

"SECUENCIAS DE URICASA MEJORADAS Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO"REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud de patente reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos n.º 62/162,280, presentada el 15 de mayo de 2015, que se incorpora al presente documento por referencia.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DE MATERIAL PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

Se incorpora por referencia en su totalidad en este documento una lista de secuencias de nucleótidos/aminoácidos, legible por ordenador, presentada al mismo tiempo con la presente e identificada del siguiente modo: Uno archivo de 103,701 Bytes ASCII (Texto) llamado "UCASE-100W01SequenceListing.TXT," creado el 12 de mayo de 2016.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Puede encontrarse una uricasa funcional en una gran variedad de organismos, tales como arqueas, bacterias y eucariotas. Sin embargo, en seres humanos y algunos primates no se expresa la uricasa. La ausencia de expresión de uricasa en seres humanos ha dado como resultado niveles sistémicos de ácido úrico más elevados y en algunos casos, afecciones hiperuricémicas, tales como gota y síndrome de lisis tumoral.

La gota afecta a más de 8 millones de estadounidenses y es una artritis inflamatoria dolorosa y debilitante definida como niveles séricos de ácido úrico que superan la solubilidad del ácido úrico en los fluidos corporales. El daño causado por la gota puede ocasionar un dolor crónico, discapacidad funcional en el trabajo y en el hogar y una calidad de vida relacionada con la salud comprometida (véase,

por ejemplo, Wertheimer, et al., *Curr Ther Res Clin Exp.*, 75: 1-4 (2013)).

El síndrome de lisis tumoral (TLS) se produce normalmente en pacientes con tumores voluminosos, que proliferan rápidamente y sensibles al tratamiento. El TLS es una complicación potencialmente letal del tratamiento contra el cáncer que surge cuando se eliminan rápidamente grandes cantidades de células cancerosas y liberan productos de descomposición que dan lugar a un fuerte aumento del ácido úrico sistémico.

Existe una serie de mecanismos de acción para controlar la hiperuricemia, tales como los inhibidores de xantina oxidasa (enzima que convierte la xantina en ácido úrico), fármacos uricosúricos (moléculas que inhiben a URAT1) y tratamiento con uricasa.

Hay dos uricasas aprobadas para uso clínico, Krystexxa® y Elitek®. Krystexxa® (pegloticasa) es una uricasa PEGilada aprobada para el tratamiento de la gota crónica en pacientes adultos refractarios a la terapia convencional. Krystexxa® es una proteína quimérica de la secuencia de uricasa de cerdo y de babuino que está hiper-PEGilada (~440 kDa de PEG por tetramero). Krystexxa® se administra mediante una infusión intravenosa (IV) durante un periodo de 2 horas. Durante los ensayos clínicos de fase 3, el 26% de los pacientes experimentaron reacciones relacionadas con la infusión y un 6.5% de los pacientes tuvo reacciones caracterizadas como anafilaxia (Baraf et al., *Arthritis Res Ther.*, 15(5):R137 (2013) y Strand et al., *J Rheumatol.*, 39(7): 1450-1457 (2012). Krystexxa® contiene un recuadro negro que avisa de las reacciones anafilácticas y a la infusión (véase la información de prescripción de Krystexxa®). Como resultado,

normalmente se trata previamente a los pacientes con antihistamínicos o corticoesteroides antes de la infusión IV y se les monitoriza después de la infusión. La monitorización antes del tratamiento, durante la infusión IV y después de la infusión se produce durante aproximadamente 6-8 horas en una clínica de IV.

Elitek® (rasburicasa) es una uricasa de *Aspergillus flavus* recombinante modificada que está indicado para la gestión inicial de los niveles plasmáticos de ácido úrico en pacientes pediátricos y adultos con leucemia, linfoma y neoplasias malignas de tumores sólidos que están recibiendo un tratamiento contra el cáncer que se espera pueda dar como resultado la lisis del tumor y la consiguiente elevación del ácido úrico en plasma. Elitek® tiene una semivida de 16-21 horas en seres humanos y ha de dosificarse diariamente mediante infusión IV. De manera similar a Krystexxa®, Elitek® tiene también un recuadro negro que avisa del riesgo de anafilaxia y hemólisis (especialmente en pacientes con deficiencia de G6PD). La frecuencia de dosificación (diaria), la ruta de administración (IV), la inmunogenicidad y el coste hacen que el tratamiento con Elitek® sea una opción poco probable para el tratamiento de la gota crónica.

En vista de lo anterior, existe la necesidad en la técnica de desarrollar opciones más seguras, más convenientes y menos inmunogénicas para tratar la hiperuricemia. La invención descrita en el presente documento satisface esta necesidad.

SUMARIO

Para superar los efectos secundarios significativos y conocidos de los tratamientos de la técnica anterior, se ha evaluado el potencial de una serie de secuencias de uricasa

y se han efectuado mejoras específicas y significativas para lograr uricasas mejoradas que son más seguras, menos inmunogénicas y más convenientes que las terapias existentes.

5 En algunos aspectos, el presente documento abarca una serie de diferentes secuencias de uricasa. Una uricasa puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34,
10 en donde la secuencia no es una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-33.

 En algunas realizaciones, la uricasa es al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o al menos
15 aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 2.

 En algunas realizaciones, la uricasa es una secuencia que difiere de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34 en de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 aminoácidos (por
20 ejemplo, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos). Por ejemplo, la uricasa puede diferir respecto de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 en aproximadamente 1 a aproximadamente
25 35 aminoácidos.

 En algunos aspectos, la uricasa es una secuencia que difiere de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34 en de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 aminoácidos (por
30 ejemplo, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 aminoácidos). Por ejemplo, la uricasa puede diferir respecto de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 en

aproximadamente 1 a aproximadamente 14 aminoácidos. En determinados aspectos, la uricasa es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la uricasa es una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-26 o 34.

5 De acuerdo con la descripción, también se proporcionan métodos de tratamiento para la hiperuricemia, la gota (incluyendo diversas formas de gota) y del síndrome de lisis tumoral.

Objetos y ventajas adicionales se expondrán en parte en la siguiente descripción, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o pueden aprenderse con la práctica. Los objetos y las ventajas se realizarán y obtendrán por medio de los elementos y combinaciones particularmente indicados en las reivindicaciones adjuntas.

15 Ha de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplares y explicativas y no son restrictivas de las reivindicaciones.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en esta memoria descriptiva y que constituyen una parte de la misma, ilustran una o varias realizaciones y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios descritos en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La figura 1 representa un análisis por SDS-PAGE de las proteínas solubles (S) e insolubles (P) presentes en los lisados celulares de células de *E. coli* que expresan varias uricasas.

Las figuras 2A-B representan la calorimetría de barrido diferencial para uricasa de *Deinococcus geothermalis*

(figura 2A) y uricasa de *Deinococcus radiodurans* (figura 2B).

La figura 3 es una línea gráfica que ilustra los resultados de los ensayos de actividad de uricasa a una serie de concentraciones de sustrato (UA). Las líneas continuas representan un ajuste cinético de Michaelis-Menten.

La figura 4 es una línea gráfica que representa la adhesión de células M21 variantes inmovilizadas de fibronectina, Fab9mCys o uricasa.

La figura 5 es una línea gráfica que ilustra los resultados de los ensayos de actividad de uricasa a una serie de concentraciones de sustrato (UA). Las líneas continuas y discontinuas representan un ajuste cinético de Michaelis-Menten.

La figura 6 es un diagrama de barras que representa las frecuencias de HLA-DRB1 en la población de estudio (donante) en comparación con las observadas en la población caucásica.

Las figuras 7A-C proporcionan datos de donantes individuales para las evaluaciones de inmunogenicidad **ex vivo**. La figura 7A es un diagrama de dispersión que representa el índice de estimulación del tampón (control negativo) en comparación con KLH (control positivo). La figura 7B es un diagrama de dispersión que representa el índice de estimulación del tampón (control negativo) en comparación con la uricasa que se ensayó. La figura 7C es un diagrama de barras que representa el índice de estimulación media (SI) para el tampón, KLH y uricasa.

Las figuras 8A-B representan el análisis de diversos truncamientos de uricasa N-terminales. La figura 8A es un análisis de SDS-PAGE de 3 variantes de uricasa truncadas en N-terminal (V1, V2, y V3), en comparación con SGD uricasa.

La figura 8B es una línea gráfica que ilustra los resultados de los ensayos de actividad de uricasa a una serie de concentraciones de sustrato (UA). Las líneas continuas representan un ajuste cinético de Michaelis-Menten.

5 Las figuras 9A-B son líneas gráficas que representan los resultados de los ensayos de actividad de uricasa a una diversidad de concentraciones de sustrato (UA). Las líneas continuas representan un ajuste cinético de Michaelis-Menten. La figura 9A representa los resultados de los ensayos
10 de actividad de uricasa efectuados en presencia de DTT para di-Cys y tri-Cys uricasas (sin PEG). La figura 9B representa los resultados de ensayos de actividad de uricasa para uricasas di-PEGiladas y tri-PEGiladas.

Las figuras 10A-D representan el análisis de la uricasa
15 di-PEGilada. La figura 10A muestra los sitios tridimensionales accesibles al disolvente dentro de la estructura cristalina tetramérica de la uricasa de *Arthrobacter globiformis* (Código de referencia PDB: 2YZB). La figura 10B es un análisis por SDS-PAGE de uricasa no
20 PEGilada y di-PEGilada. La figura 10C es un análisis por cromatografía de fase reversa de uricasa purificada di-PEGilada. La figura 10D es una línea gráfica que ilustra los resultados de los ensayos de actividad de uricasa a una serie de concentraciones de sustrato (UA). Las líneas continuas y
25 discontinuas representan un ajuste cinético de Michaelis-Menten.

Las figuras 11A-B son gráficas que representan datos farmacocinéticos para uricasa PEGilada. La figura 11A
representa los datos farmacocinéticos en ratas para uricasa
30 di-PEGilada y tri-PEGilada. La figura 11B representa los datos farmacocinéticos en perros para uricasa di-PEGilada.

Las figuras 12A-C representan el análisis basado en suero humano *ex vivo* de la actividad y estabilidad de uricasa di-PEGilada. La figura 12A muestra la comparación de la actividad de uricasa di-PEGilada y de Krystexxa® en suero humano al 50% a 37°C. La figura 12B representa la actividad de uricasa di-PEGilada que se ha incubado en suero humano a 37°C durante varios espacios de tiempo. La figura 12C representa la actividad de uricasa di-PEGilada en respuesta a dosis repetidas de UA.

La figura 13 representa un análisis por RP-HPLC de la eficacia de la pegilación a diversos tiempos de incubación. Se usó RP-HPLC para medir la conjugación con PEG, que da como resultado picos bien resueltos que corresponden a especies con diferentes grados de conjugación.

Las figuras 14A-B representan las gráficas de superficie de respuesta que demuestran el efecto de la concentración de reactivo en la eficacia de PEGilación general para instantes desde los 10 minutos hasta las 2 horas. La figura 14A ilustra los datos basándose en un análisis de la "subunidad completamente PEGilada" (es decir, 3 de 3 sitios de conjugación funcionalizados por monómero) obtenidos directamente del trazado del ensayo de RP-HPLC. La figura 14B ilustra el análisis de datos cuando se calcula la derivatización general basada en la ecuación (1).

25

30

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La tabla 1 proporciona un listado de determinadas secuencias citadas en el presente documento.

Tabla 1: Descripción de las secuencias		
5	Descripción	Secuencias
		SEQ ID NO
10	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> , extremo N-terminal modificado, SGD, 2-Cys, truncamiento C-terminal (SGD V1 C2)	MATAETSTGCKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRCTARHEIQD1 LNVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKNTVYAFARDG FATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRINDH DHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTGS EFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRYNTVEVDFDA VYASVRGLLLKAFETHSLALQQTM YEMGRAVIETHPEID EIKMSLPNKH HFLVDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIEA TIQREGSRAD
20	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> , extremo N-terminal modificado, RGD, 2-Cys, truncamiento C-terminal (RGD V1 C2)	MATAETSTGCKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRCTARHEIQD2 LNVTSQLRGDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKNTVYAFARDG FATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRINDH DHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTGS EFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRYNTVEVDFDA VYASVRGLLLKAFETHSLALQQTM YEMGRAVIETHPEID EIKMSLPNKH HFLVDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIEA TIQREGSRAD
30	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter</i>	MATAETSTGCKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRCTARHEIQD3 LNVTSQLXaa ₁ Xaa ₂ Xaa ₃ FEEAHTAGDNAHV VATDTQKNT VYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQF

5	<i>globiformis</i> , extremo N-terminal modificado, variantes de RGD, 2-Cys, truncamiento C-terminal (variantes de RGD de V1 C2)	FWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGL TVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRYN TVEVDFDAVYASVRGLLLKAF AETHSLALQQTM YEMGRAV IETHPEIDEIKMSLPNKH HFLVDLQPF GQDNPNEVFYAAD RPYGLIEATI QREGSRAD en donde Xaa ₁ es R o cualquier aminoácido natural, a excepción de C; Xaa ₂ es G o cualquier aminoácido natural, a excepción de C Xaa ₃ es D o cualquier aminoácido natural, a excepción de C.	
10			
15	Secuencia génica, con modificación N-terminal opcional, 4 posibles cisteínas, R/SGD, opcionalmente con o sin truncamiento C-terminal en	MXaa ₁ ATAETSTGXaa ₂ KVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRXa a ₃ TARHEIQDLNVTSQLXaa ₄ GDFEAAHTAGDNAHV VATD TQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKH FTEGFDWVTGGRW AAQQFFWDRI Xaa ₅ DHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGXaa ₆ EQ AIVAGIEG LTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWR Y NTVEVDFDAVYASVRGLLLKAF AETHSLALQQTM YEMGRA VIETHPEIDEIKMSLPNKH HFLVDLQPF GQDNPNEVFYAA DRPYGLIEATI QREGSRADhpiwsniagf en donde Xaa ₁ está presente o ausente y en caso de estar presente, es T; Xaa ₂ es T o C; Xaa ₃ es N o C; Xaa ₄ es R o S; Xaa ₅ es N o C; Xaa ₆ es S o C; y en donde al menos una, dos, tres o cuatro cisteínas se incluyen en la	4
20			
25	letras minúsculas		
30			

	secuencia y en donde uno o más aminoácidos en minúsculas en el extremo C-terminal (hpiwsniagf) son opcionales.	
5	Secuencia génica, con modificación N-terminal con 4 posibles cisteínas, SGD, opcionalmente con o sin truncamiento C-terminal en letras minúsculas	MATAETSTGXaa ₁ KVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRXaa ₂ TA RHEIQDLNVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKNTVY AFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFW DRIXaa ₃ DHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGXaa ₄ EQAI VAG IEGLTVLKSTGSEFHGFP RDKYTTLQETTD RILATDVSAR WRYNTVEVDFDAVYASVRGLLLKAF AETHSLALQQ TMYEM GRAVIETHPEIDEIKMSLP NKHHFLVDLQPF GQDNPNEVF YAADRPYGLIEATI QREGSRADhpiwsniagf en donde Xaa ₁ es T o C; Xaa ₂ es N o C; Xaa ₃ es N o C; Xaa ₄ es S o C; y en donde al menos una, dos, tres o cuatro cisteínas se incluyen en la secuencia y en donde uno o más aminoácidos en minúsculas en el extremo C-terminal (hpiwsniagf) son opcionales.
10		5
15		
20		
25	Secuencia génica, con N-terminal truncado, 4 posibles cisteínas, SGD, opcionalmente con o sin truncamiento	MXaa ₁ KVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRXaa ₂ TARHEIQDLN VTSQLSGDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKNTVYAFARDGFA TTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRIXaa ₃ D HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGXaa ₄ EQAI VAGIEGLTVLK STGSEFHGFP RDKYTTLQETTD RILATDVSARWRYNTVEV DFDAVYASVRGLLLKAF AETHSLALQQ TMYEMGRAVIETH PEIDEIKMSLP NKHHFLVDLQPF GQDNPNEVFYAADRPYG LIEATI QREGSRADhpiwsniagf en donde Xaa ₁ es T o C;
30		6

5	C-terminal en letras minúsculas	Xaa ₂ es N o C; Xaa ₃ es N o C; Xaa ₄ es S o C; y en donde al menos una, dos, tres o cuatro cisteínas se incluyen en la secuencia y en donde uno o más aminoácidos en minúsculas en el extremo C-terminal (hpiwsniagf) son opcionales.	
10	Secuencia génica, con modificación N-terminal opcional, 9 posibles cisteínas, R/SGD, opcionalmente con o sin truncamiento	MXaa ₁ ATAETSTGXaa ₂ KVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRXa a ₃ TARHEIQDLNVTSQ LXaa ₄ GDFEAAHTAGDNAHV VATD TQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGEGFDWVTGGRW AAQQFFWDRI Xaa ₅ Xaa ₆ HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGXaa ₇ EQAI VAGI EGLTVLKSTGSEFHGFP RDKYTTLQETTDRI LATDVSARW RYNTVXaa ₈ VDFDAVYASVRGLLLKAF AETHSLALQQTMY EMGRAVIETH Xaa ₉ EIDEIKMSLPNKH HFLVDLQPF GQDNPNEVFYAADR PYGLIEATIQRXaa ₁₀ GSXaa ₁₁ ADhpiwsniagf en donde	7
20	C-terminal en letras minúsculas	Xaa ₁ está presente o ausente y en caso de estar presente, es T; Xaa ₂ es T o C; Xaa ₃ es N o C; Xaa ₄ es R o S; Xaa ₅ es N o C; Xaa ₆ es D o C; Xaa ₇ es S o C; Xaa ₈ es E o C; Xaa ₉ es P o C; Xaa ₁₀ es E o C; Xaa ₁₁ es R o C;	
25			
30			

