

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/53

C12N 9/06 C12N 9/96

A61K 47/48 A61K 38/44



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01807750.1

[43] 公开日 2003年6月11日

[11] 公开号 CN 1423699A

[22] 申请日 2001.2.7 [21] 申请号 01807750.1

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 10 [33] US [31] 09/501,730

[86] 国际申请 PCT/US01/40069 2001. 2. 7

[87] 国际公布 WO01/59078 英 2001. 8. 16

[85] 进入国家阶段日期 2002. 10. 8

[71] 申请人 山景药品公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 M·R·舍尔曼

M·G·P·赛菲尔

L·D·威廉斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

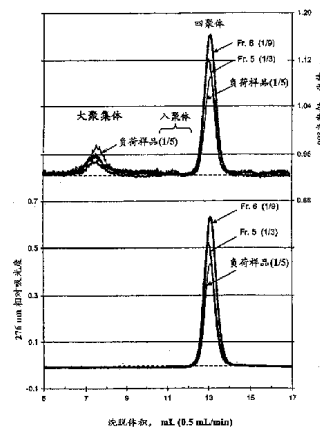
权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图 6 页

[54] 发明名称 用于制备非免疫原性聚合物性缀合物的无聚集体尿酸氧化酶

[57] 摘要

使基本上不含大聚集体的天然蛋白质或重组蛋白质、特别是猪尿酸氧化酶突变蛋白与足够少量数目链的聚合物缀合,可使其基本上无免疫原性,从而使所述蛋白的生物活性基本保留在缀合物中。所述缀合物非常适合治疗慢性疾病,因为与从含微量大聚集体的蛋白质制品制备的类似缀合物相比,它们不大可能诱导形成抗体和/或加速清除。

在 Superdex 200 上对未分级的 EKS 尿酸酶(质控样品)和缀合物产物的 Mono Q 柱混合进行的大小排阻 HPLC



1. 基本上不含大于八聚体的聚集体的纯化尿酸氧化酶(尿酸酶)。
2. 权利要求1的尿酸酶, 其中所述尿酸酶为哺乳动物尿酸酶。
- 5 3. 权利要求2的尿酸酶, 其中所述尿酸酶为猪肝脏、牛肝脏或羊肝脏尿酸酶。
4. 权利要求1的尿酸酶, 其中所述尿酸酶为重组尿酸酶。
5. 权利要求4的尿酸酶, 其中所述尿酸酶基本上具有猪、牛、羊或狒狒的肝脏尿酸酶序列。
- 10 6. 权利要求4的尿酸酶, 其中所述尿酸酶为嵌合体尿酸酶。
7. 权利要求6的尿酸酶, 其中所述嵌合体尿酸酶包含猪肝脏及狒狒肝脏尿酸酶的部分。
8. 权利要求7的尿酸酶, 其中所述嵌合体尿酸酶为PKS尿酸酶。
9. 权利要求4的尿酸酶, 其中所述尿酸酶基本上具有狒狒肝脏尿酸酶的序列, 其中97位酪氨酸被组氨酸取代。
- 15 10. 权利要求4的尿酸酶, 其中所述尿酸酶包括一个氨基末端和一个羧基末端, 而且其中所述尿酸酶在一个末端或两个末端被截断。
11. 权利要求1的尿酸酶, 其中所述尿酸酶为真菌或微生物尿酸酶。
- 20 12. 权利要求11的尿酸酶, 其中所述真菌或微生物尿酸酶分离自黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)、芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)或产朊假丝酵母(*Candida utilis*), 或者为基本上一种所述尿酸酶序列的重组尿酸酶。
13. 权利要求1的尿酸酶, 其中所述尿酸酶为无脊柱动物尿酸酶。
- 25 14. 权利要求13的尿酸酶, 其中所述无脊柱动物尿酸酶分离自果蝇(*Drosophila melanogaster*)或 *Drosophila pseudoobscura*, 或者为基本上具有一种所述尿酸酶序列的重组尿酸酶。
15. 权利要求1的尿酸酶, 其中所述尿酸酶为植物尿酸酶。

16. 权利要求 15 的尿酸酶，其中所述植物尿酸酶分离自大豆 (*Glycine max*) 根瘤或者为基本上具有所述尿酸酶序列的重组尿酸酶。

17. 与聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)缀合的权利要求 1 尿酸酶，其中所述缀合物中的尿酸酶基本上不含大于八聚体的聚集体。

5 18. 权利要求 17 的尿酸酶缀合物，其中所述聚(乙二醇)为单甲氧基聚(乙二醇)。

19. 权利要求 17 的尿酸酶，其中所述尿酸酶通过选自氨基甲酸乙酯(氨基甲酸酯)、仲胺以及酰胺的一个键与所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)缀合。

10 20. 权利要求 17 的尿酸酶缀合物，其中所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)的分子量为约 5 kDa-30 kDa。

21. 权利要求 20 的尿酸酶缀合物，其中所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)的分子量为约 10 kDa-20 kDa。

15 22. 权利要求 17 的尿酸酶缀合物，其中所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)链的平均链数为每个尿酸酶亚单位约 2-12 条。

23. 权利要求 22 的尿酸酶缀合物，其中所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)链的平均链数为每个尿酸酶亚单位约 6-10 条。

24. 权利要求 23 的尿酸酶缀合物，其中所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)的平均链数为每个尿酸酶亚单位约 7-9 条。

20 25. 权利要求 17 的尿酸酶缀合物，其中所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)为线型。

26. 权利要求 17 的尿酸酶缀合物，其中所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)为支链型。

25 27. 一种降低体液或组织尿酸水平的药用组合物，它包含权利要求 17 的缀合物和药学上可接受的载体。

28. 权利要求 27 的药用组合物，其中所述组合物通过冷冻干燥实现稳定，复制时溶解获得适于胃肠外给予的溶液。

29. 一种纯化免疫原性降低的尿酸酶的方法，它包括如下步骤：

分离尿酸酶流分中大于八聚体的尿酸酶聚集体，然后从所述纯化尿酸酶中去除所述聚集体。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述分离步骤选自离子交换色谱、大小排阻性色谱以及超滤。

5 31. 权利要求 30 的方法，其中所述分离步骤包括检测尿酸酶流分中大于八聚体的聚集体，去除包含所述聚集体的所述流分。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述检测步骤包括光散射检测。

33. 用权利要求 29 的方法制备的分离尿酸酶。

用于制备非免疫原性聚合物性缀合物的无聚集体尿酸氧化酶

5

本发明的政府权益声明

本发明介绍的一部分研究是在美国-以色列两国工业研究发展基金会支持下进行的。因此，美国政府对本发明拥有一定权益。

发明背景

10

发明领域

本发明涉及纯化和化学修饰蛋白质，以延长其循环时间并降低其免疫原性。更准确地说，本发明涉及去除尿酸氧化酶(尿酸酶)八聚体以上的聚集体，然后使其与聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)缀合。这样基本上消除了尿酸酶免疫原性而不影响其尿酸分解活性。

15

相关技术介绍

本背景部分包含的陈述不代表承认为现有技术，相反，反映了本发明人进行本发明时对技术状况的主观评论和解释。这些解释可能包括本发明人个人迄今未公开的见解，见解本身不是现有技术的一部分。

20

25

尿酸氧化酶(尿酸酶; E.C. 1.7.3.3.)是催化尿酸氧化成可溶性更强的产物尿囊素的酶，尿囊素是更容易排出的嘌呤代谢物。人体不能产生具有酶活性的尿酸酶，这是因为高等灵长类动物在进化期间尿酸酶基因获得性产生了几个突变。Wu, X等(1992) *J Mol Evol* 34:78-84。结果，在易感个体中，血中过高浓度的尿酸(高尿酸血症)和尿中过高浓度的尿酸(高尿酸尿)可引起疼痛性关节炎(痛风)、损伤性尿酸盐沉积(痛风石)以及肾衰竭。在一些患者个体中，有效药物如别嘌呤醇(一种尿酸合成抑制剂)产生治疗限制性副作用或不能充分减轻上述病情。Hande, KR 等(1984) *Am J Med* 76:47-56; Fam, AG, (1990)

