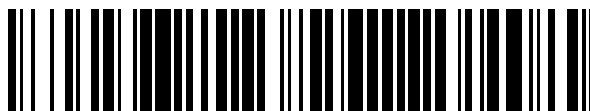


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 167**

51 Int. Cl.:
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04800091 .3**
96 Fecha de presentación: **13.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1682583**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Complejo de proteína que utiliza fragmento de inmunoglobulina y el método para su preparación**

30 Prioridad:
13.11.2003 KR 2003080299

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.04.2012

73 Titular/es:
Hanmi Holdings Co., Ltd
No 45, Bangi-dong Songpa-gu
Seoul 138-828 , KR

72 Inventor/es:
KIM, Young Min;
KIM, Dae Jin;
BAE, Sung Min;
LIM, Chang Ki;
KWON, Se Chang y
LEE, Gwan Sun

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 378 167 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Complejo de proteína que utiliza fragmento de inmunoglobulina y el método para su preparación

Campo Técnico

5 La presente invención se relaciona con un conjugado de proteína que comprende un polipéptido fisiológicamente activo, un polímero no-peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina, que se unen de forma covalente y tienen una duración prolongada de la acción fisiológica en comparación con la forma nativa.

Antecedentes de la Técnica

10 Dado que los polipéptidos tienden a ser desnaturalizados fácilmente debido a su baja estabilidad, se degradan por las enzimas proteolíticas en la sangre y pasan fácilmente a través del riñón o el hígado, los medicamentos proteicos, que incluyen los polipéptidos como componentes farmacéuticamente efectivos, se deben administrar frecuentemente a los pacientes para mantener títulos y concentraciones en el nivel sanguíneo deseado. Sin embargo, esta administración frecuente de los medicamentos proteicos, especialmente por medio de inyección, causa dolor a los pacientes. Para resolver estos problemas, se han hecho muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad en suero de los fármacos proteicos y mantener los fármacos en la sangre a niveles altos durante un periodo de tiempo prolongado, y de esta manera, maximizar la eficacia farmacéutica de los fármacos. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas con actividad sostenida, necesitan aumentar la estabilidad de los fármacos proteicos y mantener los títulos a niveles suficientemente altos sin causar respuestas inmunes en los pacientes.

20 Para estabilizar las proteínas y prevenir la degradación enzimática y la eliminación por los riñones, un polímero que tiene alta solubilidad, tal como polietileno glicol (de ahora en adelante, se refiere simplemente como "PEG"), se utilizó convencionalmente para modificar químicamente la superficie de un fármaco proteico. Al unirse con las regiones específicas o distintas de una proteína diana, el PEG estabiliza la proteína y previene la hidrólisis, sin causar graves efectos secundarios (Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71:137-139, 1991). Sin embargo, a pesar de su capacidad para mejorar la estabilidad de la proteína, este acoplamiento de PEG tiene problemas, como que reduce ampliamente el número de títulos de proteínas fisiológicamente activas. Además, el rendimiento disminuye con el incremento del peso molecular del PEG debido a la reactividad reducida de las proteínas.

25 Recientemente, se han sugerido los conjugados de fármaco proteico-polímero. Por ejemplo, como se describe en U.S. Pat. No. 5,738,846, un conjugado se puede preparar mediante el enlace de un fármaco proteico idéntico a ambos extremos de PEG, para mejorar la actividad del fármaco proteico. También, como se describe en International Pat. Publication No. WO 92/16221, dos fármacos proteicos diferentes se pueden unir a ambos extremos de PEG para proporcionar un conjugado que tiene dos actividades diferentes. Los anteriores métodos, sin embargo, no tuvieron mucho éxito en el mantenimiento de la actividad de los fármacos proteicos.

30 Por otra parte, Kinstler et al., reportaron que una proteína de fusión preparada mediante el acoplamiento del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) con albúmina humana mostró una mejora en la estabilidad (Kinstler et al., Pharmaceutical Research 12(12):1883-1888, 1995). En esta publicación, sin embargo, ya que el fármaco modificado, que tiene una estructura G-CSF-PEG-albúmina, solo mostró un incremento de aproximadamente cuatro veces del tiempo de residencia en el cuerpo y un ligero incremento en la vida media en suero en comparación con la administración única del G-CSF nativo, no ha sido industrializado como una formulación de acción prolongada efectiva de los fármacos proteicos.

35 Un método alternativo para mejorar la estabilidad in vivo de las proteínas fisiológicamente activas, es mediante el enlace de un gen de proteína fisiológicamente activa con un gen codificante de una proteína que tiene alta estabilidad en suero, mediante tecnología de recombinación genética y cultivo de las células transfectadas con el gen recombinante para producir una proteína de fusión. Por ejemplo, una proteína de fusión se puede preparar mediante la conjugación de la albúmina, de una proteína conocida por ser la más efectiva para mejorar la estabilidad de la proteína, o su fragmento con una proteína fisiológicamente activa de interés por recombinación genética (International Pat. Publication Nos. WO 93/15199 y WO 93/15200, European Pat. Publication No. 413,622). Una proteína de fusión interferón alfa y albúmina, desarrollada por the Human Genome Science Company y comercializada con la marca comercial de 'Albuferon™', aumentó la vida media de 5 horas a 93 horas en monos, pero se sabe que es problemático, ya que disminuye la actividad in vivo a menos del 5% de interferón alfa sin modificar (Osborn et al., J. Phar. Exp. Ther. 303(2):540-548, 2002).

40 Por otra parte, una inmunoglobulina (Ig) se compone principalmente de dos regiones: Fab que tiene un sitio de enlace de antígeno y Fc que tiene un sitio de enlace complemento. Se hicieron otros intentos para fusionar un fármaco proteico con un fragmento Fc de inmunoglobulina por recombinación genética. Por ejemplo, el interferón (Korean Pat. Laid-open Publication No. 2003-9464), y el receptor interleucina-4, receptor interleucina-7 o receptor reitropoyetina (EPO) (Korean Pat. Registration No. 249572) fueron expresados previamente en mamíferos en una

forma fusionada con un fragmento Fc de inmunoglobulina. International Pat. Publication No. WO 01/03737 describe una proteína de fusión que comprende una citoquina o factor de crecimiento ligado a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un ligador de oligopéptido.

5 Además, U.S. Pat. No. 5,116,964 revela una LHR (glicoproteína de superficie celular de linfocito) o proteína fusionada CD4 con un terminal amino o terminal carboxilo de una Fc de inmunoglobulina, fragmento por recombinación genética, y U.S. Pat. No. 5,349,053 describe una proteína de fusión de IL-2 y un fragmento Fc de inmunoglobulina. Otros ejemplos de proteínas de fusión Fc, preparadas por recombinación genética incluyen una proteína de fusión del interferón-beta o un derivado de esta y un fragmento Fc de inmunoglobulina (International Pat. Publication No. WO 00/23472), una proteína de fusión del receptor IL-5 y un fragmento Fc de inmunoglobulina (U.S. Pat. No. 5,712,121), una proteína de fusión del interferón alfa y un fragmento Fc de una inmunoglobulina G4 (U.S. Pat. No. 5,723,125), y una proteína de fusión de la proteína CD4 y un fragmento Fc de una inmunoglobulina G2 (U.S. Pat. No. 6,451,313). También, como se describe en U.S. Pat. No. 5,605,690, una variante de Fc que tiene un alteración de aminoácidos especialmente en un sitio de enlace complemento o sitio de enlace receptor se puede fusionar con el receptor TNF por tecnologías de ADN recombinante para proporcionar una proteína de fusión Fc TNFR-IgG1. De esta manera, los métodos de preparación de una proteína de fusión Fc utilizando un fragmento Fc de inmunoglobulina modificada por recombinación genética se revelan en U.S. Pat. Nos. 6,277,375, 6, 410, 008 y 6, 444, 792.

20 U.S. Pat. No. 6,660,843 revela un método de producción de un conjugado que comprende una proteína diana fusionada con un fragmento Fc de inmunoglobulina por medio de un ligador en *E. coli* por recombinación genética. Este método permite que el conjugado sea producido a un costo inferior que cuando se utiliza sistemas de expresión de mamífero y proporciona el conjugado en una forma aglicosilada. Sin embargo, dado que la proteína diana y el fragmento Fc de inmunoglobulina se producen juntos en *E. coli*, si la proteína diana es glicosilada en la naturaleza, es difícil aplicar dicha proteína diana utilizando este método. Este método tiene otro problema de expresión del conjugado como cuerpos de inclusión, dando lugar a velocidades de plegamiento muy altas.

25 Sin embargo, tales proteínas de fusión Fc producidas por recombinación genética tienen las siguientes desventajas: la fusión de la proteína ocurre solo en una región específica de un fragmento Fc de inmunoglobulina, el cual está en un extremo del terminal amino- o carboxilo-; solo las formas homodiméricas y las formas no-monoméricas se producen; y una fusión debería tener lugar solo entre las proteínas glicosiladas o entre las proteínas aglicosiladas, y es imposible hacer una proteína de fusión compuesta de una proteína glicosilada y una proteína aglicosilada. Además, una nueva secuencia de aminoácidos creada por la fusión puede desencadenar respuestas inmunes, y una región ligadora puede hacerse susceptible a la degradación proteolítica.

35 Por otra parte, en relación con el desarrollo de las proteínas de fusión utilizando un fragmento Fc de inmunoglobulina, no hay ningún informe de un conjugado que comprenda una proteína diana ligada a un Fc nativo derivado- humano utilizando un agente de reticulación. La preparación de un conjugado utilizando un ligador tiene las ventajas de facilitar la selección y el control de sitios de enlace y la orientación de dos proteínas que se unen entre sí, y permitir la expresión en un monómero, dímero o multímero y la preparación de construcciones homólogas o heterólogas. El fragmento Fc de inmunoglobulina se puede producir mediante tecnologías de ADN recombinante utilizando células de mamífero o *E. coli*. Sin embargo, hasta la fecha, no hay ningún informe de un fragmento Fc nativo de inmunoglobulina que se produzca en masa por separado con altos rendimientos en *E. coli* y se aplique a formulaciones de acción prolongada. También, hasta la fecha, no ha habido ningún intento de producción de un conjugado que comprenda una proteína diana ligada a un fragmento Fc de inmunoglobulina derivado de *E. coli*, producido mediante tecnologías de ADN recombinante por medio de un agente de reticulación.

