (ver abstract). Além disso, Davis afirma que 71% dos grupos amino na uricase foram modificados.

Reference D3, Yasuda et al. ("Yasuda") Chem. Pharm. Bull. 38(7):2053-2056, apresenta uma uricase que é PEGilada usando dois filamentos de PEG de 5 kDa em cada ponto de ligação, que resulta numa uricase que retém 60% da actividade uricolítica e 25% da sua antigenicidade (ver Table 1 em Specification, p. 8).

Reference D4, Osman et al. ("Osman"), assinala tentativas de purificar e caracterizar a uricase do fígado de um camelo. Nenhuma comunicação de Osman está relacionada com a síntese ou caracterização de conjugados PEG de uricase.

Reference D5, Chua et al. ("Chua") apresenta uma uricase que é PEGilada usando-se PEG com 5 kDa. No entanto, Chua não apresenta nem sugere uma exigência para uma actividade uricolítica residual do respectivo conjugado de uricase.

Reference D6, Savoca et al. ("Savoca"), apresenta a PEGilação geral da uricase usando-se PEG com 5 kDa. O método de PEGilação de Savoca foi o mesmo utilizado por Chen e a respectiva uricase modificada por PEG apresenta as mesmas imperfeições do que aquela produzida por Chen.

Reference D8, Burnham et al., trata de forma breve a ideia de que a uricase pode ser PEGilada.

A presente invenção apresenta uma PEG-uricase substancialmente não imunogénica que retém toda, ou quase toda, a actividade uricolítica da enzima não modificada.

Uma das formas de manifestação da presente invenção é um conjugado de urate oxidase (uricase) conforme definido na reivindicação 1. A uricase deste aspecto da invenção pode ser recombinante. Quer seja recombinante ou não, a uricase pode ser de origem de mamíferos. Num aspecto desta forma de manifestação, a uricase pode ser uricase de fígado de suínos, bovinos ou ovinos. Num outro aspecto desta forma de manifestação, 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 sequências na Figura 6 e os resultados dos estudos fisiológicos e imunológicos nas Figuras 7-12). Alternativamente, a uricase pode ser uricase de fígado de babuíno onde a tirosina 97 foi substituída pela histidina, através da qual a actividade específica da uricase pode ser aumentada em, pelo menos, aproximadamente 60%. A uricase da invenção, qualquer que seja a origem,

também pode estar numa forma truncada, no terminal amino ou no terminal carboxila, ou em ambos os terminais. Analogamente, a uricase pode ser uricase fúngica ou microbiana. Num aspecto desta forma de manifestação, a uricase fúngica ou microbiana 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; de preferência, o PEG pode ter um peso molecular médio entre aproximadamente 10 kDa e 60 kDa; de maior preferência, 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 por sub-unidade de uricase; de preferência, o número médio de filamentos covalentemente ligados pode ser de três a oito por sub-unidade; de maior preferência, o número médio dos filamentos do PEG pode ser de quatro a seis por sub-unidade. Num aspecto desta forma de manifestação, 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 sequência da forma de ocorrência natural.

[0021] Uma outra forma de manifestação da presente invenção é uma composição farmacêutica conforme definido na reivindicação 1. A composição pode ser estabilizada através de liofilização, e também se pode dissolver imediatamente com a reconstituição para que se obtenha soluções apropriadas para a administração parenteral.

Está previsto um uso de PEG-uricase para baixar os níveis de ácido úrico nos fluidos corpóreos e tecidos de um mamífero. O uso 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 sub-unidades, na qual cada sub-unidade pode ser covalentemente ligada a uma média de dois a dez filamentos de PEG linear ou ramificado, podendo cada molécula de PEG ter um peso molecular entre aproximadamente 5 kDa e 100 kDa, num veículo farmacologicamente aceitável. O mamífero pode ser um ser humano. A etapa da administração pode ser, por exemplo, injeção por via intravenosa, intradérmica, subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, ou pela inalação de um preparado em aerossol. Os níveis de ácido úrico elevados podem estar no sangue, na urina e/ou noutros fluidos corpóreos e tecidos, e podem ser associados à gota, cálculos artríticos, insuficiência renal, transplante de órgãos ou uma doença maligna.

Um 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 fracções do eluato e a identificação daqueles que podem conter uricase tetramérica isolada, sendo as fracções substancialmente livres de agregados de uricase; e o agrupamento das fracções 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 fracções para determinar a presença de uricase tetramérica e/ou da ausência de agregados de uricase. Por exemplo, essa análise pode incluir a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), outros métodos cromatográficos, dispersão luminosa, centrifugação e/ou electroforese. Num aspecto desta forma de manifestação, 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 actividade pela uricase PEGilada de *Candida utilis*, em função do número de filamentos de PEG acoplados por sub-unidade.

A Figura 1B mostra a retenção da actividade pela uricase PEGilada de *Candida utilis*, em função da massa total de PEG acoplada por sub-unidade.

A Figura 2A mostra a retenção da actividade pela uricase PEGilada do fígado de suíno, em função do número de filamentos de PEG acoplados por sub-unidade.

A Figura 2B mostra a retenção da actividade pela uricase PEGilada do fígado de suíno, em função da massa total de PEG acoplada por sub-unidade.

A Figura 3A mostra a retenção da actividade pela uricase quimérica de porco-babuíno (PBC) PEGilada, em função do número de filamentos acoplados por sub-unidade.

A Figura 3B mostra a retenção da actividade pela uricase de PBC PEGilada, em função da massa total de PEG acoplada por sub-unidade.

A Figura 4A mostra a retenção da actividade pela uricase PEGilada de *Aspergillus flavus*, em função do número de filamentos de PEG acoplados por sub-unidade.

A Figura 4B mostra a retenção da actividade pela uricase PEGilada de *Aspergillus flavus*, em função da massa total de PEG acoplada por sub-unidade.

A Figura 5A mostra a retenção da actividade pela uricase de nódulo de raiz de soja recombinante PEGilada, em função do número de filamentos de PEG acoplados por sub-unidade.

A Figura 5B mostra a retenção da actividade pela uricase de nódulo de raiz de soja recombinante PEGilada em função da massa total de PEG acoplada por sub-unidade.

A Figura 6 mostra as sequências 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 sequências de suíno e babuíno.

A Figura 7 mostra a actividade da uricase no soro de camundongo, 24 horas depois de cada uma (entre quatro ou cinco) das injecções intraperitoneais de uricase de PBC modificada com PEG, em relação ao valor 24 horas depois da primeira injecção.

A Figura 8 mostra a relação inversa entre a actividade da uricase de PBC modificada com PEG, injectada no soro de um camundongo 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 camundongos com deficiência em uricase (uox -/-), que foram tratados com uricase de PBC modificada com PEG.

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

A Figura 12 mostra o aclaramento acelerado da circulação de camundongos BALB/c do octâmero de uricase de PBC injectado, comparado com o tetrâmero, quando ambos foram acoplados a cinco a seis filamentos de PEG de 10 kDa por sub-unidade.

Descrição Detalhada das Formas de Realização Preferidas

A presente invenção apresenta conjugados aperfeiçoados de polímeros, de preferência de poli(etileno glicóis) ou de poli(etileno óxidos) solúveis em água, com uricases. A invenção também apresenta composições farmacêuticas dos conjugados aperfeiçoados. Esses conjugados são substancialmente não imunogénicos e retêm pelo menos 75%, de preferência 85%, e de maior preferência 95% ou mais, da actividade 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 activas da uricase. Os polímeros solúveis em água apropriados para o uso na presente invenção incluem poli(etileno glicóis) ou poli(etileno óxidos) lineares e ramificados, todos geralmente conhecidos como PEGs. Os exemplos de PEG ramificado são o objecto da Patente Estados Unidos 5.643.575. Um exemplo preferido de PEG linear é monometóxi-PEG, de estrutura geral $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, 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 sequências de uricase de fígado de porco e fígado de

babuíno, tendo sido ambas determinadas primeiramente por Wu, et al., (1989). Um exemplo dessa uricase quimérica contém os primeiros 225 aminoácidos da sequência de uricase de suíno (SEQ ID NO.: 1) e os últimos 79 aminoácidos da sequência 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 sequência de suíno (SEQ ID NO.: 1) e os resíduos 226-301 da sequência 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 sequência de suíno (SEQ ID NO.: 1) e os últimos 16 aminoácidos da sequência de babuíno (SEQ ID NO.: 2). Uma vez que a última sequência difere da sequência 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 outro sítio com potencialidade de PEGilação do que a sequência de suíno ou de babuíno.

Os ADNs 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 óptimas foram determinadas para a expressão em *E. coli*, ao serem utilizados métodos-padrão. Veja Erlich, HA, (Ed.) (1989) *PCR Technology. Principles and Applications for ADN Amplification*. New York: Stockton Press; Sambrook, J, et al., (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. As uricases recombinantes foram extraídas e purificadas, e as suas estabilidade e actividade foram avaliadas usando uma modificação de ensaios-padrão. Veja Fridovich, I, (1965) *J Biol Chem* **240**:2491-2494; Nishimura, et al., (1979), e o Exemplo 1.

Numa das formas de manifestação 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 secundária, e ligações amido. Vários PEGs activados apropriados para

essa conjugação estão disponíveis comercialmente na 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 ser sintetizada usando o procedimento descrito na patente Estados Unidos 5.612.460, que está aqui incorporada a título de referência. A NPC-PEG pode ser sintetizada ao fazer 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 Estados Unidos 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 usando um éster de N-hidróxi succinimida de um derivado de ácido carboxílico de PEG (Shearwater Polymers). As ligações amina secundária podem ser formadas usando 2,2,2-trifluoroetano sulfonyl PEG (tresil PEG; Shearwater Polymers) ou mediante a alquilação redutiva usando 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 sub-unidade, ao reter pelo menos 75% da actividade 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. Numa das formas de manifestação da invenção, o número médio de filamentos de PEG acoplados por sub-unidade de uricase fica entre dois e dez. Numa forma de manifestação preferida, o número médio de filamentos de PEG acoplados por sub-unidade de uricase fica entre três e oito. Numa forma de

manifestação mais preferida, o número médio de filamentos covalentemente ligados de PEG por sub-unidade de uricase fica entre quatro e seis. Numa outra forma de manifestação, o peso molecular do PEG utilizado para a reacção de acoplamento fica entre 5 kDa e 100 kDa, de preferência entre 10 kDa e 60 kDa, e de maior preferência entre 20 kDa e 40 kDa tal como, por exemplo, 30 kDa.