5		y en donde al menos una, dos, tres o cuatro cisteínas se incluyen en la secuencia y en donde uno o más aminoácidos en minúsculas en el extremo C-terminal (hpiwsniagf) son opcionales.	
10	Secuencia génica, con modificación N-terminal opcional, 9 posibles cisteínas, XGD, opcionalmente con o sin truncamiento C-terminal en letras minúsculas	MXaa ₁ ATAETSTGXaa ₂ KVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRXa a ₃ TARHEIQDLNVTSQLXaa ₄ GDFEAAHTAGDNAHVVD TQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGEGFDWVTGGRW AAQQFFWDRI Xaa ₅ Xaa ₆ HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGXaa ₇ EQAIVAGI EGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARW RYNTVXaa ₈ VDFDAVYASVRGLLLKAFAETHSLALQQTMY EMGRAVIETH Xaa ₉ EIDEIKMSLPNKHFLVLDLQPFQDNPNEVFYAADR PYGLIEATIQRXaa ₁₀ GSXaa ₁₁ ADhpiwsniagf en donde Xaa ₁ está presente o ausente y en caso de estar presente, es T; Xaa ₂ es T o C; Xaa ₃ es N o C; Xaa ₄ es cualquier aminoácido natural excepto C; Xaa ₅ es N o C; Xaa ₆ es D o C; Xaa ₇ es S o C; Xaa ₈ es E o C; Xaa ₉ es P o C; Xaa ₁₀ es E o C; Xaa ₁₁ es R o C; y en donde al menos una, dos, tres o cuatro cisteínas se incluyen en la	8
15			
20			
25			
30			

	secuencia y en donde uno o más aminoácidos en minúsculas en el extremo C-terminal (hpiwsniagf) son opcionales.	
5	Secuencia génica, con truncamiento N-terminal, 9 posibles cisteínas, XGD, 10 opcionalmente con o sin truncamiento C-terminal en 15 letras minúsculas	MXaa ₁ KVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRXaa ₂ TARHEIQDLN VTSQLXaa ₃ GDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKNTVYAFARD GFATTEEFLLRLGKHFTGEGFDWVTGGRWAAQQFFWDRI 9Xaa ₄ Xaa ₅ HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGXaa ₆ EQAIVAGI EGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARW RYNTVXaa ₇ VDFDAVYASVRGLLLKAFAETHSLALQQTM EMGRAVIETH Xaa ₈ EIDEIKMSLPNKHFLVLDLQPFQDNPNEVFYAADR PYGLIEATIQRXaa ₉ GSXaa ₁₀ ADhpiwsniagf en donde Xaa ₁ es T o C; Xaa ₂ es N o C; Xaa ₃ es cualquier aminoácido natural excepto C; Xaa ₄ es N o C; Xaa ₅ es D o C; 20 Xaa ₆ es S o C; Xaa ₇ es E o C; Xaa ₈ es P o C; Xaa ₉ es E o C; Xaa ₁₀ es R o C; 25 y en donde al menos una, dos, tres o cuatro cisteínas se incluyen en la secuencia y en donde uno o más aminoácidos en minúsculas en el extremo C-terminal (hpiwsniagf) son opcionales.
30		

	Secuencia	MXaa ₁ ATAETSTGXaa ₂ KVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRXa	10
	génica, con	a ₃ TARHEIQDLNVTSQLXaa ₄ GDFEAAHTAGDNAHVVD	
	modificación	TQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGEGFDWVTGGRW	
	N-terminal	AAQQFFWDRI	
5	opcional, 9	Xaa ₅ Xaa ₆ HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGXaa ₇ EQAIVAGI	
	posibles	EGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARW	
	sitios de	RYNTVXaa ₈ VDFDAVYASVRGLLLKAFAETHSLALQQTMY	
	conjugación,	EMGRAVIETH	
	XGD,	Xaa ₉ EIDEIKMSLPNKHFLVDLQPFQDNPNEVFYAADR	
10	opcionalmente	PYGLIEATIQRXaa ₁₀ GSXaa ₁₁ ADhpiwsniagf	
	con o sin	en donde	
	truncamiento	Xaa ₁ está presente o ausente y en caso de	
	C-terminal en	estar presente, es T;	
	letras	Xaa ₂ es T o cualquier aminoácido natural	
15	minúsculas	o no natural usado para la conjugación de	
		sitio específico;	
		Xaa ₃ es N o cualquier aminoácido natural	
		o no natural usado para la conjugación de	
		sitio específico;	
20		Xaa ₄ es cualquier aminoácido natural	
		excepto C;	
		Xaa ₅ es N o cualquier aminoácido natural	
		o no natural usado para la conjugación de	
		sitio específico;	
25		Xaa ₆ es D o cualquier aminoácido natural	
		o no natural usado para la conjugación de	
		sitio específico;	
		Xaa ₇ es S o cualquier aminoácido natural	
		o no natural usado para la conjugación de	
30		sitio específico;	

5		Xaa ₈ es E o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico; Xaa ₉ es P o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico; Xaa ₁₀ es E o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico;	
10		Xaa ₁₁ es R o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico;	
15		y en donde al menos una, dos, tres o cuatro cisteínas se incluyen en la secuencia y en donde uno o más aminoácidos en minúsculas en el extremo C-terminal (hpiwsniagf) son opcionales.	
20	Secuencia génica, con truncamiento N-terminal, 9 posibles sitios de conjugación, XGD, opcionalmente con o sin truncamiento C-terminal en letras minúsculas	MXaa ₁ KVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRXaa ₂ TARHEIQDLN VTSQLXaa ₃ GDFAAHTAGDNAHVVATDTQKNTVYAFARD GFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRI Xaa ₄ Xaa ₅ HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGXaa ₆ EQAIVAGI EGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARW RYNTVXaa ₇ VDFDAVYASVRGLLLKAFAETHSLALQQTMY EMGRAVIETH Xaa ₈ EIDEIKMSLPNKHFLVDLQPFQDNPNEVFYAADR PYGLIEATIQRXaa ₉ GSXaa ₁₀ ADhpiwsniagf en donde Xaa ₁ es T o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico;	11
30			

5	Xaa ₂ es N o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico; Xaa ₃ es cualquier aminoácido natural excepto C;	
10	Xaa ₄ es N o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico; Xaa ₅ es D o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico;	
15	Xaa ₆ es S o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico; Xaa ₇ es E o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico;	
20	Xaa ₈ es P o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico; Xaa ₉ es E o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico;	
25	Xaa ₁₀ es R o cualquier aminoácido natural o no natural usado para la conjugación de sitio específico;	
30	y en donde al menos una, dos, tres o cuatro cisteínas se incluyen en la secuencia y en donde uno o más aminoácidos en minúsculas en el extremo C-terminal (hpiwsniagf) son opcionales.	

5	Construcción de uricasa C1 modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> (mutación T11C, SGD, etiqueta His N-terminal opcional y enlazador corto opcional, ambos en minúsculas (el primer estos de uricasa corresponde a Thr2))	mgshhhhhhgarqTATAETSTGCKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQDLNVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHVVDATDQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGEGFDWVTGGRWAAQQFFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRLATDVSA RWRNTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFETHSLALQQTMYE MGRAVIETHPEIDEIKMSLPNKHFLVDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIEATIQREGSRAD	12
25	<i>Arthrobacter globiformis</i> (variante 1) con etiqueta eliminada, eliminación de Thr2 (para evitar la	MATAETSTGCKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQDLNVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHVVDATDQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGEGFDWVTGGRWAAQQFFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRLATDVSA RWRNTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFETHSLALQQTMYEMGRAVIETHPEIDEIKMSLPNKHFLVDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIEATIQREGSRAD	13

5	escisión parcial de Met N- terminal) y Cys en la posición 11 (en otra realización, SGD puede ser RGD)		
10	Construcción de uricasa C1 modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> (variante 2 - truncamiento N-terminal) con etiqueta eliminada, eliminación de Thr2-Ala5 y Cys en la posición 11, se espera una retención completa de la Met N- terminal (en otra realización,	METSTGCKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQDLNV TSQLSGDFEAAHTAGDNAHVVATDTQKNTVYAFARDGFAT TEEFLLRLGKHFTGEGFDWVTGGRWAAQQFFWDRINDHHA FSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTGSEFH GFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRYNTVEVDFDAVYA SVRGLLLKAFAETHSLALQQTM YEMGRAVIETHPEIDEIK MSLPNKH HFLVDLQPF GQDNPNEVFYAADRPYGLIEATIQ REGSRAD	14
15			
20			
25			
30			

	SGD puede ser RGD)		
5	Construcción de uricasa C1 modificada de <i>Arthrobacter</i> <i>globiformis</i> (variante 3 - truncamiento N-terminal) con etiqueta eliminada, eliminación de Thr2-Thr9, Cys en la posición 11, se espera un procesamiento de la Met N- terminal (en otra realización, SGD puede ser RGD)	MGCKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQDLNVTSQL SGDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKNTVYAFARDGFATTEEF LLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRINDHDHAFSRN KSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTGSEFHGFPR DKYTTLQETTDRI LATDVSARWRYNTVEVDFDAVYASVRG LLLKAFAETHSLALQQTMYEMGRAVIETHPEIDEIKMSLP NKHHLVLDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIEATIQREGS RAD	15
25	Uricasa con SGD modificada de <i>Arthrobacter</i> <i>globiformis</i> y sitios disponibles	mgshhhhhhgarqTATAETSTGCKVVLGQNQYGKAEVRLV KVTRCTARHEIQDLNVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHV VATD TQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRW AAQQFFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGCEQAIVA GIEGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSA RWRYNTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFAETHSLALQQTMYE	16

5	para PEGilación en T11C, N33C, S142C, etiqueta His N-terminal opcional y enlazador corto opcional, ambos en minúsculas (en otra realización, puede colocarse un sitio de PEGilación adicional en N119C (no mostrado aquí y/o SGD puede ser RGD)	MGRAVIETHPEIDEIKMSLPNKHFFLVLDLQPFQDNPNEV FYAADRPYGLIEATIQREGSRAD	
25	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> , truncada en NH2 terminal, SGD, sitios disponibles	mgshhhhhhgarqTATAETSTGCKVVLGQNQYGKAEVRLV KVTRCTARHEIQDLNVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHV VATD TQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGEGFDWVTGGRW AAQQFFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVA GIEGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSA RWRYNTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFAETHSLALQQTM YE MGRAVIETHPEIDEIKMSLPNKHFFLVLDLQPFQDNPNEV FYAADRPYGLIEATIQREGSRAD	17

5	para PEGilación en T11C y N33C 2-Cys (SGD His C2) con etiqueta His N-terminal opcional y enlazador corto opcional, ambos en minúsculas (en otra realización, SGD puede ser RGD)		
20	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter</i> <i>globiformis</i> (truncamiento C-terminal con SGD) (en otra realización, SGD puede ser RGD)	MATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQD LNVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKNTVYAFARDG FATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRINDH DHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTGS EFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRYNTVEVDFDA VYASVRGLLLKAFETHSLALQQTM YEMGRAVIETHPEID EIKMSLPNKH HFLVDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIEA TIQREGSRAD	18
30	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter</i>	ATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQDL NVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKNTVYAFARDGF ATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRINDHD	19

5 <i>globiformis</i> (forma procesada - Met escindida en N- terminal, SGD y truncamiento C-terminal) 10 (en otra realización, SGD puede ser RGD)	HAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTGSE FHGFPRDKYTTLQETTDRLATDVSARWRYNTVEVDFDAV YASVRGLLLKAFETHSLALQQTMYEMGRAVIETHPEIDE IKMSLPNKHFFLVLDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIEAT IQREGSRAD	
15 Uricasa modificada de <i>Arthrobacter</i> <i>globiformis</i> (contiene etiqueta His 20 N-terminal opcional y enlazador corto opcional, 25 ambos en minúsculas; contiene SGD en lugar de RGD) 30 (truncamiento C-terminal	mgshhhhhhgarqTATAETSTGTVVLGQNQYGKAEVRLV KVTRNTARHEIQDLNVTSQLSGDFEAAHTAGDNAHVVDATD TQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRW AAQQFFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVA GIEGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRLATDVSA RWRYNTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFETHSLALQQTMYE MGRAVIETHPEIDEIKMSLPNKHFFLVLDLQPFQDNPNEV FYAADRPYGLIEATIQREGSRAD	20

	con etiqueta His y SGD)		
5	Uricasa modificada de Arthrobacter globiformis (contiene etiqueta His N-terminal opcional y enlazador corto opcional, ambos en minúsculas) (truncamiento C-terminal con etiqueta His)	mgshhhhhhgarqTATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLV KVTRNTARHEIQDLNVTSQLRGDFEAAHTAGDNAHVVATD TQKNTVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRW AAQQFFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVA GIEGLTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRLATDVSA RWRYNTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFAETHSLALQQTMYE MGRAVIETHPEIDEIKMSLPNKHFLVDLQPFQDNPNEV FYAADRPYGLIEATIQREGSRAD	21
20	Uricasa modificada de Arthrobacter globiformis (0 cisteínas) (truncamiento de los 11 aminoácidos C-terminales para eliminar la Cys) (truncamiento	MTATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQ DLNVTSQLRGDFEAAHTAGDNAHVVATDTQKNTVYAFARD GFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRIND HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTG SEFHGFPRDKYTTLQETTDRLATDVSA RWRYNTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFAETHSLALQQTMYE MGRAVIETHPEIDEIKMSLPNKHFLVDLQPFQDNPNEV FYAADRPYGLIEATIQREGSRAD	22

5	C-term) (en otra realización, RGD puede ser SGD)		
10	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> (0 cisteínas) (variantes de RGD, truncamiento de los 11 aminoácidos C-terminales para eliminar la Cys) (truncamiento C-term) (en otra realización, RGD puede ser SGD)	MTATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQ DLNVTSQLXaa ₁ Xaa ₂ Xaa ₃ FEAAHTAGDNAHV VATDTQKN TVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQ FFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEG LTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRY NTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFETHSLALQQTM YEMGRA VIETHPEIDEIKMSLPNKHFLVDLQPFQDNPNEVFYAA DRPYGLIEATI QREGSRAD en donde Xaa ₁ es R o cualquier aminoácido natural, a excepción de C; Xaa ₂ es G o cualquier aminoácido natural, a excepción de C Xaa ₃ es D o cualquier aminoácido natural, a excepción de C.	23
25	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> (0 cisteínas) (truncamiento de los aa C-	MTATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQ DLNVTSQLRGDFEAAHTAGDNAHV VATDTQKN TVYAFARD GFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQ FFWDRIND HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTG SEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRYNTVEVDFD AVYASVRGLLLKAFETHSLALQQTM YEMGRAVIETHPEI	24

	terminales para eliminar la cisteína)	DEIKMSLPNKHFLVLDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIE ATIQREGSRADHPIWSNIAGF	
5	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> (0 cisteínas) (variantes de RGD, truncamiento de los aa C- terminales para eliminar la cisteína)	MTATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQ DLNVTSQLXaa ₁ Xaa ₂ Xaa ₃ FEAAHTAGDNAHV VATDTQKN TVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQ FFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEG LTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRY NTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFETHSLALQQTM YEMGRA VIETHPEIDEIKMSLPNKHFLVLDLQPFQDNPNEVFYAA DRPYGLIEATIQREGSRADHPIWSNIAGF en donde Xaa ₁ es R o cualquier aminoácido natural, a excepción de C; Xaa ₂ es G o cualquier aminoácido natural, a excepción de C Xaa ₃ es D o cualquier aminoácido natural, a excepción de C.	25
20	Uricasa modificada de <i>Arthrobacter globiformis</i> (variantes de RGD) (contiene los 11 aminoácidos C-terminales)	MTATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQ DLNVTSQLXaa ₁ Xaa ₂ Xaa ₃ FEAAHTAGDNAHV VATDTQKN TVYAFARDGFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQ FFWDRINDHDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEG LTVLKSTGSEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRY NTVEVDFDAVYASVRGLLLKAFETHSLALQQTM YEMGRA VIETHPEIDEIKMSLPNKHFLVLDLQPFQDNPNEVFYAA DRPYGLIEATIQREGSRADHPIWSNIAGFC en donde Xaa ₁ es R o cualquier aminoácido natural; Xaa ₂ es G o cualquier aminoácido natural; Xaa ₃ es D o cualquier aminoácido natural.	26
25			
30			