45 Por otra parte, las inmunoglobulinas tienen funciones de anticuerpo, tal como citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y las fracciones de azúcar presentes en un fragmento Fc de inmunoglobulinas juegan papeles importantes en los efectos de ADCC y CDC (Burton D., Molec. Immun. 22, 161-206, 1985). Las inmunoglobulinas que carecen de fracciones de azúcar tienen vidas medias en suero similares a las inmunoglobulinas glicosiladas, pero afinidades de enlace del receptor y complemento reducidas de 10 a 1000-veces (Waldmann H., Eur. J. Immunol. 23, 403-411, 1993; Morrison S., J. Immunol. 143, 2595-2601, 1989).

50 Stevenson et al. (Journal of Immunology, 1997, 158, pp. 2242-2250), revelan un conjugado que consiste de un componente de bisagra de Fc y un componente Fab fisiológicamente activo. El enlace entre los dos componentes es a través de enlaces tioéter estable. D1 no menciona el enlace de un polipéptido fisiológicamente activo y un fragmento Fc de inmunoglobulina vía un polímero no-peptídico.

55 EP 0580171A se refiere a un conjugado carbodiimida Fc con una sustancia anti-tumor, tal como mitomicina o doxorubicina. Una vez más, el enlace vía un componente polímero no-peptídico no se revela en EP0580141A.

US 5,045,312A describe la hormona humana de crecimiento carbodiimida-conjugada con una inmunoglobulina. Una vez más, esta referencia no revela el enlace del polipéptido fisiológicamente activo y la inmunoglobulina vía un

polímero no-peptídico. Adicionalmente, US5,045,312A no usa un fragmento Fc de IgG como se requiere por la reivindicación 1, pero IgG de longitud completa.

WO 01/03737A1 revela una proteína de fusión enmarcada de Fc con ligadores peptídicos y se limita a proteínas de fusión Fc-fármaco.

- 5 WO 01/81415A2 revela los polipéptidos PTH terapéuticos unidos a través de un ligador no-peptídico, con un fragmento Fc. WO01/81415A2 no revela el conjugado específico de la presente invención.

10 Como se describe anteriormente, ha sido probada una variedad de métodos para el enlace de un polímero con una proteína fisiológicamente activa. Los métodos convencionales potencian la estabilidad de los polipéptidos pero reducen notablemente la actividad de estos, o mejoran la actividad de los polipéptidos independientemente de la estabilidad. De esta manera, existe la necesidad de un método capaz de lograr tanto la reducción de actividad mínima como la mejora de la estabilidad de un fármaco proteico.

15 En este sentido, conduciendo a la presente invención, la forma intensiva y por medio de la investigación en el desarrollo de una formulación de fármaco proteico de acción prolongada, capaz de lograr tanto la reducción de la actividad mínima como la mejora de la estabilidad, lo que se considera convencionalmente difícil de lograr, resulta en el hallazgo que un conjugado de proteína, preparado mediante el enlace covalente de un fragmento Fc de inmunoglobulina, un polímero no-peptídico y un polipéptido fisiológicamente activo, extiende notablemente la vida media en suero de la proteína fisiológicamente activa y mantiene títulos más altos que los fármacos proteicos conocidos.

Divulgación de la Invención

20 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un conjugado de proteína, minimizando la reducción de la actividad de un polipéptido fisiológicamente activo mientras se extiende la vida media en suero del polipéptido, mientras que reduce el riesgo de inducir las respuestas inmunes, y un método de preparación de dicho conjugado de proteína.

25 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una formulación de fármaco proteico de acción prolongada que comprende el conjugado de proteína con la vida media en suero extendida como un componente efectivo.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para mejorar la estabilidad y la duración de acción fisiológica, minimizando la reducción de la actividad de un polipéptido fisiológicamente activo mientras que mejora la vida media en suero del polipéptido.

Breve Descripción de los Dibujos

30 Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos acompañantes, en los cuales:

FIG. 1 muestra los resultados de cromatografía de un fragmento Fc de inmunoglobulina obtenido por la transformación de una inmunoglobulina con papaina;

35 FIG. 2 muestra los resultados de SDS-PAGE de un fragmento Fc de inmunoglobulina purificado (M: marcador de tamaño molecular, carril 1: IgG, carril 2: Fc);

FIG. 3 muestra los resultados de SDS-PAGE de conjugados IFN α -PEG-Fc (A), 17Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y EPO-PEG-Fc (C), que se generan por una reacción de acoplamiento (M: marcador de tamaño molecular, carril 1: Fc, carril 2: proteína fisiológicamente activa, carril 3: conjugado proteína fisiológicamente activa-PEG-Fc);

40 FIG. 4 muestra los resultados de cromatografía de tamaño de exclusión de un conjugado IFN α -PEG-Fc que es purificado después de una reacción de acoplamiento;

FIG. 5 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado EPO-PEG-Fc;

FIGS. 6a y 6b muestran los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis SDS-PAGE, respectivamente, de un Fc de la inmunoglobulina nativa y un Fc de inmunoglobulina deglicosilada (DG Fc);

45 FIG. 7 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado IFN α -PEG-Fc y un conjugado IFN α -PEG-DG Fc;

FIGS. 8a a 8c muestran los resultados de HPLC de fase reversa de conjugados IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc y IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante;

FIG. 9 es una gráfica que muestra los resultados del análisis farmacocinético de un IFN α nativo, un complejo IFN α -40K PEG, un conjugado IFN α -PEG-albúmina y un conjugado IFN α -PEG-Fc;

5 FIG. 10 es una gráfica que muestra los resultados de análisis farmacocinético de una EPO nativa, un EPO altamente glicosiladas, un conjugado EPO-PEG-Fc y un conjugado EPO-PEG-AG Fc;

FIG. 11 es una gráfica que muestra los resultados de análisis farmacocinético de conjugados IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc y IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante;

10 FIG. 12 es una gráfica que muestra las farmacocinéticas de un Fab', un complejo Fab'-S-40K PEG, un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc;

FIG. 13 es una gráfica que muestra la actividades *in vivo* de Fab', un complejo Fab'-S-40K PEG, un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc;

FIG. 14 es una gráfica que muestra los resultados de comparación de subclases de IgG humana para afinidad de enlace con el complemento de C1q; y

15 FIG. 15 es una gráfica que muestra los resultados de comparación de un Fc glicosilado, un DG Fc enzimáticamente glicosilado y un conjugado interferón-PEG-portador, donde el portador es AG Fc producido por *E. coli* para afinidad de enlace con el complemento de C1q.

Mejor Modo para Llevar a cabo la Invención

20 En un aspecto para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un conjugado de proteína que comprende un polipéptido fisiológicamente activo, un polímero no-peptídico que tiene un grupo reactivo en ambos extremos y un fragmento Fc de inmunoglobulina, en donde el polímero no-peptídico linealmente se une al polipéptido fisiológicamente activo y el fragmento Fc de inmunoglobulina por un enlace covalente, y en donde el polímero no-peptídico es el polietileno glicol.

25 El término "conjugado de proteína" o "conjugado", como se utiliza en este documento, se refiere a que comprende uno o más polipéptidos fisiológicamente activos, uno o más polímeros no-peptídicos que tienen un grupo reactivo en ambos extremos y uno o más fragmentos Fc de inmunoglobulina, en donde los tres componentes se unen de forma covalente. Además, se debe distinguir del "conjugado", una construcción que comprende solo dos moléculas diferentes seleccionadas de un polipéptido fisiológicamente activo, un polímero no-peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina, en donde las dos moléculas se unen de forma covalente juntas, se designa como un "complejo".

30 El conjugado de proteína de la presente invención es una variante de un fármaco proteico hecho para reducir la reducción de la actividad fisiológica y para aumentar la duración *in vivo* del fármaco proteico, que se caracteriza mediante el enlace de un fragmento Fc de inmunoglobulina con el fármaco proteico.

35 El fragmento Fc de inmunoglobulina es seguro para utilizar como un portador de fármaco, ya que este es un polipéptido biodegradable que se metaboliza en el cuerpo. También, el fragmento Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo en comparación con las moléculas de inmunoglobulina completas, siendo, de esta manera ventajoso en la preparación, purificación y producción de los conjugados debido a que el fragmento Fc de inmunoglobulina no contiene el fragmento Fab, cuya secuencia de aminoácidos difiere entre las subclases de anticuerpos y que por lo tanto es altamente no-homogénea, se puede incrementar ampliamente la homogeneidad de las sustancias y ser menos antigénica.

40 El término "fragmento Fc de inmunoglobulina", como se utiliza en este documento, se refiere a una proteína que contiene la región constante de cadena pesada 2 (C_{H2}) y la región constante de cadena pesada 3 (C_{H3}) de una inmunoglobulina, y no las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, la región constante de cadena pesada 1 (C_{H1}) y la región constante de cadena ligera 1 (C_{L1}) de la inmunoglobulina. Además puede incluir la región bisagra en la región constante de cadena pesada. También, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente
45 invención puede contener una porción o toda la región constante de cadena pesada 1 (C_{H1}) y/o la región constante de cadena ligera 1 (C_{L1}), excepto para las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. También, siempre y cuando esta tenga una función fisiológica sustancialmente similar o mejor que la proteína nativa del fragmento Fc de IgG puede ser un fragmento que tiene una delección en una porción relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de C_{H2} y/o C_{H3}. Es decir, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede
50 comprender 1) un dominio C_{H1}, un dominio C_{H2}, un dominio C_{H3} y un dominio C_{H4}, 2) un dominio C_{H1} y un dominio C_{H2}, 3) un dominio C_{H1} y un dominio C_{H3}, 4) un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3}, 5) una combinación de uno o más

dominios y una región bisagra de la inmunoglobulina (o una porción de la región bisagra), y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de cadena pesada y la región constante de cadena ligera.

El fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos nativa y derivados de secuencia (mutantes) de estos. Un derivado de secuencia de aminoácidos es una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una delección, una inserción, una sustitución conservadora o no-conservadora o combinaciones de estas de uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, en un IgG Fc, residuos de aminoácidos conocidos por ser importantes en el enlace, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331, se puede utilizar como un objetivo apropiado para la modificación. También, son posibles otros diferentes derivados, incluyendo uno en los cuales una región capaz de formar un enlace disulfuro se suprime, o ciertos residuos de aminoácidos se eliminan en el extremo terminal-N de una forma Fc nativa o un residuo metionina se adiciona a este. Además, para remover las funciones efectoras, una delección puede ocurrir en un sitio de enlace complemento, tal como un sitio de enlace C1q y un sitio ADCC. Las técnicas de preparación de dichos derivados de secuencia del fragmento Fc de inmunoglobulina se revelan en International Pat. Publication Nos. WO 97/34631 y WO 96/32478.

Intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las proteínas, o péptidos se conocen en el técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Los intercambios que ocurren más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones.

Además, el fragmento Fc, si se desea, puede ser modificado por fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, y similares.

Los derivados de Fc mencionados anteriormente, son derivados que tienen una actividad biológica idéntica al fragmento Fc de la presente invención o estabilidad estructural mejorada, por ejemplo, contra calor, pH, o similares.

Además, estos fragmentos Fc se pueden obtener de formas aisladas nativas de humanos y otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y conejillo de indias, o pueden ser recombinantes o derivados de estos, obtenidos de microorganismos o células de animales transformadas. En este documento, se pueden obtener de una inmunoglobulina nativa por el aislamiento de inmunoglobulinas completas a partir de organismos humanos y de animales y tratarlos con una enzima proteolítica. La papaina digiere la inmunoglobulina nativa en los fragmentos Fc y Fab, y la pepsina, los resultados de tratamiento en la producción de los fragmentos pF'c y F(ab')₂. Estos fragmentos se puede someter, por ejemplo, a cromatografía de tamaño de exclusión para aislar Fc o pF'c.

Preferiblemente, un fragmento Fc derivado humano es un fragmento Fc de inmunoglobulina recombinante, que se obtiene de un microorganismo.

Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser en la forma de cadenas de azúcar aumentadas, que tienen cadenas de azúcar nativa en comparación con una forma nativa o cadenas de azúcar disminuidas en comparación con la forma nativa, o pueden ser en una forma deglicosilada. El incremento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar del Fc de inmunoglobulina se puede lograr por métodos comunes en la técnica, tales como un método químico, un método enzimático y un método de ingeniería genética utilizando un microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de un fragmento Fc resulta en una fuerte disminución en afinidad de enlace con la parte C1q del primer componente del complemento C1 y una disminución o pérdida en la citotoxicidad mediada de la célula dependiente del anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por lo tanto no induce respuestas inmunes innecesarias in vivo. En este sentido, un fragmento Fc de inmunoglobulina en una forma deglicosilada o aglicosilada, puede ser más apropiado para el objeto de la presente invención como un portador del fármaco.

Como se utiliza en este documento, el término "deglicosilación" se refiere a remover enzimáticamente las fracciones de azúcar de un fragmento Fc, y el término "aglicosilación" significa que un fragmento Fc se produce en una forma aglicosilada por un procarionta, preferiblemente *E. coli*.

Por otra parte, el fragmento Fc de inmunoglobulina se puede derivar de humanos u otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y conejillos de indias, y preferiblemente humanos. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede ser un fragmento Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se hace por combinaciones de estos o híbridos de estos. Preferiblemente, este se deriva de IgG o IgM, que se encuentra entre las proteínas más abundantes en sangre humana, y más preferiblemente de IgG, la cual se conoce por mejorar la vida media de las proteínas de enlace de ligandos.

Por otra parte, el término "combinación", como se utiliza en este documento, significa que los polipéptidos codificantes de las regiones de inmunoglobulina de cadena sencilla del mismo origen se unen a un polipéptido de

cadena sencilla de origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, un dímero o multímero se puede formar de dos o más fragmentos seleccionadas a partir del grupo que consiste de fragmentos Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4.

5 El término "híbrido", como se utiliza en este documento, significa que las secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de diferente origen están presentes en un fragmento Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. En la presente invención, varios tipos de híbridos son posibles. Es decir, los híbridos de dominio pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados a partir del grupo que consiste de CH1, CH2, CH3 y CH4 del Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4, y pueden incluir la región bisagra.

10 Por otra parte, la IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente invención incluye combinaciones e híbridos de estos. Se prefieren las subclases IgG2 y IgG4, y se prefiere más el fragmento Fc de IgG4 que rara vez tiene las funciones efectoras tales como CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) (ver, FIGS. 14 y 15).

15 Es decir, como el portador de fármaco de la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina más preferible es un fragmento Fc no-glicosilado derivado de IgG humana. El fragmento Fc derivado humano es más preferible que un fragmento Fc derivado no-humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunes indeseables, tales como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

La presente invención se caracteriza en que el fragmento Fc de inmunoglobulina y el fármaco proteico se unen juntos a través de un polímero no-peptídico.

20 El término "polímero no-peptídico", como se utiliza en este documento, se refiere a un polímero biocompatible incluyendo dos o más unidades de repetición unidas entre sí mediante un enlace covalente que excluye el enlace peptídico.

25 El polímero no-peptídico capaz de ser utilizado en la presente invención es el poli(etileno glicol) (PEG). También, los derivados de estos bien conocidos en la técnica y que se preparan fácilmente dentro del conocimiento de la técnica se incluyen en el alcance de la presente invención. El polímero no-peptídico preferiblemente oscila de 1 a 100 kDa, y preferiblemente de 1 a 20 kDa, en peso molecular. También, el polímero no-peptídico de la presente invención, unido al fragmento Fc de inmunoglobulina, puede ser un polímero o una combinación de diferentes tipos de polímeros.

El polímero no-peptídico útil en la presente invención tiene un grupo reactivo capaz de unirse al fragmento Fc de inmunoglobulina y el fármaco proteico.

30 El polímero no-peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, que preferiblemente se selecciona a partir del grupo que consiste de un grupo reactivo aldehído, un grupo aldehído propiónico, un grupo butil aldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser succinimidil propionato, hidroxil succinimidil, succinimidil carboximetilo o succinimidil carbonato. En particular, cuando el polímero no-peptídico tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, es efectivo en el enlace en ambos extremos con un polipéptido fisiológicamente activo y un fragmento Fc de inmunoglobulina con reacciones no-específicas mínimas. Un producto final generado por alquilación reductiva a través de un enlace aldehído es mucho más estable que cuando se une a través de un enlace amida.

40 Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no-peptídico pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el polímero no-peptídico puede tener un grupo maleimida en un extremo y, en el otro extremo, un grupo aldehído, un grupo aldehído propiónico o un grupo butil aldehído. Cuando un polietileno glicol (PEG) que tiene un grupo hidroxil reactivo en ambos extremos de estos se utiliza como el polímero no-peptídico, el grupo hidroxil se puede activar a varios grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o un PEG que tiene un grupo reactivo modificado disponible comercialmente puede ser utilizado, con el fin de preparar el conjugado de proteína de la presente invención.

45 Por otra parte, en la presente invención, un complejo del fragmento Fc de inmunoglobulina y el polímero no-peptídico se une a un polipéptido fisiológicamente activo para proporcionar un conjugado de proteína.

Los términos "polipéptido fisiológicamente activo", "proteína fisiológicamente activa", "polipéptido activo", "fármaco de polipéptido" o "fármaco proteico", como se utiliza en este documento, son intercambiables en sus significados, y se destacan en que están en una forma fisiológicamente activa que muestra varias funciones fisiológicas in vivo.

50 El fármaco proteico tiene una desventaja de ser incapaz de sostener la acción fisiológica por un largo periodo de tiempo debido a su propiedad de ser, desnaturalizado fácilmente o degradado por las enzimas proteolíticas presentes en el cuerpo. Sin embargo, cuando el fármaco de polipéptido se conjuga con el fragmento Fc de

5 inmunoglobulina de la presente invención para formar un conjugado, el fármaco ha aumentado la estabilidad estructural y la degradación de la vida media. También, el conjugado del polipéptido con el fragmento Fc tiene una disminución mucha más pequeña en actividad fisiológica que otras formulaciones del fármaco de polipéptido conocido. Por consiguiente, en comparación con la biodisponibilidad in vivo de fármacos de polipéptidos convencionales, el conjugado del polipéptido y el fragmento Fc de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que tiene biodisponibilidad in vivo marcadamente mejorada. Esto también se describe claramente a lo largo de las modalidades de la presente invención. Es decir, cuando se une al fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, IFN α , G-CSF, hGH y otros fármacos proteicos mostraron un incremento de aproximadamente dos- a seis-veces de biodisponibilidad in vivo en comparación con sus formas convencionales conjugadas con PEG solo o ambos PEG y albúmina (Tablas 8, 9 y 10).

15 Por otra parte, el enlace de una proteína y el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención se destaca en que no es una fusión por un método de recombinación convencional. Un forma de fusión del fragmento Fc de inmunoglobulina y un polipéptido activo utilizado como un fármaco por un método de recombinación se obtiene de tal manera que el polipéptido se une al terminal-N o terminal-C del fragmento Fc, y de esta manera se expresa y se plega como un polipéptido sencillo de una secuencia de nucleótidos que codifica la forma de fusión.

20 Esto provoca una fuerte disminución en la actividad de la proteína de fusión resultante, debido a que la actividad de una proteína como una sustancia funcional fisiológicamente se determina mediante la conformación de la proteína. De esta manera, cuando un fármaco de polipéptido se fusiona con Fc por un método de recombinación, no hay ningún efecto en relación con la biodisponibilidad in vivo incluso cuando la proteína de fusión ha aumentado la estabilidad estructural. También, dado que una proteína de fusión a menudo se plega incorrectamente y de esta manera se expresa como cuerpos de inclusión, el método de fusión no es económico en la producción de la proteína y el rendimiento del aislamiento. Además, cuando la forma activa o un polipéptido está en una forma glicosilada, el polipéptido debería ser expresado en células eucariotas. En este caso, Fc también es glicosilado, y esta glicosilación puede causar respuestas inmunes no apropiadas in vivo.

25 Es decir, solo la presente invención hace posible producir un conjugado de un polipéptido activo glicosilado y un fragmento Fc de inmunoglobulina aglicosilado, y supera todos los anteriores problemas, incluyendo un mejor rendimiento de la producción de la proteína, porque los dos componentes del complejo individualmente se preparan y aíslan mediante los mejores sistemas.

30 Por otra parte, el polipéptido fisiológicamente activo aplicable al conjugado de proteína de la presente invención se ejemplifica por las hormonas, citoquinas, interleucinas, proteínas de enlace de la interleucina, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores reguladores de la transcripción, factores de coagulación, vacunas, proteínas estructurales, ligandos o receptores de proteínas, antígenos de superficie celular, antagonistas del receptor, y derivados de estos.