Baillière's Clin Rheumatol 4:177-192。注射尿酸酶至少可短暂减轻高尿酸血症及高尿酸尿。因为尿酸酶是人体外源性蛋白，所以即使第一次注射源自黄曲霉的未修饰尿酸酶蛋白，都导致百分之几的治疗患者产生过敏反应(Pui, C-H 等(1997) *Leukemia* 11:1813-1816)，而且免疫反应限制其长期或间断性治疗应用。Donadio, D 等(1981) *Nouv Presse Méd* 10:711-712; Leauatic, M 等(1983) *Rev Rhum Mal Osteoartic* 50:553-554。

美国专利申请序号 09/370,084 和已公布的国际申请号 PCT/US99/17514 公开保留了至少约 75%非缀合尿酸酶尿酸分解活性并大大减少其免疫原性的聚(乙二醇)-尿酸氧化酶(PEG-尿酸酶)。在一种所述纯化尿酸酶中，每个亚单位平均与 2-10 条 PEG 共价连接，其中每个 PEG 分子的分子量可为约 5 kDa-100 kDa。

已知蛋白质聚集增加其免疫原性。对这一点的认识使得研制在蛋白质用于制备疫苗或免疫动物以产生抗血清之前通过诸如热变性处理和戊二醛交联处理而目的在于使蛋白质聚集的方法。

此外已经知道，在治疗性蛋白质的临床应用期间，例如人 γ 球蛋白(Henney 等(1968) *N. Engl. J. Med.* 278:2244-2246)和人生长激素(Moore 等(1980) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:691-697，蛋白质非目的性聚集导致产生免疫或致敏。人干扰素- α 聚集产生免疫原性已经在 BALB/c 小鼠得到证实(Braun 等(1997) *Pharm. Res.* 14:1472-1478)，已经将酶联免疫吸附测定法(ELISA)发展用于治疗蛋白聚集性免疫原性测定(Braun 等(1997) *Pharm. Res.* 14:1394-1400)。

与蛋白质聚集对免疫原性的已知作用形成对照的是，尚没有聚集对与诸如 PEG 的聚(亚烷基二醇)缀合的蛋白质免疫原性产生影响的报告。需要基本上消除尿酸酶免疫原性而不影响其尿酸分解活性的聚(亚烷基二醇)-尿酸酶缀合物。本发明提供这样的组合物。

发明概述

蛋白质与聚(亚烷基二醇)、特别是 PEG 缀合获得免疫原性降低且在血液中维持时间增加的缀合物。在试图制备基本上无免疫原性、基本上保留未修饰尿酸酶制剂全部尿酸分解活性的尿酸酶缀合物时，发现重复注射由包含大的尿酸酶聚集体的尿酸酶制备的 PEG 缀合物后，原料物质中的微量尿酸酶大聚集体在刺激抗体形成及加速从血液中清除方面都有惊人的效果，这两方面都是有害的。令人惊奇的是，本发明人发现，免疫原性增加和加速清除并不是由于存在比天然四聚体大的明确中等大小的尿酸酶亚单位聚集体，例如含八个亚单位的聚集体(八聚体)。在可通过紫外光吸光度(例如 214 nm 或 276nm)检测或通过折光率或其它蛋白质浓度测量检测的大多数尿酸酶制剂中存在足够高浓度的八聚体形式尿酸酶。然而，发现八聚体本身对免疫原性和加速 PEG-尿酸酶缀合物清除的作用非常小，相比之下含量少得多而大得多的聚集体产生的作用大得多，所述大聚集体不能在所述检测条件下通过紫外吸光度检测到，但易于通过静态(Raleigh)或动态光散射检测到。因此发现，与 PEG 缀合之前去除所述微量的非常大的聚集体而以出人意料的程度降低所获得的 PEG-尿酸酶缀合物的免疫原性和快速清除。

本发明的一个实施方案是基本上不含大于八聚体的聚集体的纯化尿酸氧化酶(尿酸酶)。优选所述尿酸酶为哺乳动物尿酸酶。更优选所述尿酸酶为猪肝尿酸酶、牛肝尿酸酶或羊肝尿酸酶。在此优选实施方案的一个方面，所述尿酸酶为重组尿酸酶。在此优选实施方案的另一方面，所述尿酸酶基本上具有猪肝、牛肝、羊肝或狒狒肝尿酸酶的序列。所述尿酸酶优选为嵌合体。优选所述尿酸酶为 PKC 尿酸酶。在此优选实施方案的另一方面，所述尿酸酶基本上具有狒狒肝脏尿酸酶序列，其中 97 位酪氨酸由组氨酸替代。所述优选尿酸酶包含一个氨基末端和一个羧基末端，其中所述尿酸酶在一个末端或两个末端截短。所述尿酸酶为真菌尿酸酶或微生物尿酸酶是有益的。

5 优选所述真菌尿酸酶或微生物尿酸酶分离自黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)、芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)或产朊假丝酵母(*Candida utilis*), 或者是基本上具有一种所述尿酸酶序列的重组尿酸酶。或者所述尿酸酶为无脊椎动物尿酸酶。优选所述无脊椎动物尿酸酶分离自果蝇(*Drosophila melanogaster*)或
10 *Drosophila pseudoobscura*, 或者是基本上具有一种所述尿酸酶序列的重组尿酸酶。在此优选实施方案的另一方面, 所述尿酸酶为植物尿酸酶。优选所述植物尿酸酶分离自大豆(*Glycine max*)根瘤或者为基本上具有所述尿酸酶序列的重组尿酸酶。

10 此优选实施方案的一个方面中, 上述尿酸酶与聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)在一定条件下缀合, 使得所述缀合物尿酸酶基本上不含大于八聚体的聚集体。优选所述尿酸酶通过氨基甲酸乙酯(氨基甲酸酯)键、仲胺键或酰胺键与聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)缀合。在此优选实施方案的一个方面, 所述聚(乙二醇)为单甲氧基聚(乙二醇)。在此优选
15 实施方案的另一方面, 所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)分子量为约 5 kDa-30 kDa。优选所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)分子量为约 10 kDa-20 kDa。所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)平均链数为每个尿酸酶亚单位约 2-12 条是有益的。更有益的是所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)平均链数为每个尿酸酶亚单位约 6-10 条链。最有益的是所述聚(乙
20 二醇)或聚(环氧乙烷)平均链数为每个尿酸酶亚单位约 7-9 条。优选所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)为线型。或者所述聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)为支链型。

25 本发明还提供降低体液或组织中尿酸水平的药用组合物, 它包括上述尿酸酶缀合物及药学上可接受的载体。优选通过冷冻干燥稳定所述组合物, 复制时溶解获得适于胃肠外给予的溶液。

本发明的另一个实施方案是用于纯化免疫原性降低的尿酸酶的方法, 它包括分离尿酸酶流分中大于八聚体的尿酸酶聚集体, 并从所纯化的尿酸酶中去除所述聚集体的步骤。优选所述分离步骤包括

检测至少一部分所述尿酸酶流分中大于八聚体的聚集体，并去除包含所述聚集体流分的步骤。所述检测步骤最好包括光散射检测步骤。

本发明还提供上述方法制备的分离尿酸酶。

5

附图简述

图 1 说明 Pharmacia Biotech Mono Q(1×10 cm)阴离子交换柱流分尿酸酶活性、总蛋白浓度以及盐浓度。通过在室温下监测 100 μM 尿酸的 200 mM 硼酸钠溶液 pH 9.2 的 292 nm 吸光度降低，从而测量尿酸酶活性。根据大小排阻性 HPLC 分析中尿酸酶吸收峰曲线下面积确定总蛋白量。

10

图 2 说明在 Pharmacia Superdex 200 柱(1×30 cm)上对包含突变 R291K 和 T301S (PKS 尿酸酶)的负荷样品(load)和选定流分进行的大小排阻性 HPLC 分析，所述流分得自对猪尿酸酶的制备型 Mono Q 色谱分析，图中所示数据为光散射检测器 90°入射光检测结果(上部曲线)及 276 nm 吸光度(下部曲线)检测获得的数据。未分级分离样品(负荷样品)和各种流分中四聚体、八聚体以及更高聚集形式尿酸酶的信号强度差异是显而易见的。所述负荷样品用 Mono Q 柱缓冲液稀释 5 倍，流分 5 稀释 3 倍，流分 6 稀释 9 倍。流分 5 和流分 6 混合形成“低盐合并物”。