5 11 aminoácidos C-terminales) (en otra realización, RGD puede ser SGD)	Uricasa de <i>Arthrobacter globiformis</i> (ts) (contiene los 11 aminoácidos C-terminales) (en otra realización, RGD puede ser SGD)	MTATAETSTGTKVVLGQNQYGKAEVRLVKVTRNTARHEIQ DLNVTSQLRGDFEAAHTAGDNAHVVATDTQKNTVYAFARD GFATTEEFLLRLGKHFTGFDWVTGGRWAAQQFFWDRIND HDHAFSRNKSEVRTAVLEISGSEQAIVAGIEGLTVLKSTG SEFHGFPRDKYTTLQETTDRI LATDVSARWRYNTVEVDFD AVYASVRGLLLKAFETHSLALQQTM YEMGRAVIETHPEI DEIKMSLPNKHHLVLDLQPFQDNPNEVFYAADRPYGLIE ATIQREGSRADHPIWSNIAGFC	27
15 1 cisteína, grampositiva, radiofila termófila 20	Uricasa de <i>Deinococcus geothermalis</i> , 1 cisteína, grampositiva, radiofila termófila	MTQTQQNQPKVKARLGANNYGKAEVNLMKVKRDSEHEI RELQVRVALIGDFAAAHEQGDNTDLLATDTVRNTIYGLAK EGFQASPEAFGKELISHFVTTGPKVTGGFMEFTEYLWERI QVGGEHGHNAFVRQMPQRTGRVESEDGKTFKITSGLQONLY VLKTTESGWANYLLNERFTTLPETHERLMASFVTAKWEYN EDQVDYDDVWPRVYRQLQETFTDHYSPLQRTLFLMGQAV LTRCPEMSRIWLQMPNKHHLQYNLERFGLDNNLEIFHVDP EPYGLMEAWVERA	28
25 2 cisteínas), es una bacteria extremófila	Uricasa de <i>Deinococcus radiodurans</i> (2 cisteínas), es una bacteria extremófila	MMTGTQQPGTQPKVKVRLGENNYGKAEVQLMKIKRGTPRH ELREAKVRVAMYGDFAAHSEGDNLDLVATDTVRNTVYGL AKEGFESSIEEFGKELLTHFVKVGPRVTGGFAEFTEHLWE RVQTPAQPPQGHDAFVRQMPKRTARVETQDGRRTVTSGI EELYVLKTTESGWENYLLDERFTTLPETHDRVMATFVTAK WEYAVESCDYDAVWERVYRQIQHTFTDHYSPLQRTLILM GEAVLSVCPEISRIWFQMPNKHHLVYNLGRFGLENNNEIL HVDPEPYGLMEAWVERAE	29
30	Uricasa de <i>Granulicella</i>	MAELTDKFEIVANRYGKSKVRLLKVTRAEGRSVDHEWTV QVLLRGDFETAHTVGDNSKIVTTDTMKNTVYSLARWSSAT TMEEF AEELIEHLLRRNEQVSSVRVHIEAALWKRLTVDGK	30

5	<i>tundricola</i> (1 cisteína)	EHPDTFMRGSNEVQTATVEQARAGEKKFIAGFANLQLLKT ANSASFSGFQRDELTTLPETRDRVFGTAVDAKWYSGPVEF AAMRKAAREVMLKVFADHMSESVQHTLYAMADAALAEVAE ITEIELAMPNKHCLLVDSLKFGQDNPNQIFVPTDEPHGYI EARVRRK	
10	Uricasa de la bacteria ácida <i>Solibacter usitatus</i> (6 cisteínas)	MERFASGWKQNYYGKGDVIVYRLNRDGVVPQGCCPVFGAN VKMLLYGDAFWPTYTTGDNTNLVATDSMKNFIQRETCNFT GYDLESYCDFLARKFMATYPHTAGIQLSARQAPYSGVAEG KVAFAPSGPDVATACVELRRNGEALESVEASSGIHGFRLL RLGGSASFQGFRLDQYTTLPDIHNRPLHMWLDLEWHYIAPE AALTGGEVTAQVRRLVHEGFHSFESGSIQQVIYQLGTKML ADIPTISEVRLEANNRTWDTIVEQGDRLGVYTDARPPYGC LGLTLRR	31
15	Uricasa de la acidobacteria <i>Terriglobus saanensis</i> (solo 2 cisteínas y 20 corta de 280 aa)	MAKLIDSRYGKARVRVMKLDRSQPQHQLLEWTVRVLLEGD FETAHTVGDNSNILPTDTMKNTVYSRAKESKAETPEEFAI ELAEFLGRNPQVHTVEVKIETAMWKRLVVDGKPHGSSFM RGSDELGTVLHHATRETKTMVCGVENMVILKSQNSSFEGY IQDDLTTLKPTADRLFATAMTADWDYTDGGSFAARREAI REAMLKAFAEHDSKSVQQTLYAMAEAAAMAAPAVNRVHMV MPNKHCLLVDLKHFGQENNEIFVPTEDPHGYIEATVVRE	32
25	Uricasa de <i>Kyrpidia tusciae</i>	MIMTGTMSTGTDQRTMYYGKGDVWVYRSYAKPLRGLGQIP ESAFAGRPNVIFGMNVQMAVEGEAFLPSFTEGDNSMVVAT DSMKNFILRQAGAFEGATAEGFLEFVAGKFLEKYAHVSGV RLFGRQIPFDELVPVEQEGFRPGELVFRYSMNEYPTAFVA VRRGPEGPVVVEHAGGVAGLKLIIKIGSSFYGYIHDEYTT LPEAQDRPLFIYLYIKWKYEHPEDFRAEHPERYVAAEQVR DIAHTVFHELTSPSIQNLIYHIGRRVLTRFPQLLEVSFEA NNRTWETVLEEVEDLAGKRAEAKVYTEPRPPYGFQGFTVT 30 RKDLEE	33

5	Secuencia consenso de uricasa procedente del alineamiento	MTATAETSTGTKIVLGQNQYGKAEVRVVKITRDGDTHHIK DLNVSVALSGDMDAVHLSGDNANVLPTDTQKNTVYAFKE HGIGSAEQFGIRLARHFVTSQEPIHGARIRIEEYAWERIE TSHDHSFVRKGQETRTAQITYDGDWEVVSGLKDLTVLNST GSEFWGYVKDKYTTLPEYDRILATDVSARWRYNWTDQDP MPDWKSYEQVRKHLLEAFAETYSLSLQQTLYQMGSRVLE ARPEIDEIRFSLPNKHHFLVDLEPFGLDNDNEVYFAADRP YGLIEATVLRDGAEPRI PVDMTNL	34
---	--	--	----

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10 La urato oxidasa (uricasa, EC 1.7.3.3, uox) es una
enzima homotetramérica compuesta de cuatro subunidades
idénticas de 34 kDa. La enzima es responsable de la etapa
inicial que comienza una serie de reacciones que convierten
el ácido úrico en un producto más soluble y fácilmente
15 excretado, la alantoína. Expuesto brevemente, la uricasa
cataliza la reacción del ácido úrico (UA) con O₂ y H₂O para
formar 5-hidroxi-isourato (HIU) y la liberación de H₂O₂. El
HIU es un producto inestable que sufre hidrólisis no
enzimática dando **2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-**
20 **ureidoimidazolina** (OHCU) u después se descarboxila
espontáneamente para formar alantoína racémica. En las
especies que contienen una uricasa funcional, se expresan
dos enzimas adicionales (HIU hidrolasa y OHCU
descarboxilasa), que catalizan esta reacción más rápidamente
25 para generar (s)-alantoína. Puede encontrarse una uricasa
funcional en una gran variedad de organismos: arqueas,
bacterias y eucariotas. Sin embargo, en seres humanos y
algunos primates no se expresa la uricasa. La falta de
expresión de uricasa se atribuye a tres mutaciones genéticas:
30 una mutación de sentido perdido en el codón 33 (que tiene
impacto en orangutanes, gorilas, chimpancés y seres

humanos), otra mutación de sentido perdido en el codón 187 (que tiene impacto en chimpancés y seres humanos) y una mutación en el sitio aceptor de corte y empalme en el intrón 2 (que tiene impacto en chimpancés y seres humanos). Se ha planteado una serie de hipótesis para explicar la eliminación evolutiva de la actividad de uricasa y el aumento proporcional en los niveles de UA. Estas incluyen la idea de que un aumento en los niveles de UA (un potente antioxidante y depurador de radicales oxígeno) da lugar a una reducción en las enfermedades asociadas con radicales libres de oxígeno (cáncer) y un aumento de la esperanza de vida. Además, el hecho de que el UA se asemeje estructuralmente a neuroestimulantes, tales como la cafeína y la teobromina, ha dado pie a especular con que los niveles aumentados de UA pueden haber dado lugar a un salto intelectual/cognitivo. Finalmente, se ha sugerido que un aumento en el ácido úrico ocasionó y ayudó a mantener los niveles de presión sanguínea necesitados por los homínidos mientras que consumían una dieta vegetariana muy baja en sal (hace 1-2 millones de años). Independientemente de la ventaja evolutiva que pueda haber producido el resultado, la ausencia de expresión de uricasa en seres humanos ha dado como resultado niveles sistémicos de UA más elevados y en algunos casos, afecciones hiperuricémicas, tales como gota y síndrome de lisis tumoral.

La gota afecta a más de 8 millones de estadounidenses y es una artritis inflamatoria dolorosa y debilitante definida como niveles séricos de UA que superan la solubilidad del UA en los fluidos corporales. Los niveles séricos de UA mayores de 6.8 mg/dl pueden dar como resultado la formación de cristales de UA en los tejidos, provocando una respuesta inflamatoria aguda. Los ataques agudos

(brotes) de artritis gotosa y la inflamación crónica que deposita cristales de UA en tejidos fibrosos es dolorosa y debilitante. El daño causado por la gota puede ocasionar un dolor crónico, discapacidad funcional en el trabajo y en el hogar y una calidad de vida relacionada con la salud comprometida (Wertheimer, et al., anteriormente citado).

El síndrome de lisis tumoral (TLS) se produce normalmente en pacientes con tumores voluminosos, que proliferan rápidamente y sensibles al tratamiento. El TLS es una complicación potencialmente letal del tratamiento contra el cáncer que surge cuando se eliminan rápidamente grandes cantidades de células cancerosas y liberan productos de descomposición. Los ácidos nucleicos púricos se metabolizan en UA, dando lugar a un drástico aumento en el UA sistémico. En los casos graves, se forman cristales de UA en los túbulos renales, provocando nefropatía por UA (insuficiencia renal aguda). El TLS se ha comunicado entre una gran variedad de tipos de tumor (Ikeda, et al., Drugs, Diseases & Procedures, Medscape (3 de diciembre de 2014)).

Existe una serie de mecanismos de acción para controlar la hiperuricemia. Desde la década de 1960 se han prescrito clínicamente inhibidores de xantina oxidasa (una enzima que convierte la xantina en UA). El más común de estos, el alopurinol, se usa por más de 2 millones de pacientes de gota en los Estados Unidos. Sin embargo, muchos pacientes continúan teniendo niveles de UA por encima de los aceptables, lo que sugiere que la hiperuricemia no es solo un problema de producción de UA. En estudios más recientes, se ha demostrado que pueden controlarse los niveles de UA en pacientes inhibiendo la URAT1, una enzima responsable del reciclado del UA. Los fármacos uricosúricos (moléculas que

inhiben a la URAT1) actúan sobre los túbulos proximales en los riñones, donde interfieren con la absorción de UA desde el riñón de vuelta a la sangre. Los fármacos uricosúricos, tales como la benzbromarona y el lesinurad, promueven la excreción del UA. Por último, se ha demostrado que el tratamiento con uricasa reduce rápidamente los niveles de UA en el torrente sanguíneo periférico mediante la oxidación del UA en un producto más soluble, la alantoína. Hay dos uricasas aprobadas para uso clínico, Krystexxa® y Elitek®.

Krystexxa® (pegloticasa) es una uricasa PEGilada aprobada para el tratamiento de la gota crónica en pacientes adultos refractarios a la terapia convencional. Krystexxa® es una proteína quimérica de la secuencia de uricasa de cerdo y de babuino que está hiper-PEGilada (~440 kDa de PEG por tetramero). Krystexxa® se administra mediante una infusión intravenosa (IV) durante un periodo de 2 horas. Durante los ensayos clínicos de fase 3, el 26% de los pacientes experimentaron reacciones relacionadas con la infusión y un 6.5% de los pacientes tuvo reacciones caracterizadas como anafilaxia (Baraf et al., *Arthritis Res Ther.*, 15(5):R137 (2013) y Strand et al., *J Rheumatol.*, 39(7): 1450-1457 (2012). Krystexxa® contiene un recuadro negro que avisa de las reacciones anafilácticas y a la infusión (véase la información de prescripción de Krystexxa®). Como resultado, normalmente se trata previamente a los pacientes con antihistamínicos o corticoesteroides antes de la infusión IV y se les monitoriza después de la infusión. La monitorización antes del tratamiento, durante la infusión IV y después de la infusión se produce durante aproximadamente 6-8 horas en una clínica de IV. La frecuencia del tratamiento es de una vez cada dos semanas. En ensayos clínicos de fase 3, un gran

número de pacientes desarrollaron anticuerpos anti-fármaco (~92%) y aproximadamente un 40% de los pacientes experimentaron un criterio de valoración primario positivo (reducción de los niveles de UA por debajo de 6 mg/dl durante 5 6 meses). A pesar de las reacciones a la unisón, la respuesta anti-fármaco y la inconveniente pauta posológica, se han observado resultados dramáticos en los ensayos clínicos y casos de estudio, demostrando la reducción o disolución de los tofos (depósitos de cristales de ácido úrico). Las fotos 10 digitales de pacientes con gota tofácea (manos o pies) antes y después de múltiples tratamientos con Krystexxa® han demostrado el potencial de una uricasa para redissolver los tofos y la carga de UA.

Elitek® (rasburicasa) es una uricasa de *Aspergillus* 15 *flavus* recombinante modificada que está indicado para la gestión inicial de los niveles plasmáticos de ácido úrico en pacientes pediátricos y adultos con leucemia, linfoma y neoplasias malignas de tumores sólidos que están recibiendo un tratamiento contra el cáncer que se espera pueda dar como 20 resultado la lisis del tumor y la consiguiente elevación del ácido úrico en plasma. Elitek® tiene una semivida de 16-21 horas en seres humanos y ha de dosificarse diariamente mediante infusión IV. De manera similar a Krystexxa®, Elitek® tiene también un recuadro negro que avisa del riesgo de 25 anafilaxia y hemólisis (especialmente en pacientes con deficiencia de G6PD). La frecuencia de dosificación (diaria), la ruta de administración (IV), la inmunogenicidad y el coste hacen que el tratamiento con Elitek® sea una

30 En vista de lo anterior, existe la necesidad en la técnica de desarrollar uricasas mejoradas que sean más

seguras, más convenientes y menos inmunogénicas que las uricasas que se encuentran actualmente disponibles. La invención descrita en el presente documento satisface esta necesidad.

5 **I. Secuencias de uricasa mejoradas**

En algunos aspectos, el presente documento abarca una serie de diferentes secuencias de uricasa. La uricasa descrita en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un
10 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34, en donde la secuencia no es una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-33. En una realización, la uricasa tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26 o 34. En otra
15 realización, la uricasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34, en donde la secuencia de uricasa no es una secuencia de uricasa de origen natural.

20 En algunas realizaciones, la uricasa es al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 2.

25 En algunas realizaciones, la uricasa es una secuencia que difiere de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34 en de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 aminoácidos (por ejemplo, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,
30 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos). Por ejemplo, la uricasa puede diferir respecto de la SEQ ID NO:

1 o la SEQ ID NO: 2 en aproximadamente 1 a aproximadamente 35 aminoácidos.

En algunos aspectos, la uricasa es una secuencia que difiere de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34 en de
5 aproximadamente 1 a aproximadamente 14 aminoácidos (por ejemplo, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 aminoácidos). Por ejemplo, la uricasa puede diferir respecto de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 en aproximadamente 1 a aproximadamente 14 aminoácidos. En
10 determinados aspectos, la uricasa es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la uricasa es una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-26 o 34. La uricasa puede "diferir respecto de" una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-34 al comprender una adición, eliminación o sustitución en la
15 secuencia de aminoácidos. Los métodos para preparar adiciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos se conocen bien en la técnica.

En algunas realizaciones, la uricasa comprende un truncamiento en el extremo N- y/o C-terminal, en donde la
20 uricasa truncada conserva su actividad enzimática. En una realización, se truncan de aproximadamente 1-15 (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15) aminoácidos del extremo N-terminal. En otra realización, se truncan de aproximadamente 1-20 (por
25 ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) aminoácidos del extremo C-terminal. En otra realización más, se truncan aproximadamente 1-15 (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15) aminoácidos del
30 extremo N-terminal y se truncan aproximadamente 1-20 (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) aminoácidos del extremo C-terminal. EN una realización, la uricasa es una uricasa de una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-34, en donde la uricasa comprende un truncamiento en el extremo N- y/o C-terminal, como se ha descrito anteriormente, en donde la uricasa truncada conserva la actividad enzimática. En una realización adicional, la uricasa truncada anteriormente mencionada contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14) cambios de aminoácidos adicionales (por ejemplo, adiciones, eliminaciones o sustituciones). Se conocen en la técnica métodos para evaluar la actividad enzimática de una uricasa (por ejemplo, ensayos de formación de producto y agotamiento de sustrato) y puede usarse cualquier método adecuado conocido en la técnica para medir la actividad enzimática de las uricasas descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, la uricasa es al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las SEQ ID NO: 27-33. En algunos aspectos, la uricasa difiere de una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-33 en de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 aminoácidos (por ejemplo, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos).