Há diversos factores que podem afectar a escolha do peso molecular e o número óptimo de filamentos de PEG para acoplar a uma determinada forma de uricase. Geralmente, a redução ou a eliminação da capacidade imunogénica sem perda substancial da actividade 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 sub-unidade ou quatro filamentos de PEG de 30 kDa por sub-unidade puderam ter uma eficácia óptima. Do mesmo modo, cada forma diferente de uricase pode ter um valor óptimo diferente no que diz 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 em França e na Itália. Dois conjugados diferentes de uricase de PBC, um contendo aproximadamente seis filamentos de PEG de 10 kDa por sub-unidade e o outro contendo aproximadamente dois filamentos de PEG de 19 kDa por sub-unidade, retiveram uma actividade significativa após a incubação em soro de camundongo por mais de um mês a 37°C. Além disso, diversos conjugados da presente invenção tiveram uma semi-vida em circulação nos camundongos superiores a 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. Semi-vidas mais longas de drogas injectadas de proteína tornam estas mais económicas e podem levar a uma melhor compatibilidade

com o paciente. A semi-vida 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 sub-unidades de 35 kDa), apresentaram uma capacidade imunogénica muito reduzida em camundongos (Figura 7), ao contrário da capacidade imunogénica moderada dos conjugados de PEG de formas maiores de enzima (*por exemplo*, octâmeros da sub-unidade de 35 kDa; veja a Figura 12), e a capacidade imunogénica muito elevada da enzima não modificada. As injeções repetidas em camundongos 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 o funcionamento dos seus rins contra os danos relacionados com o ácido úrico (Figuras 8-11).

As injeções de conjugados inteiramente activos da uricase de PBC com o PEG de 10 kDa (Figuras 3A-3B) reduziram drasticamente a hiperuricemia de camundongos com deficiência de uricase homozigóticos (Figura 8). Os níveis de ácidos úrico na urina foram também drasticamente reduzidos em todos os camundongos com deficiência em uricase, tratados com a uricase de PBC modificada com PEG. Os camundongos com deficiência em uricase receberam uma série de injeções com um preparado de PEG-uricase, semelhante ao utilizado para obter os dados na Figura 8. Esse tratamento reduziu a gravidade de um defeito de concentração na urina, tal como foi demonstrado por medições da osmolalidade da urina em 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 medições correspondentes em camundongos geneticamente semelhantes não tratados. Também foi demonstrado que dez semanas de tratamento, iniciado nos primeiros dez dias de vida, de camundongos *knockout* (de queda) com deficiência em uricase homozigóticos (*uox -/-*) com uma PEG-uricase da presente invenção, diminuíram a gravidade da rotura da arquitectura renal induzida por urate, tal como foi 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) *in* JC Gore,

(Ed.), *Reviews of Magnetic Resonance in Medicine*, Vol. 4 (pp. 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 percentagem 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 imunogénicos (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 imunogénica potencial dos agregados modificados pela PEG não foi levada em consideração. Com base nas observações dos autores da presente invenção, parece provável que esses agregados estejam 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 imunogénicos. Também parece que as grandes perdas da actividade uricolítica, observadas em esforços precedentes para PEGilar a uricase, estavam relacionadas com o 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 de até dez filamentos de PEG por sub-unidade ao passo que retêm mais de 75% da actividade uricolítica, pelo menos para determinadas uricases, por exemplo, a uricase quimérica de porco-babuíno e a enzima de *A. flavus* (veja as Figuras 3A e 4A).

Numa outra forma de manifestação 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, de preferência de 10.2, antes da conjugação do preparado de uricase resultante, substancialmente tetramérico. O peso molecular da uricase em cada fracção 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

num tampão não desnaturante. Para a uricase tetramérica isolada usando a cromatografia de exclusão de tamanho, as fracções 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 usando a cromatografia de troca de íons, as fracções da coluna de troca de íons podem ser analisadas quanto ao tamanho para se determinar quais as fracções que 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, apresentar valores tão reduzidos como 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 imunogénicas nos camundongos (Figura 12). Além disso, nos camundongos que tinham sido injectados uma vez com os conjugados de PEG de agregados de uricase, a actividade uricolítica nas injeções subsequentes, 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 podiam ser reinjectados muitas vezes sem nenhuma aceleração das suas taxas de aclaramento (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 pesquisadores precedentes pode ter conduzido ao acoplamento de um grande número de filamentos de PEG nos esforços para suprimir a capacidade imunogénica. Consequentemente, a actividade enzimática dos conjugados resultantes foi diminuída substancialmente. Noutras formas de manifestação, a presente invenção contempla expressamente 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% da sua actividade uricolítica e sejam substancialmente não imunogénicos.

Numa outra forma de manifestação 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 ADN 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 num aumento substancial na actividade enzimática específica. Quando expressa em *E. coli*, verificou-se que essa proteína mutante apresenta, pelo menos, uma actividade específica 60% mais elevada do que a enzima de babuíno recombinante da qual ela foi derivada.

Numa outra forma de manifestação, a actividade 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 expressas (veja a Figura 6). As uricases recombinantes com o truncamento do terminal carboxila podem ter uma melhor solubilidade antes da PEGilação devido à remoção da sequência- 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, de preferência dos seres humanos, e desse modo podem ser utilizados para o tratamento dos níveis elevados de ácido úrico associados às condições que incluem a gota, cálculos artríticos, insuficiência renal, transplante de órgãos e doença maligna. Os conjugados de PEG-uricase podem ser injectados num mamífero que tem níveis de ácido úrico excessivos, por uma de várias vias, incluindo as vias intravenosa, subcutânea, intradérmica, intramuscular e intraperitoneal. Alternativamente, podem ser ministrados em aerossol e inalados. Veja Patton, JS, (1996) *Adv Drug Delivery Rev* **19**:3-36 e a patente Estados Unidos 5.458.135. A dose eficaz de PEG-uricase da presente invenção vai depender do nível de ácido úrico e do tamanho do indivíduo. Numa forma de manifestação deste aspecto da invenção, a PEG-uricase é administrada num excipiente ou

diluyente farmacêuticamente aceitável, numa quantidade que varia entre aproximadamente 10 µg e aproximadamente 1 g. Numa forma de manifestação preferida, a quantidade administrada fica entre aproximadamente 100 µg e 500 mg. De maior preferência, a uricase conjugada é administrada numa 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 formas de manifestação referem-se 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*, 18th Edition, Easton, PA: Mack Publishing Co. Os excipientes apropriados para a preparação de soluções injectáveis 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 e emulsões farmacêuticamente aceitáveis, bem como pós estéreis para a reconstituição em soluções ou dispersões injectáveis 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 ministrada sob a forma de composições de liberação controlada para implante num indivíduo, para controlar continuamente os níveis de ácido úrico elevados nos fluidos corpóreos. Por exemplo, o ácido poliláctico, 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 activas. Estes materiais, quando implantados ou injectados, enfraquecem e liberam gradualmente o material activo no tecido circunvizinho. Por exemplo, um método de encapsulação de PEG-uricase compreende o método apresentado na patente Estados Unidos 5.653.974. 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 Venkateshan, 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 actualmente disponíveis.

Os seguintes exemplos ilustram os vários aspectos acima apresentados. 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 actividade, da solubilidade, da estabilidade, farmacocinéticos, farmacodinâmicos e imunológicos estão 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 hiperuricosúria e preservar a estrutura e a função renal num modelo animal, em que a hiperuricemia e a hiperuricosúria 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 imunogénicos de uricase, que retêm pelo menos aproximadamente 75% da actividade 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 na Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, catálogo número U2350 ou U3377; e na Boehringer Mannheim, Indianapolis, 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 na 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 subsequente 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 colectadas para o uso na síntese de PEG-uricase substancialmente não imunogénica, 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 iónica suficientemente baixa, para permitir a 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 iónica, pelo aumento da força iónica 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 fracções do eluato que contêm a forma tetramérica desejada de uricase, sem agregados detectáveis, para a síntese de uricase-PEG substancialmente não imunogénica. Alternativamente, a forma tetramérica de uricase pode ser isolada através do uso de outros meios de troca iónica, 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 actividade 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 9,2, para se obter concentrações finais na análise de 6-150 μ M. Os preparados de uricase foram diluídos neste tampão de borato que 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 num leitor de microplacas, a taxa de desaparecimento do ácido úrico a 25°C foi monitorada a 292 nm, de quatro em 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 actividade da uricase é definida como a quantidade de enzima que consome um micromole de ácido úrico por minuto; as actividades específicas são expressas como IU/mg de proteína. Alguns dos dados para as actividades relativas de uricase das Figuras 1A-5B foram obtidos através do uso

de 100 μM de ácido úrico na análise. Outros resultados para a velocidade em 100 μM 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:

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

onde K_m é expresso 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 activo 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 sub-unidade de uricase (peso molecular de 35 kDa). Estes e outros PEGs activos apropriados estão disponíveis na 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) *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications*. ACS Symposium Series 680, Washington, DC: American Chemical Society. A reacção 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 reacção por meio de cromatografia e/ou de ultrafiltração.

