

發明專利分割說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97145974

C12N 9/06 (2006.01)

※申請日期：90年02月06日

A61K 47/48 (2006.01)

原申請案號：90102540

※IPC分類：

A61K 38/44 (2006.01)

專利證書號碼：

一、發明名稱：

(中) 用以製備非致免疫性聚合物共軛體的不含凝聚物之尿酸氧化酶

(英) Aggregate-free urate oxidase for preparation of non-immunogenic polymer conjugates

二、申請人：(共 2 人)

1. 姓 名：(中) 山景製藥股份有限公司

(英) MOUNTAIN VIEW PHARMACEUTICALS, INC.

代表人：(中) 1. 梅瑞 歇爾曼

(英) 1. SHERMAN, MERRY R.

地 址：(中) 美國加州曼洛公園艾迪生路三四七五號

(英) 3475 Edison Way, Suite S, Menlo Park, CA 94025, U. S. A.

國籍：(中英) 美國 U.S.A.

2. 姓 名：(中) 杜克大學

(英) DUKE UNIVERSITY

代表人：(中) 1. 羅伯特 塔伯

(英) 1. TABER, ROBERT L.

地 址：(中) 美國北卡羅來納州德罕郵政信箱九〇〇八三號

(英) P.O. Box 90083, Durham, NC 27705, U.S.A.

國籍：(中英) 美國 U.S.A.

三、發明人：(共 5 人)

1. 姓 名：(中) 梅瑞 歇爾曼

(英) SHERMAN, MERRY R.

國 籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

2. 姓 名：(中) 馬克 塞佛

(英) SAIFER, MARK G.P.

國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

3. 姓 名：(中) 艾爾 威廉斯
(英) WILLIAMS, L. DAVID

國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

4. 姓 名：(中) 麥克 賀許菲爾德
(英) HERSHFELD, MICHAEL S.

國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

5. 姓 名：(中) 蘇珊 凱利
(英) KELLY, SUSAN J.

國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2000/02/10 ; 09/501,730 ☒ 有主張優先權

國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

3. 姓 名：(中) 艾爾 威廉斯
(英) WILLIAMS, L. DAVID

國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

4. 姓 名：(中) 麥克 賀許菲爾德
(英) HERSHFELD, MICHAEL S.

國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

5. 姓 名：(中) 蘇珊 凱利
(英) KELLY, SUSAN J.

國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2000/02/10 ; 09/501,730 ☒ 有主張優先權

九、發明說明

本發明之政府權利聲明

本申請中所述的研究有一部分得到美－以兩國工業研究及發展基金（U.S.-Israel Binational Industrial Research and Development Foundation）的支援。因此，美國政府擁有本發明之某些權利。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於蛋白質的純化及化學改質，以延長其循環壽命，降低其致免疫性。更特定言之，本發明係關於在聚乙二醇或聚（環氧乙烷）共軛作用前去除尿酸氧化酶（尿酸酶）中大於八聚體的凝聚物。這將實質地消除尿酸酶的致免疫性，而不損及其尿酸分解活性。

【先前技術】

相關技藝說明

本背景部分所含之聲明並不構成對習知技藝的確認，而是反映發明者對本發明進行時最先進技術的主觀評價和解釋。這些解釋包括了至今為止未公開的發明者個人認知，該認知自身並不屬於習知技藝。

尿酸氧化酶（尿酸酶；E.C.1.7.3.3）是一種酵素，其催化尿酸的氧化成為更可溶性產物，尿囊素，一種更易於排泄的嘌呤代謝物。人類並不產生具酶活性的尿酸酶，這是人類在更高級靈長類動物進化過程中，尿酸酶基因多次

變異的結果。Wu, X, et al., (1992) *J Mol Evol* 34:78-84。結果，在易患病個體中，血液中過高濃度的尿酸（高尿酸血）及尿液中過高濃度的尿酸（高尿酸尿）可導致疼痛的關節炎（痛風），損形的尿酸鹽沉積（痛風石）及腎衰。在某些受影響的個體中，現有的藥物如別嘌呤醇（一種尿酸合成抑制劑）會產生限制治療的反作用或不能準確地舒解這些症狀。Hande, KR, et al., (1984) *Am J Med* 76:47-56; Fam, AG, (1990) *Baillière's Clin Rheumatol* 4:177-192。注射尿酸酶可降低高尿酸血及高尿酸尿，至少是暫時的。但既然尿酸酶在人體內為異體蛋白，即使是首次注射來自黃麴黴素（*Aspergillus flavus*）的未改質蛋白，也會在許多受治療的病人引發過敏反應（Pui, C-H, et al., (1997) *Leukemia* 11:1813-1816），且免疫反應限制了其在長期或間歇治療中的使用。Donadio, D, et al., (1981) *Nouv Presse Méd* 10:711-712; Leaustic, M, et al., (1983) *Rev Rhum Mal Osteoartic* 50:553-554。

美國專利申請序號 09/370,084 及公開的國際申請 PCT/US99/17514，其所有內容均併入本文作為參考，揭示出聚乙二醇－尿酸氧化酶（PEG-尿酸酶），其保留未共軛尿酸酶至少約 75% 的尿酸分解活性，且實質降低了致免疫性。在一此種純化過的尿酸酯中，每個次單位係共價連接於平均 2 至 10 股的聚乙二醇，其中每一聚乙二醇分子的分子量係介於 5kDa 至 100kDa 之間。

蛋白質凝聚物係已知可增強其免疫性。此理解以助成

故意凝聚蛋白質方法的發展，其中係經由如在使用以製備疫苗或用於動物免疫化以產生抗血清之前熱變性並曝露於戊二醛中交聯等處理。

蛋白質的無意凝聚也經確認有助於在治療性蛋白質的臨床使用中的免疫化或致敏作用，如人類 γ 球蛋白（Henney et al. (1968) N. Engl. J. Med. 278:2244-2246）及人類生長激素（Moore et al. (1980) J. Clin. Endocrinol. Metab. 51:691-697）。凝聚物對人類干擾素 α 的免疫性的助成作用已表現於 BALB/c 小鼠中（Braun et al. (1997) Pharm. Res. 14:1472-1478）且已開發出用於其測量的酶相關免疫吸收檢定（ELISA）（Braun et al. (1997) Pharm. Res. 14:1394-1400）。

與已知的凝聚對蛋白質免疫性影響相反者，沒有出現過反映凝聚對共軛到聚烷醇如 PEG 上的蛋白質所具免疫性影響的報告。因此需要有聚烷醇尿酸酶共軛物，其可大幅消除尿酸酶的免疫性，而不會降低其尿酸分解活性。本發明提供了這種組合物。

【發明內容】

發明概述

蛋白質與聚烷醇特別是聚乙二醇共軛產生的共軛物在血液中具有降低的免疫性和提高的持久性。為了產生基本上不具免疫性且實質地保持住未經改質尿酸酶製備物所具尿酸分解活性的尿酸酶共軛物，經發現重複注射由含大尿

尿酸酶凝聚物的尿酸酶製備的聚乙二醇共軛物後，起始物中微量的大尿酸酶凝聚物對引發抗體形成和加速其被循環系統廓清上有驚人的效果，這兩種反應均為有害的。令人驚奇的是，本案發明者發現提高的免疫性和加速的廓清並非因為大於天然四聚體物，如含八個次單位的凝聚物（八聚體），的明確，中等大小尿酸酶次單位凝聚物的存在所致。尿酸酶的八聚體形式在大多數尿酸酶的製備中，其存在的濃度足夠高，可由其對紫外線如 214nm 或 276nm 的吸收，或可經由其對折射指數的貢獻或其他蛋白質濃度的測量方法，來偵檢到。然而，八聚體自身經發現對聚乙二醇尿酸酶共軛物的免疫性及加速的廓清作用最小，這與遠較為少量的遠較為大之凝聚物相反，其在受測條件下無法經由紫外線吸收來偵檢，但可經由靜態的（Raleigh）或動態的光散射方法而輕易地偵檢。因此，發現在與 PEG 共軛前去除此類殘餘的非常大凝聚物可降低所得 PEG-尿酸酶共軛物的免疫性，並減緩其增加的廓清至一驚人的程度。

本發明一具體實例為純化尿酸氧化酶（尿酸酶），其實質地不含大於八聚體的凝聚物。較佳者，該尿酸酶為哺乳動物尿酸酶。更佳者，該尿酸酶為豬肝、牛肝或綿羊肝的尿酸酶。該較佳具體實例的一方面中，尿酸酶為重組體。在該較佳具體實例的另一方面中，尿酸酶實質地具有豬、牛、綿羊或狒狒的肝尿酸酶所具序列。有利者，該尿酸酶為嵌合體。較佳者，該尿酸酶為 PKS 尿酸酶。該較佳