En una realización, la uricasa es al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los números de referencia del NCBI D0VWQ1, WP_011525965, WP_010887803, WP_013581210.1, WP_011682147, WP_013569963 o ADG06709. En algunos aspectos,

la uricasa difiere de uno cualquiera de los números de referencia del NCBI D0VWQ1, WP_011525965, WP_010887803, WP_013581210.1, WP_011682147, WP_013569963 o ADG06709 en de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 aminoácidos (por ejemplo, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos).

En algunas realizaciones, la uricasa es aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 27. En algunos aspectos, la uricasa difiere de la SEQ ID NO: 27 en de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 aminoácidos (por ejemplo, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos).

En algunas realizaciones, la uricasa es al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 28. En algunos aspectos, la uricasa difiere de la SEQ ID NO: 28 en de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 aminoácidos (por ejemplo, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos).

Se sabe de sobra en la técnica que el procesado de proteínas expresadas puede dar como resultado la escisión del resto de metionina N-terminal, una modificación co-traducciona que puede producirse en hospedadores tanto procariotas como eucariotas (Sherman, et al., *Bioessays*, 3: 27-31 (1985)). Este procesamiento, que se efectúa enzimática por la metionina aminopeptidasa, depende de la identidad del resto de aminoácido adyacente al extremo amino-terminal. La

metionina se elimina de manera eficaz de las proteínas cuando el segundo resto es glicina o un aminoácido con una cadena lateral pequeña, tal como alanina (Hirel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 8247-8251 (1989) y Huang et al., *Biochemistry*, 26: 8242-8246 (1987)). Sin embargo, la metionina N-terminal no se escinde cuando el resto adyacente es un aminoácido con una cadena lateral grande. Pueden producirse grados variables de escisión cuando el segundo resto es un aminoácido de tamaño intermedio, tal como treonina o asparagina (Hirel et al., anteriormente citado). Por lo tanto, en algunas realizaciones, se escinde la metionina en la posición 1 de la uricasa, de tal forma que la forma procesada de la uricasa no contiene una metionina en la posición 1. En otra realización, la uricasa conserva la metionina en la posición 1. Para prevenir la escisión de la metionina en la posición 1, la uricasa puede comprender una o más sustituciones o eliminaciones de aminoácidos después de la metionina N-terminal. Dichas sustituciones o eliminaciones se diseñarán para dar como resultado que un aminoácido grande se encuentre en la segunda posición dentro de una secuencia. Los ejemplos de aminoácidos grandes son glutamina, ácido glutámico, fenilalanina, metionina, lisina, tirosina, triptófano y arginina. Por ejemplo, en algunos aspectos, la uricasa puede no comprender una treonina en la posición 2 y la posición 2 o bien se elimina o bien se sustituye, en donde la numeración es en relación con la SEQ ID NO: 27. En algunas realizaciones, se ha modificado la secuencia de la uricasa para que comprenda una alanina u otro aminoácido pequeño en la posición 2 (es decir, el aminoácido próximo a la metionina N-terminal). Los ejemplos de aminoácidos pequeños son glicina, alanina, serina,

prolina, treonina, valina y cisteína, pero se da preferencia a los más pequeños de estos (glicina y alanina) para limitar la posibilidad de procesamiento parcial (Hirel et al., anteriormente citado).

5 En algunas realizaciones, la secuencia de uricasa se conjuga o fusiona recombinantemente con un polímero sintético o biosintético para prolongar la semivida de la proteína y/o para mitigar la inmunogenicidad. Los polímeros ejemplares que pueden usarse en la invención son
10 polietilenglicol (PEG), polímeros de fosforilcolina (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2013/0034517), polímeros de péptidos repetidos, tales como secuencias "PAS" o "X-TEN" (véase, por ejemplo, Schlapschy et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 26: 489-
15 501 (2013), Schellenberger et al., *Nat. Biotechnol.*, 27: 1186-1190 (2009), y Podust et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 26: 743-753 (2013)) o polímeros a base de carbohidratos, tales como heparosano (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2014/060397) o
20 hidroxietilalmidón (véase, por ejemplo, el documento EP 2270036). En otras realizaciones, la secuencia de uricasa puede fusionarse recombinantemente con polipéptidos que prolongan la semivida en circulación reduciendo la tasa de eliminación renal. Dichos compañeros de fusión se conocen
25 bien en la técnica e incluyen agentes que se unen directamente al receptor de Fc neonatal (FcRn) de un modo dependiente del pH (por ejemplo, la región Fc de las inmunoglobulinas o albúmina sérica) o como alternativa, se unen a un resto de unión a FcRn de origen natural (por
30 ejemplo, polipéptidos que se unen a albúmina sérica). En otra realización, la secuencia de uricasa puede conjugarse

o fusionarse recombinantemente a una o más repeticiones de un fragmento peptídico C-terminal procedente de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 6,225,449).

5 En otras realizaciones, se conjuga un polímero sintético o biosintético al extremo N- y/o C-terminal de la uricasa para prolongar la semivida de la proteína y/o para mitigar la inmunogenicidad.

 En algunas realizaciones, se modifica la secuencia de uricasa para crear 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) sitios en la superficie accesibles para la conjugación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se modifica la secuencia de uricasa para que contenga 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos de cisteína accesibles en la superficie a los que puede conjugarse un polímero (por ejemplo, PEG). En algunas realizaciones, una secuencia de uricasa de origen natural que no contiene ninguna cisteína o que contiene únicamente unas pocas cisteínas proporciona una secuencia inicial beneficiosa, de tal forma que pueden insertarse las cisteínas en las ubicaciones de superficie accesibles adecuadas. En otras realizaciones, se modifica la secuencia de uricasa para que contenga 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos de origen no natural accesibles en la superficie a los que puede conjugarse un polímero.

25 En algunas realizaciones, se modifica una secuencia de uricasa de origen natural para mutar algunas o todas las cisteínas existentes (mediante eliminación y/o sustitución) con aminoácidos alternativos. En algunas realizaciones, se introducen nuevas cisteínas en ubicaciones deseadas (mediante adición y/o sustitución), para posibilitar la conjugación de sitio específico de los polímeros o

polipéptidos que pueden modificar el comportamiento farmacocinético. En una realización, la selección de un aminoácido adecuado para la sustitución de Cys está guiada por el alineamiento de la uricasa de interés con otras secuencias de uricasa para determinar la diversidad de aminoácidos naturales en la posición equivalente entre todas las uricasas. Después, se selecciona un aminoácido distinto de cisteína basándose en su prevalencia en la posición de interés entre las otras uricasas. En otra realización, la selección de un aminoácido adecuado para la sustitución de Cys está guiada por el análisis de la estructura cristalina para esa uricasa particular para determinar qué restos de aminoácidos están accesibles en la superficie. Después, se seleccionan uno o más aminoácidos accesibles en la superficie y se modifican a cisteína. En algunos casos, las cisteínas en la secuencia de uricasa modificada final se ubican en posiciones accesibles de la superficie, de tal forma que pueden PEGilarse las cisteínas.

En algunas realizaciones, la uricasa comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 cisteínas, específicamente, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 cisteínas. En una realización, la uricasa comprende aproximadamente 2 cisteínas.

En determinadas realizaciones, la uricasa comprende un resto de PEG unido a los restos de cisteína. El control sobre el número y la ubicación de los restos de cisteína permite controlar el número de sitios de unión a PEG y las propiedades óptimas del conjugado resultante, incluyendo atributos biofísicos y la actividad enzimática.

El polietilenglicol (PEG) es un compuesto de poliéter con la estructura $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$. Los reactivos PEG usados

con más frecuencia para su conjugación a proteínas son derivados de monometoxi poli(etilenglicol) que tienen la estructura $\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n\text{-X}$, en donde X contiene un enlazador y grupo funcional reactivo lineal (PEG lineal). En algunos casos, X puede contener un elemento de ramificación, de tal forma que el reactivo de PEG contiene un grupo funcional reactivo y más de una cadena polimérica de PEG (PEG ramificado) o más de un grupo funcional reactivo y cadenas de polímero de PEG (PEG ahorquillado). Los reactivos de PEG pueden incluir aproximadamente 5, 10, 20, 40, 60 y 80 kDa en total de polímero de PEG.

En algunas realizaciones, pueden usarse PEG reactivos con tiol para que reaccionen con el grupo tiol en al menos una cisteína. Por ejemplo, puede usarse PEG-maleimida, así como PEG-ortopiridil-disulfuro, PEG-vinilsulfona y PEG-yodoacetamida. En otras realizaciones, los PEG reactivos con tiol tienen una estructura lineal o ramificada con un solo resto tiol reactivo o puede tener una estructura ahorquillada con dos o más grupos reactivos por cada molécula de PEG.

Por lo tanto, se conocen una diversidad de estrategias y puede usarse cualquier método adecuado conocido en la técnica para PEGilar las cisteínas en la uricasa.

En algunas realizaciones, la uricasa comprende una cisteína en al menos una de las siguientes posiciones: 11C, 33C, 119C y 142C, en donde la numeración de la posición es en relación con la SEQ ID NO: 27.

En una realización, la uricasa comprende una cisteína en al menos una de las siguientes posiciones: 11C, 33C, 119C, 120C, 142C, 196C, 238C, 286C y 289C en donde la numeración de la posición es en relación con la SEQ ID NO: 27.

Se sabe que las integrinas, como una familia principal de receptores de adhesión celular, desempeñan un papel clave en las interacciones entre células y entre la célula y la matriz extracelular. Se ha demostrado que el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) dentro de la fibronectina media la adhesión celular a través de la unión a integrina. Se han generado péptidos sintéticos que contienen un motivo RGD específicamente para que se dirijan a alfa(v)-integrina para su internalización a través de endocitosis dependiente de integrina como potencial agente terapéutico para el cáncer. Supuestamente, un motivo de unión a integrina (RGD) podría ser problemático para un agente terapéutico que se espere que funcione en el torrente sanguíneo periférico. Por lo tanto, en determinados aspectos de la invención, la uricasa no comprende una secuencia RGD.

Los métodos para mutar aminoácidos se conocen bien en la técnica y pueden usarse dichos métodos para mutar uno o más de los aminoácidos de RGD en cualquier otro aminoácido de origen natural. En una realización, se muta la arginina en el motivo RGD en una serina, de tal forma que la uricasa contiene un SGD en lugar de un RGD. En otra realización, la arginina, la glicina y/o el ácido aspártico en el motivo RGD se muta en cualquier otro aminoácido de origen natural, de tal forma que la uricasa no contiene un motivo RGD. En una realización, se alinea una serie de secuencias de aminoácidos de uricasa usando métodos conocidos en la técnica para determinar el resto más altamente conservado en las posiciones de aminoácidos donde está presente un motivo RGD y se mutan uno o más aminoácidos presentes en el motivo DGD en el resto de aminoácido que se encuentra más conservado en esa posición de aminoácido concreta. Por ejemplo, en caso de

que la G y la D del motivo RGD estén altamente conservadas, se mutaría únicamente la R al resto de aminoácido que esté más altamente conservado en esa posición particular (por ejemplo, serina).

5 Los métodos para preparar secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de uricasa se conocen bien en la técnica, de tal forma que un experto en la materia podría preparar rápidamente una secuencia de ácido nucleico que codifique las secuencias de aminoácido de uricasa
10 divulgadas en el presente documento. Por lo tanto, en una realización, la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de uricasa divulgada en el presente documento. Se conocen y se encuentran disponibles en la técnica vectores de expresión
15 adecuados, de tal forma que la invención también abarca un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de uricasa divulgada en el presente documento. En otra realización más, la invención abarca una línea celular que comprende el vector de
20 expresión. La línea celular puede ser una línea celular eucariota o procariota. En una realización preferida, la línea celular es una línea celular procariota, tal como *E. coli*, *corynebacterium* o *Pseudomonas fluorescens*. En otra realización, la línea celular es una línea celular eucariota,
25 tal como *Saccharomyces cerevisiae*, células de insecto, etc. También pueden usarse líneas celulares de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO).

En una realización, la invención abarca una composición que comprende la uricasa descrita en el presente documento.
30 En un aspecto, la uricasa en la composición forma un tetrámero. En algunos aspectos, al menos un 93% (por ejemplo,

un 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso un 100%) de los monómeros de uricasa presentes en la composición están mono-pegilados (por ejemplo, está presente un resto de PEG en cada monómero). En algunos aspectos, al menos un 93% (por ejemplo, un 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso un 100%) de los monómeros de uricasa presentes en la composición están di-pegilados (por ejemplo, están presentes dos restos de PEG en cada monómero). En algunos aspectos, al menos un 93% (por ejemplo, un 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso un 100%) de los monómeros de uricasa presentes en la composición están tri-pegilados (por ejemplo, están presentes tres restos de PEG en cada monómero).

En otra realización, la invención abarca un modelo estadístico para determinar la eficacia de la PEGilación de una proteína oligomérica, tal como un tetramero de una proteína uricasa descrita en el presente documento. La invención también proporciona una medida estadística para derivar la funcionalización general de una proteína oligomérica a partir de los datos obtenidos de ensayos fácilmente accesibles que provocan la disociación de subunidades asociadas de manera no covalente, tal como se describen en el ejemplo 14 del presente documento.

En otra realización, la invención abarca un enfoque estadístico basado en una distribución multinomial que permite el cálculo de la conjugación general de proteína para proteínas oligoméricas cuando el tamaño y la naturaleza de la proteína o las propiedades biofísicas del conjugado no permiten el análisis en condiciones nativas.

II. Métodos de tratamiento

En algunos aspectos, la invención abarca un método para tratar a un paciente hiperuricémico, que comprende

administrar cualquiera de las uricasas descritas en el presente documento y de este modo, reducir los niveles de ácido úrico y/o la carga de cristales de UA. Los pacientes pueden tener cualquiera de una serie de afecciones que den
5 como resultado hiperuricemia. Por ejemplo, el paciente puede tener gota, tal como, pero sin limitación, gota refractaria, gota tofácea y/o alta carga de UA. A modo de otro ejemplo, el paciente puede tener o estar en riesgo de padecer síndrome de lisis tumoral.

10 En algunos aspectos del método, la uricasa puede administrarse por vía subcutánea. En otros aspectos, puede administrarse por vía intravenosa o intramuscular.

Para determinados métodos de tratamiento, el paciente puede tener un nivel de UA mayor de 6.8 mg/dl antes del
15 tratamiento y un nivel sérico de UA menor de 6.8 mg/dl después del tratamiento.

En algunas realizaciones, la uricasa o el método de tratamiento no está asociado con anafilaxia. En una realización, la uricasa o el método de tratamiento no es
20 inmunogénico.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Selección de la enzima uricasa

Se alinearon más de 200 secuencias de uricasa procedentes de bases de datos públicas que incluían uricasas
25 de mamífero, vegetales, microbianas, etc. Se seleccionaron las uricasas candidatas con secuencias disponibles en las bases de datos usando criterios propios que incluían (pero sin limitación): propiedades biológicas favorables (tales como expresión en *E. coli*, solubilidad a pH neutro, actividad
30 a pH neutro), baja identidad o similitud de secuencia con otras secuencias (diversidad), bajo contenido endógeno de

Cys y organismos que tienen propiedades interesantes que sugieren que su uricasa podría tener propiedades favorables (extremófilos, termófilos, acidófilos, etc.).

Después de este proceso, se seleccionaron las siguientes 7 secuencias candidatas para su investigación adicional: Uricasa de *Arthrobacter globiformis* (SEQ ID NO: 27), uricasa de *Deinococcus geothermalis* (SEQ ID NO: 28), uricasa de *Deinococcus radiodurans* (SEQ ID NO: 29), uricasa de *Granulicella tundricola* (SEQ ID NO: 30), uricasa de *Solibacter usitatus* (SEQ ID NO: 31), uricasa de *Terriglobus saanensis* (SEQ ID NO: 32) y uricasa de *Kyrpidia tusciae* (SEQ ID NO: 33). Además, como 8ª secuencia, se previó una secuencia consenso de uricasa a partir del alineamiento de muchas secuencias de uricasa. La secuencia consenso se representa por la SEQ ID NO: 34. Tal como se muestra en la tabla 2 a continuación, hay una gran cantidad de diversidad entre las 8 secuencias que se seleccionaron.