O número de filamentos de PEG acoplado por sub-unidade 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 reacção de PEGilação ou fracções das colunas preparatórias de troca iónica ou por exclusão de tamanho, foram caracterizadas por meio de HPLC analítica por exclusão de tamanho numa 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 na 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 à 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 actividade pela uricase de fígado de suíno PEGilada, como uma função do número de filamentos de PEG acoplado por sub-unidade. Os dados dos autores da presente invenção (▲, □) são comparados com os de Chen, et al., (1981). O ponto de dados dentro de um círculo grande denota um conjugado relatado para ser não imunoreactivo, por Chen, et al., (1981). Conforme mostrado na Figura 2A, os conjugados de uricase tetramérica de suíno com até seis filamentos de PEG de 30 kDa por sub-unidade ou até sete filamentos de PEG de 5 kDa por sub-unidade retiveram pelo menos 75% da actividade da enzima não modificada. O aumento aparente na actividade específica, com um número crescente de filamentos de PEG de 5 kDa ou de 30 kDa (até aproximadamente quatro filamentos por sub-unidade) pode reflectir 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 sub-unidade contêm uma massa maior de PEG do que foi considerado suficiente para impossibilitar a capacidade reactiva, por Chen, et al. (1981).

EXEMPLO 3

Propriedades dos conjugados de PEG de uricase de PBC tetramérica recombinante

O ADN da uricase quimérica de porco babuíno (PBC) foi subclonado no vector de expressão pET3d (Novagen, Madison, WI) e a construção resultante de plasmídeo foi transformada e expressada num 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 sequência 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 sequências de suíno (SEQ. ID. No.: 1) e de babuíno (SEQ. ID. No.: 2). Os resíduos na sequência de babuíno que diferem dos que estão presentes na sequência de suíno, são mostrados em negrito. As sequências 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 sequência 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 sequência 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 sub-unidade. Os conjugados preparados com os PEGs de, pelo menos, 10 kDa, retiveram mais do que 95% da actividade 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 sub-unidade, são ilustradas nas figuras indicadas: a falta da capacidade imunogénica (Figura 7) e a eficácia em camundongos com deficiência de uricase em: 1) correcção 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 nefrogénico (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 actividade 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 activação de PEG. Um preparado (●) foi testado em camundongos com deficiência de uricase (*uox* -/-); os outros dois (Δ, ■) foram testados em camundongos normais BALB/c. O preparado mais imunoreactivo (Δ) 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 sub-unidade, através do uso do derivado do carbonato de succinimidila de PEG (SC-PEG). Zalipsky, patente Estados Unidos 5.612.460, aqui incorporada a título de referência. O preparado moderadamente imunoreactivo (■) foi preparado por meio do acoplamento de um preparado de uricase de PBC que contém 11% dos agregados numa média de dois filamentos de PEG de 19 kDa por sub-unidade, através do uso de um derivado de carbonato de 4-nitrofenila de PEG (NPC-PEG). Sherman, *et al.*, (1997). O conjugado menos imunoreactivo (●) foi preparado por meio do acoplamento de uma média de seis filamentos NPC-PEG de 10 kDa por sub-unidade, numa 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 actividade de PEG-uricase injectada 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 sub-unidade da enzima.

A Figura 9 mostra que o tratamento de camundongos com deficiência de uricase com a uricase de PBC modificado pela 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 injectados dez vezes, entre o terceiro e o septuagésimo segundo (72^o) 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 nefrogénico, 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 os 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 Center for *in vivo* Microscopy, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina.

Além dos resultados resumidos 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 imunogénica em camundongos. Esta propriedade é reflecte-se no aclaramento acelerado do octâmero modificado pela PEG, dentro de cinco dias após uma única injeção intraperitoneal. Os mesmos camundongos foram novamente injectados 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 actividade uricolítica não foi detectável nos soros dos camundongos injectados com o octâmero PEGilado, mas foi detectada prontamente nos soros dos que foram injectados com o tetrâmero PEGilados. Estes resultados, em combinação com o aclaramento 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 na Sigma-Aldrich (St. Louis MO; catálogo No. U1878) ou na 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 actividade pela uricase PEGilada de *Candida utilis* em função do número de filamentos de PEG acoplados por sub-unidade. 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 antigénicos, por Nishimura, et al., (1979 ou 1981) ou não imunorreativos, por Chen, et al., (1981).

A Figura 1B mostra a retenção da actividade pela uricase PEGilada de *Candida utilis* em função da massa total de PEG acoplado por sub-unidade. Os dados dos autores da presente invenção (▲, ●, □) são comparados com os 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 sub-unidade retiveram, pelo menos, 75% da actividade da enzima não modificada. O aumento aparente na actividade específica quando um número crescente de filamentos de PEG de 30 kDa é ligado (até cinco ou seis filamentos por sub-unidade), pode reflectir 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 na Sanofi Winthrop (Gentilly Cédex, France). 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 sub-unidade, retiveram pelo menos 75% da actividade 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 sub-unidade, com retenção de, pelo menos, 75% da actividade uricolítica inicial.

EXEMPLO 7

Conjugação de PEG de uricase de *Arthrobacter globiformis*

A uricase de *Arthrobacter globiformis* foi obtida na 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. Ao passo que os conjugados com uma média de mais de três filamentos de PEG de 5 kDa por sub-unidade retiveram menos do que 60% da actividade específica inicial, os conjugados com uma média de aproximadamente dois filamentos de PEG de 30 kDa por sub-unidade retiveram, pelo menos, 85% da actividade 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 imunogénicos, os quais retêm, pelo menos, 75% da actividade 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 expressas 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 peroxissomal. 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 imunogénicos, os quais retêm, pelo menos, 75% da actividade específica inicial. A sequência 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 imunogénicos, os quais retêm, pelo menos, 75% da actividade 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 sequência 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 imunogénicos, os quais retêm, pelo menos, 75% da actividade 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 sequência 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 imunogénica substancialmente reduzida, os quais retêm, pelo menos, 75% da actividade específica inicial de uricase recombinante.

EXEMPLO 12

Capacidade imunogénica dos conjugados de PEG provenientes de *Candida utilis*, *Aspergillus 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 imunogénica destes conjugados é substancialmente reduzida ou eliminada.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

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

<120> PEG-URATE OXIDASE CONJUGATES AND USE THEREOF

<130> MVIEM.001VPC

<140>

<141>

<150> 09/130.392

<151> 1999 08-08

<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				

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado incluindo uma uricase purificada conjugada a poli(etilenoglicol) (PEG), em que pelo menos 90% da dita uricase se encontra numa forma tetramérica.
2. Composição farmacêutica adequada para baixar os níveis de ácido úrico num fluido ou tecido corporal, incluindo o conjugado da reivindicação 1 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

RESUMO

CONJUGADOS DE PEG-URATO OXIDASE E SUA UTILIZAÇÃO

Uma oxidase de urato de ocorrência natural ou recombinante (uricase) covalentemente ligada a poli (etileno glicol) ou poli (óxido de etileno) (ambos referidos como PEG), em que uma média de 2 a 10 fios de PEG são conjugados para cada subunidade de uricase e os PEG tem um peso molecular médio entre cerca de 5 kDa e 100 kDa. Os conjugados de PEG-uricase resultantes são substancialmente não imunogénicos e retém pelo menos 75% da actividade uricolítica da enzima inalterada.