15

图 3 说明对图 1 Mono Q 柱流分的大小排阻性分析，与图 2 相同，所示数据为光散射检测器检测 90°入射光及通过 276 nm 下的吸光度检测获得的数据。该图中所示流分用于形成“高盐合并物”，由所述高盐合并物制备 PEG 缀合物并注入 BALB/c 小鼠。所得的 BALB/c 小鼠血清活性及免疫反应见图 5 及图 6。

20

图 4 说明未分级分离 PKC 尿酸酶和 PKS 尿酸酶的制备型 MonoQ 柱色谱的选择流分(图 1)中的八聚体含量，八聚体含量通过 276 nm 吸光度及 90°光散射测定获得，根据图 2 及图 3 数据计算获得。

25

图 5 说明每次注射(每周一次，共 6 次)PKS 尿酸酶的 6 × 10-kDa

PEG 缀合物或 Mono Q 柱流分合并物后 24 小时取血清在 37℃ 下温育 4 小时后尿酸酶活性 UV 分析(同图 1)。

图 6 说明对 PKS 尿酸酶 PEG 缀合物的 IgG 抗体形成及对图 1 所示 Mono Q 柱流分合并物中的 PEG 缀合物的 IgG 抗体形成的 ELISA 分析, 其中对 BALB/c 雌性小鼠每次注射(每周一次, 共 6 次)0.2 mg 尿酸酶蛋白/20g 体重后 24 小时取血清进行所述分析。对于每只小鼠, 从第一次注射至第六次注射后 24 小时的取血分析获得的数据从左至右显示。检测条件描述于实施例 6。各组中 8 只小鼠的数据按免疫反应递增顺序从左至右排列。

10

优选实施方案详述

以前的研究表明, 与 PEG 缀合(PEG 化)达到尿酸酶免疫原性和/或抗原性显著降低的同时, 始终伴有尿酸分解活性大量丧失。本发明观察到, 微量大于八聚体的尿酸氧化酶聚集体直接与 PEG-尿酸酶缀合物免疫原性及诱导快速清除有关。这一发现最可能适用于尿酸酶以外的蛋白质, 包括干扰素及生长因子。

生物药物的安全性、方便性、成本效益都受药物效价降低从的不利影响, 结果是需要增加给药剂量。因此需要降低包括血液和尿液在内的体液中高尿酸水平的安全有效的替代方法。本发明提供生产用于合成 PEG-尿酸酶、去除了大于八聚体的尿酸酶聚集体的尿酸酶的方法。所述 PEG-尿酸酶保留了未修饰尿酸酶所有或几乎所有尿酸分解活性。本发明还提供基本上不含大于八聚体的聚集体的纯化尿酸酶。术语“基本上不含”是指包含不超过约 2%、优选不超过约 1% 的大于八聚体的聚集体的纯化尿酸酶。

本发明提供纯化尿酸酶的方法, 从而从纯化尿酸酶制剂中去除大于八聚体的尿酸酶。因为这些较大的聚集体具有高度免疫原性, 所以纯化尿酸酶制剂不能含有所述聚集体。所述方法涉及通过光散射而不是通过 280 nm 紫外吸光度或者通过光散射和 280 nm 紫外吸

25

光度监测色谱柱分离的流分，因为所述聚集体可能浓度太小而用紫外吸光度检测不到。然后将所述纯化尿酸酶与水溶性聚合物、优选聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)缀合，见共同未决的美国专利申请序号09/370,084介绍。

5 从主要由四聚体尿酸酶构成的制剂中去除聚集尿酸酶可通过本领域技术人员已知的任何方法实现，包括大小排阻性色谱法、离子交换色谱法、通过微孔膜超滤以及包括超速离心在内的离心。所述分离方法可包括各流分的分离和分析以及去除包含过量聚集体的流分。所得尿酸酶制剂比未分级分离尿酸酶更适于合成基本上没有免疫原性的尿酸酶缀合物。对于长期用药，蛋白质的 PEG 缀合物如
10 PEG-尿酸酶具有低免疫原性且重复给药后不引起药物从血液中进行性的更快速清除是重要的。

本发明还提供聚合物-尿酸酶缀合物的药用组合物。所述缀合物基本上无免疫原性，并保留未修饰尿酸酶的至少 75%、优选 85%、
15 更优选 95%或 95%以上的尿酸分解活性。适于与水溶性聚合物缀合的尿酸酶包括从细菌、真菌、植物组织以及动物组织(包括脊椎动物和无脊椎动物)中分离的天然尿酸氧化酶，以及包括重组形式的尿酸酶，包括变异尿酸酶、杂交尿酸酶和/或酶性截短的活性尿酸酶变异体。适用于本发明的水溶性聚合物包括线型和支链型聚(乙二醇)或聚
20 (环氧乙烷)，通常都称为 PEG。支链型 PEG 实例是美国专利 5,643,575 的主题。线型 PEG 的一个优选实例为单甲氧基 PEG，通式结构为 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ，其中 n 为约 100-2,300。

本发明的一个实施方案为保留非缀合尿酸酶的至少约 75%尿酸分解活性并且显著降低免疫原性的尿酸氧化酶(尿酸酶)缀合物。本发明此方面的尿酸酶可以是重组尿酸酶。不论是否重组尿酸酶还是非
25 重组尿酸酶，所述尿酸酶可以是哺乳动物来源。在此实施方案的一个方面，所述尿酸酶可以是猪、牛或羊的肝脏尿酸酶。在此实施方案的另一方面，所述尿酸酶可以是嵌合体。所述嵌合体尿酸酶可包

含猪肝脏和/或狒狒肝脏尿酸酶的组成部分。例如所述嵌合体尿酸酶可以是包含突变 R291K 和 T301S 的猪尿酸酶(PKS 尿酸酶)。另一方面,所述尿酸酶可以是狒狒肝脏尿酸酶,其中 97 位的酪氨酸由组氨酸替代,所以所述尿酸酶比活可增加至少约 60%。无论什么来源,5 本发明所述尿酸酶,也可以是截短形式,在氨基末端、或者在羧基末端、或者两个末端截断。同样所述尿酸酶可以是真菌尿酸酶或微生物尿酸酶。在本发明的一个实施方案中,所述真菌尿酸酶或微生物尿酸酶可以是源自黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)、芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)或产朊假丝酵母(*Candida utilis*)的天然或重组尿酸酶。或者,所述尿酸酶可以是无脊椎动物尿酸酶,例如源自果蝇(*Drosophila melanogaster*)或 *Drosophila pseudoobscura* 的天然或重组尿酸酶。本发明的尿酸酶也可以是植物尿酸酶,例如源自大豆 (*Glycine max*) 根瘤的天然或重组尿酸酶。所述 PEG 平均分子量可以是约 5 kDa-100 kDa; 优选所述 PEG 平均分子量约 8 kDa-60 kDa; 更优选所述 PEG 平均分子量约 10 kDa-40 kDa, 15 例如 10-20 kDa。共价连接的 PEG 链平均数可以是 2-12 条/尿酸酶亚单位; 优选共价连接链平均数可以是 6-10 条/亚单位; 更优选 PEG 链平均数可以是 7-9 条/亚单位。在本实施方案的一个方面,所述尿酸酶可以是四聚体。所述 PEG 链可以通过氨基甲酸乙酯(氨基甲酸酯)键、仲胺键和/或酰胺键与尿酸酶共价连接。当所述尿酸酶为重组形式的本文所述任何一种尿酸酶时,所述重组形式尿酸酶可以基本上具有天然形式尿酸酶序列。

一种优选哺乳动物尿酸酶为重组猪-狒狒嵌合体尿酸酶,由猪肝脏尿酸酶部分序列和狒狒肝脏尿酸酶部分序列组成,两部分均由 Wu 25 等(1989)首次测定。所述嵌合体尿酸酶的一个实例包含猪尿酸酶序列(SEQ ID NO:1)的前 288 个氨基酸及狒狒尿酸酶序列(SEQ ID NO:2)的最后 16 个氨基酸。Hershfield 等,国际公布 WO 00/08196,尿酸氧化酶,2000 年 2 月 17 日公布。因为后一序列只在两个位点上不同于猪

尿酸酶序列，赖氨酸(K)代替 291 位残基精氨酸，丝氨酸(S)代替 301 位残基苏氨酸，这种突变蛋白称为猪-K-S 尿酸酶或 PKS 尿酸酶(SEQ ID NO:3)。PKS 尿酸酶还具有一个赖氨酸残基，因此比猪或狒狒尿酸酶序列多一个潜在的 PEG 化位点。

5 亚克隆包括 PKS 尿酸酶在内的各种哺乳动物尿酸酶的 cDNA，并用标准方法确定在大肠杆菌中表达的最佳条件。参见 Erlich, HA, (Ed.) (1989) *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press; Sambrook 等(1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press。提取并纯化所述重组尿酸酶，使用改进的标准测定法测定其稳定性及活性。参见 Fridovich, I, (1965) *J Biol Chem* 240:2491-2494; Nishimura 等(1979)及实施例 1 和 5。

 在本发明的一个实施方案中，可通过生物学上稳定的无毒性共价键将尿酸酶与较少数目的 PEG 链缀合。所述共价键可包括氨基甲酸乙酯(氨基甲酸酯)键、仲胺键以及酰胺键。适于这类缀合的各种活化 PEG 可购自 Shearwater Polymers, Huntsville, AL.