Tabla 2: Comparación de identidad de secuencia de uricasa

		<i>Arthrob</i>	<i>Deinoco</i>	<i>Deinoco</i>	<i>Granuli</i>	<i>Solibac</i>	<i>Terrigl</i>	<i>Kyrpi</i>
	Consens	<i>actor</i>	<i>ccus</i>	<i>ccus</i>	<i>cella</i>	<i>ter</i>	<i>obus</i>	<i>dia</i>
	o	<i>globifo</i>	<i>geother</i>	<i>radiodu</i>	<i>tundric</i>	<i>usitatus</i>	<i>saanen</i>	<i>tusci</i>
		<i>rmis</i>	<i>malis</i>	<i>rans</i>	<i>ola</i>	<i>s</i>	<i>is</i>	<i>ae</i>
20	Conse	100	61.7	44.4	44.1	36.7	28.0	28.5
25	nso							
		<i>Arthrob</i>						
		<i>actor</i>	100	41.2	43.4	42.7	29.2	27.3
		<i>globifo</i>						
		<i>rmis</i>						
30		<i>Deinoco</i>	100	75.1	36.0	23.4	34.5	22.2
		<i>ccus</i>						

	<i>geother</i>				
	<i>malis</i>				
	<i>Deinoco</i>				
	<i>ccus</i>				
5	<i>radiodu</i>	100	36.3	23.1	37.0
	<i>rans</i>				21.6
	<i>Granuli</i>				
	<i>cella</i>				
	<i>tundric</i>	100	26.4	58.4	27.1
10	<i>ola</i>				
	<i>Solibac</i>				
	<i>ter</i>				
	<i>usitatu</i>	100	21.5	43.7	
	<i>s</i>				
	<i>Terrigl</i>				
	<i>obus</i>				
15	<i>saanens</i>	100	25.6		
	<i>is</i>				
	<i>Kyrpidi</i>				
	<i>a</i>		100		
	<i>tusciae</i>				

Ejemplo 2. Paradigma de exploración

Se usó un paradigma de exploración inicial para identificar candidatos para su optimización adicional. Las 8 secuencias de uricasa descritas en el ejemplo 1 se clonaron con una etiqueta His amino-terminal y se expresaron en *E. coli*. Se evaluó el nivel de expresión de cada construcción de uricasa y en particular, la expresión soluble. Se lisaron *E. coli* que expresaban uricasa y el material soluble se separó del material insoluble (sedimento). Los lisados se separaron por SDS-PAGE y se visualizaron las proteínas mediante tinción de azul de Coomassie. Tal como se muestra en la figura 1, la mayoría de las uricasas estaban presentes

a un alto nivel en el material insoluble (P). La quimera de cerdo-babuino parece expresarse prácticamente por completo en la fracción de sedimento (P) (insoluble) (figura 1, carril 9). La expresión citosólica soluble (S) se consideró una propiedad favorable. Después, se purificaron las 8 uricasas de los lisados celulares de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad de Ni. El rendimiento de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. El tamaño de la proteína se verificó mediante espectrometría de masas y la formación de tetramero se confirmó mediante cromatografía de exclusión por tamaños y detección de dispersión de luz (véase la tabla 3 a continuación).

Tabla 3: Análisis de espectrometría de masas y de SEC-LS

	Masa predicha (kDa)	Masa monómero medida (kDa)	de Tetramero teórico (kDa)	Tetramero medido SEC-LS (kDa)	Formación por de tetramero
20	<i>Arthrobacter globiformis</i> 33.88	33.88	135.52	135.20	✓
	<i>Deinococcus geothermalis</i> 35.19	35.19	140.76	136.30	✓
	<i>Terriglobus saanensis</i> 32.69	32.69	130.76	126.80	✓
25	Consenso 35.83	35.83	143.32	141.30	✓
	<i>Deinococcus radiodurans</i> 35.58	35.58	142.32	140.40	✓
	<i>Granulicella tundricola</i> 33.60	33.60	134.40	128.00	✓
30	<i>Kyrpidia tusciae</i> 38.24	38.24	152.96	147.20	✓

<i>Solibacter</i>	33.24	33.24	132.96	137.70	✓
<i>usitatus</i>					

Se eliminaron tres uricasas de las evaluaciones posteriores basándose en sus rendimientos de expresión, solubilidad o purificación desfavorables, a saber, las de *Solibacter usitatus*, *Kyrpidia tusciae* y *Granulicella tundricola*.

Se llevaron a cabo mediciones de calorimetría de barrido diferencial para evaluar la estabilidad térmica (véase la tabla 4 a continuación). Se observaron dos transiciones para cada uricasa. Las de *Terriglobus saanensis* y *Deinococcus radiodurans* mostraron una transición térmica (TM1) que era menor de lo deseado y, como resultado, se eliminaron estas dos uricasas del grupo de candidatos. Las figuras 2A y 2B muestran dos ejemplos de los resultados de la DSC (uricasa de *Deinococcus geothermalis* (figura 2A) y uricasa de *Deinococcus radiodurans* (figura 2B)).

Tabla 4: Estabilidad de calorimetría de barrido diferencial

	TM1 (°C)	TM2 (°C)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	47.5	73.0
<i>Deinococcus geothermalis</i>	55.0	63.0
<i>Terriglobus saanensis</i>	42.0	90.0
Consenso	56.0	69.0
<i>Deinococcus radiodurans</i>	32.0	54.0

Cinco uricasas (SEQ ID NO: 27, 28, 29, 32 y 34) se evaluaron respecto de sus características de solubilidad a pH neutro y de actividad en términos de formación de producto

(H₂O₂) a pH 9.0 y 7.4. En el ensayo de formación de producto, la formación de alantoína es proporcional a la formación de H₂O₂, que está vinculada a la reacción colorimétrica catalizada por peroxidasa de rábano picante. La aparición de peróxido de hidrógeno puede medirse mediante un aumento en la absorbancia a 540 nm. Los ensayos de formación de producto fueron proporcionales a los ensayos de agotamiento en términos de actividad de uricasa. Sin embargo, los ensayos de formación de producto no permiten la monitorización continua de actividad enzimática con el paso del tiempo. Los ensayos de agotamiento de sustrato fueron mucho mejores para evaluar parámetros cinéticos, tales como V_{máx} y K_m.

El agotamiento de sustrato (UA) es otro método común para evaluar la actividad de uricasa. En el ensayo de agotamiento de sustrato, se incubaron UA y tampón fosfato durante 1 hora a la temperatura indicada (típicamente a 30°C). Después, se diluyó la uricasa a 1 µg/ml y se combinó con una curva de UA (400 µM diluido a 1:1.6 hasta 23.8 µM) en tampón de fosfato 0.1M (PB), pH 7.4. En algunos ensayos, se añadió DTT 1 mM al ensayo. La temperatura del lector de Molecular Devices se ajustó a 30°C. Se registraron mediciones de absorbancia a 292 nm cada 20 segundos durante un periodo de 10 minutos. Se calculó la velocidad de degradación de UA mediante el programa informático SoftMax Pro. Se calcularon la V_{máx} y K_m para estas uricasas (véase la tabla 5 a continuación). Los datos se muestran en la figura 3. Cada curva representa 4320 puntos de datos de actividad específica.

Tabla 5: V_{máx}, K_m y k_{cat}/K_m

Uricasa	Tampón	pH	V _{máx}	K _m
Krystexxa	PB	7.4	5.68	116.3

	<i>Arthrobacter globiformis</i>	PB	7.4	10.80	109.7
	<i>Deinococcus geothermalis</i>	PB	7.4	5.75	55.73
5	<i>Terriglobus saanensis</i>	PB	7.4	5.48	76.18
	Consenso	PB	7.4	4.09	31.76
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	PB	7.4	5.20	83.06

Basándose en parámetros cinéticos, se seleccionaron dos uricasas para su estudio posterior, la de *Deinococcus geothermalis*, que tenía una $V_{\max}$ mejorada 2 veces en relación con Krystexxa® (10.8 frente a 5.7) y la de *Arthrobacter globiformis*, que tenía una K_m 2 veces mejor en relación con Krystexxa® (55.7 frente a 116.3). Ambas uricasas tenían una k_{cat}/K_m aproximadamente 2 veces mejor en relación con Krystexxa®. Por último, aunque la uricasa consenso mostró una cinética favorable, la secuencia consenso es un 61.7% idéntica a *Arthrobacter globiformis* mientras que *Deinococcus geothermalis* y *Arthrobacter globiformis* son únicamente un 41.2% idénticas entre sí, lo que sugiere una mayor diversidad entre estas dos. El alto grado de diversidad se consideró ventajoso y por lo tanto, se seleccionaron para su investigación adicional las uricasas de *Deinococcus geothermalis* y de *Arthrobacter globiformis*.

Ejemplo 3. El modelado de la dosis sugiere que la k_{cat} es el parámetro cinético más importante

Los pacientes con gota y síndrome de lisis tumoral tienen típicamente niveles saturantes de UA (>6.8 mg/dl, 408 μ M). Por lo tanto, se barajó la hipótesis de que la $V_{\max}$ (k_{cat}) es el parámetro cinético más importante para una uricasa terapéutica. Se generaron modelos de dosis basándose en una mejora en k_{cat} (*Arthrobacter Globiformis*) o K_m

(*Deinococcus geothermalis*). Aunque el modelo predijo que una km mejorada (*Deinococcus geothermalis*) podría no proporcionar una ventaja en la cantidad o frecuencia de la dosificación, el modelo predijo que una kcat mejorada
5 (*Arthrobacter globiformis*) podría proporcionar una ventaja en términos de cantidad y frecuencia de dosificación. Por lo tanto, los resultados del modelado de la dosis sugieren que kcat es el parámetro cinético más importante para una uricasa terapéutica.

10 **Ejemplo 4. Inmunogenicidad basada en análisis de péptidos solapantes**

Ya que se ha demostrado que la inmunogenicidad es un problema clínico para las uricasas disponibles en la actualidad, se exploraron las uricasas tanto de *Arthrobacter*
15 *Globiformis* como de *Deinococcus geothermalis* con respecto a la inmunogenicidad putativa de linfocitos T mediante análisis EpiScreen™. Se analizaron las secuencias de ambas enzimas uricasas usando péptidos solapantes respecto de la presencia de epítomos de linfocitos T CD4+ (análisis de mapeo
20 de epítomos de linfocitos T EpiScreen™). Se probó un total de 93 péptidos 15-meros solapantes que abarcan la secuencia de uricasa de *Arthrobacter Globiformis* y 94 para *Deinococcus geothermalis* frente a una cohorte de 54 donantes sanos seleccionados para representar una sección transversal de
25 haplotipos HLA-DRB1. Las respuestas de linfocitos T CD4+ frente a péptidos individuales se midieron usando ensayos de proliferación de incorporación de ³H timidina y se usaron los resultados para compilar un mapa de epítomos de las dos secuencias de uricasa. Se tomó en consideración un epítomo
30 de linfocitos T putativo en caso de que 3 o más muestras donantes suscitasen un índice de estimulación de CD4 mayor

de 2.00 en el ensayo. Se identificó un total de cinco epítomos putativos de linfocitos T en la secuencia de *Arthrobacter globiformis*. En este caso, ningún péptido desencadenó una respuesta de linfocitos T en más de 4 muestras donantes (<10%). Además, la magnitud del índice de estimulación para cada péptido positivo fue relativamente baja, lo que sugiere que los péptidos pueden no ser epítomos fuertes para linfocitos T. El análisis de péptidos solapantes de linfocitos T de *Deinococcus geothermalis* sugirió la existencia de seis epítomos putativos. Algunos de estos péptidos desencadenaron una repuesta positiva de linfocitos T en más del 10% de los donantes explorados y la magnitud de la respuesta (índice de estimulación) fue mayor.

Basándose en estos resultados y la V_{máx} mejorada para *Arthrobacter globiformis*, se tomó la determinación de mejorar adicionalmente esta secuencia.

Ejemplo 5. Evolución de secuencia para uricasa de *Arthrobacter globiformis*

A. Evolución inicial de secuencia

La SEQ ID NO: 22 se modificó para añadir una etiqueta His N-terminal y un enlazador corto y para truncar los 11 aminoácidos C-terminales para eliminar la Cys C-terminal, dando como resultado la SEQ ID NO: 21.

B. Cambio de RGD a SGD

Se sabe que las integrinas, como una familia principal de receptores de adhesión celular, desempeñan un papel clave en las interacciones entre células y entre la célula y la matriz extracelular. Se ha demostrado que el tripéptido RGD dentro de la fibronectina media la adhesión celular a través del motivo de RGD. Supuestamente, un motivo de unión a integrina (RGD) podría ser problemático para un agente

terapéutico que se espere que funcione en el torrente sanguíneo periférico. La SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22 contienen en ambos casos un motivo RGD. Se llevó a cabo un ensayo de adhesión a células tumorales M21 para determinar si el RGD está accesible en la superficie. Se usaron células M21 debido a que expresan $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ integrinas. Se recubrió una placa de ELISA con un sustrato de fibronectina que contiene RGD, PBS (control negativo) o artículo de ensayo a razón de 0-100 ug/ml durante una noche en PBS. Se incubaron células M21 marcadas fluorescentemente (calceína-AM) durante 1 hora a 37°C sobre placas recubiertas. Las células no unidas se eliminaron por lavado y las células unidas se midieron según la fluorescencia total. Fab9mCys es una IgG que contiene un RGD dentro del bucle CDR-H3 y sirve como control positivo junto con la fibronectina. Los resultados se muestran en la figura 4 e ilustran que la uricasa que contiene RGD de *Arthrobacter globiformis* se une a las células M21. Estos datos sugieren que el RGD en la uricasa de *Arthrobacter globiformis* está accesible en la superficie.

Usando una base de datos de más de 200 uricasas alineadas, se determinó que la glicina (G) y el aspartato (D) en el motivo RGD eran restos altamente conservados entre las uricasas alineadas. Sin embargo, la arginina (R) no era una posición altamente conservada y el resto consenso en esta posición es una serina (S). Por lo tanto, se usó mutagénesis de sitio dirigido para reemplazar la R en el motivo RGD con una S, convirtiendo de este modo el RGD en un SGD. Esta modificación elimina el motivo de unión a integrina potencial, generando de este modo una uricasa que tiene la SEQ ID NO: 20, en donde la His y la etiqueta enlazadora en

el extremo N-terminal de la secuencia como se muestra son opcionales.

C. Evaluación de la modificación SGD

Se evaluó el impacto de la mutación RGD a SGD respecto de su impacto en la expresión, solubilidad, purificación, rendimiento, etc. Aunque la mutación SGD parece haber reducido en cierta medida la expresión soluble, pueden optimizarse las condiciones de cultivo para mejorar la expresión soluble.

La mutación RGD a SGD mostró una reducción marcada en el ensayo de unión a integrina (véase la figura 4). Se evaluaron ambas uricasas respecto de su actividad a pH 7.4. La mutación SGD parece tener una actividad comparable (véase la figura 5).

Ejemplo 6. Evaluación de la inmunogenicidad de uricasa modificada de *Arthrobacter globiformis*

A. Ensayo de inmunogenicidad LONZA (Epibase®)

Aunque la uricasa de *Arthrobacter globiformis* (SEQ ID NO: 22) tenía 5 epítomos putativos de linfocitos T basándose en el ensayo EpiScreen, ninguno de estos suscitó una fuerte respuesta en más de un 10% de las muestras donantes. Además, se sabe que los ensayos de epítomos de linfocitos T de péptidos sintéticos solapantes predicen por exceso los epítomos de MHC de clase 2. Esto se debe probablemente al hecho de que no todas las potenciales variantes peptídicas existirán en un proceso de degradación endosómica endógeno del agente terapéutico proteínico. Como resultado, se exploró *Arthrobacter globiformis* modificada (SEQ ID NO: 18) como una holoproteína en el ensayo de inmunogenicidad Epibase®. El ensayo Epibase® es un ensayo de inmunogenicidad de linfocitos T de PBMC usado para evaluar el "riesgo de

inmunogenicidad". Aunque este ensayo no puede predecir necesariamente la inmunogenicidad clínica, puede usarse para identificar proteínas de "alto riesgo" y "bajo riesgo", basándose en el número de respondedores y en la magnitud de la respuesta general (índice de estimulación). En este ensayo, se usaron muestras de PBMC de 202 donantes normales para evaluar la inmunogenicidad de linfocitos T de un candidato de uricasa en relación con un control negativo (tampón) y un control positivo (KLH). En este caso, se seleccionaron 202 donantes para representar las frecuencias de HLA-DRB1 en la población caucásica (véase la figura 6). Se descongelaron PBMC de reservas congeladas y se añadieron a una placa de 96 pocillos a una densidad de 3×10^5 células por pocillo. Se añadieron los artículos de ensayo al medio a 30ug/ml (Tampón, KLH, SEQ ID NO: 18). Se llevó a cabo cada condición de ensayo en 8 replicados (n=8). Los PBMC se incubaron durante 7 días. En el día 7, se marcaron los PBMC respecto de marcadores CD3⁺ y CD4⁺ superficiales. Las células T CD4⁺ en proliferación se identificaron por citometría de flujo. Los valores de los índices de estimulación (SI) describen la proporción de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ en los pocillos tratados con antígeno frente a los no tratados. Los valores de SI >2 se consideran positivos, lo que está soportado por un valor de p <0.05. Los análisis de inmunogenicidad de población también se determinaron calculando la magnitud de la respuesta de linfocitos T para la población completa.