Figura 1A: Retenção de actividade pela uricase de Candida PEGilada

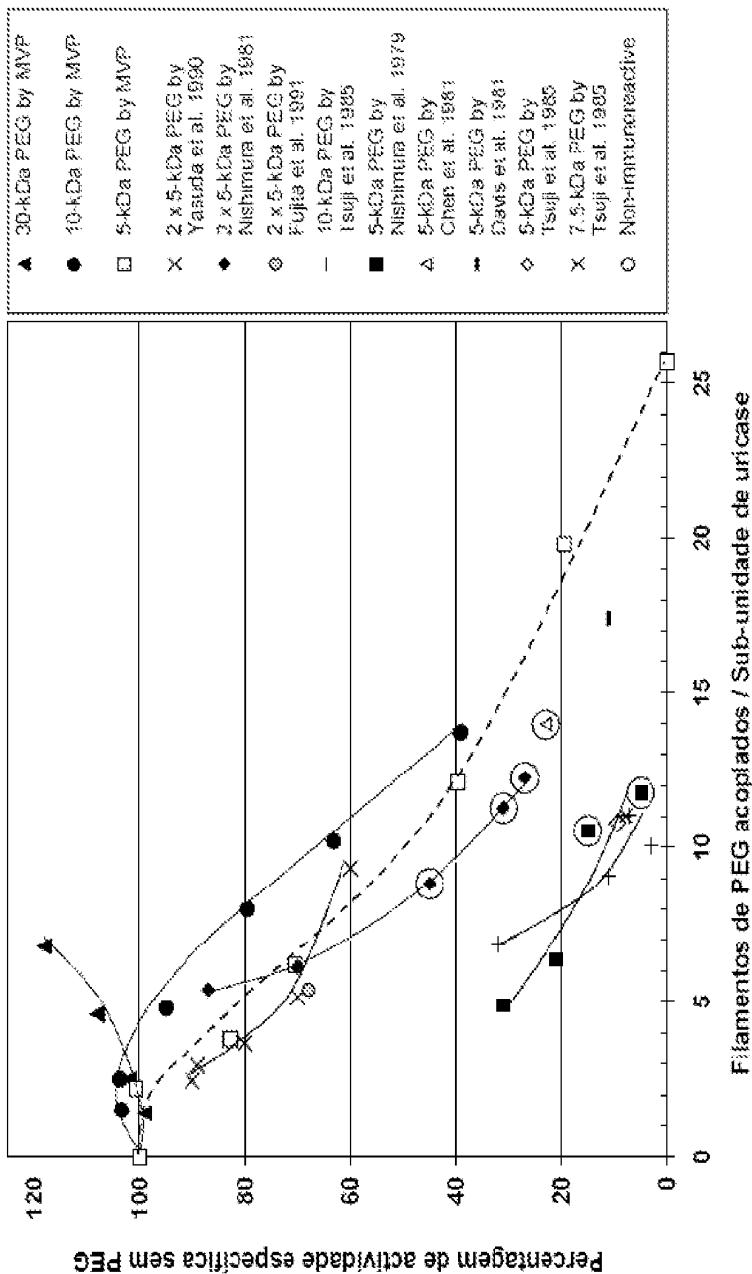


Figura 1B: Retenção de actividade pela uricase de *Candida* PEGilada

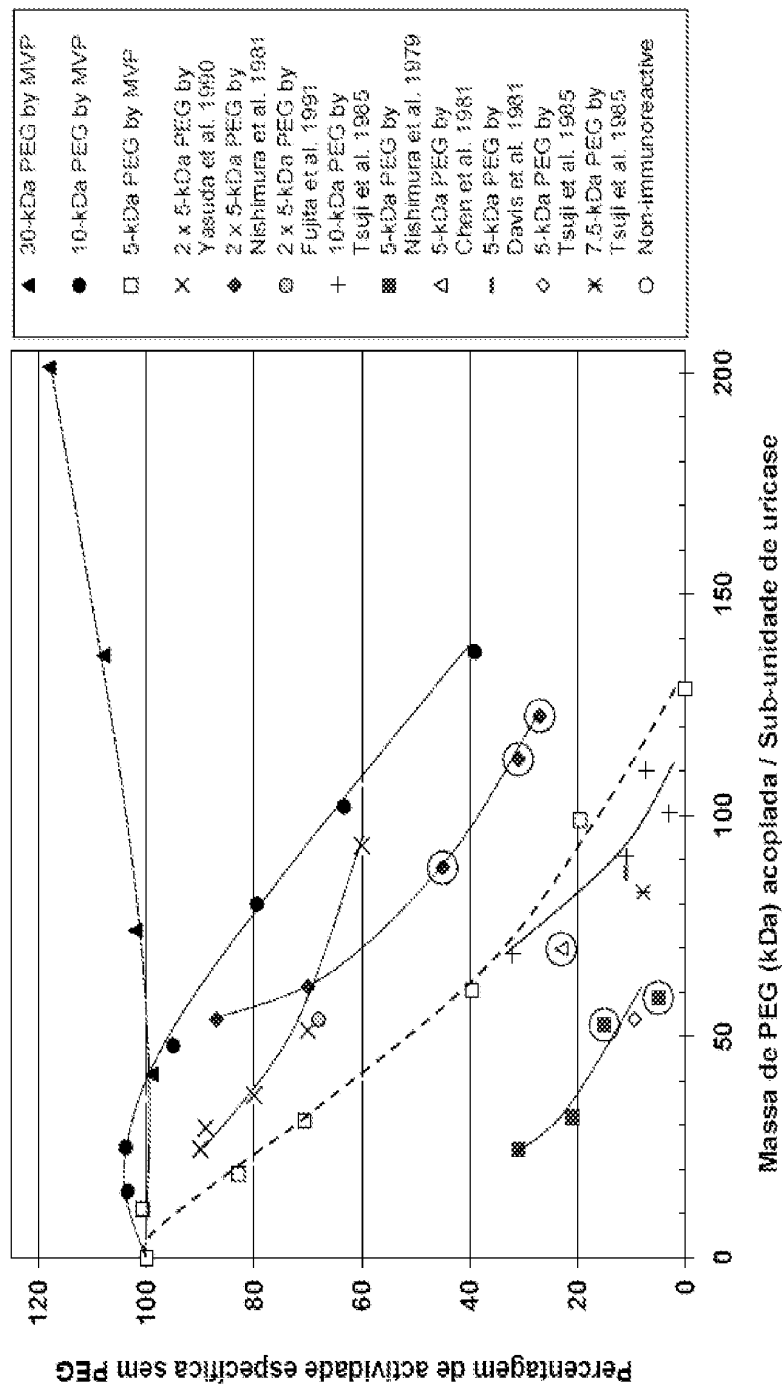


Figura 2A: Retenção de actividade pela uricase de suíno PEGilada

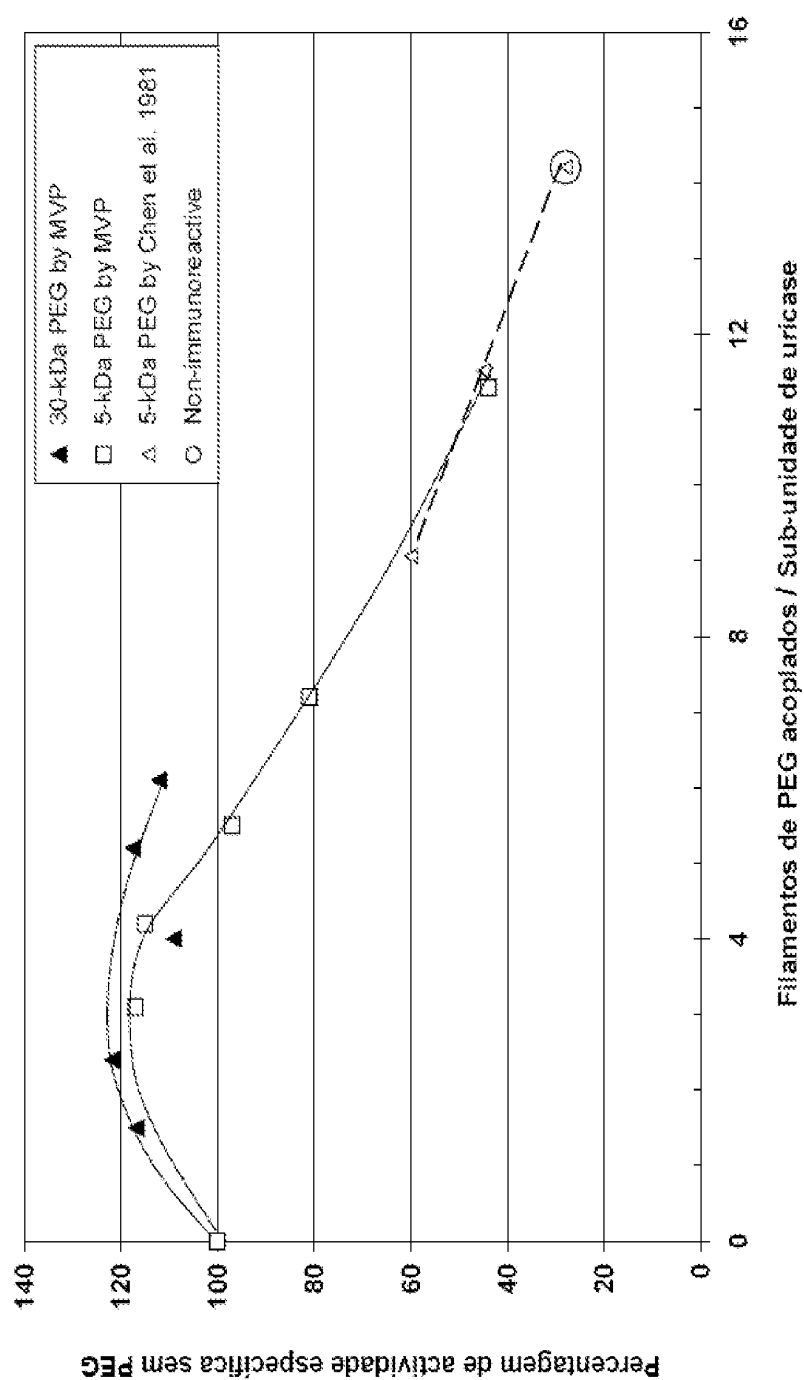


Figure 2B: Retenção de actividade pela uricase de suína PEGilada