具體實例的另一方面中，該尿酸酶基本上具狒狒肝尿酸酶的序列，其中酪胺酸 97 已為組胺酸所取代。較佳者，該尿酸酶包含一個胺基端和一個羧基端，其中該尿酸酶在一端或兩端經截短。有利者，該尿酸酶為真菌或微生物尿酸酶。較佳者，真菌或微生物尿酸酶是由黃麴黴（*Aspergillus flavus*）、球形節桿菌（*Arthrobacter globiformis*）、桿菌屬（*Bacillus* sp.），產胞甲絲酵母（*Candida utilis*）分離得來，或為基本上具上述尿酸酶之一序列的重組體酶。作為替代方法，該尿酸酶可為無脊椎動物尿酸酶。較佳者，該無脊椎動物尿酸酶是由黃猩猩果蠅（*Drosophila melanogaster*）或假醬油果蠅（*Drosophila pseudoobscura*）中分離得來，或為基本上具上述尿酸酶之一序列的重組體酶。在該較佳具體實例的另一方面，該尿酸酶為植物尿酸酶。較佳者，該植物尿酸酶是由大豆（*Glycine max*）根節分離得來或為基本上具上述尿酸酶之一序列的重組體酶。

在該較佳具體實例的一方面中，上述尿酸酶係與聚乙二醇或聚氧化乙烯共軛，共軛條件為使得共軛物中的尿酸酶實質地不含大於八聚體的凝聚物。較佳者，該尿酸酶經由胺基甲酸酯、第二胺或醯胺鍵與聚乙二醇或聚氧化乙烯共軛。在該較佳具體實例的一方面中，聚乙二醇為單甲氧基聚乙二醇。在該較佳具體實例的另一方面中，聚乙二醇或聚氧化乙烯的分子量介於 5kDa 及 30kDa 之間。較佳者，該聚乙二醇或聚氧化乙烯的分子量介於 10kDa 及 20kDa

之間。有利者，該聚乙二醇或聚氧化乙烯的平均單鏈數介於每個尿酸酶次單位具 2 至 12 股間。更有利者，該聚乙二醇或聚氧化乙烯的平均單鏈數介於每個尿酸酶次單位具 6 至 10 股間。最有利者，該聚乙二醇或聚氧化乙烯的平均單鏈數介於每個尿酸酶次單位具 7 至 9 股間。較佳者，聚乙二醇或聚氧化乙烯為直鏈。代之者，該聚乙二醇或聚氧化乙烯可具支鏈。

本發明還提出一種在體液或組織內降低尿酸含量的組合物，其包括上述尿酸酶共軛物和藥學上可接受的載劑。較佳者，該組合物係經由冷凍乾燥穩定後，並於重調時溶解以提供適於非經腸給藥用的溶液。

本發明的另一個具體實例為純化具降低免疫性尿酸酶的方法，其包括下列諸步驟：自尿酸酶部份分離出大於八聚體的尿酸酶凝聚物，及自純化的尿酸酶中排除此類凝聚物。較佳者，該分離步驟包括的步驟為自至少一部分的尿酸酶部份中偵檢出大於八聚體的凝聚物，並排除包含該凝聚物的部份。有利者，該偵檢步驟包含光散射測量。

本發明還提出經由上述方法製備的分離尿酸酶。

【實施方式】

較佳具體實例的詳細說明

先前的研究顯示當尿酸酶的免疫性及／或抗原性顯著下降是經由與 PEG（聚乙二醇化）共軛來達到時，其不可避免地會與尿酸分解活性的實質喪失相聯繫。本發明包括

下述觀察，微量大於八聚體的尿酸氧化酶凝聚物會助成 PEG-尿酸酶共軛物的免疫性及加速廓清的誘發。該發現最可能應用於尿酸酶以外的蛋白質，包括干擾素及生長因子。

生物製藥的安全、方便及成本效益性均因其效力的下降而受到不良影響，使得必須提高給用劑量。因此，有需要一安全有效的替代手段來降低體液內（包括血液及尿液）升高的尿酸水平。本發明提供了一種產生尿酸酶的方法，該尿酸酶排除了大於八聚體的尿酸酶凝聚物而用於 PEG-尿酸酶的合成。該 PEG-尿酸酶保留了未改質酶的所有或幾乎所有的尿酸分解活性。本發明還提供了實質地不含有大於八聚體凝聚物的純化尿酸酶。術語“實質地不含有”表示純化的尿酸酶包含不超過 2%，較佳者不超過 1% 的大於八聚體的凝聚物。

本發明提出一種純化尿酸酶的方法，使得大於八聚體的凝聚物自純化製備中排除。因為這些大凝聚物免疫性強，它們存在於純化的尿酸酶製備中是不宜的。該方法包括經由光散射監測管柱液份，而非或額外進行 280nm 吸光度，係因為該凝聚物可能太過稀而無法經由紫外線吸收來偵檢之故。然後可使純化的尿酸酶與水溶性聚合物共軛，較佳者聚乙二醇或聚氧化乙烯，如申請中的美國申請序號 09/370,084 所述，其全部內容併入本文作為參考。

自主要由四聚體尿酸酶構成的製備物中去除凝聚尿酸酶可經由熟悉本技藝人士所知的任一方法來完成，包括粒

徑排斥層析術，離子交換層析術，經由微孔膜及離心作用的超濾作用，包括超離心作用。分離方法包括對液份的分離和分析及對含過量大凝聚物液份的排斥或排除。所得之尿酸酶製備物較未分液份尿酸酶更適於合成實質地不具免疫性的尿酸酶共軛物。供長期服用時，重要的是蛋白質的 PEG 共軛物，如 PEG-尿酸酶，具有低免疫性，且不會逐漸地引發在重複劑量後更快的自血流之廓清。

本發明還提出聚合物－尿酸酶共軛物的藥學組合物。這些共軛物基本上不具免疫性，保留了未改質酶尿酸分解活性的至少 75%，較佳者 85%，且更佳者 95%或以上。適合與水溶性聚合物共軛的尿酸酶包括自然界存在的由細菌、真菌及植物和動物（無脊椎或脊椎動物）組織中分離出的尿酸氧化酶，以及重組體形式的尿酸酶，包括尿酸酶的突變、雜交及／或經截短的酶活性變種。適用於本發明的水溶性聚合物包括直鏈及具支鏈的聚乙二醇或聚氧化乙烯，全都為一般稱為 PEGs 者。帶支鏈 PEG 的例子為美國專利 5,643,575 的主體。直鏈型 PEG 的一個較佳例子為單甲氧基 PEG，具一般結構 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ，其中 n 在 100 至約 2,300 之間變化。

本發明一具體實例為尿酸氧化酶（尿酸酶）的共軛物，該物質保留了未共軛尿酸酶至少 75% 的尿酸分解活性，大幅降低了免疫性。本發明此方面的尿酸酶可為重組體。無論其是否為重組體，該尿酸酶可具哺乳動物的起源。本具體實例的一方面中，尿酸酶可為豬、牛或綿羊肝尿酸酶

。本具體實例的另一方面中，該尿酸酶為嵌合體。嵌合尿酸酶可包含部分的豬肝及／或狒狒肝尿酸酶。例如，嵌合尿酸酶可為包含突變 R291K 及 T301（PKS 尿酸酶）的豬尿酸酶。作為替換，尿酸酶可為狒狒肝尿酸酶，其中酪氨酸 97 被組胺酸所取代，因此尿酸酶的特定活性可提高至少 60%。本發明的尿酸酶，無論其來源，也可為截短形式，截短位於胺基端或羧基端，或兩端。相似的，尿酸酶可為真菌或微生物尿酸酶。本具體實例的一方面，真菌或微生物尿酸酶可為自然存在的或由黃麴黴（*Aspergillus flavus*）、球形節桿菌（*Arthrobacter globiformis*）、桿菌屬（*Bacillus* sp.），產胞甲絲酵母（*Candida utilis*）所得之尿酸酶的重組體形式。作為替代方法，該尿酸酶可為無脊椎動物尿酸酶。如黃猩猩果蠅（*Drosophila melanogaster*）或假醬油果蠅（*Drosophila pseudoobscura*）所得之尿酸酶的自然存在或重組體形式。本發明之尿酸酶也可為植物尿酸酶，如大豆根節（*Glycine max*）所得之尿酸酶的自然存在或重組體形式。PEG 所具平均分子量介於 5kDa 及 100Kda 之間；較佳者 PEG 所具平均分子量介於 8kDa 及 60kDa 之間；更佳者 PEG 所具平均分子量介於 10kDa 及 40kDa 之間，如 10 至 20kDa。PEG 共價偶合股數的平均數為每尿酸酶次單位 2 至 12 股；較佳者，共價偶合股數的平均數為每次單位 6 至 10 股；更佳者，PEG 股的平均數為每次單位 7 至 9 股。本具體實例的一方面中，尿酸酶可為四聚體。PEG 股可經由胺基甲酸酯鍵、