Los resultados fueron los siguientes: control negativo—0/202 muestras de donantes (0%) respondieron con una SI media de población = 1.0; uricasa candidata—1/202 muestras de donantes (0.5%) respondieron con una SI media de población

= 1.03; control positivo-181/202 donantes (91%) respondieron con una SI media = 4.2. Los datos de donantes individuales se muestran en las figuras 7A-C. La figura 7A muestra que el índice de estimulación del tampón (control negativo) es 1.0 y el KLH (control positivo) tuvo una respuesta del 91% (SI>2). El SI medio total de KLH = 4.2. La figura 7B muestra el candidato de uricasa en comparación con el control de tampón. Se considera que una tasa de respuesta del 4% o menor en este ensayo es de "bajo riesgo" y la exploración histórica de otros compuestos clínicos potenciales ha producido tasas de inmunogenicidad en el intervalo del 20-25%. La figura 7C muestra que el índice de estimulación del tampón es de 1.0, el índice de estimulación de KLH es de 4.2 y el índice de estimulación de la uricasa candidata es de 1.03. Aunque este ensayo no puede predecir necesariamente la inmunogenicidad clínica, puede usarse para evaluar el riesgo de inmunogenicidad y estos datos sugieren que la uricasa evaluada tiene un "bajo riesgo" de inmunogenicidad clínica. Teniendo en consideración que la secuencia de la proteína uricasa que se ensayó es de origen microbiano (*Arthrobacter globiformis*), este es un hallazgo bastante sorprendente.

Ejemplo 7. Eliminación de la etiqueta His

La etiqueta His N-terminal se añadió al extremo N-terminal de las secuencias de uricasa para proporcionar un método eficaz para purificar las proteínas uricasas que se generaron (es decir, purificación por afinidad de Ni). Aunque la etiqueta His proporciona ventajas durante el descubrimiento, especialmente en el área de la purificación, es deseable eliminar la etiqueta His antes de la preparación de un producto farmacológico.

Ejemplo 8. Optimización del extremo N-terminal

Es de sobra conocido que cuando las proteínas se expresan en *E. coli*, puede retirarse la metionina N-terminal mediante una Met aminopeptidasa, dependiendo del segundo resto que sigue a la metionina. En caso de que se encuentre un resto pequeño en la segunda posición, normalmente se produce la escisión. En caso de que se encuentre un resto voluminoso en la segunda posición, no se produce la escisión. Mientras tanto, en caso de que el segundo resto no sea ni voluminoso ni particularmente pequeño, la Met aminopeptidasa puede funcionar escindiendo algunas Met pero no todas, generando una sustancia farmacológica heteróloga. Se generaron tres variantes N-terminales y se analizaron respecto de su expresión, solubilidad, escisión de metionina y actividad para determinar la secuencia N-terminal óptima.

La secuencia inicial para este proceso fue la SEQ ID NO: 12 y se crearon tres variantes. La SEQ ID NO: 13 (variante 1) tiene una eliminación de Thr2. La SEQ ID NO: 14 (variante 2) tiene una eliminación de Thr2-Ala5 y se espera que se conserve la Met N-terminal. La SEQ ID NO: 15 (variante 3) tiene una eliminación de Thr2-Thr9 y se espera que se procese la Met N-terminal.

Las tres variantes de uricasa N-terminales se clonaron, expresaron en *E. coli* y se purificaron. Cada construcción se expresó en la fracción soluble de manera similar a las construcciones etiquetadas con His. Debido a la falta de una etiqueta His, se desarrolló un procedimiento de purificación para estas construcciones. En resumen, esto incluyó una etapa de cromatografía de intercambio iónico Q (tampón A: PBS, pH 7.8, DTT 5mM; tampón B: 10x PBS, pH 7.2) seguido de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC). Las fracciones de la SEC se ejecutaron en SDS-PAGE y se visualizaron las

proteínas mediante tinción de azul de Coomassie. Las fracciones que contenían altos niveles de uricasa se combinaron para análisis posteriores. La figura 8A muestra le SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie procedentes de las preparaciones purificadas en relación con la construcción etiquetada con His (SGD marcado). Se observó que las variantes 1 y 3 tenían la metionina N-terminal procesada (eliminada), mientras que se observó que la variante 2 conservaba la metionina N-terminal. Todo el procesamiento pareció uniforme.

La figura 8B muestra la actividad de V1, V2 y V3. Las variantes 1 y 2 tenían una actividad considerablemente mejor que la variante 3. La variante 1 se seleccionó para su desarrollo adicional.

15 **Ejemplo 9. PEGilación específica**

La modificación de proteínas terapéuticas con polietilenglicol (PEG) puede efectuarse como una unión aleatoria a restos seleccionados de la proteína (por ejemplo, cadenas laterales de lisina) o en sitios específicos en un sitio único predeterminado. Esta última estrategia tiene la ventaja de que puede controlarse mejor la química de la conjugación y fabricarse de manera consistente, proporcionando un producto PEGilado altamente homogéneo con una bioactividad definida. Entre los métodos para la unión de sitio específico, la estrategia más ampliamente usada es el acoplamiento a restos de cisteína no emparejados y esto implica generalmente la introducción de uno o más restos de cisteína libres en la secuencia de la proteína. Los sitios para la introducción de Cys pueden seleccionarse cuidadosamente para evitar cualquier impacto negativo en la

bioactividad o las propiedades biofísicas del producto conjugado después de la modificación con PEG.

La uricasa de *Arthrobacter globiformis* descrita en la SEQ ID NO: 27 es particularmente adecuada para su modificación de sitio específico a base de cisteína ya que contiene únicamente un resto de Cys C-terminal nativo. La región C-terminal se truncó (SEQ ID NO: 18 y 20) de tal forma que la proteína no contiene Cys. Por lo tanto, la modificación de esta proteína mediante reactivos que reaccionan con Cys se confina fácilmente a sitios donde se hayan introducido los restos de Cys. Para seleccionar sitios potenciales para la introducción de restos de Cys en la secuencia de uricasa de *Arthrobacter globiformis*, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios

i. Los sitios tienen que encontrarse en una superficie de la proteína expuesta al disolvente para asegurar una reacción eficaz con un reactivo de PEG tio-reactivo;

ii. Los sitios no deben encontrarse próximos a los sitios activos de una enzima, para evitar el riesgo de impacto en su actividad; y

iii. Los sitios no deben encontrarse próximos entre sí, de tal forma que la PEGilación de un sitio no impide estéricamente la PEGilación de otros sitios.

Además, dada la naturaleza tetramérica de la uricasa, las distancias intra e inter-subunidad deben considerarse idealmente en el caso de ii. e iii.

Para calcular los parámetros relevantes para estas consideraciones, se usó una estructura tridimensional de la uricasa de *Arthrobacter globiformis*. Se ha informado acerca de un número limitado de diferentes estructuras de uricasa

y una de estas es la estructura cristalina de la uricasa de *Arthrobacter globiformis* unida al sustrato de ácido úrico (código de referencia de PDB: 2YZB) (véase la figura 10A). Se usaron las coordenadas atómicas para esta estructura para
5 calcular el siguiente conjunto de parámetros:

i. Área superficial accesible al disolvente para cada resto de aminoácido dentro de esta uricasa y

ii. Las distancias atómicas entre cada átomo C α de cadena lateral y el átomo C5 del sustrato de ácido úrico
10 (distancia C α -C5).

Para identificar las posiciones preferidas dentro de la uricasa de *Arthrobacter globiformis* para su sustitución por cisteína, se ajustaron inicialmente los siguientes criterios. En primer lugar, se identificaron restos con un
15 área superficial total accesible al disolvente $> 100\text{\AA}^2$ y con una distancia C α -C5 $> 25\text{\AA}$ (es decir, para cada C5 en las 4 moléculas de ácido úrico unidas al tetramero de uricasa). En segundo lugar, como restricción adicional, para cualquier resto de uricasa dado, han de cumplirse estos criterios en
20 las cuatro subunidades. De los 287 restos de aminoácidos en cada subunidad de uricasa, solo 9 cumplieron estos criterios. Estos fueron Thr11; Asn33; Asn119; Asp120; Ser142; Glu196; Pro238; Glu286 y Arg289. Después, se tomó en consideración el tercer criterio calculando la matriz de distancias
25 atómicas entre pares de átomos C α dentro de este grupo de restos entre las estructuras tetraméricas (véase la tabla 6). A partir de este análisis, se seleccionaron Thr11, Asn33, Glu196 y Asn119 como restos preferidos para su sustitución por cisteína, ya que sus átomos C α entre el tetramero se
30 encuentran bien separados ($\geq 19.5\text{\AA}$ para todos los pares).

5	T11-B	68.2	72	62.3	65	79.1	79	79.8	80.1	76.8
	N33-B	71.3	52.9	35.1	37.3	59.8	49.5	43.2	45	49.3
	N119-B	61.3	34.7	22	22.3	41.5	29.5	24.9	30.8	34.3
	D120-B	64.1	36.9	22.3	23.1	45.3	33.3	28.5	34.1	37.8
10	S142-B	79.8	60.6	42.8	46.5	76.4	69.6	68.3	71.2	71.5
	E196-B	79.2	49.6	29.8	33.6	68.8	59.5	58.2	63	64.3
15	P238-B	80.2	43	24.8	28.5	67.2	58	58.9	65.4	65.7
	E286-B	80.9	44.8	30.6	33.9	70.3	62.9	65.4	71.9	70.8
20	R289-B	77.7	49.2	34.4	37.8	70.7	64.3	66	71.1	69.9
25	T11-C	83.5	42.7	27.2	30.5	69.9	61.2	63.5	70.7	70.3
	N33-C	43.5	54	58.5	58.7	53.7	60.1	66.1	67.6	60.3
30	N119-C	28	58.6	59.7	60.1	48.2	55.5	58.3	56.3	49.5
	D120-C	31.2	58.8	60.1	60.6	50.3	57.5	60.7	59.3	52.4
	S142-C	71.2	53.6	47.5	49.7	71.1	69.5	73.7	78.1	74.1

5	E196 -C	61. 9	60. 8	56.1	58	69.9	71.2	74.8	76.8	71.9
	P238 -C	63. 8	66. 4	58.7	61.1	73.9	74.5	76.4	77.3	73.3
	E286 -C	70. 9	67. 9	56.7	59.6	78	76.5	77.2	78.4	75.7
	R289 -C	70. 7	60. 8	49.9	52.8	74.1	71.8	73.4	75.9	73.1
10										
	T11- D	50. 9	44. 3	43.4	41.8	28.6	20.4	9.1	8.2	16
	N33- D	44. 2	74. 8	66.8	68.4	63.8	66.4	62.9	57.1	54.8
	N119 -D	44	66. 6	60.6	62.3	61.9	65.1	65.1	62.5	58.2
15	D120 -D	42. 4	68. 4	62.4	64	61.7	65.3	64.8	61.6	57.3
	S142 -D	27. 5	63. 6	61.9	61.6	38.5	43.2	37.8	27.9	25.6
	E196 -D	19. 5	66. 5	65.4	65.5	43.9	51	48.5	40.8	36.1
	P238 -D	8.5	63	65.4	65	38.9	48.7	48.7	42.5	35.7
20	E286 -D	6.3	57. 5	63.1	62	29.4	41.3	42.8	37.5	29.5
	R289 -D	13. 8	55. 1	58.8	57.8	26.7	36.4	35.9	29.4	22.1

Ejemplo 10. Cisteína que contiene variantes de uricasa para la PEGilación de sitio específico

30 Se generó una serie de combinaciones diferentes de 1, 2, 3 y 4 restos de Cys por cada monómero de uricasa. Estos

se analizaron respecto de la expresión, solubilidad, pureza y actividad tanto antes como después de la PEGilación. Debido a la naturaleza expuesta al disolvente de la Cys, estas construcciones tienden a agregarse (unirse por disulfuro) a menos que se mantengan en condiciones reductoras. Esto necesita que esté presente un agente reductor (DTT u otro) durante los procedimientos de purificación y ensayo. Una vez que se ha PEGilado la Cys, el agente reductor deja de ser necesario. Todas las permutaciones ensayadas de construcciones que contenían Cys se pudieron expresar y purificar y demostraron buena actividad tanto antes como después de la PEGilación.

La figura 10A muestra los sitios tridimensionales accesibles al disolvente dentro de la estructura cristalina tetramérica de la uricasa de *Arthrobacter globiformis* (Código de referencia PDB: 2YZB) (1). Se muestra cada subunidad de monómero de uricasa de la enzima tetramérica y se identificaron los restos seleccionados para la sustitución (T11, N33, S142). Estas cadenas laterales están altamente expuestas en la superficie, están distantes entre sí y distantes respecto de cada sitio activo en el tetrámero. Dos variantes que contenían Cys (T11C, N33C (SEQ ID NO: 17) y T11C, N33C, S142C (SEQ ID NO: 16)) se analizaron respecto de la expresión, solubilidad, pureza y actividad tanto antes como después de la PEGilación. La figura 9A muestra la actividad uricasa sin Cys (SEQ ID NO: 20), di-Cys (T11C, N33C) (SEQ ID NO: 17) y tri-Cys (T11C, N33C y S142C) (SEQ ID NO: 16). Todos los ensayos se ejecutaron en presencia de DTT para eliminar el potencial de unión disulfuro.

Ejemplo 11. Optimización de la PEGilación

La supresión a largo plazo de UA mediante uricasa requiere que la molécula se modifique de algún modo para prolongar su semivida. La rasburicasa disponible comercialmente, que no está PEGilada y no contiene propiedades conjugadas que prolonguen la semivida, tiene una semivida en seres humanos de 16-21 horas, lo que requiere una dosificación IV diaria para el síndrome de lisis tumoral (Ueng et al 2005). Se ha empleado la PEGilación para prolongar la semivida de una serie de uricasas preclínicamente. Krystexxa® es una uricasa hiper-PEGilada que contiene ~44 X 10 kDa moléculas de PEG (~440 kDa de PEG total por cada tetramero) conjugadas a la superficie de tetramero activo. Basándose en la bibliografía, durante las fases iniciales de desarrollo de Krystexxa® se barajó la hipótesis de que el PEG podría enmascarar de manera eficaz la uricasa, que es una proteína exógena, y hacerla menos inmunogénica (Hershfield et al, 2010 PNAS). Se llevaron a cabo estudios preclínicos para maximizar la cantidad de PEG en la superficie de la uricasa a la vez que se conserva la actividad enzimática. Se observó que 44 X 10 kDa de PEG por cada tetramero era la cantidad máxima de PEG que podía conjugarse a la uricasa y conservar la actividad funcional. La conjugación con PEG se logró PEGilando aleatoriamente las aminas primarias. Los datos clínicos de los ensayos de Krystexxa® demostraron que ~90% de los pacientes desarrollaron una respuesta al fármaco anti-Krystexxa® (Lipsky et al 2014 Arthritis Research & therapy). Un gran porcentaje de la respuesta anti-fármaco parece ser frente a PEG y no contra la proteína. Lo más prometedor es el hecho de que los anticuerpos de los pacientes que desarrollaron una respuesta anti-fármaco (PEG) se unen a las proteínas no

de uricasa PEGiladas, lo que demuestra que la respuesta es contra PEG y no la proteína o la interfaz proteína-PEG. Antes de estos ensayos, el conocimiento convencional era que el motivo de PEG de un agente terapéutico PEGilado tenía pocas probabilidades de ser inmunogénico. La gran mayoría de los agentes terapéuticos PEGilados contienen únicamente la cantidad de PEG suficiente para prolongar la semivida y no se encuentran "hiper-PEGilados", como Krystexxa®. Una hipótesis es que la cantidad de PEG en Krystexxa® ha provocado la inmunogenicidad anti-PEG asociada con el fármaco. El tetrámero Krystexxa® es de aproximadamente 136 kDa, con aproximadamente 440 kDa de PEG conjugado a la superficie. Esto produce una molécula de ~576 kDa, un tamaño sin precedentes para los agentes terapéuticos PEGilados. Como resultado, se modificó un número limitado de restos de Cys para la PEGilación de sitio específico, tal como se describe en el ejemplo 10.

Las uricasas con dos (di-Cys) o tres (tri-Cys) cisteínas se generaron inicialmente con una etiqueta His para facilitar la purificación. La figura 9A muestra que estas di-Cys y tri-Cys uricasas conservan la actividad enzimática de uricasa.

Las condiciones de reacción de di-PEGilación se optimizaron variando el tiempo, el pH, la concentración de fosfato, el NaCl, la proteína, el PEG y el TCEP. Se demostró que unas concentraciones mayores de PEG mejoran la eficacia de la PEGilación y una mayor concentración de TCEP redujo ligeramente la eficacia de la PEGilación. Otras variables tienen muy poco efecto en la eficacia de PEGilación. La tabla 7 a continuación muestra las variables que se ensayaron para optimizar la PEGilación y las condiciones óptimas logradas.

Tabla 7: Optimización de la PEGilación

Factor	Intervalo estudiado	Efecto	Óptimo
pH	6.5-7.5	Poco efecto	pH 7
Conc. de fosfato	20 mM - 100 mM	Poco efecto	60 mM
Conc. de proteína	1-5 mg/ml	Poco efecto	1-3 mg/ml
Conc. de PEG	50-1000 uM	Efecto pronunciado	700-900 uM
Conc. de TCEP	0-500 uM	Efecto evidente	Sin TCEP
Tiempo de reacción a 4°C	10 min - 4 h	Reacción completa tras 1.75 h	

La figura 9B muestra que las uricasas di-PEGiladas y tri-PEGiladas conservan la actividad enzimática de uricasa.