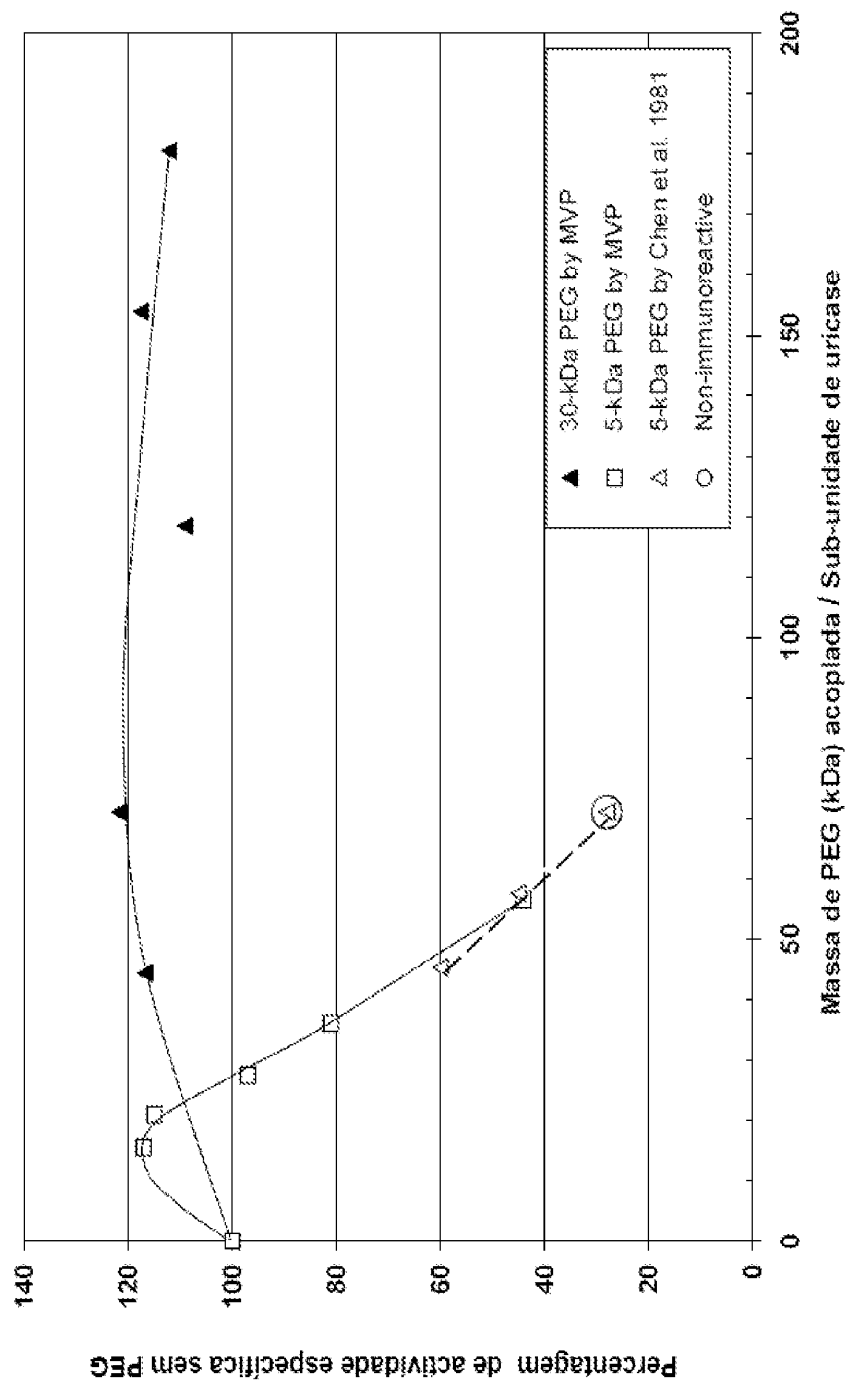


Figura 3A: Retenção de actividade pela uricase química de porco-babuino PEGilada

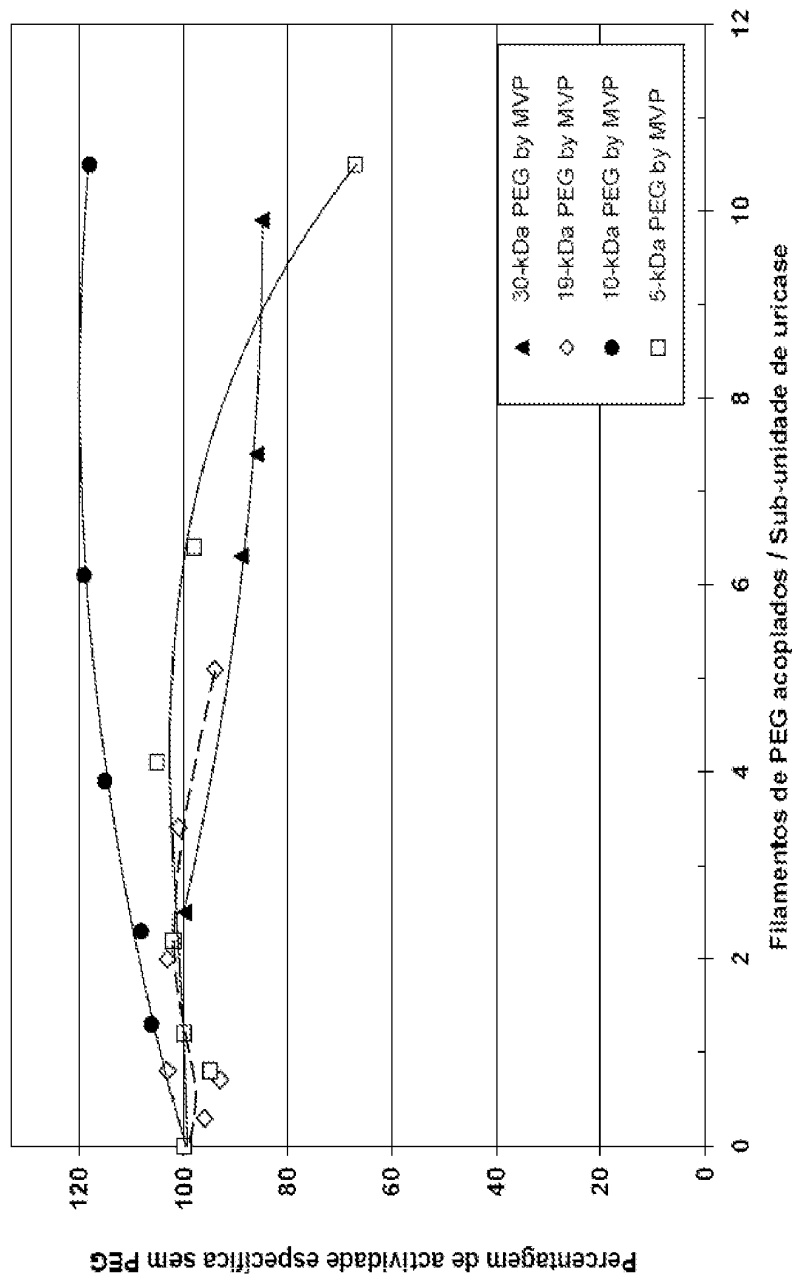


Figura 3B: Retenção de actividade pela urícase química de porco-babuino PEGilada

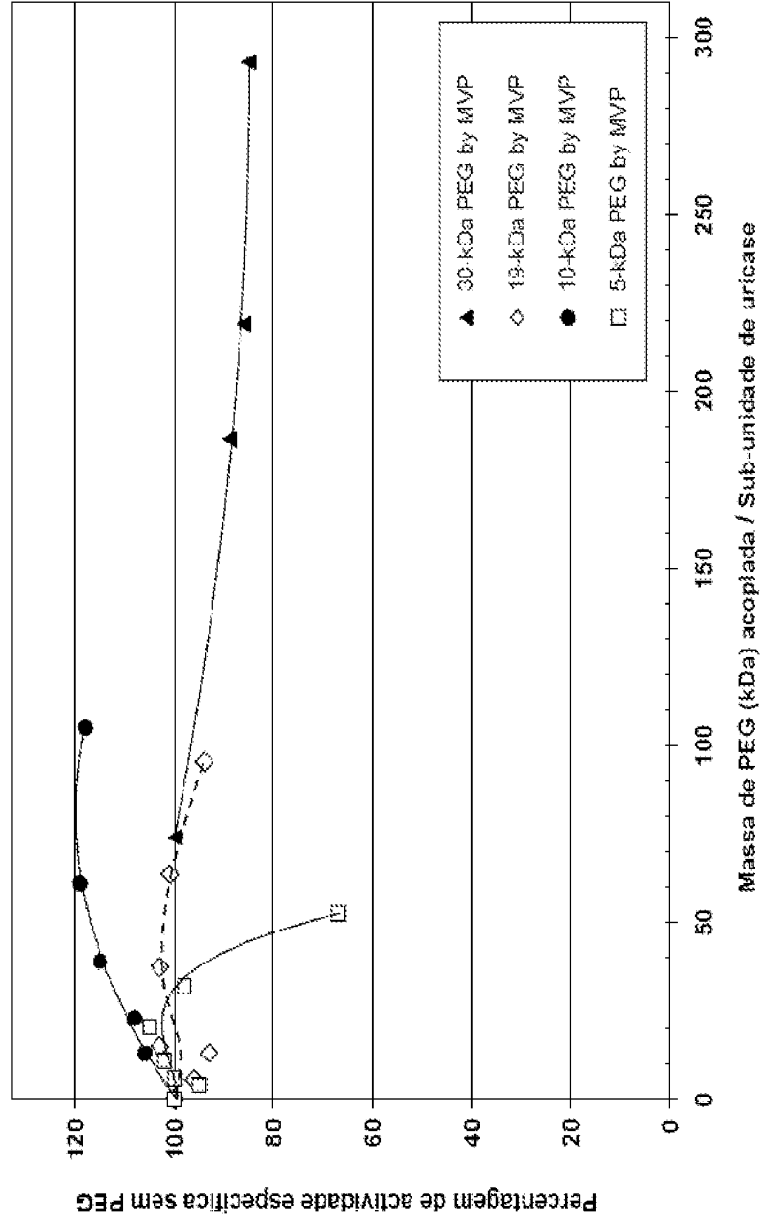


Figura 4A: Retenção de actividade pela Uricozyme® (Uricase *A. flavus*) PEGilado