第二胺鍵、及／或醯胺鍵共價連接到尿酸酶。當尿酸酶為本文所述之任一尿酸酶的重組形式時，該重組體基本上具自然存在形式的序列。

一較佳哺乳動物尿酸酶為重組型豬－狒狒嵌合型尿酸酶，由部分豬肝及狒狒肝尿酸酶序列組成，這兩種尿酸酶係由 Wu, et al., (1989) 首次確定。這種嵌合尿酸酶的一個例子包含豬序列 (SEQ ID NO: 1) 的前 288 個胺基酸及狒狒序列 (SEQ ID NO: 2) 的最後 16 個胺基酸。Hershfield, et al., International Publication WO 00/08196, Urate Oxidase, 2000 年 2 月 17 日公開。由於後者的序列只在 2 個位置異於豬的序列，殘基 291 的精胺酸改換為離胺酸 (K)，殘基 301 的蘇胺酸改換為絲胺酸 (S)，該突變體稱為豬-K-S 或 PKS 尿酸酶 (SEQ ID NO: 3)。PKS 尿酸酶多具一個離胺酸殘基，因此，較豬或狒狒序列多一個潛在的聚乙二醇化的位置。

使用標準方法將各種哺乳動物尿酸酶的 cDNA，包括 PKS 尿酸酶，予以分殖，且定出在 E. coli 中表現的最適條件。參閱 Erlich, HA, (ED.)(1989) PCR Technology. Principles an Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press; Sambrook, J, et al., (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press。將重組體尿酸酶提取，純化，並使用標準檢定的變體來評估其穩定性及活性。參閱 Fridovich, I, (1965) J

Biol Chem 240:2491-2494; Nishimura ,et al., (1979), 及實施例 1 和 5。

在本發明一具體實例中，尿酸酶可經由生物穩定性、無毒、共價鍵共軛於相對少的 PEG 股上。此類鍵可包括胺基甲酸酯鍵、第二胺鍵、及／或醯胺鍵。適於此類共軛的各種經活化 PEG 可自 Shearwater Polymers, Huntsville, AL 處購得。

例如，對尿酸酶的尿烷鍵可經由於 PEG 的碳酸琥珀醯亞胺基酯（SC）或碳酸對硝基苯酯（NPC）衍生物之存在中將尿酸酶溫置而形成。SC-PEG 可使用美國專利 5,612,460 中所述之程序來合成，此專利併入本文作為參考。NPC-PEG 可經由將 PEG 與氯甲酸對－硝基苯酯根據 Veronese, FM, et al., (1985) Appl Biochem Biotechnol 11:141-152 及美國專利 5,286,637 中所述方法合成，其併入本文作為參考。該 637 號專利中所述的方法經由調整反應物濃度以保持類似的化學計算法來適應高分子量的 PEGs。NPC-PEG 合成的一個替代方法如 Büttner , W, et al., 東德專利說明 DD 279 486 A1 中所述。

尿酸酶的醯胺鍵可使用 PEG 羧酸衍生物之 N-羥基丁二醯亞胺酯（Shearwater Polymers）來得到。尿酸酶的第二胺鍵可使用 2,2,2-三氟乙烷磺醯基 PEG（tresyl PEG; Shearwater Polymers）來形成或經由使用 PEG 醛（Shearwater Polymers）及氰硼氫化鈉的還原烷化來形成。

於包含具分子量 10kDa 的 PEG 之共軛物中，每次單

位偶合的最大 PEG 股數對哺乳動物尿酸酶來說為 12 股，同時保留未變性酶至少 75% 的尿酸分解活性（如 PKS 尿酸酶，豬尿酸酶的突變蛋白；參閱實施例 5 的檢定條件）。聚乙二醇化的後述程度對應於總胺基的 40%。本發明一具體實例中，每尿酸酶次單位偶合的聚乙二醇平均股數介於 2 至 12 間。在一較佳具體實例中，每尿酸酶次單位偶合的 PEG 平均股數介於 6 至 10 間。在一個更佳具體實例中，每尿酸酶次單位偶合的 PEG 平均股數介於 7 至 9 間。在另一具體實例中，用於偶合反應的 PEG 分子量介於 5kDa 至 30kDa 之間，較佳者介於 10kDa 至 20kDa 之間。

有許多因素可影響對偶合於一個特定形式尿酸酶的 PEG 最佳分子量及最佳股數的選擇。一般說來，相較於較高分子量的具相對較少支鏈的 PEG，在基本上不喪失尿酸分解活性情況下降低或消除免疫性需要偶合較低分子量的 PEG 的相對較多的支鏈。相似的，考慮到大小及股數量，每種不同形式的尿酸酶可具不同的最佳量。PEG 最佳的股數及分子量可使用本文所述的方法來確定。

當哺乳動物尿酸酶的 PEG 共軛物是由純化的四聚體及八聚體形式的酶（包含四個或八個約為 35kDa 的次單位）製備而成時，它們在小鼠體內展示了顯著降低的免疫性，這與包含大凝聚物的尿酸酶 PEG 共軛物的中等免疫性（參閱圖 6）及未改質酶的很高免疫性相反。

自然存在及重組體尿酸酶的純化製備物中除了四聚體（140-kDa）及八聚體（280-kDa）形式之外，通常包含非

常大的酵素凝聚物之混合物。四聚體或八聚體形式的每種尿酸酶製備物一般在 20%至 95%間變化（參閱圖 2-4）。儘管有證據顯示許多其他蛋白質的未 PEG 化凝聚物具高度非致免疫性（參閱，如 Moore, WV, et al., (1980) J Chlin Endocrinol Metab 51:691-697），先前對 PEG-尿酸酶的研究並未說明任何限制凝聚物內容的嘗試，顯示 PEG 變異凝聚物潛在的免疫性沒被考慮。基於對本發明的觀察，顯示很可能此類凝聚物存在於酶的製備中，該製備用以先前的 PEG-尿酸酶的合成。其存在可能使得製備非致免疫性共軛物變得更加困難。這還顯示先前嘗試 PEG 化尿酸酶中觀察到的尿酸分解活性的大幅喪失是與偶合的低分子量 PEG 的大量支鏈相關。另一方面，本文所述之尿酸酶純化及 PEG 化方法允許每次單位共價連接最多 12 股 PEG 股，同時保留高於 75%的尿酸分解活性，至少對特定尿酸酶而言如此，如 PKS 尿酸酶（一種豬尿酸酶的突變蛋白）及嗜熱 *sp.*桿菌所得之酶。

在另一較佳具體實例中，基本上酶的所有大凝聚物可經由離子交換層析術（表 1-3）或粒徑排斥層析術在 pH 值介於 9 至 10.5 之間，較佳者 10.2，來去除，然後將所得之實質地不含凝聚物的尿酸酶製備與 PEG 共軛。由製備型管柱所得每個液份尿酸酶的分子量可經由任一依靠大小進行分析的技術來監測，包括如 HPLC，常規粒徑排斥層析術，離心作用，光散射，非變性緩衝液中毛細電泳法或膠電泳法。對不含凝聚物，經由粒徑排斥層析術分離的

尿酸酶而言，只包含酶的 140kDa 及 280kDa 形式的液份可成池，並用以 PEG 的共軛。對四聚體加八聚體，使用離子交換層析術分離的尿酸酶而言，由離子交換柱所得的液份可考慮到大小進行分析以確定哪個液份包含四聚體和八聚體形式的主要量，且不含經由光散射所發現的大凝聚物。因此在純化產物中，不必要的大凝聚物只構成尿酸酶總量的 1%或更少。

本文所列的結果顯示即使大幅 PEG 化，大於八聚體的 PKS 尿酸酶形式會引發加速廓清（圖 5），並在鼠體內為某種程度的免疫性。相反的，由完全不含大凝聚物（經由光散射可發現）的尿酸酶來製備的共軛物可在一周的間歇中 6 次注射，而且沒有什麼加速廓清速度的證據（圖 5），沒有發現抗體的形成，這是經由敏感的酶相關免疫檢定測得的（圖 6）。使用高純化四聚體或八聚體尿酸酶進一步自先前該 PEG-尿酸酶製備中區分本發明之改進的共軛物。相反的，在先前研究者所用的尿酸酶製備中存在相當量的大凝聚物，這可使其與 PEG 的大量支鏈偶合，以抑制免疫性。結果，所得共軛物的酶活性大幅降低。