35 En concreto, ejemplos no-limitantes del polipéptido fisiológicamente activo incluyen hormona humana de crecimiento, hormona de liberación de la hormona de crecimiento, péptido de liberación de la hormona de crecimiento, interferones y receptores del interferón (por ejemplo, interferón- α , - β y - γ , receptor del interferón tipo I soluble en agua, etc.), factores de estimulación de colonias, interleucinas (por ejemplo, interleucina-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, etc.) y receptores de la interleucina (por ejemplo, receptor IL-1, receptor IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2- sulfatasa, alfa-galactosidasa-A, alfa-L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato descarboxilasa, miglucerasa, lipasa, uricasa, acetilhidrolasa factor activador de las plaquetas, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), interleucina y proteínas de enlace de la citoquina (por ejemplo, IL-18bp, proteína de enlace-TNF, etc.), factor de activación del macrófago, péptido macrófago, factor de célula B, factor de célula T, proteína A, inhibidor de la alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotóxina, linfotóxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento de metástasis, alfa-1 antitripsina, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, reitropoyetina, reitropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de la trombina, trombomodulina, factor VII, factor VIIA, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activador del plasminógeno, péptido de enlace de fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína reactiva C, inhibidor de la renina, inhibidor de la collagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína de estimulación ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador del tejido conectivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona estimuladora del folículo, hormona luteinizante, hormona de liberación de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, axogenesis factor-1, péptidos similares al glucagón (por ejemplo, GLP-1 etc.), péptido natriurético cerebral, factor neurotrófico derivado glial, netrina, factor inhibidor neurofilo, factor neurotrófico, neuturina, etc.), hormona paratiroide, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido de liberación de gastrina, factor de liberación de la corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (por ejemplo, TNFR(P75), TNFR(P55), receptor de IL-1, receptor VEGF, receptor del factor activador de la célula B, etc.), antagonistas del

receptor (por ejemplo, IL1-Ra etc.), antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fd), y antígenos de vacuna derivados de virus.

5 En particular, se prefieren como polipéptidos fisiológicamente activos, aquellos que requieren frecuente dosificación con la administración al cuerpo para terapia o prevención de enfermedades, que incluyen hormona humana de crecimiento, interferones (interferón- α , - β , - γ , etc.), factor estimulante de colonias de granulocitos, reitropoyetina (EPO) y fragmentos de anticuerpos. El fármaco de polipéptido más preferido es el interferón alfa. Además, ciertos derivados se incluyen en el alcance de los polipéptidos fisiológicamente activos de la presente invención siempre y cuando tengan función, estructura, actividad o estabilidad sustancialmente idéntica o mejor en comparación de las formas nativas de los polipéptidos fisiológicamente activos.

10 En la presente invención, un fragmento de anticuerpo puede ser Fab, Fab', F(ab')₂, Fd o scFv, que es capaz de unirse a un antígeno específico, y preferiblemente Fab'. Los fragmentos Fab contienen el dominio variable (V_L) y dominio constante (C_L) de la cadena ligera y el dominio variable (V_H) y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en términos de la adición de varios residuos de aminoácidos incluyendo uno o más residuos de cisteína a partir de la región bisagra al terminal carboxilo del dominio C_{H1}. Los fragmentos Fd comprenden solo el dominio V_H y C_{H1}, y los fragmentos F(ab')₂ se producen como un par de fragmentos Fab' mediante ya sea un enlace disulfuro o una reacción química. Los fragmentos scFv (Fv de cadena sencilla) comprenden los dominios V_L y V_H que se unen entre sí por un ligador de péptido y de esta manera están presentes en una cadena de polipéptido sencillo.

15 Por otra parte, cuando un fragmento Fc de inmunoglobulina y un fármaco proteico se unen juntos por medio de un polímero no-peptídico, los sitios de enlace del fragmento Fc de inmunoglobulina incluyen uno o más grupos reactivos libres de residuos de aminoácidos presentes en la región bisagra o región constante. Preferiblemente, la región constante del Fc de inmunoglobulina y el fármaco proteico se unen de forma covalente en un extremo terminal amino, un grupo amino de un residuo de lisina, un grupo amino de un residuo de histidina o un residuo de cisteína libre con un grupo reactivo en los extremos respectivos del polímero no-peptídico.

20 El conjugado de proteína de la presente invención puede incluir una o más estructuras de unidad del "polipéptido fisiológicamente activo-polímero no-peptídico-fragmento Fc de inmunoglobulina", en donde todos los componentes se unen linealmente mediante un enlace covalente. Dado que el polímero no-peptídico posee un grupo reactivo en ambos extremos de este, se conecta con el polipéptido fisiológicamente activo y el fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un enlace covalente. Es decir, a un fragmento Fc de inmunoglobulina sencillo, uno o más complejos de un polímero no-peptídico con un polipéptido fisiológicamente activo, se pueden unir mediante un enlace covalente para proporcionar un monómero, dímero o multímero del polipéptido fisiológicamente activo por medio del fragmento Fc de inmunoglobulina, por lo tanto más eficaz para lograr una mejor actividad y estabilidad in vivo.

25 En el conjugado de proteína de la presente invención, la proteína fisiológicamente activa se puede unir al fragmento Fc de inmunoglobulina a diversas relaciones molares.

30 Además, como se conoce convencionalmente, dos diferentes proteínas se unen juntas a través de un oligopéptido, una secuencia de aminoácidos, creada en el sitio de unión, tiene un riesgo de inducir respuestas inmunes, y sitios de enlace de las proteínas se limitan a un terminal-N y terminal-C. Por lo contrario, dado que el conjugado de proteína de la presente invención se media por un polímero biocompatible no-peptídico, es ventajoso en términos de no tener efectos secundarios, tales como toxicidad o inducción de respuesta inmune y que permite la preparación de las diversos conjugados de proteína debido a su diversidad de sitios de enlace.

35 Además, el método convencional de fusionar directamente un fragmento Fc de inmunoglobulina con una proteína activa por recombinación genética es problemático debido a que permite que la fusión que se hace solo en una secuencia terminal del fragmento Fc de inmunoglobulina utilizado como un socio de fusión y debido a que limita el rendimiento de la proteína de fusión debido a su modo de producción que es dependiente del cultivo celular animal. El método convencional tiene otros problemas en los cuales la actividad de la proteína activa puede disminuir debido a la glicosilación no-nativa, el plegamiento de proteínas debe ocurrir con exactitud, y la proteína de fusión se puede producir en una forma de homodímero. En particular, cuando los conjugados se producen en *E. coli*, los conjugados plegados incorrectamente insolubles son muy difíciles de remover. Por lo contrario, el conjugado de proteína de la presente invención puede lograr una duración de acción más prolongada y una estabilidad mucho mayor sin causar estos problemas, se prefiere en relación con el mantenimiento de actividad de un polipéptido, y permite la preparación de un conjugado que comprende una proteína terapéutica glicosilada ligada a un Fc no-glicosilado.

40 Por otra parte, los aglutinantes químicos de peso molecular bajo, tales como carbodiimida o glutaraldehído, tienen los siguientes problemas: se unen de forma simultánea a varios sitios en una proteína, conduciendo a la desnaturalización de la proteína, y se unen de forma no-específica, por lo que es difícil controlar los sitios de enlace o purificar una proteína conectada. Por lo contrario, dado que el conjugado de proteína de la presente invención

emplea un polímero no-peptídico, esto facilita el control de sitios de enlace, minimiza las reacciones no-específicas y facilita la purificación de la proteína.

5 La utilidad de la presente invención se describe con más detalle basándose en las modalidades de la presente invención, de la siguiente manera. El conjugado de proteína (polipéptido-PEG-Fc) de la presente invención, que comprende un polipéptido fisiológicamente activo y un fragmento Fc de inmunoglobulina, que se unen a cada extremo de PEG, ejerce una estabilidad mucho mayor que un complejo polipéptido-PEG o un conjugado polipéptido-PEG-albúmina. El análisis farmacocinético reveló que IFN α tiene un aumento de la vida media en suero de aproximadamente 20 veces cuando se une a un PEG de 40-kDa (complejo IFN α -40K PEG) y de aproximadamente 10 veces en un conjugado IFN α -PEG-albúmina, en comparación con el IFN α nativo. Por lo contrario, un conjugado IFN α -PEG-Fc de acuerdo con la presente invención mostró un aumento notable de la vida media de aproximadamente 50 veces (ver, Tabla 3). Además, el mismo resultado se observó en otras proteínas dianas, la hormona humana de crecimiento (hGH), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y su derivado (¹⁷S-G-CSF), o reitropoyetina (EPO). Los conjugados de proteínas de acuerdo con la presente invención, cada uno de los cuales comprende una proteína diana ligada a PEG-Fc, mostró incrementos de aproximadamente 10-veces en el tiempo de residencia medio (MRT) y la vida media en suero en comparación con las formas nativas de las proteínas y las formas conjugadas con PEG o PEG-albúmina (ver, Tablas 4 a 7).

Además, cuando un complejo PEG-Fc se une a un grupo –SH, cerca del terminal-C de un Fab' o del terminal-N del Fab', el conjugado Fab'-PEG-Fc resultante mostró una vida media en suero 2 a 3-veces mayor que un complejo 40K PEG-Fab' (ver, FIG. 12).

20 Además, cuando los conjugados de proteína se preparan utilizando Fc de inmunoglobulina deglicosilada (DG Fc), donde las fracciones de azúcar se retiran, y los derivados de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante (AG Fc), sus vidas medias en plasma y la actividad in vitro se conservaron similares a las de los conjugados de proteína preparados utilizando el Fc nativo (ver, Tabla 3 y FIGS. 8 y 11).

25 Por consiguiente, ya que los conjugados de proteína de la presente invención han alargado la vida media en suero y el tiempo de residencia medio (MRT) cuando se aplican a una variedad de polipéptidos fisiológicamente activos incluyendo la hormona humana de crecimiento, interferón, reitropoyetina, factor estimulante de colonias o sus derivados, y los derivados de anticuerpo, son útiles para desarrollar las formulaciones de acción prolongada de diversos polipéptidos fisiológicamente activos.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de un conjugado de proteína con una mejorada estabilidad y duración in vivo, que comprende: (a) facilitar una reacción entre un polímero no-peptídico que tiene un grupo reactivo en ambos extremos de estos, un polipéptido fisiológicamente activo y un fragmento Fc de inmunoglobulina que se liga de forma covalente; y (b) aislamiento de un conjugado resultante, que comprende el polipéptido fisiológicamente activo y el fragmento Fc de inmunoglobulina que se une de forma covalente a cada extremo del polímero no-peptídico.