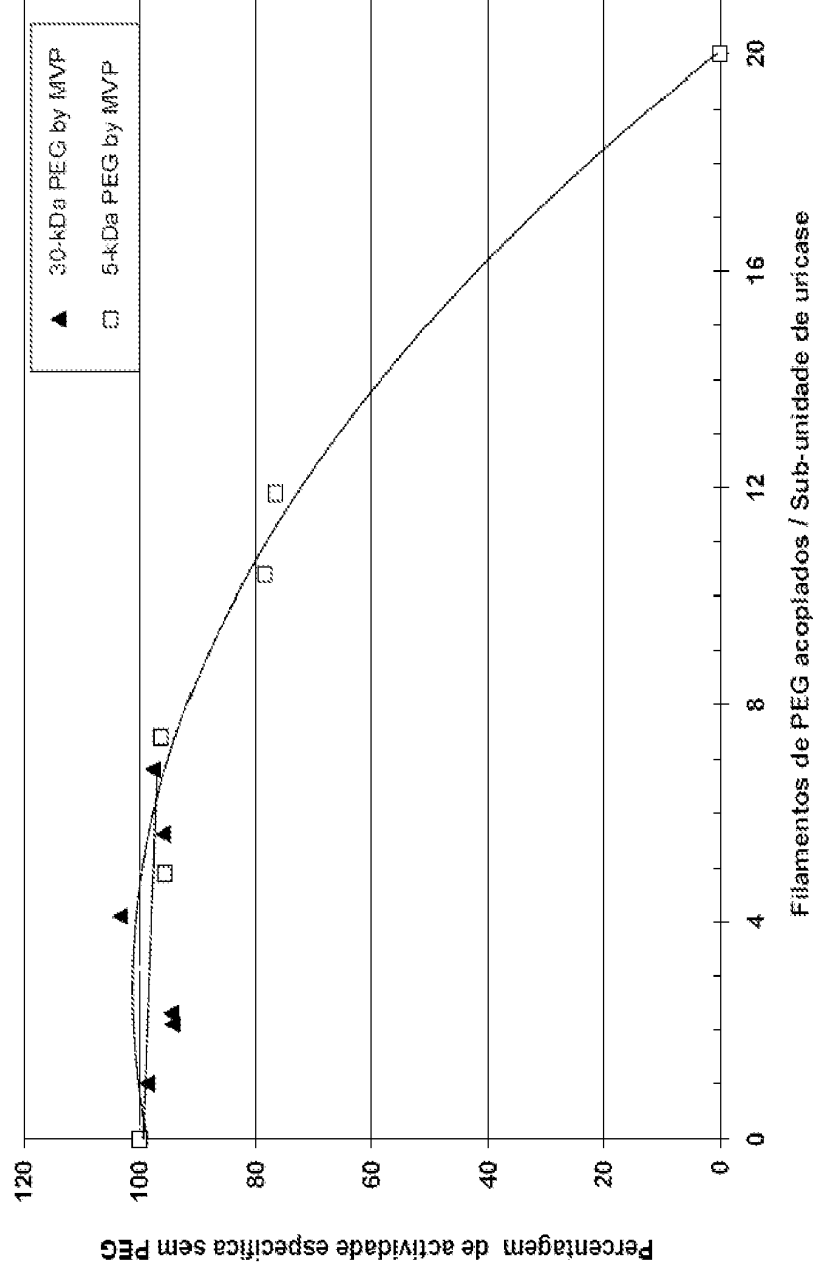


Figura 4B: Retenção de actividade pela Uricozyme® (Uricase *A. flavus*) PEGilado

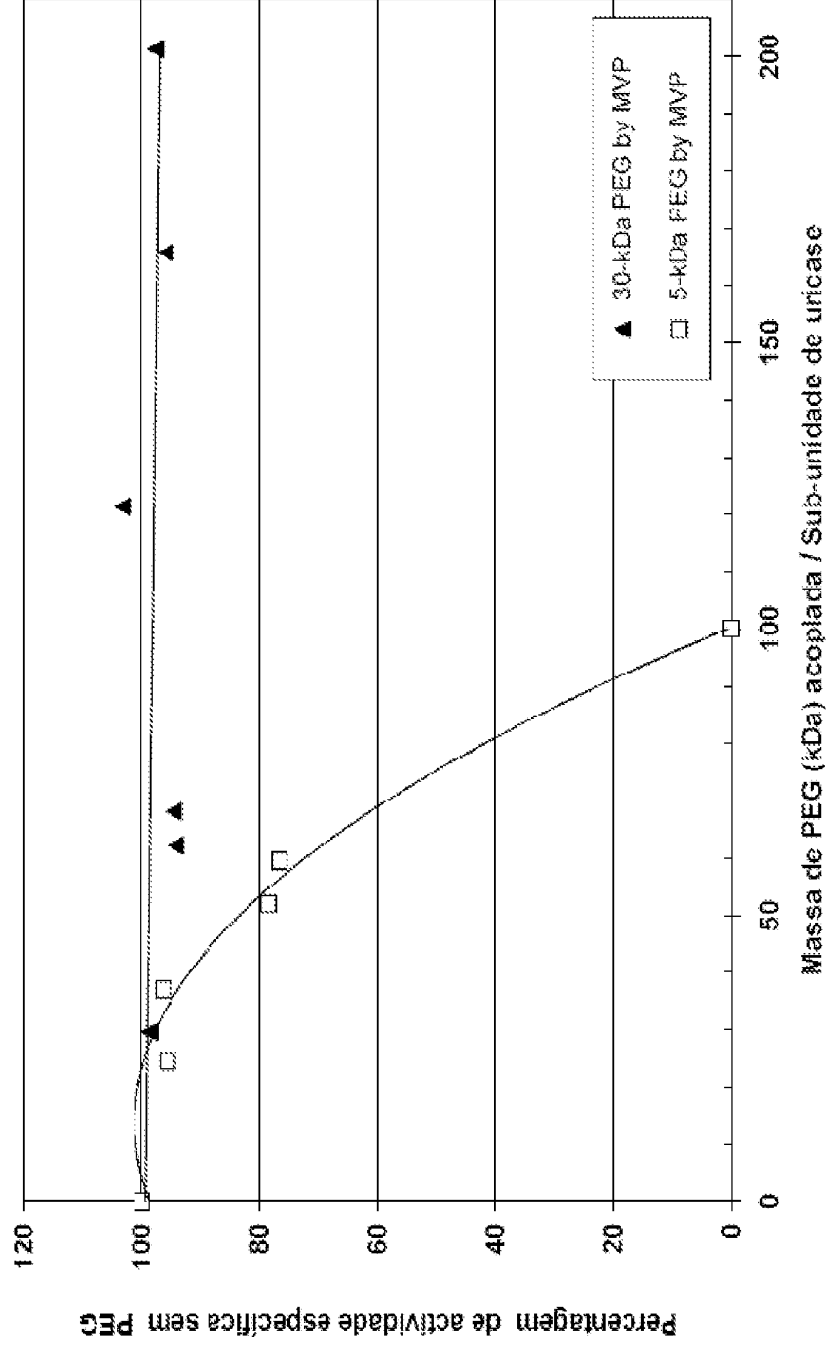


Figura 5A: Retenção de actividade pela uricase de nódulo de raiz de soja PEGilada

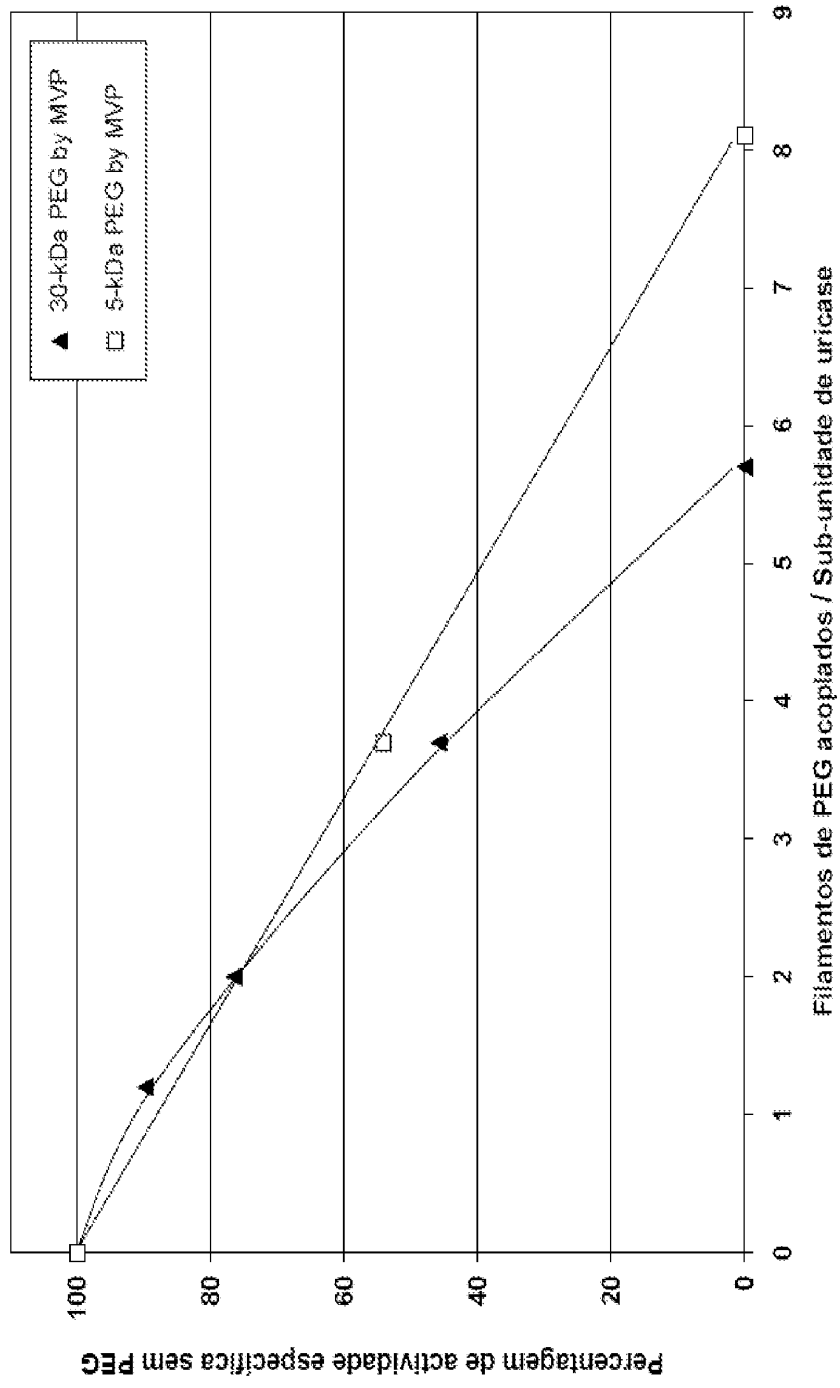


Figura 5B: Retenção de actividade pela uricase de nódulo de raiz de soja PEGilada