本發明 PEG-尿酸酶可用以降低體液及哺乳動物，較佳者人類，組織內尿酸水平，因此可用以治療高尿酸相關的疾病，包括痛風、痛風石、腎衰、組織移植及惡性疾病。PEG-尿酸酶共軛物可注射入具超量尿酸水平的哺乳動物體內，注射途徑很多，包括靜脈注射、皮下注射、皮內注射、肌肉注射及腹膜注射。作為替換，其可被霧化，並

吸入。參閱 Patton, JS, (1996) Adv Drug Delivery Rev 19:3-36 及美國專利 5,458,135。本發明 PEG-尿酸酶的有效劑量依尿酸水平及個人身材而定。在本發明此方面的一具體實例中，PEG-尿酸酶以藥學可接受賦形劑或稀釋劑的形式服用，服用量介於 10 微克到 1 克。在一較佳具體實例中，服用量介於 100 微克至 500 毫克。更佳者，共軛尿酸酶的服用量介於 1 毫克至 100 毫克間，如 5 毫克，20 毫克或 50 毫克。該等具體實例中劑量所用的質量是指共軛物中蛋白質的量。

含 PEG-尿酸酶的藥學製劑可經由常規技術來製備，如 Gennaro, AR (Ed.)(1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Easton, PA: Mack Publishing Co 中所述。適於製備可注射溶劑的賦形劑包括如磷酸鹽緩衝食鹽水，乳酸鹽 Ringer's 溶液，水，多元醇及甘油。非腸道注射用藥學組合物包含藥學上可接受的無菌水性或非水性液體，分散液、懸浮液或乳液，以及用於在使用前重組成無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。這些製劑可包括額外的成份，如防腐劑、增溶劑、穩定劑、濕化劑、乳化劑、緩衝液、抗氧化劑及稀釋液。

PEG-尿酸酶還可做為人體內移植的控制釋放組合物，使之可持續控制體液內過高的尿酸水平。如，聚乳酸、聚乙醇酸、再生膠原質、聚 L 離胺酸、褐藻酸鈉、gellan 膠、chitosan、瓊脂糖、多薄層脂質體及許多其他常規貯存製劑包括生物易蝕或生物易降解物質，這些物質可與生

物活性組合物一起配製。這些物質當移植或注射時逐漸分解並向周圍組織釋放出活性物質。例如，一個使 PEG-尿酸酶裝入膠囊的方法包括美國專利 5,653,974 中所述方法，因此該方法作為參考並入本文。在本發明中可直接考慮使用生物易蝕、生物易降解及其它貯存製劑。使用用以釋放 PEG-尿酸酶的浸劑泵及矩陣陷阱系統也在本發明的範圍內。PEG-尿酸酶也可較好地包裹在膠囊或脂質體中。脂質體膠囊技術在技藝中為人所知。參閱如 Lasic, D, et al., (Eds.)(1995) *Stealth Liposomes*. Boca Raton, FL: CRC Press。

本發明 PEG-尿酸酶藥學組合物可降低尿酸導致的腎衰高危病人進行血液透析的需要，如接受器官移植的病人（參閱 Venkataseshan, VS, et al., (1990) *Nephron* 56:317-321）及患惡性疾病的病人。在患者體內具大量尿酸鹽（痛風石）晶體的積累時，此類藥學組合物將此現有的治療能更快地提高生命質量。

下列實施例並不解釋為本發明任何形式的限制，而是用以闡釋上述的各個方面。這些實施例說明了經由偶合活化的 PEG（如碳酸對－硝基苯酯衍生物）至豬尿酸酶突變蛋白來製備 PEG-尿酸酶。這些實施例為本技藝中生產實質地不具免疫性尿酸酶共軛物普通技能之一者提供了指導，該共軛物保留了未改質酶至少 75% 的尿酸分解活性且很適於長期服用。

實施例 1

製備型尿酸酶離子交換層析術

製備型離子交換層析術係在快速蛋白質液體層析術 (FPLC) 裝置 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) 上進行。Mono Q 管柱 (1×10 公分, Amersham Pharmacia) 的溶析是梯度使用 50mM 碳酸鈉 pH 10.3, 0.1M 氯化鈉 (緩衝液 A), 50mM 碳酸鈉 pH 10.3, 0.6M 氯化鈉 (緩衝液 B), 流速為 0.5 毫升/秒, 而樣品的注入流速較慢。該技術係用以部份分離 25 毫升的 PKS 尿酸酶溶液 (pH 10.3)。PKS 尿酸酶是由 Bio-Technology General Limited (Rehovot, Israel) 得到。後者為重組體豬尿酸酶, 其中一個離胺酸 (K) 殘基及一個絲胺酸 (S) 殘基分別替代了親代豬序列中的一個精胺酸殘基及一個蘇胺酸殘基 (Lee et al. (1988) Science 239:1288-1291; Wu et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:9412-9416)。注入樣品後, 該管柱即用 100 毫升的緩衝液 A 來清洗。尿酸酶的頂峰開始在 31 毫升線性梯度 0 至 26%緩衝液 B 的末尾溶析出。大多數的尿酸酶是經由 7 毫升的含 26%緩衝液 B 的緩衝液來等溶劑組成地溶析出。其他回收尿酸酶係經由 89 毫升線性梯度 26%至 100%的緩衝液 B 來溶析。收集 4 毫升或 6 毫升液份。對 4 號至 11 號的液份進行尿酸酶及總蛋白質的檢定 (圖 1), 並用粒徑排斥 HPLC (HPLC) 進行分析, 如實施例 2 中所述 (圖 2 及 3)。其餘 # 5 至 10 液份則與 PEG 偶合, 如實施例 3 中所述。基於實施例

2 中的分析結果，將 5 號和 6 號液份的 PEG 共軛物合併為“低鹽池”並將 7-10 號液份的 PEG 共軛物合併為“高鹽池”，如圖 1 所示。

實施例 2

經由光散射及紫外線吸光度監測尿酸酶的粒徑排斥層析

粒徑排斥 HPLC 係在室溫下，Superdex 200 管柱（1×30 公分，Amersham Pharmacia Biotech）上對未分液份的 PKS 尿酸酶，及對來自實施例 1 之 PKS 尿酸酶的製備型 Mono Q 層析術中選取的液份實施。自 Thermo Separations HPLC（Sunnyvale, CA）的吸光度監視器（紫外線 2000）中所得的洗出液以對入射光呈 90°的光散射分析，其中係使用得自 Wyatt Technologies（Santa Barbara, CA）的 MiniDawn 偵檢器。

圖 2-4 所示的結果顯示尿酸酶次單位內四聚體、八聚體及較大凝聚物的解析，以及由各種樣品中所含這些形式的尿酸酶所偵檢到的信號之不同比例。與直接與濃度成正比的吸光度信號不同者，光散射信號係正比於濃度乘光散射單位大小的積。所得之光散射偵檢器對很少量的高凝聚尿酸酶的敏感度顯示最大凝聚物之存在，該物質係在或接近於空管柱體積溶析出（約 7 毫升）。

實施例 3

PEG-尿酸酶共軛物的合成

將未分液份的 PKS 尿酸酶（得自 Bio-Technology General Limited）及實施例 1 中 Mono Q 管柱液份中的尿酸酶使用得自 Shearwater Polymers（Huntsville, AL）的 PEG 碳酸對－硝基苯酯衍生物（NPC-PEG）偶合到 10kDa PEG。使用氯甲酸苯酯自 PEG 製備 NPC-PEG 已在數個報告中述及（如 Veronese, FM, et al., (1985) Appl Biochem Biotechnol 11:141-152; Kito, M, et al., (1996) J Clin Biochem Nutr 21:101-111），且 NPC-PEG 已被先前的研究者（包括本案發明人）用於 PEG-蛋白質共軛物的合成（如 Veronese et al., supra; Sherman, MR, et al., in JM Harris, et al., (Eds.) Poly (ethylene glycol) Chemistry and biological Applications. ACS Symposium Series 680 (pp.155-176) Washington, DC: American Chemical Society）。偶合到每一尿酸酶次單位的 10kDa PEG 股數經用 Kunitani, M, et al., (1991) J Chromatogr 588:125-137 所述方法測定為 6。

實施例 4

尿酸酶及 PEG-尿酸酶的活體內血清持續性及免疫性

重組體哺乳動物尿酸酶的聚乙醇共軛物是根據實施例 3 中之方法來製備，將其在磷酸鹽緩衝食鹽水（PBS），pH 7.4 中調整為 1 毫克蛋白質／毫升，供注射所用。將樣品冷凍保存直到用以分析或注射。樣品在注射進以八隻分組的 BALB/c 雌鼠之前加熱至 37℃ 1 個小時。該小鼠組