35 En la etapa (a), el enlace covalente de los tres componentes ocurre de forma secuencial o simultánea. Por ejemplo, cuando el polipéptido fisiológicamente activo y el fragmento Fc de inmunoglobulina se unen a cada extremo del polímero no-peptídico, cualquiera de los polipéptidos fisiológicamente activos y el fragmento Fc de inmunoglobulina se une a un extremo del polímero no-peptídico, y a continuación el otro se une con el otro extremo del polímero no-peptídico. Este enlace secuencial se prefiere para minimizar la producción de los diferentes subproductos de un conjugado de proteína deseado.

40 De esta manera, la etapa (a) pueden incluir (a1) el enlace de forma covalente de un fragmento Fc de inmunoglobulina o polipéptido fisiológicamente activo con un extremo de un polímero no-peptídico; (a2) aislamiento de un complejo que comprende el fragmento Fc de inmunoglobulina o el polipéptido fisiológicamente activo unido al polímero no-peptídico de la mezcla de reacción; y (a3) el enlace de forma covalente de un polipéptido fisiológicamente activo o fragmento Fc de inmunoglobulina con el otro extremo del polímero no-peptídico del complejo aislado para proporcionar un conjugado de proteína que comprende el fragmento Fc de inmunoglobulina y el polipéptido fisiológicamente activo, que se unen a cada extremo del polímero no-peptídico.

45 En la etapa (a1), la relación molar óptima de la reacción del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no-peptídico puede oscilar de 1:2.5 a 1:5, y la relación molar óptima de la reacción del fragmento Fc de inmunoglobulina y el polímero no-peptídico puede oscilar de 1:5 a 1:10.

Por otra parte, en la etapa (a3), la relación molar de la reacción del complejo obtenido en la etapa (a2) con el fragmento Fc de inmunoglobulina o polipéptido fisiológicamente activo puede oscilar de 1:0.5 a 1:20, y preferiblemente de 1:1 a 1:3.

Si se desea, las etapas (a1) y (a3) se pueden llevar a cabo en la presencia de un agente reductor dependiendo del tipo de grupos reactivos en ambos extremos del polímero no-peptídico que participa en las reacciones en las etapas (a1) y (a3). Los agentes reductores preferidos pueden incluir cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃), borohidruro de sodio, dimetilamina borato y piridina borato.

5 Teniendo en cuenta, los grados de pureza necesarios en las etapas (a2) y (b) y los pesos moleculares y las cargas de los productos, se puede seleccionar un método apropiado de aislamiento de proteínas a partir de métodos comúnmente utilizados para el aislamiento de proteínas en el oficio. Por ejemplo, una variedad de métodos conocidos incluyendo cromatografía de tamaño de exclusión y cromatografía de intercambio iónico se pueden aplicar. Si se desea, una combinación de una pluralidad de diferentes métodos se puede utilizar para un alto grado de purificación.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para proporcionar un polipéptido fisiológicamente activo que presenta una estabilidad y una duración in vivo mejorada, que comprende el conjugado de proteína de la presente invención como un componente efectivo junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

15 El término "administración", como se utiliza en este documento, significa introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente mediante un cierto método apropiado. El conjugado de la presente invención se puede administrar a través de cualquiera de las rutas comunes, siempre y cuando sean capaces de alcanzar un tejido deseado. Una variedad de modos de administración se contempla, incluyendo vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarectal, pero la presente invención no se limita a estos modos de administración ejemplificados. Sin embargo, dado que los péptidos se digieren bajo la administración oral, los ingredientes activos de una composición para la administración oral se deben recubrir o formular para la protección contra la degradación en el estómago. Preferiblemente, la presente composición se puede administrar en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar utilizando cierto mecanismo capaz de transportar los ingredientes activos en una célula diana.

20 La composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con la presente invención puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, excipientes, solubilizantes, agentes dispersantes, estabilizadores, agentes de suspensión, agentes colorantes y perfumes. Para las preparaciones inyectables, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir agentes reguladores, agentes conservantes, analgésicos, solubilizantes, agentes isotónicos y estabilizadores. Para las preparaciones de administración tópica, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir bases, excipientes, lubricantes y agentes conservantes. La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una variedad de formas de dosificación en combinación con los portadores farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en comprimidos, comprimidos medicinales, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes o wafers. Para las preparaciones inyectables, la composición farmacéutica se puede formular en una forma de dosificación por unidad, tal como un contenedor multidosis o una ampolla como una forma de dosificación de dosis unitaria. La composición farmacéutica también se puede formular en soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

35 Por otra parte, ejemplos de portadores, excipientes y diluentes apropiados para las formulaciones farmacéuticas incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, las formulaciones farmacéuticas además pueden incluir rellenos, agentes anti-coagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes, emulsionantes y antisépticos.

40 Una dosificación sustancial de un fármaco en combinación con el fragmento Fc de la presente invención como un portador se puede determinar por varios factores relacionados incluyendo los tipos de enfermedades que se tratan, rutas de administración, la edad del paciente, género, peso y gravedad de las enfermedades, así como por los tipos del fármaco como un componente activo. Dado que la composición farmacéutica de la presente invención tiene una duración de acción in vivo muy prolongada, tiene una ventaja de reducir ampliamente la frecuencia de administración de los fármacos farmacéuticos.

45 Una mejor comprensión de la presente invención, se puede obtener a través de los siguientes ejemplos que se presentan para ilustrar, pero no se deben interpretar como el límite de la presente invención.

EJEMPLO 1: Preparación I del conjugado IFN α -PEG-fragmento Fc de inmunoglobulina

55 <Etapa 1> Preparación del fragmento Fc de inmunoglobulina utilizando inmunoglobulina

Un fragmento Fc de inmunoglobulina se preparó de la siguiente manera. 200 mg de inmunoglobulina G de 150-kDa (IgG) (Green Cross, Korea) disueltos en solución reguladora de fosfato 10 mM se trató con 2 mg de una enzima proteolítica, papaina (Sigma) a 37°C durante 2 hrs con agitación suave. Después de la reacción de la enzima, el fragmento Fc de inmunoglobulina regenerado de esta manera fue sometido a cromatografía para la purificación utilizando secuencialmente una columna Superdex, una columna de proteína A y una columna de intercambio catiónica. En detalle, la solución de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (PBS, pH 7.3), y la columna fue eluida con la misma solución reguladora a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las moléculas de inmunoglobulina no-reactivas (IgG) y F(ab')₂, que tienen un peso molecular relativamente alto en comparación con el fragmento Fc de inmunoglobulina, fueron eliminadas utilizando su propiedad de ser eluidos más temprano que el fragmento Fc de Ig. Los fragmentos Fab que tienen un peso molecular similar al fragmento Fc de Ig fueron eliminados mediante cromatografía de columna de proteína A (FIG. 1). Las fracciones resultantes que contienen el fragmento Fc de Ig eluido de la columna Superdex 200 fueron cargadas a una velocidad de flujo de 5 ml/min en una columna de proteína A (Pharmacia) equilibrada con solución reguladora de fosfato 20 mM (pH 7.0), y la columna se lavó con la misma solución reguladora para remover las proteínas sin unir a la columna. A continuación, la columna de proteína A fue eluida con solución reguladora de citrato de sodio 100 mM (pH 3.0) para obtener el fragmento Fc de inmunoglobulina de alta pureza. Las fracciones Fc recolectadas de la columna de proteína A, finalmente se purificaron utilizando una columna de intercambio catiónica (polyCAT, PolyLC Company), en donde esta columna cargada con las fracciones Fc fue eluida con un gradiente lineal de NaCl 0.15-0.4 M en solución reguladora de acetato 10 mM (pH 4.5), proporcionando así, las fracciones de Fc altamente puras. Las fracciones Fc altamente puras fueron analizadas por SDS-PAGE al 12% (carril 2 en la FIG. 2).

<Etapa 2> Preparación del complejo IFN α -PEG

El polietileno glicol de 3.4-kDa, que tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), se mezcló con interferón humano alfa-2b (hIFN α -2b, MW: 20 kDa) disuelto en solución reguladora de fosfato 100 mM en una cantidad de 5 mg/ml a una relación molar de IFN α : PEG de 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 y 1:20. A esta mezcla, se le adicionó un agente reductor, cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃, Sigma), a una concentración final de 20 mM y se deja reaccionar a 4°C durante 3 hrs, con agitación suave para permitir que PEG se una al extremo del terminal amino del interferón alfa. Para obtener un complejo 1:1 de PEG e interferón alfa, la mezcla de reacción fue sometida a cromatografía de tamaño de exclusión utilizando una columna SuperdexR (Pharmacia). El complejo IFN α -PEG fue eluido de la columna utilizando solución reguladora de fosfato de potasio 10 mM (pH 6.0) como una solución reguladora de elución, y fueron eliminados el interferón alfa no ligado a PEG, PEG sin reaccionar y los subproductos dímeros donde PEG se unió a dos moléculas de interferón alfa. El complejo IFN α -PEG purificado se concentró a 5 mg/ml. A través de éste experimento, se encontró que la relación molar óptima de la reacción para IFN α con PEG, que proporciona la más alta reactividad y que genera la más pequeña cantidad de subproductos, tales como dímeros, fue 1:2.5 a 1:5.

<Etapa 3> Preparación del conjugado IFN α -PEG-Fc

Para unir el complejo IFN α -PEG purificado, en la anterior etapa 2, con el terminal-N de un fragmento Fc de inmunoglobulina, el fragmento Fc de inmunoglobulina (aproximadamente 53 kDa) preparado en la anterior etapa 1 se disolvió en solución reguladora de fosfato 10 mM y se mezcló con el complejo IFN α -PEG, a una relación molar del complejo IFN α -PEG: Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después, la concentración de la solución reguladora de fosfato de la solución de reacción, se ajustó a 100 mM, un agente reductor, NaCNBH₃, se le adicionó a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 20 hrs con agitación suave. A través de este experimento, se encontró que la relación molar óptima de la reacción para el complejo IFN α -PEG con Fc, que proporciona la más alta reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, fue 1:2.