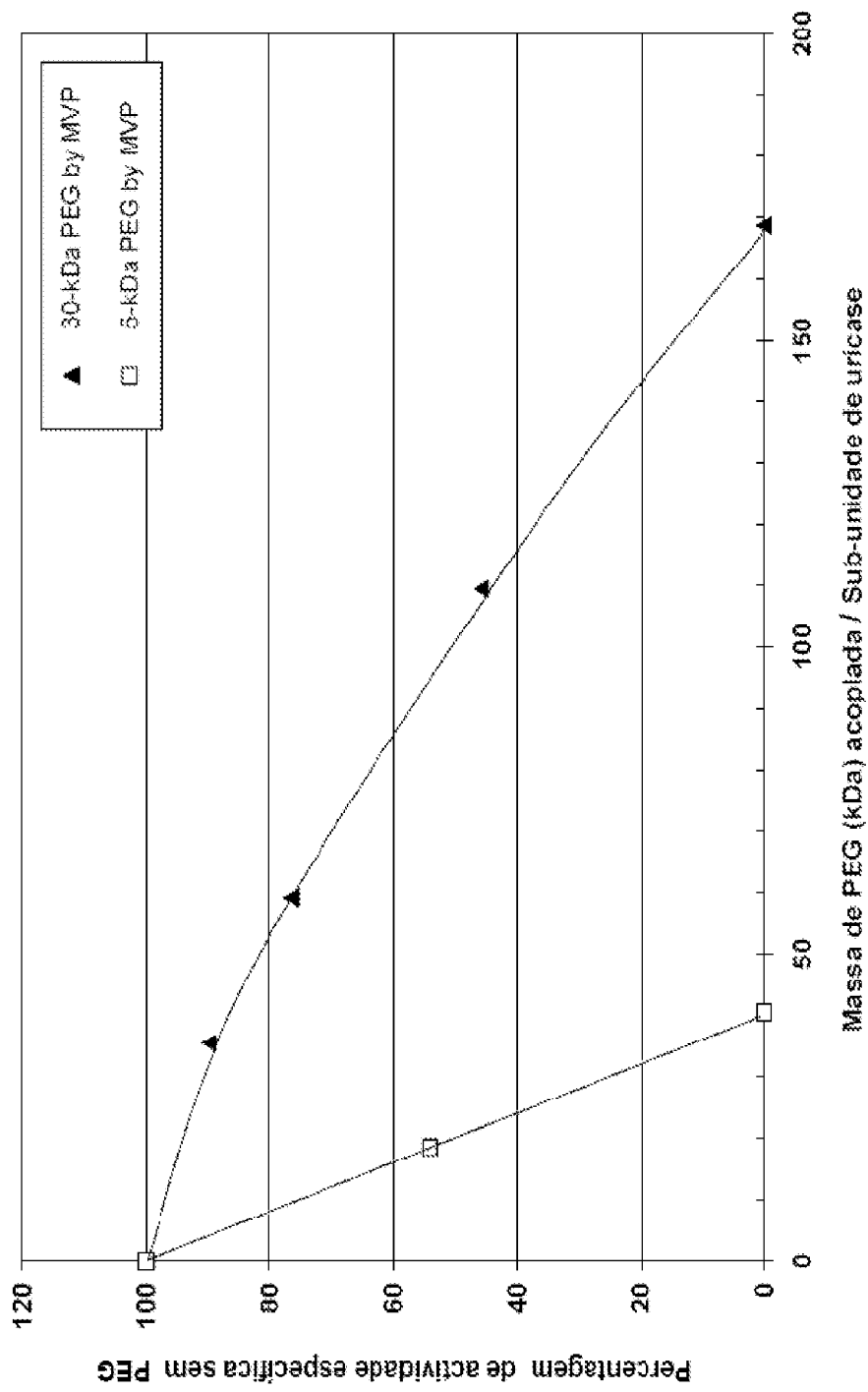


Figura 6: Sequências de aminoácidos deduzidas de uricase quimérica de Porco-Babuíno (PBC), da uricase de PBC que é truncada nos terminais amino e carboxila (PBC-NT-CT) e da uricase de suíno que contém as mutações R291K e T301S (uricase de PKS), comparadas com a sequência de suíno (SEQ ID NO: 1) e a sequência de babuíno (SEQ ID NO: 2).

Porcine	MAHYRNDYKK NDEVEFVRTG YGKDMIKVLH IQRDGKYHSI	40
PBC	sequência de suíno 1-225 →	40
PBC-NT-CT	sequência de suíno 1-219 →	34
PKS	sequência de suíno 1-288 →	40
Baboon	MADYHNNYKK NDELEFVRTG YGKDMVKVLH IQRDGKYHSI	40
Porcine	KEVATSVQLT LSSKKDYLHG DNSDVIPTDT IKNTVNVLAK	80
PBC	sequência de suíno →	80
PBC-NT-CT	sequência de suíno →	74
PKS	sequência de suíno →	80
Baboon	KEVATSVQLT LSSKKDYLHG DNSDIIPTDT IKNTVHVLAK	80
Porcine	FKGIKSIETF AVTICEHFLS SFKHVIRAQV YVEEVPWKRF	120
PBC	sequência de suíno →	120
PBC-NT-CT	sequência de suíno →	114
PKS	sequência de suíno →	120
Baboon	FKGIKSIEAF GVNICEYFLS SFNHVIRAQV YVEEIPWKRL	120
Porcine	EKNGVKHVHA FIYTPTGTHF CEVEQIRNGP FVIHSGIKDL	160
PBC	sequência de suíno →	160
PBC-NT-CT	sequência de suíno →	154
PKS	sequência de suíno →	160
Baboon	EKNGVKHVHA FIHTPTGTHF CEVEQLRSGP FVIHSGIKDL	160
Porcine	KVLKTTQSGF EGFIKDQFTT LPEVKDRCPA TQVYCKWRYH	200
PBC	sequência de suíno →	200
PBC-NT-CT	sequência de suíno →	194
PKS	sequência de suíno →	200
Baboon	KVLKTTQSGF EGFIKDQFTT LPEVKDRCPA TQVYCKWRYH	200
Porcine	QGRDVFDEAT WDTVRSIVLQ KFAGPYDKGE YSPSVQKTLY	240
PBC	sequência de suíno → ← seq. de babuíno	240
PBC-NT-CT	sequência de suíno → ← seq. de babuíno	234
PKS	sequência de suíno →	240
Baboon	QCRDVFDEAT WGTIRDLVLE KFAGPYDKGE YSPSVQKTLY	240
Porcine	DIQVLTGQV PEIEDMEISL PNIHYLNIDM SKMGLINKEE	280
PBC	sequência de babuíno →	280
PBC-NT-CT	sequência de babuíno →	274
PKS	sequência de suíno →	280
Baboon	DIQVLSLSRV PEIEDMEISL PNIHYFNIDM SKMGLINKEE	280
Porcine	VLLPLDNFYG RITGTVKRKL TSRL	304
PBC	sequência de babuíno →	304
PBC-NT-CT	sequência de babuíno →	295
PKS	suíno ← babuíno →	304
Baboon	VLLPLDNFYG KITGTVKRKL SSRL	304

Figura 7: Actividade da uricase no soro 24 horas depois de cada injeção de PEG-uricase em relação à primeira injeção

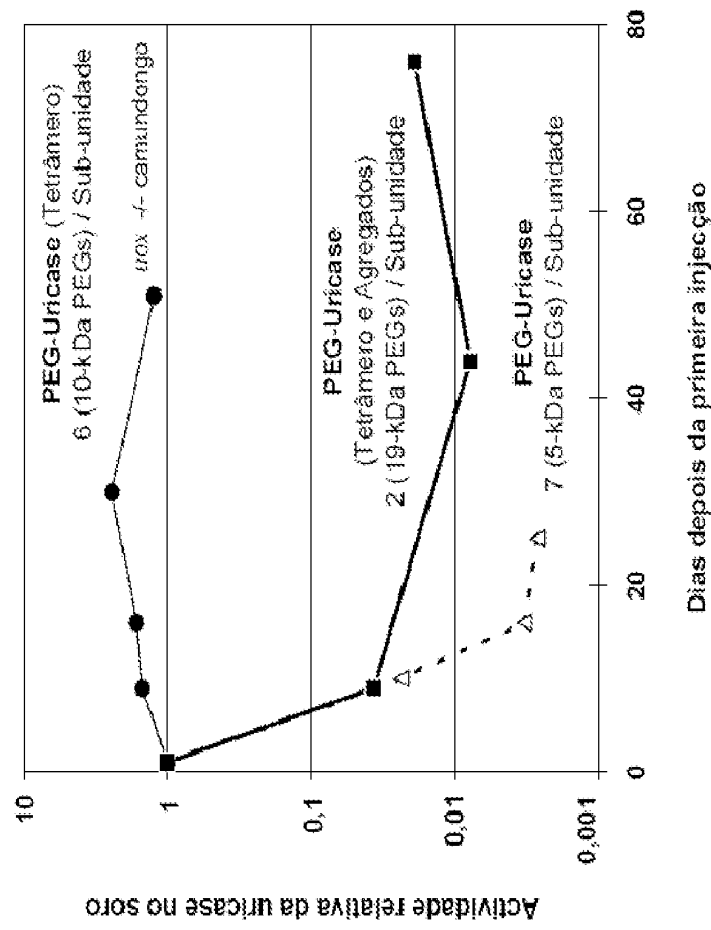


Figura 8: Relação inversa entre a actividade do PEG-uricase no soro e os níveis de ácido úrico no soro e na urina de um camundongo com deficiência de uricase

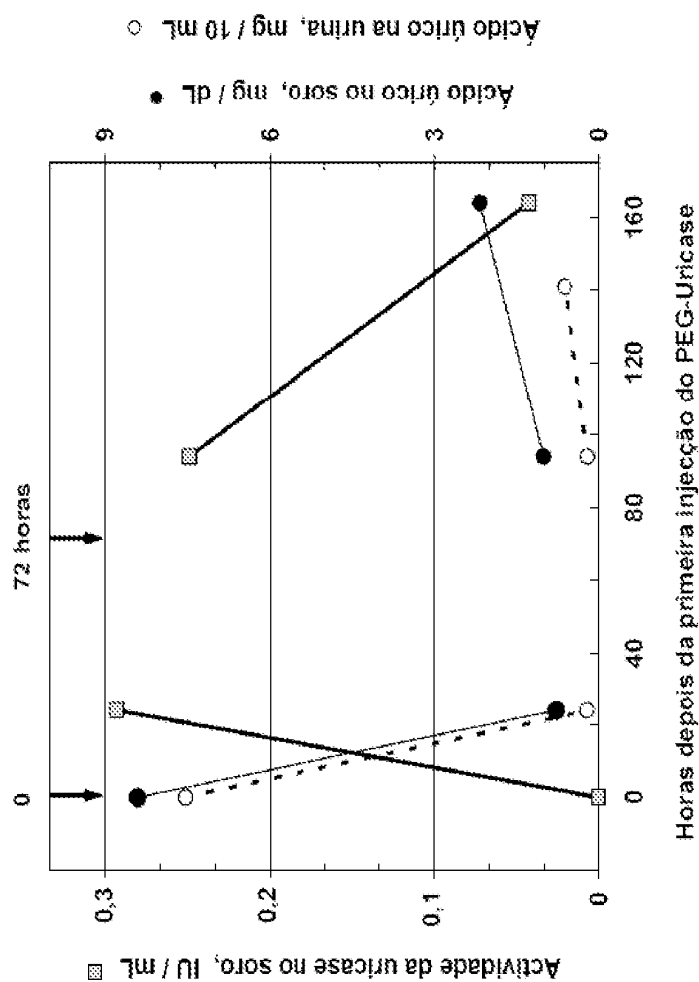


Figura 9:
Gravidade decrescente de um defeito de concentração na urina, em camundongos com deficiência em uricase tratados com PEG-Uricase