在研究開始時平均體重 在 18 至 22 克之間。

所有小鼠的體重均被監測，並記錄下對注射的不良反應跡象及其它健康不利跡象。每周 6 次注射，每次注射的 24 小時後，用氯胺酮麻醉鼠，睜後收集 100 至 200 微升血液，不過需要採集更大量血液時，犧牲體無需如此（放血）。血液在 2-8℃ 下 4 至 32 小時中凝結，由凝結的血液中製備血清。將血清保存在 -20℃ 下。血清係如實施例 5 中所述進行尿酸分解活性分析，並如實施例 6 中所述進行尿酸酶抗體分析。

實施例 5

自注射 PEG-尿酸酶小鼠的血清中進行的 PEG-尿酸酶尿酸分解活性檢定

基於紫外線光吸光度的活性檢定（UV 檢定）係使用在 200mM 硼酸鈉 pH 9.2 中的 100 μ M 尿酸作為受質，以 I. Fridovich (J Biol Chem. (1965) 240:2491-2494) 方法的微盤調整方式進行。在一底部為紫外線透射性的 96-洞盤中（Costar, Corning NY），使用 Molecular Devices (Sunnyvale, CA) 的 SpectraMAX 250 微盤讀器室溫下監測 292nm 吸光度的降低 15 分鐘。數據係經由找出在該測量期間有 10%至 40%的受質被氧化所做的吸光度測量之最大斜率（以毫吸光度單位每秒）來分析。該檢定所得結果顯示在圖 1 和 5 中。

第一次注射偶合於 10kDa PEG 每次單位 6 股的 PKS

尿酸酶之小鼠，其血清的平均半生期為 29 ± 4 小時，這是根據注射 24 和 72 小時後所得血清的數據所得者。

在分開的實驗中，確定注射入 PEG-尿酸酶的小鼠血清內可偵檢的尿酸分解活性會在 -20°C 下貯存時下降，且該活性的最大恢復是在檢定前在 37°C 下保溫 4 個小時得到。圖 5 顯示重複每星期注射 $6 \times 10 \text{ kDa}$ PEG PKS 尿酸酶後，尿酸分解活性的最大恢復是發生在該酶經由如實施例 1 所述的 Mono Q 管柱層析術純化後根據實施例 3 的方法 PEG 化之情況中。最大恢復發生在注射入由實施例 1 的高鹽洗出液池製備的共軛物（參看圖 1），該池中具最少量的非常大凝聚物（參閱圖 3 中 7 至 10 液份的光散射圖形）。中等恢復是得自低鹽洗出液池製備的共軛物，該池係由實施例 1 Mono Q 管柱得到，而最低恢復是得自未分液份 PKS 尿酸酶所製得的共軛物，該共軛物具有最多的非常大凝聚物（參看圖 2）。可觀察到重複注射後自血清中恢復的相對活性之相同順序（高鹽池 $>$ 低鹽池 $>$ 未分液份尿酸酶），不論是否使用上述紫外線檢定或自 P. Fossati et al. (J. Clin Chem (1980) 26:227-231) 調整的比色法檢定，也不論該血清是否在檢定前有在 37°C 下保溫過都一樣。

實施例 6

對注射 PEG-尿酸酶小鼠的血清進行酶聯結免疫吸收檢定 (ELISA)

用結合到 96-洞 Immulon 2 盤 (Dynex Technologies , from VWR Scientific, San Francisco, CA) 的豬尿酸酶進行非競爭性 ELISA 。原抗血清是來自注射尿酸酶或根據實施例 3 的方法所製 6×10-kDa PEG 共軛物的小鼠。次級抗體為偶合於辣根過氧化酶的山羊抗 - 小鼠 IgG (Calbiochem-Novabiochem #401 253, La Jolla, CA) , 且受質為鄰 - 苯二胺二鹽酸鹽 (Sigma P-9187, St. Louis, MO), 如 B. Porstmann et al. (Clin. Chem. Clin. Biochem. (1981) 19:435-440) 中所述者。

圖 6 闡釋非競爭性 ELISA 分析的結果。該結果顯示根據實施例 3 方法, 由實施例 1 Mono Q 管柱所得高鹽洗出液 (如圖 1 所示) 合成的 6×10-kDa PEG PKS 尿酸酶在八隻於 6 周內每周接受注射的小鼠體內不產生可偵檢的免疫反應。一些注射了由未分液份 PKS 尿酸酶根據實施例 3 的方法製備的共軛物之小鼠顯示出低但可偵檢的免疫反應。最高免疫反應發生率出現在注射了根據實施例 3 的方法自實施例 1 Mono Q 管柱低鹽洗出液池製備的共軛物之小鼠中。

如果沒有實施例 2 中所述的用於粒徑排斥 HPLC 分析的光散射偵檢器之助益, 就不會突顯出最大凝聚物、而非八聚體形式的尿酸酶的存在係與 PEG-尿酸酶共軛物在重複注射後漸進地減低的恢復有關, 如實施例 5 中觀察所得者 (圖 5) , 並與 BALB/c 小鼠免疫性的提高相關, 如實施例 6 中觀察所得者 (圖 6) 。這些結果對於用作生產臨

床使用的 PEG-尿酸酶之起始物的尿酸酶規格具有很重要的提示作用。

雖然上述發明已經由理解清楚的目的提出的示範說明及實施例予以詳細說明過，但諳於此技者都明白可以根據本發明的教導做出某些變化和修改而不遠離已說明和申請專利範圍的旨意和範圍。

【圖式簡單說明】

圖 1 說明 Pharmacia Biotech Mono Q (1×10 公分) 陰離子交換管柱所得諸液份中尿酸酶活性、總蛋白質及鹽濃度。尿酸酶活性是在室溫下，經由監測 100 μ M 尿酸在 200mM 硼酸鈉 pH 為 9.2 中於 292nm 的吸光度之降低而測得。總蛋白質是從粒徑排斥 HPLC 分析中尿酸酶吸光度尖峰曲線下的面積測定的。

圖 2 說明包含突變體 R291K 及 T301S (PKS 尿酸酶) 的豬尿酸酶經製備型 Mono Q 層析術中的注入物和選取的液份在 Pharmacia Superdex 200 管柱 (1×30 公分) 上進行之粒徑排斥 HPLC 分析，顯示經由在 90℃ 光散射檢測器 (上曲線) 及在 276nm 的吸光度 (下曲線) 所得的數據。未分段樣品 (注入物) 及各液份中尿酸酶四聚體、八聚體及更高凝聚形式，其不同的信號長度係明顯的。注入物係經由 Mono Q 管柱緩衝液稀釋至 1/5，液份 5 稀釋至 1/3，而液份 6 稀釋至 1/9。將液份 5 及 6 合併而成“低鹽池”。

圖 3 說明圖 1 中 Mono Q 管柱中所得諸液份的粒徑排斥分析，顯示了如圖 2 經由光散射檢測器在 90° 及在 276nm 的吸光度所得的數據。此圖中所示的液份是用以形成“高鹽池”的，由此製備 PEG 共軛物並注射入 BALB/c 小鼠中。BALB/c 小鼠所得之血清活性及免疫反應如圖 5 及 6 所示。

圖 4 說明未分液份 PKS 尿酸酶及由 PKS 尿酸酶的製備型 Mono Q 管柱層析術中選取的液份（圖 1）中，由 276nm 吸光度及 90° 光散射來測定，由圖 2 及 3 中的數據來計算所得之八聚體含量。

圖 5 說明尿酸酶活性的紫外線檢定，如圖 1 中者，該尿酸酶在 37°C 下保溫 4 個小時，每周 6 次分別注射 6×10^{-6} kDa PKS 尿酸酶的 PEG 共軛物或由 Mono Q 管柱所得液份池，每次注射的 24 小時後抽取血清。

圖 6 說明針對 PKS 尿酸酶的 PEG 共軛物，及由圖 1 所示的 Mono Q 管柱所得液份池的 PEG 共軛物之 IgG 抗體形成的 ELISA 分析，其血清係每周 6 次向 BALB/c 小鼠每 20 毫克體重注射 0.2 毫克的尿酸酶蛋白，每次注射的 24 小時後抽取的。每隻小鼠第一次至第六次注射 24 小時後所流的血液資料係從左向右顯示。檢定條件在實施例 6 中說明。每組中八隻小鼠的數據是根據遞增的免疫反應順序從左到右排列出。