El análisis del material di-PEGilado mediante SDS-PAGE (figura 10B) confirmó que la mayoría de la proteína se conjugó uniformemente con PEG. El análisis por cromatografía en fase reversa del material di-PEGilado sugirió que el 92.6% estaba di-PEGilado, el 4.4% mono-PEGilado y se observó que una pequeña cantidad de material estaba sobre-PEGilado (~3%). La PEGilación no pareció tener impacto en la actividad enzimática. El material di-PEGilado mostró una tasa similar de oxidación de UA en comparación con la enzima no PEGilada (figura 10D). Se obtuvieron resultados similares para el material tri-PEGilado (datos no mostrados). Estos métodos de análisis alteran la estructura cuaternaria de la uricasa, pero en forma de homo-tetrámero, podría esperarse que el producto en estado nativo predominante para la uricasa di-

PEG tenga cadenas de PEG de 8 x 10 kDa, mientras que podría esperarse que la uricasa tri-PEG tenga cadenas de PEG de 12 x 10 kDa.

Basándose en las condiciones de PEGilación optimizadas (véase la tabla 7) se generaron uricasas di-PEG y tri-PEG no etiquetadas con His, se purificaron y se analizaron respecto de la eficacia de la PEGilación y la actividad enzimática. Estas moléculas PEGiladas se analizaron adicionalmente en estudios PK *in vivo*.

Ejemplo 12. PK *in vivo* para uricasas di-PEG y tri-PEG

Se evaluaron dos uricasas PEGiladas (di-PEG T11C, N33C y tri-PEG T11C, N33C y S142C) en un estudio en ratas. Se eligió un estudio en ratas debido a que hay precedentes de estudios PK de uricasas PEGiladas en ratas (Zhang et al, 2012 International Journal of Pharmaceutics). Las SEQ ID NO: 16 y 17 se usaron en este ensayo. Se determinó la farmacocinética *in vivo* en ratas para las uricasas tanto di-PEGiladas como tri-PEGiladas. Se dosificó por vía IV a 4 ratas en cada grupo a razón de 5 mg/kg y se recogieron 10 muestras (Día -1), 0.5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 y terminal a las 144 horas después de la inyección. Se recogió sangre completa en tubos para separación de suero y se congelaron. El suero se analizó respecto de la actividad residual de uricasa y se ajustaron los datos a una curva de titulación. La actividad enzimática específica de la uricasa que se introdujo en ratas (antes de la dosis) y la uricasa que se midió del suero (después de la dosis) fue comparable, lo que sugiere que la actividad se conservó durante el estudio *in vivo*. La figura 11A demuestra que las uricasas di y tri-PEGiladas tienen semividas sustancialmente más largas que la

uricasa no PEGilada. La uricasa no PEGilada tenía una semivida de 2-3 horas en este estudio (Figura 11A, triángulos). Las uricasas tanto di- como tri-PEGiladas muestran perfiles monofásicos. Las semividas, el volumen de distribución (Vd) y la velocidad de eliminación para cada uricasa se muestran en la tabla 8 a continuación. El coeficiente de variación se expresa en forma de porcentaje entre paréntesis.

Tabla 8: PK en ratas para uricasa di-PEGilada y tri-PEGilada

	Semivida (h)	Vd (L/kg)	Eliminación (L/h/kg)
Di-PEGilada	22.8 (7.4)	0.03 (7.2)	0.00096 (8.1)
Tri-PEGilada	29.9 (12.1)	0.03 (25)	0.00077 (12.8)

Los resultados mostrados en la tabla 8 indican que di-PEG y tri-PEG mostraron perfiles farmacocinéticos similares con una ligera ventaja de tri-PEG frente a di-PEG. Sin embargo, se consideró que di-PEG era ligeramente más deseable respecto a su fabricación y análisis y por lo tanto, se seleccionó di-PEG T11C, N33C para su análisis adicional. Con una cantidad de PEG sustancialmente menor que en Krystexxa®, la uricasa di-PEGilada puede ser ventajosa desde el punto de vista de la inmunogenicidad.

También se evaluó el comportamiento farmacocinético de Krystexxa® en el mismo estudio PK en ratas. A diferencia de las uricasas di- y tri-PEGiladas, Krystexxa® no mostró una eliminación monofásica, sino un perfil complejo en el que Krystexxa® se eliminó rápidamente en las primeras 2 horas, seguido de un perfil de eliminación más gradual (figura 11A,

cuadrados). El perfil de eliminación de Krystexxa® es distintivamente diferente respecto de las uricasas di- y tri-PEGiladas.

La PK de la uricasa di-PEGilada administrada por vía SC se estudió en cánidos. Se seleccionó un estudio en cánidos debido a que hay precedentes de ensayos PK de uricasa PEGilada en cánidos (Pegloticasa/ Krystexxa® FDA BLA n.º 125293, sección 2.6.5.4.1). Se dosificó a los canes por vía SC a razón de 3 y 10 mg/kg y se recogieron muestras de suero o sangre en diversos instantes y se analizaron respecto de la actividad de uricasa (PK) o de ácido úrico (PD). La actividad enzimática específica de la uricasa que se introdujo en canes (antes de la dosis) y la uricasa que se midió del suero (después de la dosis) fue comparable, lo que sugiere que la actividad se conservó durante el estudio *in vivo*. La figura 11B demuestra que la uricasa di-PEGilada suministrada a canes por la vía de administración SC tuvo una semivida de 1.81 ± 0.31 días para 3 mg/kg (n=3) y de 1.82 ± 0.22 días para 10 mg/kg (n=3). Se observó una reducción sustancial (~85%) en los niveles de UA y parece ser proporcionar a los niveles séricos de uricasa (figura 11B). Los niveles de UA en sangre volvieron a la normalidad a medida que se agotaron los niveles de uricasa.

Ejemplo 13. Evaluación ex vivo de la actividad y la estabilidad

Se evaluó la actividad de di-PEG uricasa (SEQ ID NO: 1) en suero humano al 50% (la sangre completa contiene ~50% de suero) a 37°C para imitar el complejo ambiente de matriz *in vivo* y la temperatura. El ensayo se realizó de la siguiente manera: UA, el tampón fosfato y el suero se calentaron hasta 37°C. Todas las etapas de reacción se llevaron a cabo a 37°C.

La uricasa se diluyó a 8 ug/ml en suero durante 20-30 minutos para agotar el ácido úrico endógeno en la muestra de suero humano. Después, se añadió un volumen igual de UA en tampón fosfato y la reacción se detuvo a los 0, 1, 2, 4 o 6 minutos usando ácido perclórico al 50%. Se ha demostrado que el ácido perclórico precipita proteínas pero no precipita al UA (Sakuma et al, 1987 Clinical Chemistry y Stove et al, 2007 Clinical Chemistry). El precipitado se sedimentó y se transfirieron 100 uL del sobrenadante a una placa de UV. La absorbancia se midió a 292 nM. La velocidad se calculó representando la pendiente de los 4 puntos a cada concentración de UA usando el programa informático SoftMax Pro. La figura 12A muestra la comparación de la actividad de uricasa di-PEGilada y de Krystexxa® en suero humano al 50% a 37°C.

También se llevó a cabo un ensayo de estabilidad basado en suero humano. Se incubó uricasa di-PEGilada en suero humano al 50% durante 0, 0.5, 1, 2, 4 o 24 horas a 37°C y después se ensayó su actividad. La di-PEG uricasa conserva la actividad en cada instante, lo que sugiere que la proteína es estable en suero humano al 50% durante al menos 24 horas y conserva su actividad de UA oxidasa. La figura 12B muestra los resultados del experimento de estabilidad en suero.

Por último, se exploró la actividad de la uricasa di-PEGilada con dosis repetidas (recarga) de UA a 37°C. En resumen, se combinaron UA (100 µM) y di-PEG uricasa (1 µg/ml) en un volumen de 100 µL (placa de 96 pocillos transparente de UV) a 37°C. Se monitorizó la absorbancia a 292 nm durante 10 minutos. Se añadieron 2.5 µL de UA 2000uM a los pocillos de 100 µL ("recarga") y se monitorizó la absorbancia a 292nm durante 10 min adicionales. Se repitió el proceso y la

actividad (pendiente del agotamiento de UA) permaneció constante para cada "recarga". La figura 12C muestra los resultados de este estudio.

Ejemplo 14. Determinación de la eficacia de la conjugación con PEG

Cuando hay múltiples sitios de conjugación en una biomolécula, las reacciones de conjugación con frecuencia originan una mezcla heterogénea de productos que se caracteriza por diversos grados de funcionalización y/o diferentes sitios de modificación. Este es generalmente el caso para las químicas de primera generación de acoplamiento no específico, tales como las conjugaciones de proteína que se dirigen a grupos ϵ -amino de los restos de lisina. Sin embargo, incluso cuando se selecciona una estrategia de conjugación de sitio específico, por ejemplo, en la estrategia empleada con frecuencia de dirigir restos de cisteína diseñados, la reacción puede no llegar a completarse, por ejemplo, debido a las limitaciones estéricas. Esto da como resultado igualmente en una distribución de las proteínas conjugadas con diversos grados de derivatización. Ya que las bioactividades pueden variar significativamente dependiendo del grado de modificación, se necesita caracterizar exhaustivamente el producto en términos de modificación para asegurar un bioconjugado bien definido y fabricado de manera consistente.

Pueden emplearse varias estrategias analíticas para caracterizar la derivatización general de los bioconjugados, incluyendo métodos basados en espectrometría de masas o HPLC. Sin embargo, para la importante clase de bioconjugaciones que implican la unión de polímeros, tales como poli(etilenglicol) (PEG) a proteínas, la mayoría de estas

técnicas son un reto para conjugados que contienen múltiples polímeros unidos. Debido al tamaño y a la distribución de carga del polímero y la proteína, así como a la polidispersidad del PEG, generalmente no son factibles las estrategias de espectrometría de masas basadas en ionización por electronebulización (ESI), y la MALDI MS con frecuencia da como resultado un espectro de masas amplio continuo. Para proteínas PEGiladas más pequeñas y/o en caso de un bajo número de sitios de conjugación ($N < 3$), las técnicas basadas en HPLC en condiciones nativas (basadas en exclusión por tamaños o de intercambio iónico) aún pueden proporcionar una resolución suficiente para distinguir especies individuales. Sin embargo, estas técnicas no son generalmente factibles o no tienen una resolución suficiente en el caso de proteínas más grandes con múltiples sitios de conjugación. El polímero de PEG altamente hidratado confiere un gran radio hidrodinámico a los conjugados de proteína, lo que impide una separación a base de SEC con una resolución suficiente y el apantallamiento de las cargas superficiales debilita las interacciones electrostáticas con resinas IEX. En este caso, la HPLC en fase reversa (RP) es con frecuencia el método de elección para una monitorización de la reacción y una caracterización del producto precisa. Sin embargo, en el caso de las proteínas oligoméricas, esta técnica da lugar generalmente a una disociación de subunidades y proporciona únicamente una descripción de la unidad monomérica, lo que proporciona una comprensión parcial de la funcionalización de la molécula que puede ser engañosa para los esfuerzos de optimización del proceso. Para cuantificar con precisión el auténtico estado de conjugación de un agente bioterapéutico para optimizar el proceso y caracterizar el producto, debe

obtenerse una comprensión de la relación entre el alcance de la modificación y el nivel de monómero y la derivatización general resultante a nivel cuaternario.

Diseño experimental:

5 Se obtuvo de NOF PEG-10 funcionalizado con maleimida (10kDa, Sunbright MA-100). Todos los componentes y reactivos del tampón se adquirieron de Sigma (St Louis, MO) o Avantor Performance Materials (Center Valley, PA). Las reacciones de PEGilación de tri-Cys uricasa se llevaron a cabo en tampón
10 de fosfato de sodio, pH 7.0. Las reacciones de PEGilación se inactivaron pasados unos instantes seleccionados mediante la adición de DTT a una concentración final de 10 mM y se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) usando una columna
15 YMC-Pack Protein-RP (250x2.0mm, S-5µm) de YMC America (Allentown, PA, USA) con un sistema Agilent HPLC1200. La fase móvil A fue TFA al 0.1% en agua y la fase móvil B consistía en TFA al 0.1 % en acetonitrilo. La muestra se eluyó con un gradiente lineal de fase móvil B creciente a un
20 caudal de 0.4 ml/min. Se monitorizaron los perfiles de elución mediante la absorbancia UV a 280nm.

Se empleó un diseño en dos etapas de Box-Behnken con el objetivo de maximizar la PEGilación de la proteína. La concentración de proteína (1-3 mg/ml), PEG-10 (0.5-1mM) y el
25 agente reductor, TCEP (0-0.5mM) se variaron para di-cys y tri-cys uricasas que contenían 8 o 12 sitios de conjugación por tetramero, respectivamente, mientras que el pH, la sal y la concentración iónica del tampón fosfato se mantuvieron a valores fijos. Los datos se analizaron tras instantes
30 seleccionados en el intervalo de 10 minutos a 4 horas. Todos los efectos de segundo orden así como el tiempo se trataron

como variables categóricas, proporcionando un diseño de 64 experimentos para estudios de exploración para cada variante de proteína en la ronda 1 y 60 experimentos adicionales por variante de proteína para la segunda ronda de estudios de optimización. El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa informático JMP 10.

Modelo estadístico:

Se generó una medida estadística para derivar la derivatización general de una proteína oligomérica a partir de datos obtenidos de ensayos fácilmente accesibles (tales como HPLC en fase reversa (RP)) que provocan la disociación de subunidades asociadas de manera no covalente. Para una proteína (o biomolécula) que contiene n subunidades, que tiene m sitios de conjugación potenciales en cada subunidad. Sea p_i , con $i=0, \dots, m$, la proporción observada experimentalmente de las subunidades que tienen i sitios conjugados, entonces $\sum_{i=0}^m p_i = 1$. La probabilidad, q_j , de observar una proteína oligomérica con j sitios conjugados en total puede resumirse usando la siguiente tabla de probabilidad multinomial.

Tabla 9

Sitios conjugados totales	Probabilidad
0	$q_0 = p_0^n$
1	$q_1 = np_0^{n-1}p_1$
2	$q_2 = \binom{2}{n} p_1^2 p_0^{n-2} + np_2 p_0^{n-1}$
$\vdots$	$\vdots$

J	q_j
	$= \sum_{0k_0+1k_1+\dots+mk_m=j} \binom{k_0}{n} \binom{k_1}{n-k_0} \dots \binom{k_{m-1}}{k_{m-1}+k_m} \prod_{i=0}^m p_i^{k_i}$
$\vdots$	$\vdots$
$n \times m$	$q_{n \times m} = p_m^n$

donde k_i , $i=0, \dots, m$, son el número de subunidades que tienen exactamente i sitios conjugados y el conjunto de estas subunidades tiene un total de j sitios conjugados y $\sum_{j=0}^{n \times m} q_j = 1$. La derivatización general media de la molécula se escribe fácilmente como:

$$\text{Derivatización}_{\text{general}} = 1q_1 + 2q_2 + \dots + jq_j + \dots + n \times m \times q_{n \times m} \quad (\text{Ec. 1})$$

La normalización de este valor con el número total de sitios de conjugación disponibles ($n \times m$) proporciona la eficacia de conjugación.

Para las clases bioquímica y farmacéuticamente importantes de proteínas diméricas, triméricas y tetraméricas, los cálculos se detallan a continuación.

Tabla 10: Cálculo de la derivatización general para una proteína dimérica ($n = 2$) con $m = 2$ o 3 sitios de conjugación por subunidad

1. Entrada de observación experimental de conjugación por subunidad en la tabla en Excel del modo siguiente:

	A	B	C	D	E
1	P_0	P_1	P_2	P_3	Sum Check
2					= SUM(A2:D2) *

$p_0, p_1, \dots, p_3$: Proporciones observadas experimentalmente de subunidades con 0, 1, ...3 moléculas conjugadas. Para $m = 2$ sitios de conjugación por subunidad,

complétense los campos A2,B2,C2; para 3 sitios de conjugación por subunidad, complétense los campos A2,B2,C2,D2.

5 *: E2 = Sum Check = SUM(A2:D2). Es necesario que las proporciones totales sumen hasta un valor de 1, por ejemplo, un 100%.

2. Cálculos de probabilidades multinomiales y derivatización general

Configurar la tabla de Excel del modo siguiente:

	A	B	C	D	E
10	9 J sitio conjugados q _j en total (de 0,1..... (<i>nxm</i>))	Probabilidades	Conjugaciones esperadas	Derivatización general	Eficacia de conjugación (%)
15	10 0	=A2^2	=A10*B10	=SUM(C10:C16)	=D10*100/(<i>n</i> <i>xm</i>) ***
	11 1	=2*B2*A2	=A11*B11		
	12 2	=B2^2+2*C2*A2	=A12*B12		
20	13 3	=2*C2*B2+2*D2*A2	=A13*B13		
	14 4	=C2^2+2*D2*B2	=A14*B14		
	15 5	=2*D2*C2	=A15*B15		
	16 6	=D2^2	=A16*B16		
25	17 Sum Check	=SUM(B10:B16) * *			

En caso de que la proteína tenga únicamente *m* = 2 sitios de conjugación por subunidad, no se rellenarán los campos B15 y B16.