 例如将尿酸酶在 PEG 的碳酸琥珀酰亚胺酯(SC)衍生物或碳酸对硝基苯酯(NPC)衍生物存在下温育可形成与尿酸酶连接的氨基甲酸乙酯键。SC-PEG 可用美国专利 5,612,460 介绍的方法合成。NPC-PEG 可按照 Veronese, FM 等(1985) *Appl Biochem Biotechnol* 11:141-152 及美国专利 5,286,637 中介绍的方法通过 PEG 与氯甲酸对硝基苯酯反应而合成。可通过调节反应物的浓度保持类似的化学计量，使美国专利 5,286,637 介绍的方法适合于高分子量 PEG。Büttner, W 等，东德专利说明书 DD 279 486 A1 介绍了合成 NPC-PEG 的替代方法。

25 使用 PEG 羧酸衍生物的 N-羟基琥珀酰亚胺酯(Shearwater Polymers)可获得与尿酸酶连接的酰胺键。可使用 2,2,2-三氟乙烷磺酰 PEG (tresyl PEG; Shearwater Polymer)或使用 PEG 醛(Shearwater Polymers)和氰基硼氢化钠通过还原性烷化形成仲胺键。

在含分子量为 10 kDa PEG 的缀合物中, 哺乳动物尿酸酶(如 PKC 尿酸酶, 一种猪尿酸酶的突变蛋白; 参见实施例 5 中的分析条件)每个亚单位连接 PEG 链的最大数目为约 12 条, 同时保留未修饰尿酸酶至少 75% 的尿酸分解活性。后者 PEG 化程度相当于总氨基的约 40%。

5 本发明的一个实施方案中, 每个尿酸酶亚单位连接的 PEG 平均链数为约 2-12 条。在一个优选实施方案中, 每个尿酸酶亚单位连接的 PEG 平均链数为约 6-10 条。在一个更优选的实施方案中, 每个尿酸酶亚单位共价连接的 PEG 平均链数为约 7-9 条。在另一个实施方案中, 用于连接反应的 PEG 分子量为约 5 kDa-30 kDa, 优选约 10 kDa-20

10 kDa。

若干因素可能影响用于与给定型尿酸酶连接的 PEG 最佳分子量和最佳链数选择。通常, 与较少数目的高分子量 PEG 链相比, 减少或消除免疫原性而不明显丧失尿酸分解活性可能需要尿酸酶与较多数目的低分子量 PEG 链连接。同样, 每种不同形式的尿酸酶在 PEG

15 链的大小和数目上可能具有不同的最佳选择。可使用本文所述方法容易地确定 PEG 链的最佳数目和最佳 PEG 分子量。

当用纯化的尿酸酶四聚体和八聚体(含四个或八个约 35 kDa 的亚单位)制备哺乳动物尿酸酶的 PEG 缀合物时, 其在小鼠中的免疫原性显著降低, 相反, 含大聚集体的尿酸酶制剂的 PEG 缀合物(参见图 6)

20 具有中等免疫原性而未修饰尿酸酶的免疫原性非常高。

天然和重组尿酸酶纯化制剂除含有四聚体(140-kDa)和八聚体(280 kDa)形式的尿酸酶外, 通常包含尿酸酶非常大的聚集体混合物。四聚体或八聚体形式尿酸酶制剂的百分率通常在约 20%-95% 范围内(参见图 2-4)。尽管有证据显示几种其它蛋白的未 PEG 化聚集体具有

25 高度免疫原性(参见例如 Moore, WV 等(1980) *J Clin Endocrinol Metab* 51:691-697), 但是以前的 PEG-尿酸酶研究没有介绍限制聚集体含量的任何尝试, 提示未考虑 PEG 修饰聚集体的潜在免疫原性。根据本发明的观测结果, 似乎可以看出所述聚集体存在于以前用于合成 PEG-

尿酸酶的酶制剂中。它们的存在可能会导致制备非免疫原性缀合物更困难。还可以看出以前所观察到的 PEG 化尿酸酶尿酸分解活性大量丧失与所连接的高数目低分子量 PEG 链有关。另一方面,至少对于某些尿酸酶,例如 PKS 尿酸酶(猪尿酸酶的突变蛋白)及源自嗜热芽孢杆菌的尿酸酶,本文所述尿酸酶纯化和 PEG 化方法容许每个尿酸酶亚单位与多达 12 条 PEG 链共价连接而保留 75%以上的尿酸分解活性。

在本发明的另一个优选实施方案中,在得到的基本上不含聚集体的尿酸酶制剂与 PEG 缀合之前,在 pH 为约 9-10.5、优选 10.2 的条件下,通过离子交换色谱法(图 1-3)或大小排阻性色谱法可去除所述尿酸酶的几乎所有大的聚集体。可通过任何大小相关性分析技术监测制备型柱各流分中尿酸酶分子量,所述分析技术包括例如 HPLC、常规大小-排阻性色谱法、离心、光散射、在非变性缓冲液中的毛细管电泳或凝胶电泳。对于使用大小-排阻性色谱法分离的没有聚集体的尿酸酶,可将只含 140-kD 和 280-kDa 形式尿酸酶的流分汇集在一起,用于与 PEG 聚合。对于使用离子交换色谱法分离的四聚体和八聚体尿酸酶,可对离子交换柱的各流分进行大小方面的分析,以确定含大量四聚体或八聚体形式而不含通过光散射检测到的大聚集体的流分。因此在所述纯化产物中,不需要的在聚集体可仅仅占总尿酸酶的约 1%或更少。

本文所述结果表明,即使充分 PEG 化,大于八聚体的 PKS 尿酸酶形式可刺激小鼠快速清除所述尿酸酶(图 5)及具有一定的免疫原性(图 6)。相比之下,由基本上不含大的聚集体(可通过光散射检测)的尿酸酶制备的缀合物可以在 1 周周期重复注射至少 6 次而清除速率较慢(图 5)且没有敏感型酶联免疫测定可检测到的抗体形成(图 6)。使用高度纯化的四聚体或八聚体尿酸酶进一步将本发明中改进的 PEG 缀合物与从前介绍的 PEG-尿酸酶制剂区别开来。相比之下,以前一些研究者使用的尿酸酶制剂中所含的大量大的聚集体可能使尿酸酶

与大量数目的 PEG 链连接，以抑制其免疫原性。因此所得缀合物的酶活性大大降低。

5 本发明 PEG-尿酸酶缀合物可用于降低哺乳动物、优选人的体液和组织中的尿酸水平，因此可用于治疗与包括痛风、痛风结节、肾功能不全、器官移植以及恶性肿瘤在内的病症伴有的尿酸水平升高。PEG-尿酸酶缀合物可通过无数给药途径中任何一种途径注射给予尿酸水平升高的哺乳动物，所述途径包括静脉内、皮下、真皮内、肌肉内以及腹膜内途径。另外也可雾化吸入 PEG-尿酸酶缀合物。参见 Patton, JS, (1996) *Adv Drug Delivery Rev* 19:3-36 及美国专利
10 5,458,135。本发明 PEG-尿酸酶的有效剂量取决于尿酸水平及患者个体的大小。本发明此方面的一个实施方案中，以约 10 μg -1g 剂量用药学上可接受的赋形剂或稀释剂给予 PEG-尿酸酶。在一个优选实施方案中，给药剂量为约 100 μg -500 mg。更优选所述缀合的尿酸酶给药剂量为约 1 mg-100mg，例如 5 mg、20 mg 或 50 mg。所述实施方案的给药剂量的质量是指所述缀合物中蛋白质质量。