序列表

<110> Sherman, Merry R.
Saifer, Mark G.P.
Williams, L. David

<120> AGGREGATE-FREE URATE OXIDASE FOR
PREPARATION OF NON-IMMUNOGENIC POLYMER CONJUGATES

<130> MVIEW.005A

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 304

<212> PRT

<213> 野猪

<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> 阿拉伯狒狒

<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

<210> 3

<211> 304

<212> PRT

<213> 野豬與阿拉伯狒狒之混合

<400> 3

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

五、中文發明摘要

發明之名稱：用以製備非致免疫性聚合物共軛體的不含凝聚物之尿酸氧化酶

自然存在或重組體蛋白質，特別是豬尿酸酶突變蛋白，其實質地不含大凝聚物，可經由與聚合物所含足夠少量支鏈共軛成為非致免疫性，這樣蛋白質的生物活性基本上就保留在共軛物內。此類共軛物非常適用於治療慢性病況，因為彼等比由含微量大凝聚物的蛋白質製備物製備成類似共軛物較不太可能誘發抗體的形成及／或加速廓清之故。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

Aggregate-free urate oxidase for preparation of non-immunogenic polymer conjugates

Abstract of the Disclosure

A naturally occurring or recombinant protein, especially a mutein of porcine urate oxidase (uricase), that is essentially free of large aggregates can be rendered substantially non-immunogenic by conjugation with a sufficiently small number of strands of polymer such that the bioactivity of the protein is essentially retained in the conjugate. Such conjugates are unusually well suited for treatment of chronic conditions because they are less likely to induce the formation of antibodies and/or accelerated clearance than are similar conjugates prepared from protein preparations containing traces of large aggregates.

十、申請專利範圍

1.一種純化保留有尿酸分解活性之尿酸氧化酶（尿酸酶）之方法，包括

（a）藉由分級法以降低該尿酸酶中大於八聚體之凝聚物的量，

（b）在含有尿酸酶之液份中偵檢出大於八聚體之凝聚物，及

（c）排除該含有大於八聚體之凝聚物之液份。

2.如申請專利範圍第1項之方法，其中該降低凝聚物的量係藉由選自離子交換層析術、粒徑排斥層析術及超濾中之方法而達成。

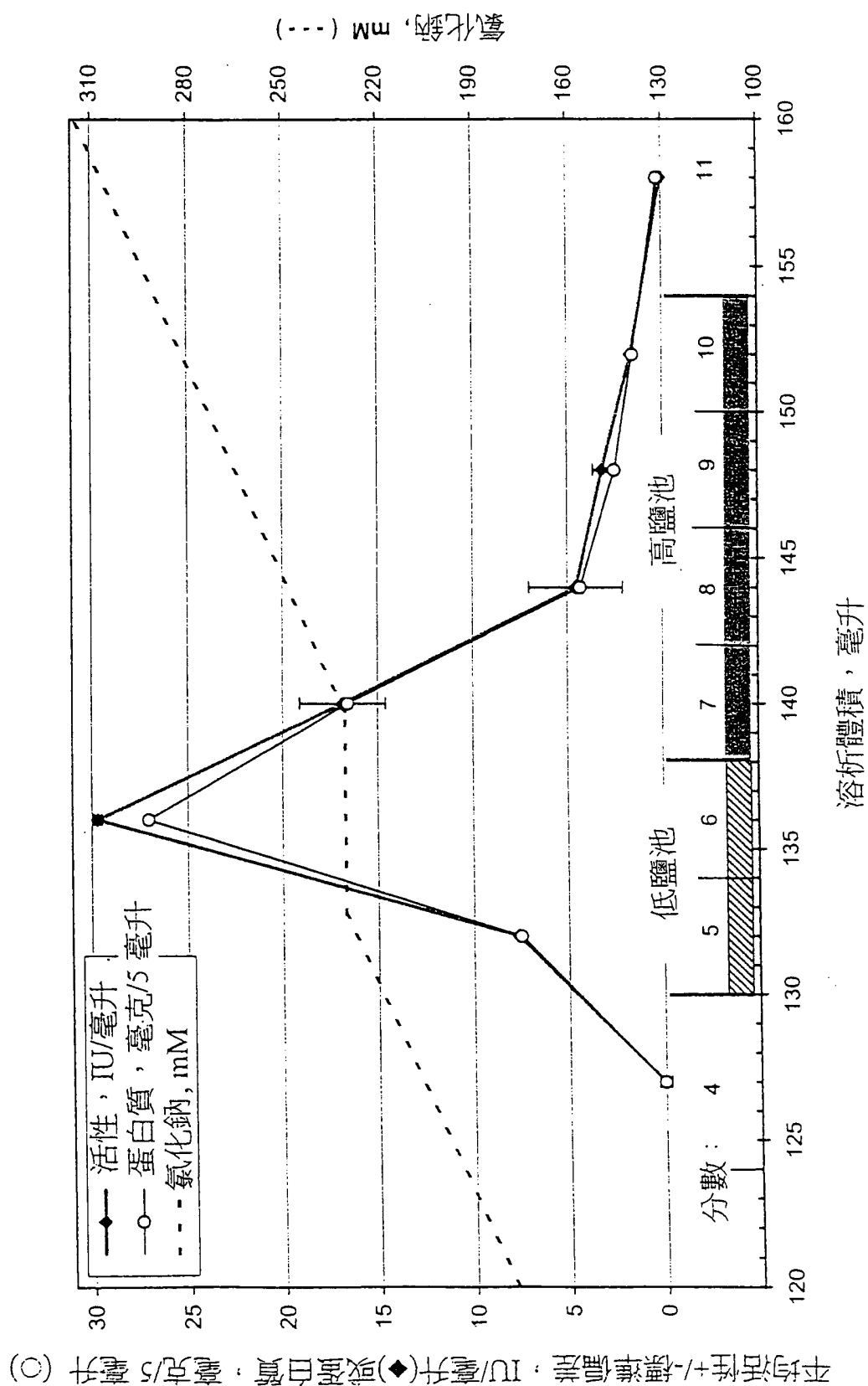
3.如申請專利範圍第1項之方法，其中該偵檢步驟包括光散射測量。

4.如申請專利範圍第1項之方法，其中高於95%之所得之純化尿酸酶為四聚體及八聚體形式者。

5.一種經分離出之尿酸氧化酶（尿酸酶），其係由包括以下步驟之方法所製得：將尿酸酶中大於八聚體之凝聚物與尿酸酶八聚體及四聚體分離，及由經分離出之尿酸酶中排除該凝聚物，其中高於95%之該經分離出之尿酸酶為八聚體及四聚體形式者。