**: El campo B17 (SumCheck) tiene que ser =1

30 ***: (*nxm*), el número total de sitios de conjugación tiene que introducirse aquí de forma numérica.

Tabla 11: Cálculo de la derivatización general para una proteína trimérica ($n = 3$) con $m = 2$ o 3 sitios de conjugación por subunidad

1. Entrada de observación experimental de conjugación por subunidad en la tabla en Excel del modo siguiente:

	A	B	C	D	E
1	P_0	P_1	P_2	P_3	Sum Check
2					= SUM(A2:D2) *

10 $p_0, \quad p_1, \quad \dots p_3$: Proporciones observadas experimentalmente de subunidades con 0, 1, ...3 moléculas conjugadas. Para $m = 2$ sitios de conjugación por subunidad, complétense los campos A2,B2,C2; para 3 sitios de conjugación por subunidad, complétense los campos A2,B2,C2,D2.

15 *: E2 = Sum Check = SUM(A2:D2). Es necesario que las proporciones totales sumen hasta un valor de 1, por ejemplo, un 100%.

2. Cálculos de probabilidades multinomiales y derivatización general

20 Configurar la tabla de Excel del modo siguiente:

	A	B	C	D	E
9	J sitio conjugados en total (de 0,1..... ($n \times m$))	Probabilidades q_j	Conjugaciones esperadas	Derivatización general	Eficacia de conjugación (%)
10	0	=A2^3	=A10*B10	=SUM(C10:C19)	=D10*100/ ($n \times m$) ***
11	1	=3*B2*A2^2	=A11*B11		

25

30

5	12	2	$=3*B2^2*$ $A2+3*C2*$ $A2^2$	$=A12*B12$		
	13	3	$=B2^3+6*$ $C2*B2*A2$ $+3*D2*A2$ 2	$=A13*B13$		
10	14	4	$=3*C2^2*$ $A2+6*D2*$ $B2*A2+3*$ $C2*B2^2$	$=A14*B14$		
15	15	5	$=3*D2*B2$ $^2+6*D2*$ $C2*A2+3*$ $B2*C2^2$	$=A15*B15$		
	16	6	$=3*D2^2*$ $A2+6*B2*$ $C2*D2+C2$ 3	$=A16*B16$		
20	17	7	$=3*D2^2*$ $B2+3*D2*$ $C2^2$	$=A17*B17$		
	18	8	$=3*D2^2*$ $C2$	$=A18*B18$		
25	19	9	$=D2^3$	$=A19*B19$		
30	20	Sum Check	$=SUM(B10$ $:B19)**$			

En caso de que la proteína tenga únicamente $m = 2$ sitios de conjugación por subunidad, no se rellenarán los campos B17-B19.

** : El campo B20 (SumCheck) de suma tiene que ser =1

***: ($n \times m$), el número total de sitios de conjugación tiene que introducirse aquí de forma numérica.

Tabla 12: Cálculo de la derivatización general para una proteína tetramérica ($n = 4$) con $m = 2$ o 3 sitios de conjugación por subunidad

1. Entrada de observación experimental de conjugación por subunidad en la tabla en Excel del modo siguiente:

	A	B	C	D	E
1	P_0	P_1	P_2	P_3	Sum Check
2					= SUM(A2:D2) *

$p_0, p_1, \dots p_3$: Proporciones observadas experimentalmente de subunidades con 0, 1, ...3 moléculas conjugadas. Para $m = 2$ sitios de conjugación por subunidad, complétense los campos A2,B2,C2; para 3 sitios de conjugación por subunidad, complétense los campos A2,B2,C2,D2.

*: E2 = Sum Check = SUM(A2:D2). Es necesario que las proporciones totales sumen hasta un valor de 1, por ejemplo, un 100%.

2. Cálculos de probabilidades multinomiales y derivatización general

Configurar la tabla de Excel del modo siguiente:

	A	B	C	D	E
9	Sitios de conj. totales	Probabilidades q_j	Conjugaciones esperadas	Derivatización general	Eficacia de conjugación (%)
10	0	=A2^4	=A10*B10	=SUM(C10:C22)	=D10*100/($n \times m$) ***

5	11	1	$=4*B2*A2^3$	$=A11*B11$		
	12	2	$=6*B2^2*A2^2+4*C2*A2^3$	$=A12*B12$		
	13	3	$=4*D2*A2^3+4*B2^3*A2+12*B2*C2*A2^2$	$=A13*B13$		
	14	4	$=6*C2^2*A2^2+B2^4+12*D2*B2*A2^2+12*C2*B2^2*A2$	$=A14*B14$		
10	15	5	$=4*C2*B2^3+12*D2*C2*A2^2+12*D2*B2^2*A2+12*C2^2*B2*A2$	$=A15*B15$		
15	16	6	$=6*C2^2*B2^2+24*A2*B2*C2*D2+4*D2*B2^3+6*D2^2*A2^2+4*C2^3*A2$	$=A16*B16$		
	17	7	$=12*D2*C2^2*A2+12*D2^2*B2*A2+4*C2^3*B2+12*D2*C2*B2^2$	$=A17*B17$		
20	18	8	$=C2^4+12*D2*B2*C2^2+12*D2^2*C2*A2+6*D2^2*B2^2$	$=A18*B18$		
25	19	9	$=4*C2^3*D2+4*D2^3*A2+12*D2^2*C2*B2$	$=A19*B19$		
	20	10	$=4*D2^3*B2+6*D2^2*C2^2$	$=A20*B20$		
	21	11	$=4*D2^3*C2$	$=A21*B21$		
30	22	12	$=D2^4$	$=A22*B22$		
	23	Sum Check	$=SUM(B10:B22)$			

En caso de que la proteína tenga únicamente $m = 2$ sitios de conjugación por subunidad, no se rellenarán los campos B19-B22.

** : El campo B23 (SumCheck) de suma tiene que ser =1

5 *** : $(n \times m)$, el número total de sitios de conjugación tiene que introducirse aquí de forma numérica.

Los datos anteriores describen una medida estadística para derivar la funcionalización general de una proteína oligomérica a partir de los datos obtenidos de ensayos
10 fácilmente accesibles que provocan la disociación de subunidades asociadas de manera no covalente. Los datos anteriores ilustran este método usando la conjugación de una proteína uricasa homo-tetramérica con poli(etilenglicol) (PEG) como sistema modelo. La modificación covalente de
15 proteínas terapéuticas con PEG es ahora una estrategia bien establecida para aumentar la semivida *in vivo*, reducir la inmunogenicidad, mejorar la solubilidad y reducir la susceptibilidad a la degradación proteolítica. Sin embargo, el método puede aplicarse igualmente a otros procesos de
20 bioconjugación de oligómeros que dan como resultado una funcionalización parcial en un número fijo de sitios de conjugación.

La proteína uricasa tetramérica ($n=4$) estudiada en este caso tiene una masa total >100 kDa. Se introdujo un número
25 fijo de sitios de conjugación diseñando restos de cisteína libre que permiten la PEGilación con PEG funcionalizado con maleimida. La siguiente descripción se centra en la variante de proteína con $m=3$ sitios de conjugación por subunidad, dando como resultado un número total de 12 posibles sitios
30 de conjugación para el tetrámero. Como se ha descrito anteriormente, debido al tamaño de la proteína y al número

de sitios de conjugación, todas las herramientas analíticas que caracterizan el producto bioconjugado con una resolución suficiente están basados en técnicas que disocian el oligómero unido de manera no covalente en subunidades individuales. La figura 13 ilustra el análisis de reacción frente al tiempo usando RP HPLC, lo que da como resultado picos bien resueltos que corresponden a especies con grados diferentes de conjugación que pueden cuantificarse fácilmente mediante integración. Los resultados del ensayo son, por lo tanto, las cantidades relativas de monómero con diferentes grados de funcionalización: las proporciones p_0 , p_1 , p_2 , p_3 , de subunidades que contienen 0, 1, 2, o 3 cadenas de PEG unidas. A partir de estos valores, se calcularon las probabilidades individuales q_0 , q_1 , q_2 , q_3 , ..., q_{12} , para la proteína tetramérica con 0, 1, 2, 3, ..., 12 cadenas de PEG unidas de acuerdo con la tabla de probabilidad multinomial anterior como:

$$q_j = \sum_{0k_0+1k_1+\dots+3k_3=j} \binom{k_0}{4} \binom{k_1}{4-k_0} \dots \binom{k_{3-1}}{k_{3-1}+k_3} \prod_{i=0}^3 p_i^{k_i}$$

Para este ejemplo, la ecuación 1 se convierte en:

$$\text{Derivatización}_{\text{general}} = 1q_1 + 2q_2 + 3q_3 + \dots + 12q_{12}.$$

La tabla 13 ilustra este análisis y lista las cantidades relativas de subunidades PEGiladas de manera diferente, según se deriva del análisis de RP HPLC, junto con la derivatización general computada, calculada a partir de la ecuación (1) y la eficacia de PEGilación.

Tabla 13: Análisis de datos para el experimento ilustrado en la figura 13.

	Resultado del ensayo RP HPLC	Conjugación general calculada

5
10

Los datos ilustran que la derivatización general calculada es una herramienta valiosa para desarrolladores de procesos que permite calibrar inmediatamente la modificación general de la proteína. Por ejemplo, tras el instante de los 10 minutos, las condiciones de reacción seleccionadas proporcionan un 28.9% de subunidades con 3 (de 3) sitios de conjugación funcionalizados. Sin embargo, teniendo en cuenta el hecho de que las subunidades restantes están parcialmente conjugadas (15.9% con 1 cadena de PEG, 53.9% con 2 cadenas de PEG) e introduciendo estos datos en la distribución multinomial de acuerdo con la ecuación 1, permite determinar inmediatamente que la derivatización general de la proteína es de hecho de 8.4 de los 12 sitios de conjugación en total, lo que supone un 70.1%.

15
20
25
30

condiciones de reacción que proporcionaron la PEGilación máxima de la proteína. Estos resultados se compararon con análisis de datos cuando se seleccionó la salida experimental de conjugación para subunidades individuales. Tal como se describe en la sección experimental, se empleó un diseño de Box-Behnken. Las figuras 14A y 14B ejemplifican las gráficas de superficie de respuesta para la primera ronda de estudios que demuestran el efecto de la concentración de reactivo en la eficacia de PEGilación general para instantes desde los 10 minutos hasta las 2 horas. Mientras que la figura 14A ilustra los datos basándose en un análisis de la "subunidad completamente PEGilada" (es decir, 3 de 3 sitios de conjugación funcionalizados por monómero) obtenidos directamente del trazado del ensayo de RP-HPLC, la figura 14B ilustra el análisis de datos cuando se computa la derivatización general basándose en la ecuación (1). Ambos paneles muestran que la eficacia de PEGilación aumenta con el aumento de la concentración de PEG. Sin embargo, las conclusiones son diferentes para las dos formas de análisis: Si, por ejemplo, el objetivo es una eficacia de conjugación >90%, el análisis basado en la figura 14A podría guiar a los desarrolladores del proceso a añadir una concentración de al menos 2 veces de PEG e incubar durante tiempos de reacción más prolongados, en comparación con el análisis basado en la derivatización general (figura 14B). Esta aparente diferencia se vuelve más pronunciada cuantos más sitios de conjugación estén presentes por subunidad. Al seleccionar únicamente la máxima conjugación por subunidad como parámetro de respuesta en lugar de la derivatización computada general no proporciona la imagen auténtica de la funcionalización para una molécula oligomérica y podría ser

engañoso. Teniendo en cuenta el elevado coste del PEG y otros reactivos de conjugación, la optimización del proceso basada en la derivatización general puede dar como resultado un ahorro considerable de coste y bienes (así como de tiempo).

5 Este ejemplo proporciona un enfoque estadístico aplicable basado en una distribución multinomial que permite el cálculo de la conjugación general de proteína para proteínas oligoméricas cuando el tamaño y la naturaleza de la proteína o las propiedades biofísicas del conjugado no
10 permiten el análisis en condiciones nativas. La descripción cuantitativa de la derivatización general de la molécula calculada de acuerdo con la ecuación (1) apoyará ambos esfuerzos de optimización del proceso así como la caracterización precisa del conjugado para presentaciones
15 reglamentarias y deseablemente, ayudar a una transición exitosa de los nuevos bioconjugados a la práctica clínica.

Referencias

- Aly, M., Turkish Journal of Biology, 37, (2013) 520 - 529.
- 20 Anderson, A., Journal of Experimental Sciences, 2 (2011) 05-08.
- Batista-Viera, F., J. Carlsson, Preparative Biochemistry, 7 (1977) 102 - 110.
- Bongaerts, G.P., Biochim Biophys Acta, 27 (1978) 348-
25 58.
- Chen, R, Biochim. Biophys. Acta., 660 (1981) 293-298.
- Chen, Y., African Journal of Biotechnology, 9 (2010) 4788-4795.
- Chun, Z., Biosci.Biotechnol.Biochem. 74 (2010) 1298-
30 1301.

- da Silva Freitas, D., International Journal of Pharmaceutics 387 (2010) 215-222.
- Davidson, J.N., Journal of Biochemistry, 32, (1938) 1386.
- 5 Davidson, J.N., Nature, 141, (1938) 790.
- Davis S., Lancet. 8241 (1981) 281-283.
- Fayyadh, M. Current Research in Microbiology and Biotechnology, 2 (2014) 384-390.
- Geweely, N., Australian Journal of Basic and Applied
10 Sciences, 10 (2011) 220-230.
- Giffard, M., PloS ONE, 6 (2011) 1-9.
- Habeeb, A.F., Anal. Biochem., 14 (1966), 328-336.
- Holmberg, C.G., Journal of Biochemistry, 33 (1939) 1901
- 1906.
- 15 Hongoh, Y., Insect Biochemistry and Molecular Biology,
30 (2000) 173-182.
- Ikeda, A., et al., Tumor Lysis Syndrome Clinical Presentation, Medscape (3 de diciembre de 2014).
- Itaya, K., Agr. Biol. Chem, 31 (1967) 1256-1264.
- 20 Liu, J., Annals of the New York Academy Sciences, 750
(2006) 477-481.
- Lucas, K, Archives of Biochemistry and Biophysics, 11
(1983) 190-7.
- Mabrouk, A., Gate2Biotech, 2, (2010) 1 -13.
- 25 Machida, Y., Agricultural and Biological Chemistry, 44
(1980) 2811-2815.
- Montalbini, P., Plant Science. 147 (1999) 139-147.
- Nanda, P., International Journal of Pharmaceutical
Technology, 1 (2011) 2277-3436.
- 30 Nanda, P., Research in Biotechnology, 3 (2012) 35-46.

Ortlund, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 10 (2014) 3763-3768.

Pfrimer, P., Journal of Biomedicine and Biotechnology, (2010) 1-6.

5 Poovizh, T., Internation Journal of Advanced Research, 2 (2014) 34-40.

Redondo, J, Planta, 202 (1997) 3.

Salleh, A.B., Pertanika, 3 (1980) 97-102.

Sherman, M. et al., Adv. Drug. Deliv. Rev. 60 (2008)
10 59-68.

Tian, H., Journal of Pharmacy and Pharmacology, 65 (2013) 53-63.

Watanabe, T., Analytical Biochemistry, 89 (1978) 343-347.

15 Watanabe, T., Analytical Biochemistry, 86 (1978) 357-362.

Wertheimer, A., et al., A Revised Estimate of the Burden of Illness of Gout, Curr Ther Res Clin Exp 75:1-4 (2013).

Zhang, C., PLOS ONE, 7 (2012).

20 **Equivalentes**

Se considera que, la anterior memoria descriptiva escrita, es suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica las realizaciones. La descripción y los ejemplos anteriores detallan determinadas realizaciones y describen el mejor modo contemplado por los
25 inventores. Sin embargo, se apreciará que, sin importar lo detallado de lo anterior que pueda aparecer en el texto, las realizaciones pueden ponerse en práctica de muchas maneras y deben interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones
30 adjuntas y cualquiera de sus equivalentes.

Tal como se usa en el presente documento, el término aproximadamente se refiere a un valor numérico incluyendo, por ejemplo, números enteros, fracciones y porcentajes, estén o no indicados explícitamente. El término

5 aproximadamente se refiere generalmente a un intervalo de valores numéricos (por ejemplo +/-5-10 % del intervalo citado) que un experto habitual en la materia consideraría equivalente al valor citado (por ejemplo, que tiene la misma función o resultado). Cuando los términos tales como "al

10 menos" y "aproximadamente" preceden a una lista de valores o intervalos numéricos, los términos modifican todos los valores o intervalos proporcionados en la lista. En algunos casos, el término aproximadamente puede incluir valores numéricos que están redondeados a la cifra significativa más

15 próxima.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

20

25

30