包含 PEG-尿酸酶的药用制剂可通过常规技术制备，例如参见 Gennaro, AR (Ed.) (1990) *Remington's Pharmaceutical Science*, 18 版，Easton, PA: Mack Publishing Co.。用于制备注射溶液剂的合适赋形剂包括例如磷酸缓冲盐水、乳酸化 Ringer's 溶液、水、多元醇以及甘油。
20 胃肠外注射的药用组合物包括药学上可接受的无菌水溶液剂或非水溶液剂、分散剂、悬浮剂或乳化剂以及使用之前复制成注射无菌溶液或分散液的无菌粉末。所述制剂可包含附加组分如防腐剂、增溶剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、缓冲剂、抗氧化剂以及稀释剂。

PEG-尿酸酶还可以作为控释组合物用于植入患者体内以持续控制
25 体液尿酸水平升高。例如聚乳酸、聚乙醇酸、再生胶原蛋白、聚 L-赖氨酸、藻酸钠、凝胶化树脂、壳聚糖、琼脂糖、多层脂质体以及许多其它常规贮库型制剂包括可用生物活性组合物配制的可生物腐蚀或可生物降解物质。所述物质当植入或注射入体内时，渐渐分解，

将所述活性物质释放到周围组织。例如一种包囊化 PEG-尿酸酶的方法包括美国专利 5,653,974 中公开的方法。本发明特别考虑了可生物腐蚀、可生物降解以及其它贮库型制剂的应用。用于传递 PEG-尿酸酶的输注泵和基质包埋系统的应用也在本发明范围内。PEG-尿酸酶还可有利地包封在胶粒或脂质体中。脂质体包囊技术为本领域熟知的技术。参见例如 Lasic, D 等(Eds.)(1995) *Stealth Liposomes*. Boca Raton, FL; CRC Press。

本发明 PEG-尿酸酶药用组合物降低尿酸盐性肾衰高危患者对血液透析的需求, 所述肾衰患者为例如器官移植接受者(参见 Venkataseshan, VS 等(1990) *Nephron* 56:317-321 及具有某些恶性肿瘤患者。对于大量结晶尿酸盐累积(痛风石)的患者, 所述药用组合物比现有治疗方法更迅速地改善患者生活质量。

以下实施例说明以上公开内容的各个方面, 决不能解释为限制本发明。这些实施例说明通过活化 PEG(如碳酸对硝基苯酯衍生物)与猪尿酸酶突变蛋白连接制备的 PEG-尿酸酶。下述实施例指导本领域技术人员生产至少保留未修饰尿酸酶约 75%尿酸分解活性且非常适于长期用药、基本上无免疫原性的尿酸酶缀合物。

实施例 1

尿酸酶的制备型离子交换色谱

在快速蛋白质液相色谱(FPLC)仪(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)上进行制备型离子交换色谱。除所述样品以较低流速装载以外, 用 pH 10.3 的 50 mM 碳酸钠、0.1M 氯化钠(缓冲 A)至 pH 10.3 的 50 mM 碳酸钠、0.6 M 氯化钠(缓冲液 B)的梯度以 0.5 ml/分钟的流速洗脱 Mono Q 柱(1×10 cm, Amersham Pharmacia)。该技术用来分级分离 25 mL PKS 尿酸酶溶液(pH 10.3)。PKS 尿酸酶由 Bio-Technology General Limited (Rehovot, Israel)获得。后者为重组猪尿酸酶, 其中一个赖氨酸残基(K)和一个丝氨酸(S)残基分别代替了原猪尿酸酶序列中

一个精氨酸残基和一个苏氨酸残基(Lee 等(1988) *Science* 239:1288-1291; Wu 等(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*86:9412-9416)。加样后, 用 100 mL 缓冲液 A 洗涤该柱。在 31 mL 0-26%的线性梯度缓冲液 B 结束时开始洗脱出尿酸酶峰。大多数尿酸酶通过 7 mL 含 26%缓冲剂 B 的缓冲液等度洗脱。用 89 mL 26%-100%线性梯度缓冲液 B 洗脱回收尿酸酶的其余部分。收集 4 ml 或 6 ml 流分。检测 # 4-11 等分流分的尿酸酶及总蛋白(图 1), 并通过实施例 2 所述大小排阻性高效液相色谱(HPLC)进行分析(图 2 及图 3)。# 5-10 流分的其余部分如实施例 3 所述与 PEG 连接。基于实施例 2 的分析结果, 如图 1 所示, # 5-6 流分的 PEG 缀合物合并为“低盐合并物”, # 7-10 流分的 PEG 缀合物合并为“高盐合并物”。

实施例 2

通过光散射和紫外吸光度监测尿酸酶大小排阻性色谱

在室温下用 Superdex 200 柱(1× 30 cm, Amersham Pharmacia Biotech)对未分级分离 PKS 尿酸酶及得自实施例 1 PKS 尿酸酶的制备型 Mono Q 色谱分析的选定流分进行大小排阻性 HPLC。使用 Wyatt Technologies (Santa Barbara, CA)的 MiniDawn 检测器通过在 90 度对入射光的散射分析得自 Thermo Separations HPLC (Sunnyvale, CA)的吸收监测器(UV 2000)的洗脱液。

图 2-4 所示结果表明尿酸酶亚单位的四聚体、八聚体以及更大聚集体的解析, 以及在不同样品中检测到所述形式尿酸酶的不同信号比例。不同于与浓度成正比的吸收信号, 光散射信号与浓度和光散射单位大小的乘积成正比。光散射检测器对非常少量的高度聚集尿酸酶的结果敏感度表明存在最大的聚集体, 该聚集体在空隙容积或接近空隙容积(约 7 ml)时被洗脱出。

实施例 3

PEG 尿酸酶缀合物的合成

使用得自 Shearwater Polymer (Huntsville, AL)的 PEG 的碳酸对硝基苯酯衍生物(NPC-PEG)使未分级分离的 PKC 尿酸酶(Bio-Technology General Limited)及实施例 1 Mono Q 柱流分尿酸酶与 10-kDa PEG 连接。若干报告(例如 Veronese, FM 等, (1985) *Appl Biochem Biotechnol* 11:141-152; Kito, M 等(1996) *J Clin Biochem Nutr* 21:101-111)中已介绍了使用氯甲酸苯酯由 PEG 制备 NPC-PEG, 包括本发明者在内的以前研究者已将 NPC-PEG 用于合成 PEG-蛋白缀合物(例如 Veronese 等, 见上文; Sherman, MR 等, 载于 JM Harris 等(Eds.) *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Application(聚乙二醇化学及生物应用)*, ACS Symposium Series 680 (第 155-176 页) Washington, DC: American Chemical Society)。根据 Kunitani, M 等(1991) *J Chromatogr* 588:125-137)介绍的方法, 确定与每个尿酸酶亚单位连接的 10-kDa PEG 链数为 6 条。

实施例 4

尿酸酶和 PEG-尿酸酶的体内血清持续时间及免疫原性

在 pH 7.4 磷酸缓冲盐水(PBS)中, 将按照实施例 3 方法制备的重组哺乳动物尿酸酶 PEG 缀合物调节为 1 mg 蛋白/mL 用于注射。冷冻样品并贮存以备分析或注射。样品温热至 37°C 持续达 1 小时, 然后注射给予 BALB/c 雌性小鼠(8 只/组)。各组小鼠在研究开始时平均体重为 18-22 g。

监测所有小鼠的体重并记录对实验注射产生的副反应或其它非健康表现。每次注射(每周注射一次, 注射 6 次)后 24 小时, 用氯胺酮麻醉小鼠, 眶后取血 100-200 μ L, 当收集大量血液时放血处死小鼠。从于 2-8°C 凝固 4-32 小时的血液中制备血清。将血清贮存于 -20°C。如实施例 5 所述分析血清测得尿酸分解活性, 以及如实施例 6