6.如申請專利範圍第5項之尿酸酶，其中高於97%之該經分離出之尿酸酶為八聚體及四聚體形式者。

圖 1



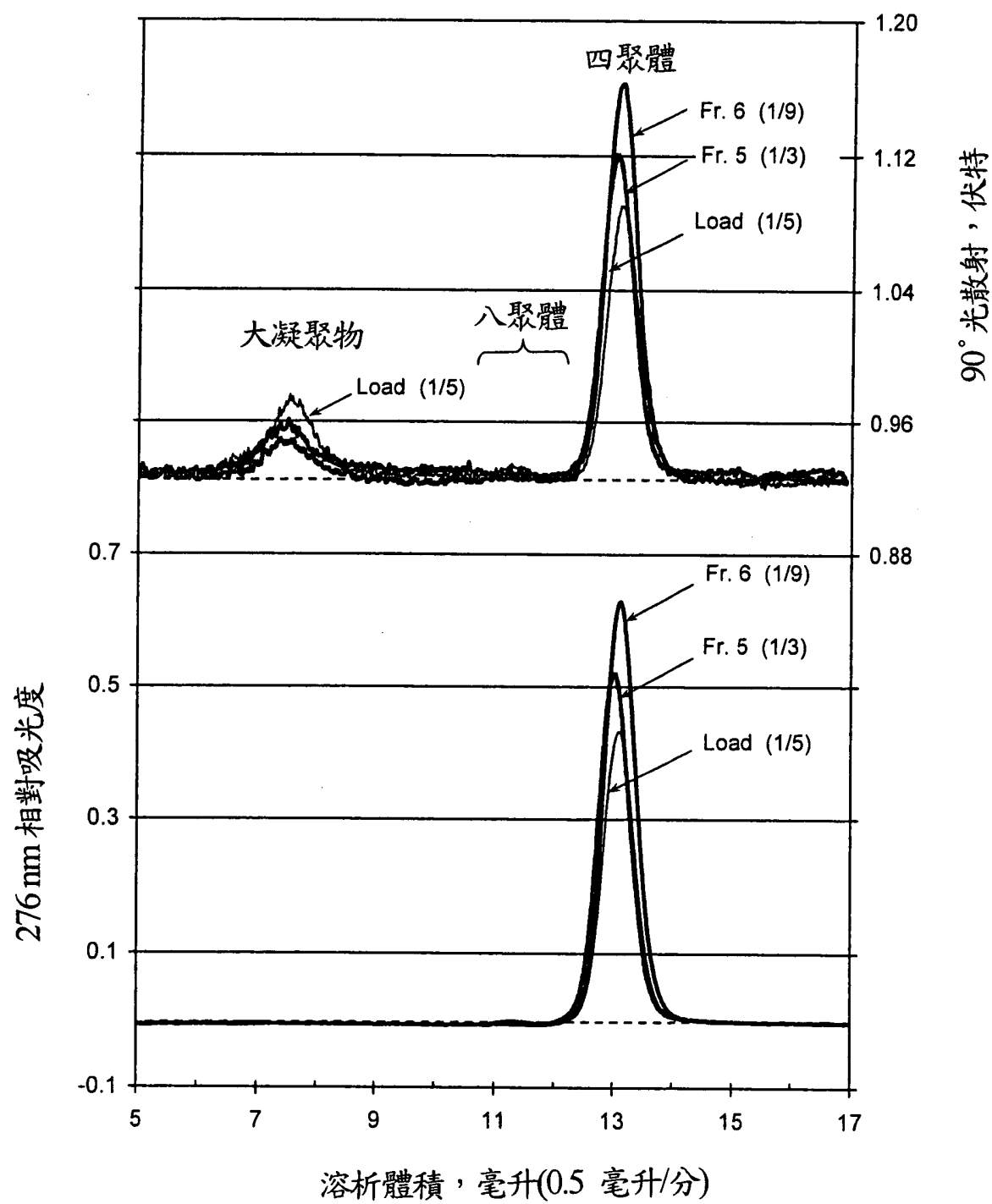


圖 2

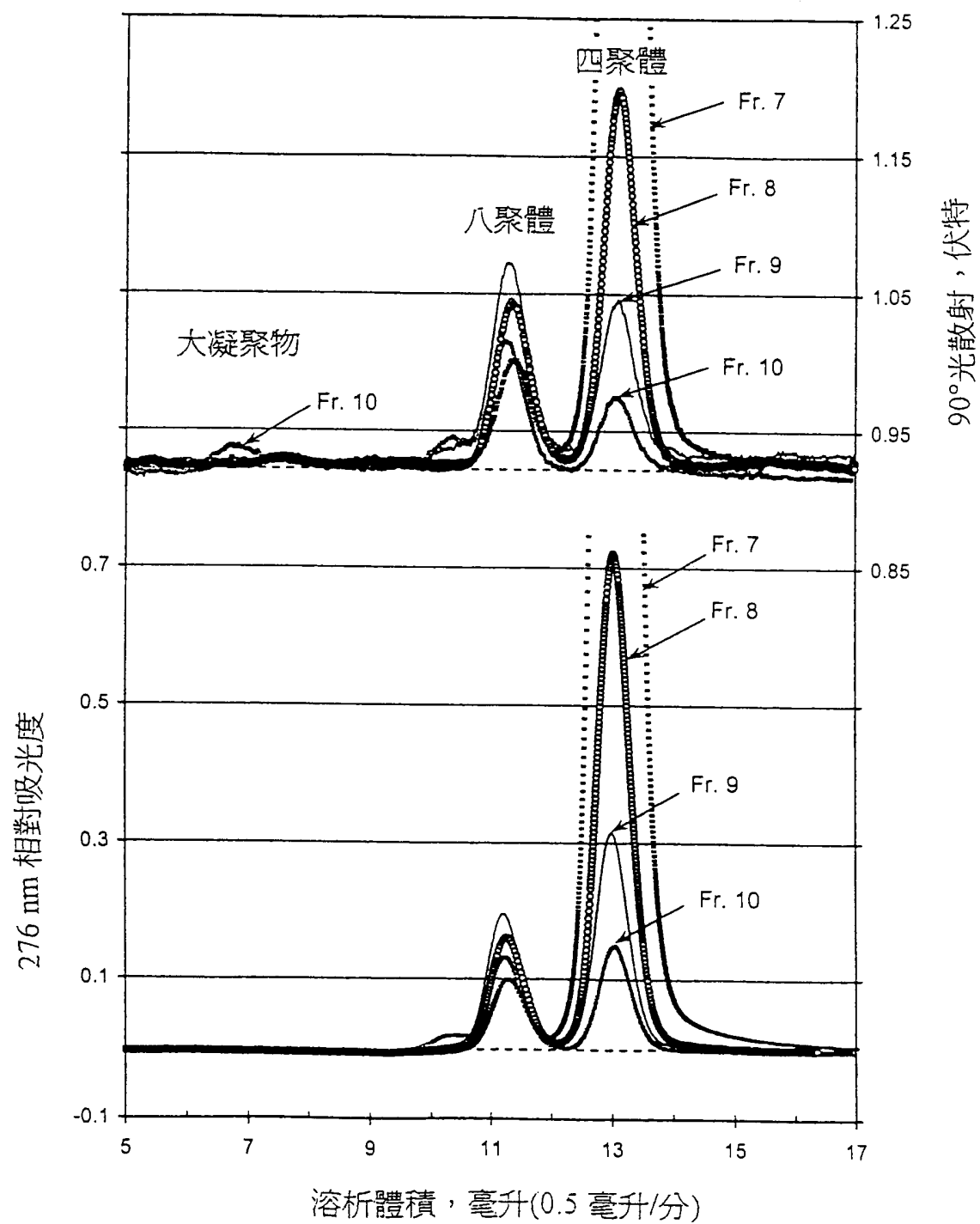


圖 4