<Etapa 4> Aislamiento y purificación del conjugado IFN α -PEG-Fc

Después de la reacción de la anterior etapa 3, la mezcla de reacción fue sometida a cromatografía de tamaño de exclusión Superdex, con el fin de eliminar las sustancias sin reaccionar y los subproductos y purificar el conjugado de la proteína IFN α -PEG-Fc producida. Después la mezcla de reacción se concentró y cargó en una columna Superdex, se pasó la solución reguladora de fosfato 10 mM (pH 7.3) a través de la columna a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min para remover el Fc sin unir y las sustancias sin reaccionar, seguido por la elución de la columna para recolectar las fracciones del conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc. Dado que las fracciones del conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc recolectadas, contienen una pequeña cantidad de impurezas, Fc sin reaccionar y dímeros del interferón alfa, una cromatografía de intercambio catiónico se llevó a cabo para remover las impurezas. Las fracciones del conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc fueron cargadas en una columna PolyCAT LP (PolyLC) equilibrada con acetato de sodio 10 mM (pH 4.5), y la columna fue eluida con un gradiente lineal de 0-0.5 M NaCl en solución reguladora de acetato de sodio 10 mM (pH 4.5), utilizando NaCl 1 M. Por último, el conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc fue purificado utilizando una columna de intercambio aniónica. Las fracciones del conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc fueron cargadas en una columna PolyWAX LP (PolyLC), equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH

7.5), y a continuación, la columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl 0-0.3 M en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5) utilizando NaCl 1 M, aislando así el conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc en una forma muy pura.

EJEMPLO 2: Preparación II del conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc

<Etapa 1> Preparación del complejo Fc-PEG

5 El polietileno glicol de 3.4-kDa, que tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), se mezcló con el fragmento Fc de inmunoglobulina preparado en la etapa 1, del Ejemplo 1 a relaciones molares de Fc:PEG de 1:1, 1: 2.5, 1:5, 1:10 y 1:20, en donde el fragmento Fc de Ig se ha disuelto en solución reguladora de fosfato 100 mM, en una cantidad de 15 mg/ml. A esta mezcla, un agente reductor, NaCNBH₃ (Sigma), se le adicionó a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C, durante 3 hrs con agitación suave. Para obtener un complejo 1:1 de PEG y Fc, la mezcla de reacción fue sometida a cromatografía de tamaño de exclusión utilizando una columna SuperdexR (Pharmacia). El complejo Fc-PEG fue eluido de la columna utilizando solución reguladora de fosfato de potasio 10 mM (pH 6.0), como la solución reguladora de elución, y fueron eliminados el fragmento Fc de inmunoglobulina no ligado a PEG, PEG sin reaccionar y los subproductos dímeros donde PEG se unió a dos moléculas de fragmentos Fc de inmunoglobulina. El complejo Fc-PEG purificado se concentró a aproximadamente 15 mg/ml. A través de este experimento, la relación molar óptima de la reacción para Fc con PEG, que proporciona la más alta reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tal como dímeros, se encontró que fue 1:3 a 1:10.

<Etapa 2> Formación y purificación del conjugado del complejo Fc-PEG y el interferón alfa

20 Para unir el complejo Fc-PEG purificado en la anterior etapa 1, con el terminal-N de IFN α , el complejo Fc-PEG se mezcló con IFN α disuelto en solución reguladora de fosfato 10 mM a relaciones molares del complejo Fc-PEG: IFN α de 1:1, 1:1.5, 1:3 y 1:6. Después la concentración de la solución reguladora de fosfato de la solución de reacción se ajustó a 100 mM, un agente reductor, NaCNBH₃, se le adicionó a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 20 hrs con agitación suave. Después de que la reacción se completó, las sustancias sin reaccionar y los subproductos fueron eliminados de acuerdo con el mismo método de purificación como en la etapa 4 del Ejemplo 1, aislando así, el conjugado de proteína Fc-PEG-IFN α en una forma muy pura.

EJEMPLO 3: Preparación del conjugado hGH-PEG-Fc

Un conjugado hGH-PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que otro fármaco diferente del interferón alfa, fue utilizada la hormona humana de crecimiento (hGH, MW: 22 kDa) y una relación molar de hGH:PEG fue 1:5.

EJEMPLO 4: Preparación del conjugado G-CSF-PEG-Fc

Un conjugado G-CSF-PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que otro fármaco diferente del interferón alfa, se utilizó el factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hG-CSF), y la relación molar de hG-CSF: PEG fue 1:5.

35 Por otra parte, un conjugado de proteína ¹⁷S-G-CSF-PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con el mismo método como se describe anteriormente, utilizando un derivado de G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, que tiene una sustitución de serina en el decimoséptimo residuo del aminoácido del hG-CSF nativo.

EJEMPLO 5: Preparación del conjugado EPO-PEG-Fc

40 Un conjugado EPO-PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que otro fármaco diferente del interferón alfa, se utilizó la reitropoyetina humana (EPO), y la relación molar de EPO: PEG fue 1:5.

EJEMPLO 6: Preparación del conjugado de proteína utilizando PEG que tiene diferente grupo reactivo

45 Un conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc se preparó utilizando PEG que tiene un grupo reactivo succinimidil propionato (SPA) en ambos extremos, de la siguiente manera. El polietileno glicol de 3.4-kDa, SPA-PEG-SPA (Shearwater), se mezcló con 10 mg de interferón alfa disuelto en solución reguladora de fosfato 100 mM a unas relaciones molares de IFN α :PEG 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 y 1:20. A continuación la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 hrs. Para obtener un complejo 1:1 de PEG y el interferón alfa (complejo IFN α -PEG), donde PEG se unió selectivamente al grupo amino de un residuo de lisina de interferón alfa, la mezcla de reacción fue sometida a cromatografía de tamaño de exclusión Superdex. El complejo IFN α -PEG fue eluido de la columna, utilizando solución reguladora de fosfato de potasio 10 mM (pH 6.0) como una solución reguladora de elución, y fueron eliminados el interferón alfa no-ligado a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos

dímeros en los cuales dos moléculas de interferón alfa se unieron a ambos extremos de PEG. Para unir el complejo IFN α -PEG al grupo amino de un residuo de lisina de Fc de inmunoglobulina, el complejo IFN α -PEG purificado se concentró a aproximadamente 5 mg/ml, y un conjugado IFN α -PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con los mismos métodos que en las etapas 3 y 4 del Ejemplo 1. A través de este experimento, la relación molar óptima de la reacción para IFN α con PEG, que proporciona la más alta reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se encontró que fue 1:2.5 a 1:5.

Por otra parte, otro conjugado IFN α -PEG-Fc se preparó de acuerdo con los mismos métodos que se describen anteriormente utilizando PEG) que tiene un grupo reactivo N-hidroxisuccinimidil (NHS) en ambos extremos, NHS-PEG-NHS (Shearwater), o PEG que tiene un grupo reactivo butil aldehído en ambos extremos, BUA-PEG-BUA (Shearwater).

EJEMPLO 7: Preparación del conjugado de proteína utilizando PEG que tiene diferente peso molecular

Un complejo IFN α -10K PEG se preparó utilizando polietileno glicol 10-kDa que tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater). Este complejo se preparó y purificó de acuerdo con el mismo método que el de la etapa 2 del Ejemplo 1. A través de este experimento, la relación molar óptima de la reacción para IFN α con PEG 10-kDa, que proporciona la más alta reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se encontró que fue 1:2.5 a 1:5. El complejo IFN α -10K PEG purificado, se concentró a aproximadamente 5 mg/ml, y, utilizando este concentrado, un conjugado IFN α -10K PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con los mismos métodos que en las etapas 3 y 4 del Ejemplo 1.

EJEMPLO 8: Preparación del conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc (grupo -SH)

<Etapa 1> Expresión y Purificación de Fab'

Un *E. coli* transformado, BL21/poDLHF (número de acceso: KCCM-10511), que expresa anti-factor de necrosis tumoral-alfa Fab', se cultivó en 100 ml de medio LB durante la noche con agitación, y se inoculó en un fermentador de 5-L (Marubishi) y se cultivó a 30°C y 500 rpm y a una velocidad de flujo del aire de 20 vvm. Para compensar la insuficiencia de nutrientes del crecimiento de bacterias durante la fermentación, los cultivos fueron suplementados con glucosa y extractos de levadura de acuerdo con los estados de fermentación de las bacterias. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de OD600 de 80-100, un inductor, IPTG, se le adicionó a los cultivos para inducir la expresión de la proteína. Los cultivos además fueron cultivados durante 40 a 45 hrs hasta que el valor de OD a 600 nm se incrementó de 120 a 140. El líquido de fermentación obtenido de esta manera se centrifugó a 20,000 X g durante 30 min. El sobrenadante fue recolectado, y se descartó la pella.

El sobrenadante fue sometido a la siguiente cromatografía de columna de tres etapas para purificar el factor-alfa de necrosis anti-tumoral Fab'. El sobrenadante se cargó en una columna de proteína G HiTrap (5 ml, Pharmacia) equilibrada con solución reguladora de fosfato 20 mM (pH 7.0), y la columna fue eluida con glicina 100 mM (pH 3.0). A continuación, las fracciones Fab' recolectadas se cargaron en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM. (PBS, pH 7.3), y esta columna fue eluida con la misma solución reguladora. Por último, las segundas fracciones Fab' fueron cargadas en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC), y esta columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0.15-0.4 M en solución reguladora acetato 10 mM (pH 4.5), proporcionando así, las fracciones del factor-alfa de necrosis anti-tumoral Fab' de alta pureza.

<Etapa 2> Preparación y purificación del complejo Fc-PEG

Para unir un ligador PEG al terminal-N de un Fc de inmunoglobulina, el Fc de inmunoglobulina preparado de acuerdo con el mismo método que el de la etapa 1 del Ejemplo 1, se disolvió en solución reguladora de fosfato 100 mM (pH 6.0) a una concentración de 5 mg/ml, y se mezcló con NHS-PEG-MAL (3.4 kDa, Shearwater) a una relación molar de Fc:PEG de 1:10, seguido por la incubación a 4°C durante 12 hrs con agitación suave.

Después de que la reacción se completó, la solución de reacción reguladora se intercambió con solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM (pH 6.0) para eliminar el NHS-PEG-MAL no unido. A continuación, la mezcla de reacción se cargó en una columna polyCAT (PolyLC). La columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0.15-0.5 M en solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM (pH 6.0). Durante esta elución, el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG se eluye más temprano que Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, y el Fc de Ig sin reaccionar se eluye más tarde, eliminando así las moléculas de Fc de Ig sin reaccionar.