所述分析血清中的抗尿酸酶抗体。

实施例 5

注射 PEG-尿酸酶的小鼠血清中 PEG-尿酸酶的尿酸分解活性分析

5 在 I. Fridovich 方法(*J Biol Chem.* (1965) 240:2491-2494)中使用微量板, 用溶于 pH 9.2 的 200 mM 硼酸钠的 100 μ M 尿酸作为底物进行基于紫外光吸收度(UV 分析)的活性分析, 使用 Molecular Devices (Sunnyvale, CA)的 SpectraMAX 250 微量板读取器于室温下对 UV-透明底的 96 孔板(Costar, Corning, NY)监测 292 nm 吸光度的下降, 监测时间为 15 分钟。通过观察在 10%-40%的底物被氧化期间所测吸光度的最大吸收坡度(每分钟毫吸光度单位)分析所述数据。此分析法获得的结果见图 1 和 5。

10 根据注射后 24 和 72 小时获得血清的数据, 第一次注射连接 6 条 10-kDa PEG/亚单位(6×10 kDa PEG PKS)的 PKS 尿酸酶的小鼠血清尿酸酶平均半衰期为 29 ± 4 小时。

20 独立实验发现, 在 -20°C 贮存期间注射 PEG-尿酸酶小鼠血清中的可检测尿酸分解活性下降, 在分析之前将血清于 37°C 温育 4 小时获得尿酸酶活性最大程度回收。图 5 表明, 按照实施例 3 方法进行 PEG 化之前, 如实施例通过 Mono Q 柱色谱法纯化 PEG PKS 尿酸酶时, 每周重复性注射 6×10 -kDa PEG PKS 尿酸酶后尿酸分解活性回收最多。注射由实施例 1 高盐脱出液合并物制备的缀合物后尿酸分解活性回收程度最高(见图 1), 所述脱出液合并物含有最少量的非常大的聚集体(见图 3 中 7-10 流分的光散射曲线)。用实施例 1 Mono Q 柱的低盐脱出液合并物制备的缀合物获得中度回收, 用未分级分离 PKS 尿酸酶制备的缀合物获得尿酸酶活性回收最差, 所述未分级分离 PKS 尿酸酶含有最大量的非常大的聚集体(见图 2)。在重复注射后, 不论使用上述 UV 分析法或 P. Fossati 等(*J. Clin Chem* (1980) 26:227-231)的改良比色法, 以及不论是否在分析血清之前将其在 37°C 下温育,

都观察到同样的血清相对活性回收顺序(高盐合并物>低盐合并物>未分级分离尿酸酶)。

实施例 6

5 注射 PEG-尿酸酶小鼠血清的酶联免疫吸附分析(ELISA)

用结合于 96 孔 Immulon 2 板(Dynex Technologies, VWR Scientific, San Francisco, CA)的猪尿酸酶进行非竞争性 ELISA 分析。第一抗血清得自注射尿酸酶或注射按照实施例 3 方法制备的 6×10 -kDa PEG 缀合物的小鼠。如 B. Porstmann 等所述(*J Clin. Chem. Clin. Biochem.*(1981) 19:435-440), 第二抗体为偶联辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠 IgG (Calbiochem-Novabiochem #401 253, La Jolla, CA), 底物为邻苯二胺二盐酸盐(Sigma P-9187, St. Louis, MO)。

图 6 说明非竞争性 ELISA 分析的结果。该结果证明用实施例 1 Mono Q 柱的高盐洗出液按照实施例 3 方法合成的 6×10 -kDa PEG PKS 尿酸酶(见图 1)在连续 6 周每周接受注射的 8 只小鼠中没有任何一只产生可检测的免疫反应。有几只注射按照实施例 3 方法由未分级分离 PKS 尿酸酶制备的缀合物的小鼠表现低度但可检测的免疫反应。免疫反应发生率最高为注射按照实施例 3 方法从实施例 1 Mono Q 柱的低盐脱出液合并物制备的缀合物的小鼠。

20 没有如实施例 2 所述的用于大小排阻性 HPLC 分析的光散射检测器的优势, 最大聚集体形式而不是八聚体形式尿酸酶的存在与重复注射后 BALB/c 小鼠 PEG-尿酸酶缀合物回收进行性下降有关(见实施例 5 观察结果(图 5)), 而免疫原性提高(见实施例 6 观察结果(图 6)), 这样的结果不明显。所述结果对于用作生产临床应用的 PEG-尿酸酶 25 的原料的尿酸酶规格具有重要意义。

虽然为了清楚理解本发明, 借助于阐述和实施例在一定详细程度上介绍了上述发明, 但是根据本发明指导本领域普通技术人员显而易见的是: 在不背离本文介绍和要求保护的主体及范围内对本发明进行的某些改变和改进。

30

图 1

UV 测定 PKS 尿酸酶 Mono Q 色谱流分的尿酸分解活性
(根据大小排阻性 HPLC 检测蛋白质)