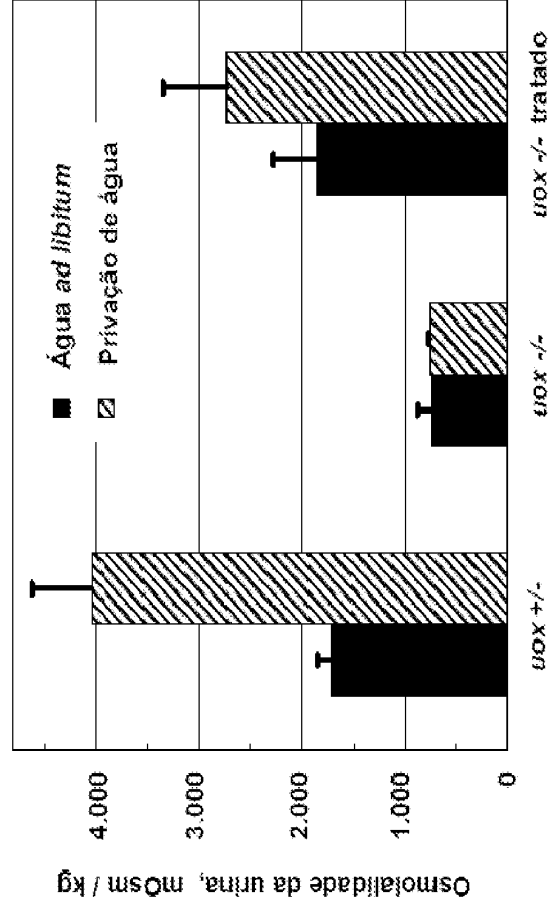


Figura 10: Gravidade decrescente de diabetes insipidus nefrogénica em camundongos com deficiência de uricase e tratados com PEG-Uricase

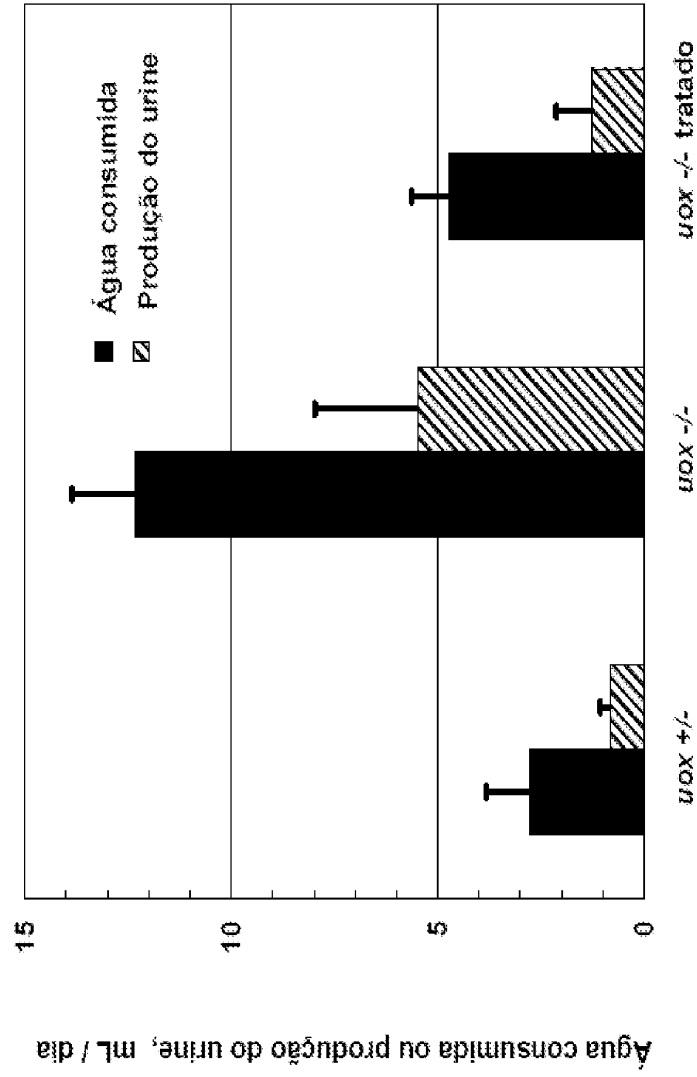


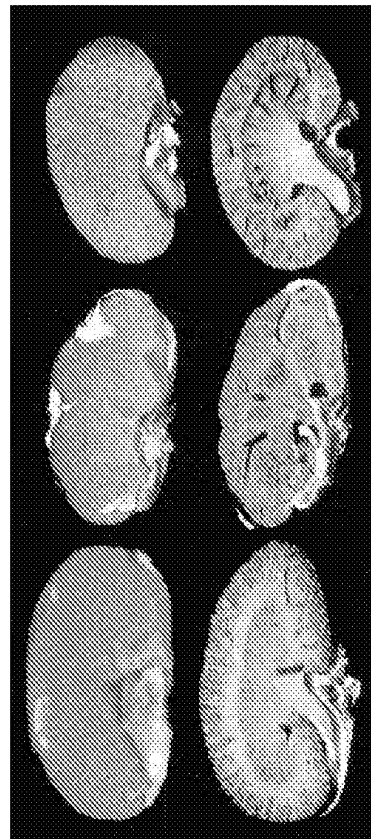
Figura 11:

Gravidade decrescente da nefropatia induzida por ácido úrico depois do tratamento com PEG-Uricase, segundo a visualização microscópica por ressonância magnética

Rim de um camundongo normal

Rim de um camundongo
"knockout" não tratado com
uricase

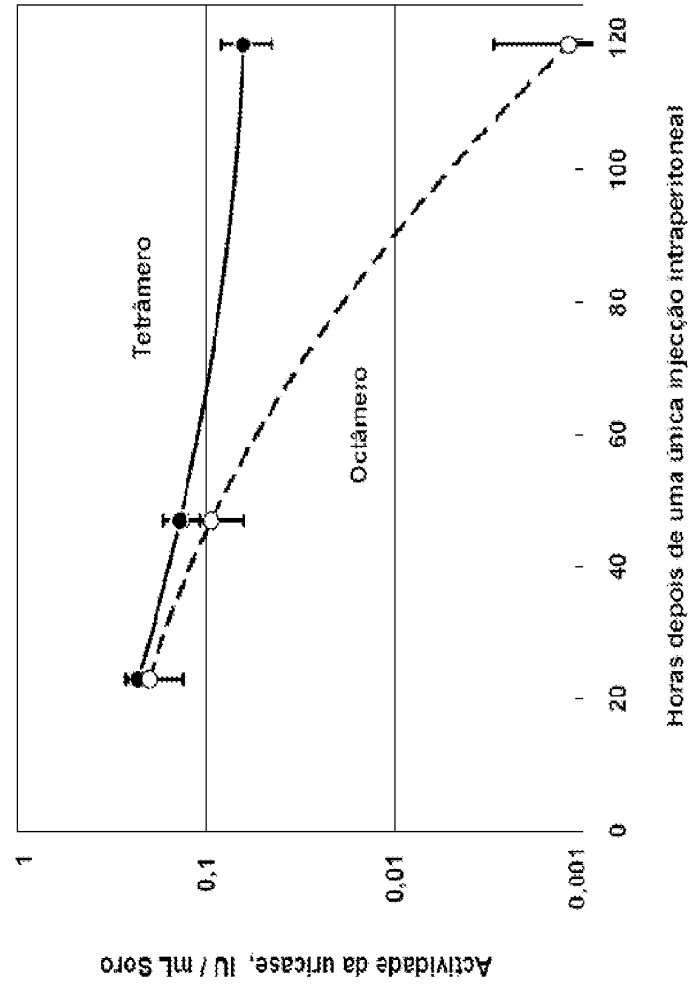
Rim de um camundongo
"knockout" e tratado
com PEG-uricase



Superfície
representada

Corte
coronal

Figura 12: Aclaramento da circulação de camundongos BALB/c do tetrâmero e octâmero de uricase PBC acoplados a 5-6 filamentos de PEG de 10-kDa / sub-unidade





European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY
Tel. +49 (0)89 2399 - 0
Fax +49 (0)89 2399 - 4465



Evenson, Jane Harriet
Mathys & Squire LLP
120 Holborn
London EC1N 2SQ
GRANDE BRETAGNE

**For any questions about
this communication:**

Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date
20.01.11

Reference P32275EP-D1-PCT	Application No./Patent No. 05011069.1 - 2112 / 1588716
Applicant/Proprietor Mountain View Pharmaceuticals, Inc., et al	

Decision to grant a European patent pursuant to Article 97(1) EPC

Following examination of European patent application No. 05011069.1 a European patent with the title and the supporting documents indicated in the communication pursuant to Rule 71(3) EPC dated 01.07.09 is hereby granted in respect of the designated Contracting States.

The request for amendments received at the EPO on 01.10.09 and any subsequent modifications agreed with the applicant have been taken into account.

Patent No. : 1588716
Date of filing : 02.08.99
Priority claimed : 06.08.98/USP 219318

Designated Contracting States
and Proprietor(s)

: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
Mountain View Pharmaceuticals, Inc.
3475-S Edison Way
Menlo Park, CA 94025-1813/US

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
Duke University
Office of Licensing and Ventures
2812 Erwin Road, Suite 306
Durham, NC 27705/US

This decision will take effect on the date on which the European Patent Bulletin mentions the grant (Art. 97(3) EPC).

The mention of the grant will be published in European Patent Bulletin 11/07 of 16.02.11.