<Etapa 3> Preparación y purificación del conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc (grupo -SH)

Para unir el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG con un grupo cisteína del Fab', el Fab' purificado en la anterior etapa 1 se disolvió en solución reguladora de fosfato de sodio 100 mM (pH 7.3) a una concentración de 2 mg/ml, y se mezcló con el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG preparado en la anterior etapa 2 a una relación molar de

Fab': complejo de 1:5. La mezcla de reacción se concentró a una concentración final de proteína de 50 mg/ml y se incubó a 4°C durante 24 hrs con agitación suave.

Después de que la reacción se completó, la mezcla de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.3), y la columna fue eluida con la misma solución reguladora a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc acoplado se eluye relativamente más temprano debido a su alto peso molecular, y complejo PEG- Fc de inmunoglobulina sin reaccionar y Fab' se eluyen más tarde, eliminando así las moléculas sin reaccionar. Para eliminar completamente PEG- Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, las fracciones recolectadas del conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc se cargaron otra vez en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC), y esta columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0.15-0.5 M en solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM (pH 6.0), proporcionando así un conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc puro, que comprende el complejo Fc-PEG ligado a un grupo -SH cerca al terminal-C del Fab'.

EJEMPLO 9: Preparación del conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc (terminal-N)

<Etapa 1> Preparación y purificación del complejo Fab'-PEG (terminal-N)

40 mg del Fab' purificado en la etapa 1 del Ejemplo 8, se disolvió en solución reguladora de fosfato de sodio 100 mM (pH 6.0) a una concentración de 5 mg/ml, y se mezcló con butil ALD-PEG-butyl ALD (3.4 kDa, Nektar) a una relación molar de Fab':PEG de 1:5. Se le adicionó, un agente reductor, NaCNBH₃ a la mezcla de reacción para una concentración final de 20 mM, y la mezcla de reacción luego se dejó reaccionar a 4°C durante 2 hrs con agitación suave.

Después de que la reacción se completó, la solución de reacción reguladora se intercambiò con solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM (pH 6.0). A continuación, la mezcla de reacción se cargó en una columna polyCAT (PolyLC). La columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0.15-0.4 M en solución reguladora de acetato 20 mM (pH 4.5). Durante la elución de esta columna, el complejo Fab'-PEG que comprende el ligador PEG alineado al terminal-N del Fab' se eluye más temprano que el Fab' sin reaccionar, y el Fab' sin reaccionar se eluye más tarde, eliminando así las moléculas Fab' sin reaccionar.

<Etapa 2> Preparación y purificación del conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc

Para unir el complejo Fab'-PEG purificado en la anterior etapa 1 con el terminal-N de un Fc de inmunoglobulina, el complejo Fab'-PEG se disolvió en solución reguladora de fosfato de sodio 100 mM (pH 6.0) a una concentración de 10 mg/ml, y se mezcló con el Fc de inmunoglobulina disuelto en la misma solución reguladora a una relación molar del complejo Fab'-PEG:Fc de 1:5. Después la mezcla de reacción se concentró a una concentración final de proteína de 50 mg/ml, un agente reductor, NaCNBH₃, se le adicionó a la mezcla de reacción a una concentración final de 20 mM, y a continuación la mezcla de reacción se hizo reaccionar a 4°C durante 24 hrs con agitación suave.

Después de que la reacción se completó, la mezcla de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.3), y la columna fue eluida con la misma solución reguladora a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc acoplado se eluye relativamente más temprano debido a su alto peso molecular, y el Fc de inmunoglobulina sin reaccionar y el complejo Fab'-PEG se eluyen más tarde, eliminando así las moléculas sin reaccionar. Para eliminar completamente las moléculas de Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, las fracciones recolectadas del conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc se cargaron otra vez en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC), y esta columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0.15-0.5 M en solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM (pH 6.0), proporcionando así un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc puro, que comprende el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG ligado al terminal-N del Fab'.

EJEMPLO 10: Preparación y purificación del Fc de inmunoglobulina deglicosilada

200 mg de un Fc de inmunoglobulina preparado de acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo 1, se disolvió en solución reguladora de fosfato 100 mM (pH 7.5) a una concentración de 2 mg/ml, y se mezcló con 300 U/mg de una deglicosilasa, PNGase F (NEB). La mezcla de reacción se deja reaccionar a 37°C durante 24 hrs con agitación suave. A continuación, para purificar el Fc de inmunoglobulina deglicosilada, la mezcla de reacción se cargó en una columna SP Sepharose FF (Pharmacia), y la columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0.1-0.6 M en solución reguladora de acetato 10 mM (pH 4.5) utilizando NaCl 1 M. El Fc de inmunoglobulina nativa se eluye más temprano, y el Fc de inmunoglobulina deglicosilada (DG Fc) se eluye más tarde.

EJEMPLO 11: Preparación del conjugado IFN α -PEG-DG Fc

Para unir el Fc de inmunoglobulina deglicosilada preparado en el Ejemplo 10 con el complejo IFN α -PEG purificado en la etapa 2 del Ejemplo 1, el complejo IFN α -PEG se mezcló con el DG Fc disuelto en solución reguladora de fosfato 10 mM en las relaciones molares del complejo IFN α -PEG: DG Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de la

5 concentración de la solución reguladora de fosfato, la solución de reacción se ajustó a 100 mM, un agente reductor, NaCNBH₃, se le adicionó a la solución de reacción para una concentración final de 20 mM y se deja reaccionar a 4°C durante 20 hrs con agitación suave. A través de este experimento, la relación molar óptima de la reacción para el complejo IFN α -PEG con DG Fc, que proporciona la más alta reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se encontró que fue 1:2.

10 Después de la reacción de acoplamiento, la mezcla de reacción fue sometida a cromatografía de tamaño de exclusión utilizando una columna SuperdexR (Pharmacia) con el fin de eliminar las sustancias sin reaccionar y los subproductos y purificar el conjugado de proteína IFN α -PEG-DG Fc. Después la mezcla de reacción se cargó en la columna, una solución reguladora de fosfato (pH 7.3) se pasó a través de la columna a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min para eliminar el DG Fc sin unir y las sustancias sin reaccionar, seguido por la elución de la columna para recolectar las fracciones del conjugado de proteína IFN α -PEG-DG Fc. Dado que las fracciones recolectadas del conjugado de proteína IFN α -PEG-DG Fc contienen una pequeña cantidad de impurezas, DG Fc sin reaccionar y complejo IFN α -PEG, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico, para eliminar las impurezas. Las fracciones del conjugado de proteína IFN α -PEG-DG Fc fueron cargadas en una columna PolyCAT LP (PolyLC) equilibrada con acetato de sodio 10 mM (pH 4.5), y la columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl 0-0.6 M en solución reguladora de acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) utilizando NaCl 1 M. Por último, el conjugado de proteína IFN α -PEG-DG Fc fue purificado utilizando una columna de intercambio aniónica. Las fracciones del conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc fueron cargadas en una columna PolyWAX LP (PolyLC) equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), y a continuación, la columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl 0-0.3 M en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5) utilizando NaCl 1 M, aislando así, el conjugado de proteína IFN α -PEG-DG Fc en una forma muy pura.

EJEMPLO 12: Preparación y purificación del derivado de Fc de inmunoglobulina recombinante aglicosilado

<Preparación del vector de expresión del derivado 1 de Fc IgG4 >

25 Para preparar las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina humana IgG4, un primer derivado (IgG4 delta-Cys), que tiene una delección de nueve aminoácidos en el terminal amino de la región bisagra nativa, y un segundo derivado (monómero IgG4), que carece de la región bisagra por una delección de todos los doce aminoácidos de la región bisagra, se prepararon. Como vector de expresión se utilizó uno que contiene una secuencia secretora de *E. coli*, pT14S1SH-4T20V22Q (Korean Pat. No. 38061), desarrollado con anterioridad a la presente invención por la presente invención.

30 Para obtener las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina humana IgG4, se llevó a cabo un RT-PCR utilizando ARN aislado de células sanguíneas humanas como una plantilla, de la siguiente manera. En primer lugar, el ARN total fue aislado de aproximadamente 6 ml de sangre utilizando un kit de sangre de ARN Qiamp (Qiagen), y la amplificación del gen se realizó utilizando el ARN total como una plantilla y un kit RT-PCR de Una-Etapa (Qiagen). En este PCR, fueron utilizados un par de cebadores sintetizados representados por SEQ ID Nos. 1 y 2 y otro par de cebadores sintetizados representados por SEQ ID Nos. 2 y 3. La SEQ ID NO. 1 es una secuencia de nucleótidos a partir del décimo residuo, serina, de 12 residuos de aminoácidos, abajo, de la región bisagra de IgG4. La SEQ ID NO. 3 fue diseñada para tener una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio C_H2 que tiene alanina como un primer residuo de aminoácido. La SEQ ID NO. 2 fue diseñada para tener un sitio de reconocimiento BamHI que contiene un codón de terminación.

```

1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12
gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca
ctc agg ttt ata cca ggg ggt acg ggt agt acg ggt
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

```

40 Para clonar cada uno de los fragmentos de la región constante IgG4 amplificado en un vector de expresión que contiene un derivado de secuencia secretora de *E. coli*, fue utilizado el pT14S1SH-4T20V22Q (Korean Pat. No. 38061) desarrollado con anterioridad a la presente invención por los actuales inventores. Este vector de expresión contiene un derivado de secuencia secretora enterotoxina estable al calor, que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO. 4. Para facilitar la clonación, un sitio de reconocimiento Stul se insertó en un extremo del derivado de secuencia secretora enterotoxina estable al calor de *E. coli* del plásmido pT14S1SH-4T20V22Q a través de mutagénesis de sitio dirigida utilizando un par de cebadores representados por SEQ ID Nos. 5 y 6 para inducir la mutagénesis para introducir el sitio Stul en una secuencia de nucleótidos que codifica para el último residuo de aminoácido de la secuencia secretora. Se encontró que esta inserción del sitio Stul tenía éxito mediante

la secuenciación del ADN. El plásmido pT14S1SH-4T20V22Q resultante que contiene un sitio *StuI* se diseñó como "pmSTII". El plásmido pmSTII se trató con *StuI* y *Bam*HI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y fue purificado un fragmento grande (4.7 kb), que contiene el derivado de secuencia secretora enterotoxina estable al calor de *E. coli*. A continuación, los fragmentos del gen amplificado fueron digeridos con *Bam*HI y se ligaron con el vector de expresión lineal, proporcionando así pSTIIdCG4Fc y pSTIIG4Mo.