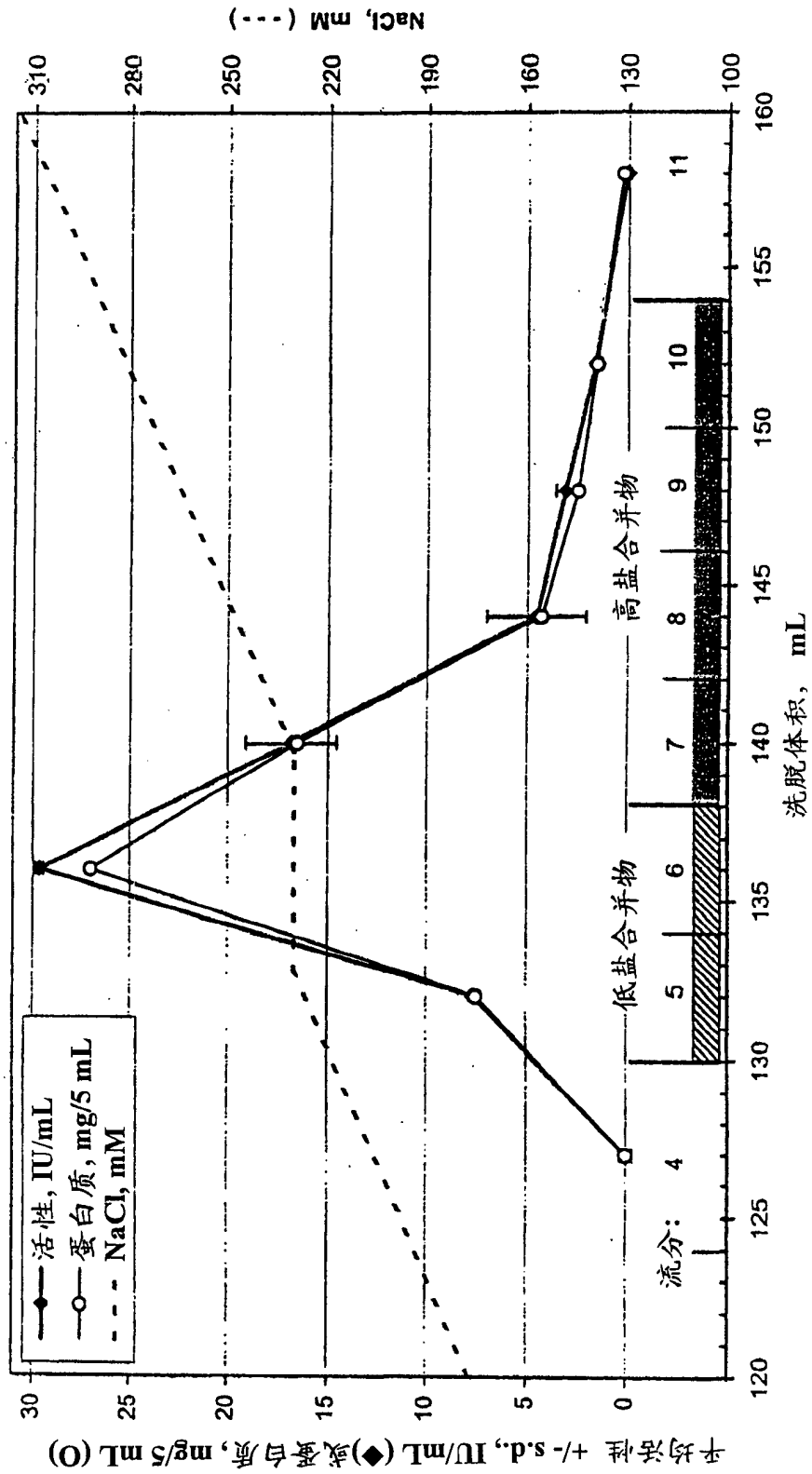


图 2

在 Superdex 200 上对未分级分离的 PKS 尿酸酶(负荷样品)和低盐合并物的 Mono Q 柱流分进行的大小排阻性 HPLC

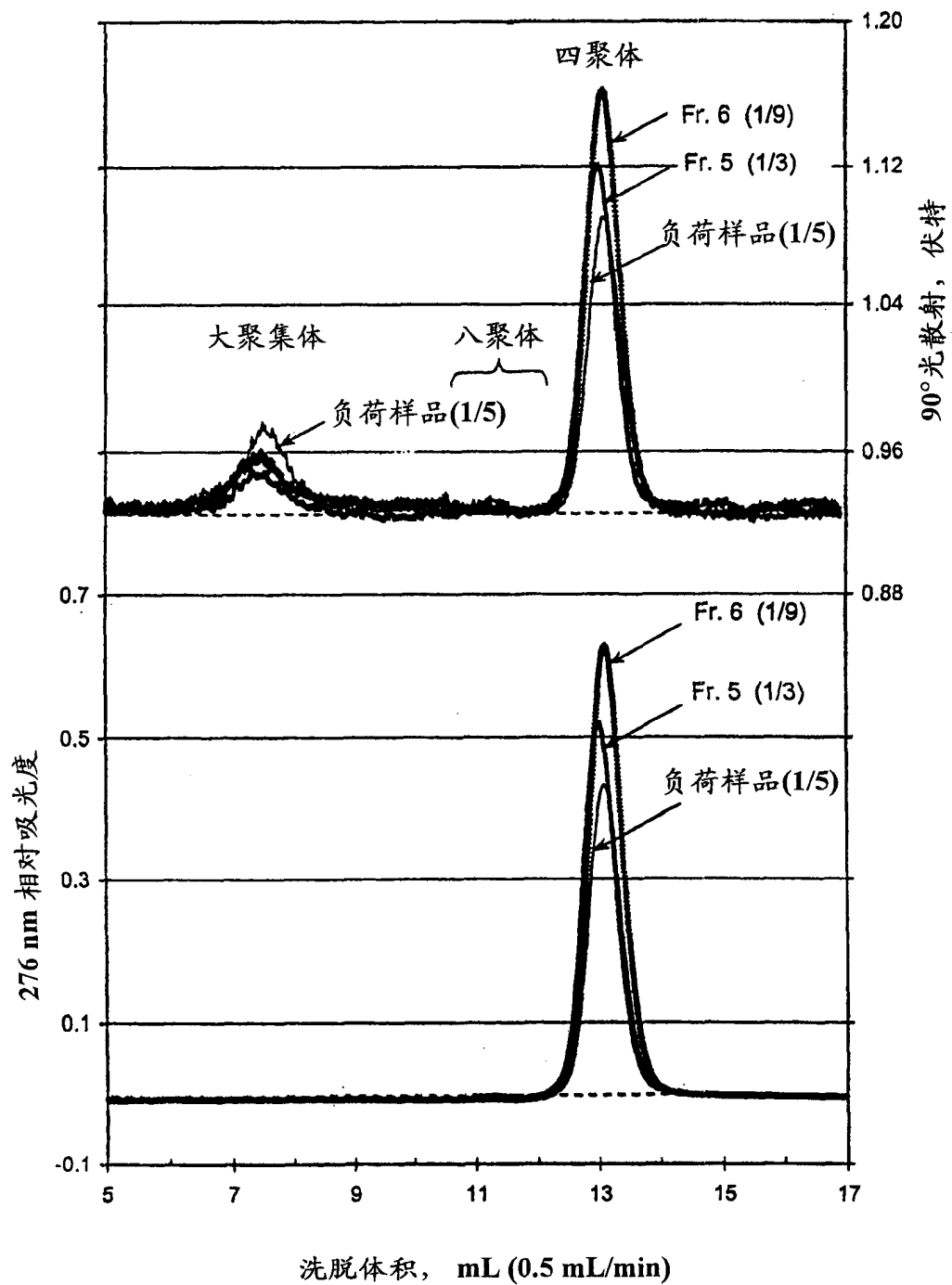


图 3

在 Superdex 200 上对高盐合并物 PKS 尿酸酶的 Mono Q 柱流分进行的大小排阻性 HPLC

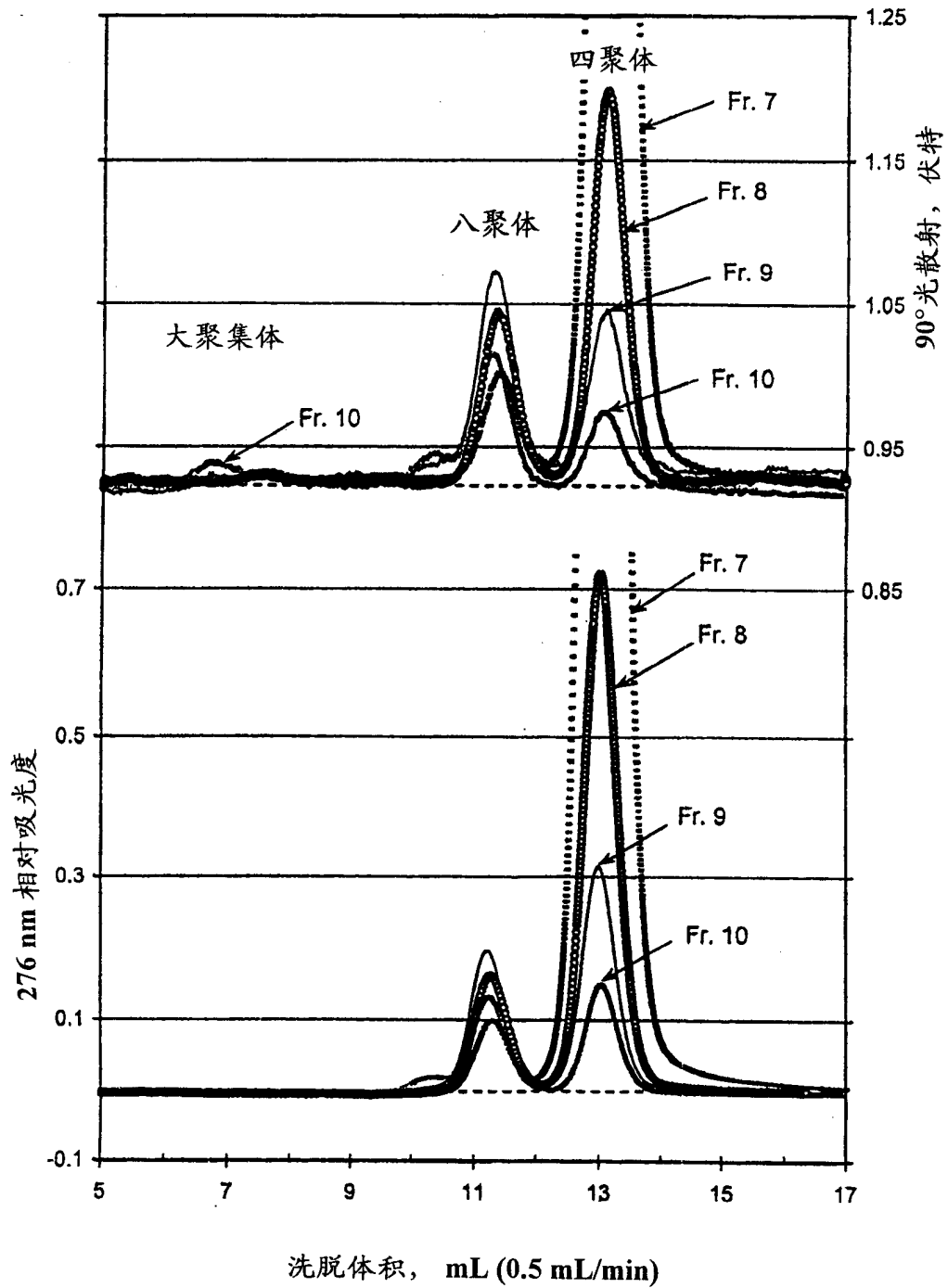


图 4
PKS 尿酸酶 Mono Q 柱流分的八聚体含量