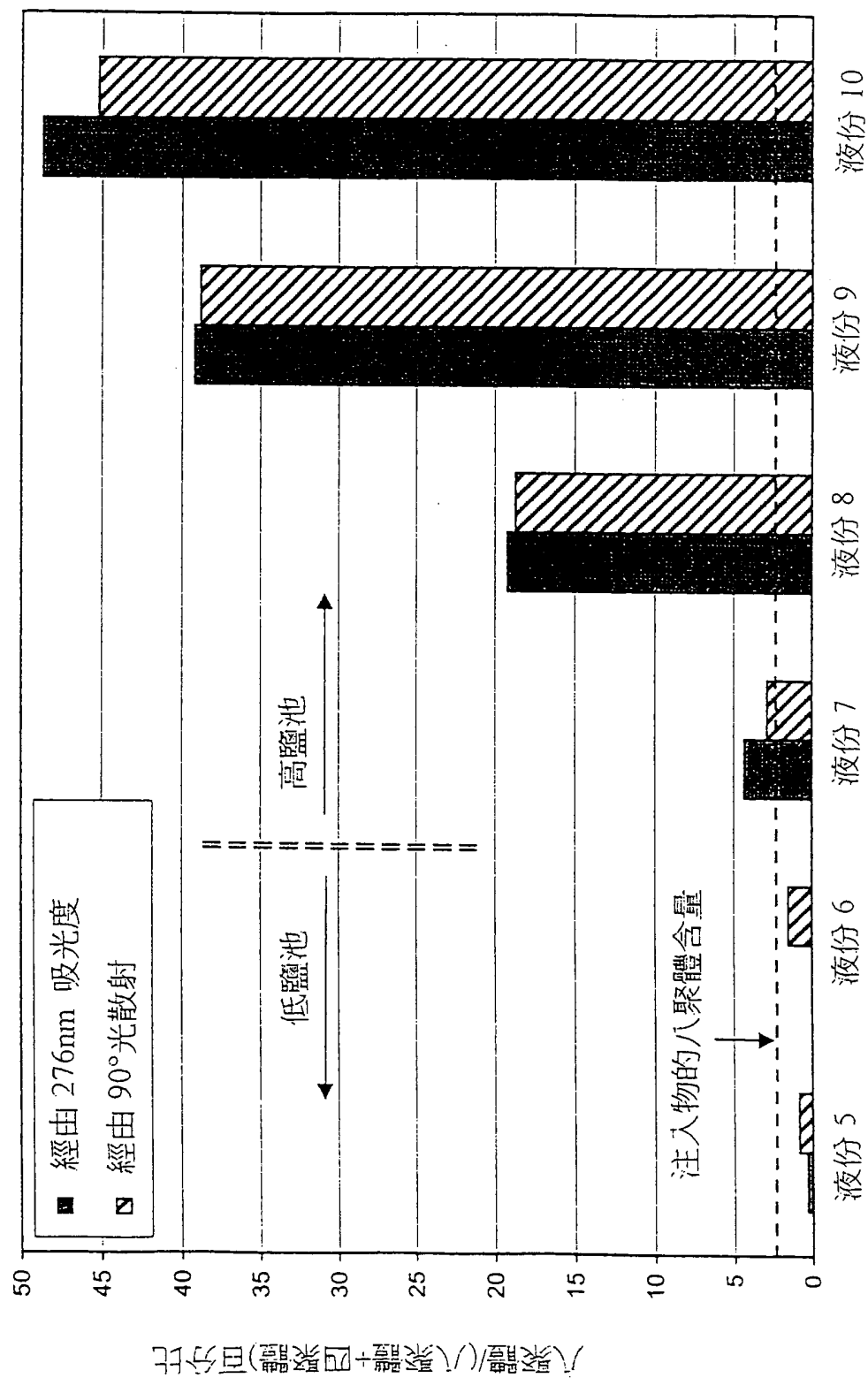


圖 5

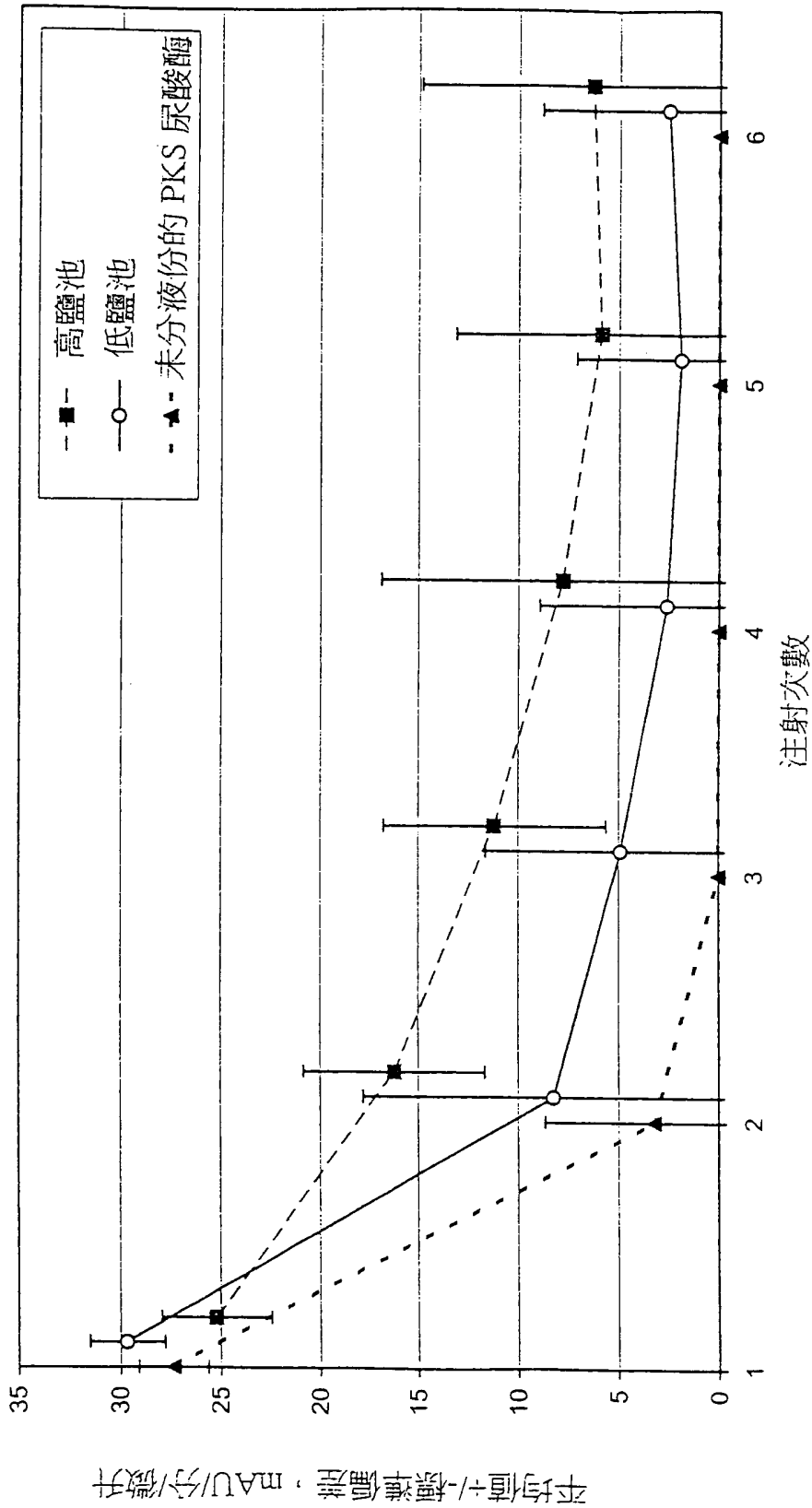
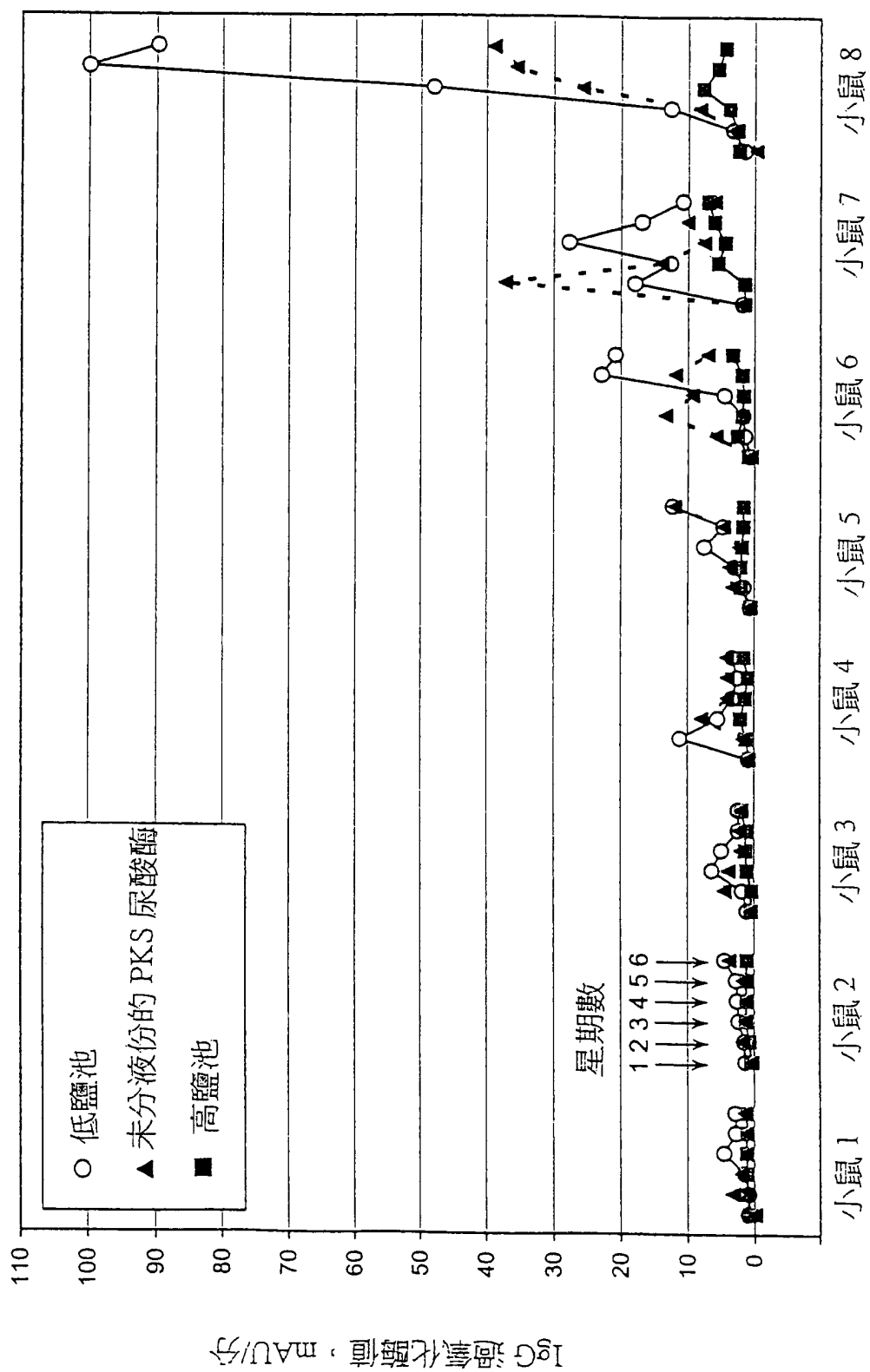


圖 6



七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無