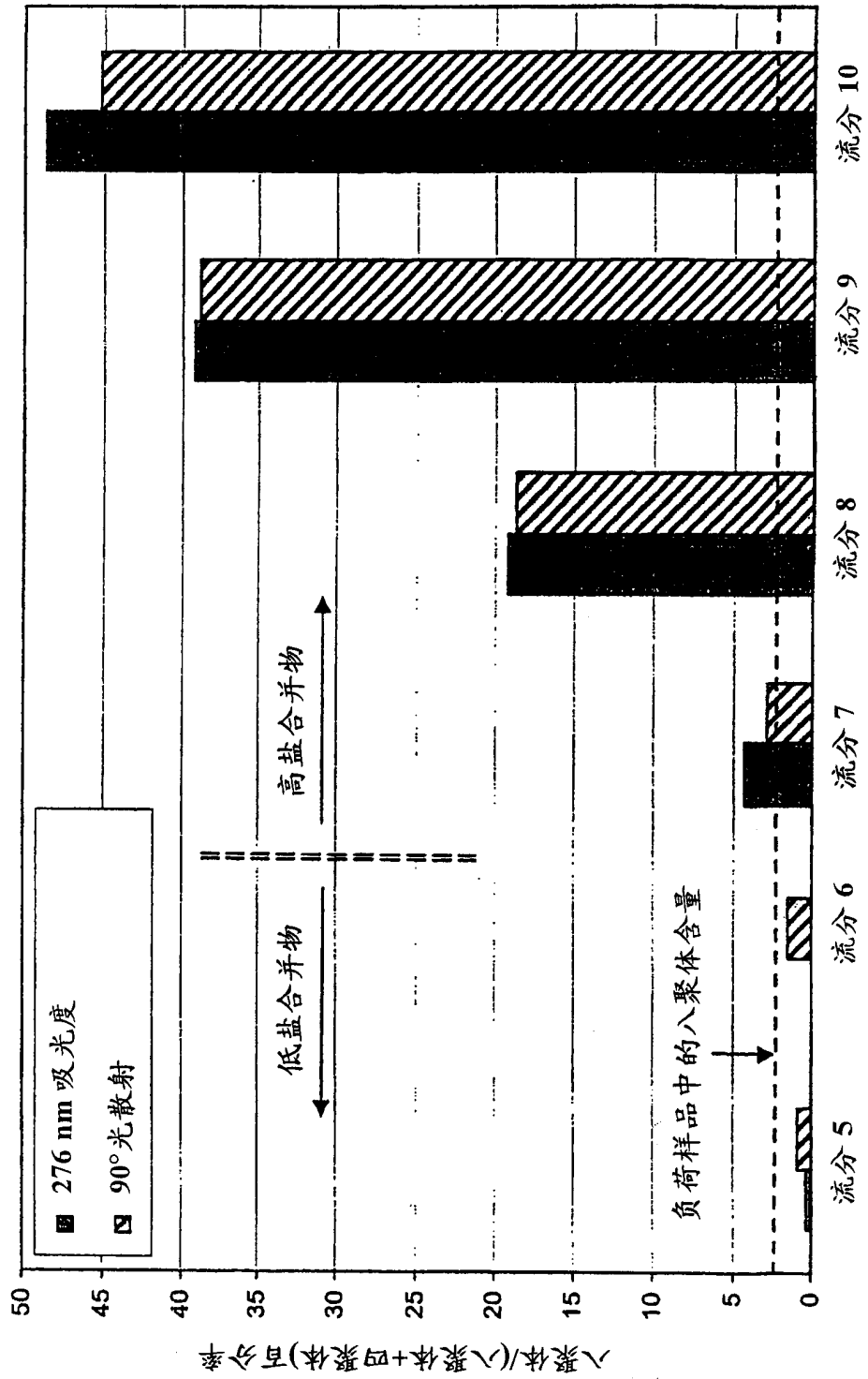
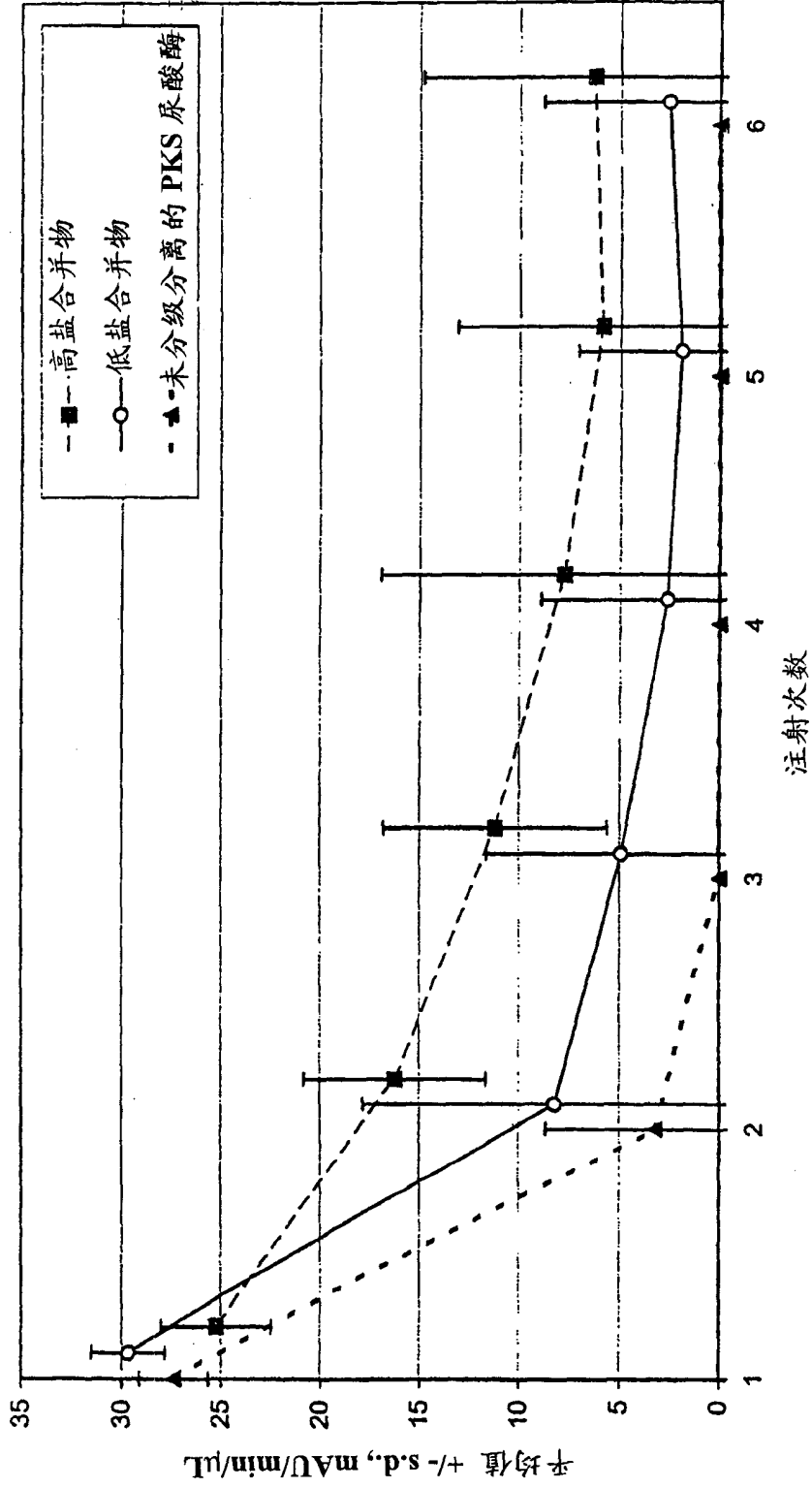


图 5
注射 PKS 尿酸酶或 Mono Q 柱流分合并物的 6×10 -kDa PEG 缓合物的小鼠血清 UV 尿酸酶分析
每次注射(每周一次)后 24 小时从小鼠取血



低盐和高盐合并物数据在 x-轴上分别位移 0.1 和 0.2 单位。

图 6
 对板中的猪尿酸酶和注射未分级分离的PKS尿酸酶或低盐合并物或高盐合并物的 6 × 10- kDa PEG 缓合物的小鼠血清(1: 30)进行ELISA 分析