Los vectores de expresión final se transformaron individualmente en *E. coli* BL21(DE3), y los transformantes resultantes se designaron como "BL21/pSTIIdCG4Fc (HM10932)" y "BL21/pSTIIdCG4Mo (HM10933)", que fueron depositados en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 15 de Sep, 2004 y se les asignaron los números de acceso KCCM- 10597 y KCCM-10598, respectivamente. En lo sucesivo, cuando los cultivos alcanzaron un valor de OD₆₀₀ de 80, un inductor, IPTG, se le adicionó a los cultivos para inducir la expresión de la proteína. Los cultivos además fueron cultivados durante 40 a 45 hrs hasta que el valor de OD a 600 nm aumentó de 100 a 120. Las células *E. coli* recolectadas de los líquidos de fermentación fueron desestabilizadas, y los lisados celulares resultantes fueron sometidos a cromatografía de columna de dos-etapas, para purificar los derivados de región constante de inmunoglobulina recombinante presente en el citosol de *E. coli*.

5 ml de una columna de afinidad de proteína-A (Pharmacia) se equilibró con PBS, y los lisados celulares fueron cargados en la columna a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Las proteínas sin unir se lavaron con PBS, y las proteínas unidas se eluyen con citrato 100 mM (pH 3.0). Las fracciones recolectadas se desalaron utilizando una columna de desalación HiPrep 26/10 (Pharmacia) con solución reguladora Tris 10 mM (pH 8.0). A continuación, cromatografía de columna de intercambio aniónica secundaria se llevó a cabo utilizando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia). Las fracciones primarias de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante purificado fueron cargadas en la columna Q-Sepharose HP 26/10, y la columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl 0-0.2 M en solución reguladora Tris 10 mM (pH 8.0), proporcionando así un derivado de Fc de inmunoglobulina (AG Fc) aglicosilado recombinante de alta pureza, IgG4 delta-Cys y una fracción de IgG4 monómero de alta pureza.

EJEMPLO 13: Preparación del conjugado del complejo IFN α -PEG y derivado de AG Fc recombinante

De acuerdo con los mismos métodos que en los Ejemplos 1 y 11, el complejo IFN α -PEG se unió al terminal-N del IgG4 delta-Cys como un derivado de AG Fc preparado en el Ejemplo 12. Después de la reacción de acoplamiento, las sustancias sin reaccionar y los subproductos fueron eliminados de la mezcla de reacción, y el conjugado de proteína IFN α -PEG-AG Fc, producido de esta manera (I) en primer lugar se purificó utilizando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) y además se purifica mediante un análisis de cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna polyCAT 21.5x250 (polyLC), purificando así el conjugado a un alto grado. La solución de reacción de acoplamiento fue desalada utilizando una columna de desalación HiPrep 26/10 (Pharmacia) con solución reguladora Tris 10 mM (pH 8.0). A continuación, la solución de reacción se cargó en 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) a una velocidad de flujo de 8 ml/min, y esta columna se eluye con un gradiente lineal de NaCl, de 0-0.2 M para obtener las fracciones deseadas. Las fracciones recolectadas se cargaron otra vez en una columna polyCAT 21.5X250 equilibrada con solución reguladora acetato 10 mM (pH 5.2) a una velocidad de flujo de 15 ml/min, y esta columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0.1-0.3 M, proporcionando así fracciones de alta pureza. De acuerdo con el mismo método como se describe anteriormente, otro conjugado de proteína IFN α -PEG-AG Fc (II) se preparó utilizando otro derivado de AG Fc preparado en el Ejemplo 12, IgG4 monómero.

EJEMPLO 14: Preparación del conjugado EPO-PEG-derivado de AG Fc recombinante

De acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo 13, un conjugado EPO-PEG-derivado de AG Fc recombinante se preparó mediante el enlace de un derivado de AG Fc, IgG4 delta-Cys, con el complejo EPO-PEG.

EJEMPLO COMPARATIVO 1: Preparación del complejo IFN α -40K PEG

5 mg de interferón alfa se disolvió en solución reguladora de fosfato 100 mM para obtener un volumen final de 5 ml, y se mezcló con metoxi activado 40-kDa-PEG-aldehído (Shearwater), a una relación molar IFN α :40-kDa PEG de 1:4. A esta mezcla, un agente reductor, NaCNBH₃ se le adicionó a una concentración final de 20 mM y se deja reaccionar a 4°C durante 18 hrs con agitación suave. Para inactivar el PEG, que no reaccionó con IFN α , se le adicionó etanolamina a la mezcla de reacción a una concentración final de 50mM.

Una columna Sephadex G-25 (Pharmacia) fue utilizada para eliminar PEG sin reaccionar y el intercambio de la solución reguladora con otra solución reguladora. En primer lugar, esta columna se equilibró con dos volúmenes de columna (CV) de solución reguladora Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), y se cargó con la mezcla de reacción. Los flujos de salida se detectaron midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro UV. Cuando la columna fue eluida con la misma solución reguladora, el interferón alfa se modifica mediante la adición de PEG que tiene un peso molecular superior a su terminal-N se eluye antes, y el PEG sin reaccionar se eluye más tarde, permitiendo así el aislamiento de IFN α -40K PEG solo.

La siguiente cromatografía se llevó a cabo para purificar más el complejo IFN α -40K PEG de las fracciones recolectadas. 3 ml de una columna PolyWAX LP (PolyLC) se equilibró con Tris-HCl 10 mM (pH 7.5). Las fracciones recolectadas que contienen el complejo IFN α -40K PEG se cargaron en la columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min, y la columna se lavó con 15 ml de la solución reguladora de equilibrio. A continuación, la columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0-100% utilizando 30 ml de NaCl 1 M, eluyendo así el interferón alfa conjugado para tri-, di- y mono-PEG, secuencialmente. Para una purificación adicional el mono-PEG-interferón alfa conjugado, las fracciones recolectadas que contienen el mono-PEG-interferón alfa conjugado, fueron sometidas a cromatografía de tamaño de exclusión. Las fracciones se concentraron y cargaron en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.0), y la columna fue eluida con la misma solución reguladora a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las moléculas de tri- y di-PEG-interferón alfa conjugado fueron eliminadas con base a su propiedad de ser eluidos más temprano que el mono-PEG-interferón alfa conjugado, aislando así, el mono-PEG-interferón alfa conjugado en una forma muy pura.

De acuerdo con el mismo método como se describe anteriormente, PEG 40-kDa se conjugó con el terminal-N de hormona humana de crecimiento, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), y un derivado de G-CSF, proporcionando así, los complejos hGH-40K PEG, G-CSF-40K PEG y 40K PEG-¹⁷S-derivado de G-CSF.

EJEMPLO COMPARATIVO 2: Preparación del conjugado IFN α -PEG-albúmina

Para unir el complejo IFN α -PEG purificado en la etapa 2 del Ejemplo 1, con el terminal-N de albúmina, el complejo IFN α -PEG se mezcló con albúmina de suero humano (HSA, aproximadamente 67 kDa, Green Cross) disuelto en solución reguladora de fosfato 10 mM a una relación molar del complejo IFN α -PEG: albúmina de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después la concentración de la solución reguladora de fosfato de la solución de reacción se ajustó a 100 mM, un agente reductor, NaCNBH₃, se le adicionó a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se deja reaccionar a 4°C durante 20 hrs con agitación suave. A través de este experimento, la relación molar óptima de la reacción para el complejo IFN α -PEG con albúmina, que proporciona la más alta reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se encontró que fue 1:2.

Después de la reacción de acoplamiento, la mezcla de reacción fue sometida a cromatografía de tamaño de exclusión utilizando una columna SuperdexR (Pharmacia) con el fin de eliminar las sustancias sin reaccionar y los subproductos y purificar el conjugado de proteína IFN α -PEG-albúmina producido. Después la mezcla de reacción se concentró y cargo en la columna, la solución reguladora de acetato de sodio 10 mM se pasó a través de la columna a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min para eliminar la albúmina sin unir y las sustancias sin reaccionar, seguido por la elución de la columna para purificar solo el conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina. Dado que las fracciones recolectadas del conjugado de proteína IFN α -PEG-albúmina contienen una pequeña cantidad de impurezas, albúmina sin reaccionar y los dímeros del interferón alfa, cromatografía de intercambio catiónico se llevó a cabo para eliminar las impurezas. Las fracciones del conjugado de proteína IFN α -PEG-albúmina fueron cargadas en una columna SP5PW (Waters) equilibrada con acetato de sodio 10 mM (pH 4.5), y la columna fue eluida con un gradiente lineal de 0-0.5 M NaCl en solución reguladora de acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) utilizando NaCl 1 M, aislando así, el conjugado de proteína IFN α -PEG-albúmina en una forma muy pura.

De acuerdo con el mismo método como se describe anteriormente, la albúmina se conjugó con la hormona humana de crecimiento, GCSF, y un derivado de G-CSF, proporcionando así, los conjugados hGH-PEG-albúmina, G-CSF-PEG-albúmina y ¹⁷S-G-CSF-PEG-albúmina.

EJEMPLO COMPARATIVO 3: Preparación del complejo Fab'-S-40K PEG

El residuo de cisteína libre del Fab' purificado en la etapa 1 del Ejemplo 8 fue activado por incubación en una solución reguladora de activación (acetato de sodio 20 mM (pH 4.0), DTT 0.2 mM) por 1 hr. Después la solución reguladora se cambió por una solución reguladora de modificación de PEG, fosfato de potasio 50 mM (pH 6.5), maleimida-PEG (MW: 40 kDa, Shearwater) se le adicionó a esta, a una relación molar de Fab':40-kDa PEG de 1:10 y se hizo reaccionar a 4°C durante 24 hrs con agitación suave.

Después de que la reacción se completó, la solución de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.3), y la columna fue eluida con la misma solución reguladora a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El conjugado Fab' 40-kDa PEG (Fab'-40K PEG) se eluye relativamente más temprano debido a su alto peso molecular, y Fab' sin reaccionar se eluye más tarde, eliminando así, el Fab' sin reaccionar. Para eliminar completamente el Fab' sin reaccionar, las fracciones recolectadas del complejo Fab'-40K PEG se cargaron otra vez en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC), y esta columna fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0.15-0.5 M en solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM (pH 4.5), proporcionando así, un complejo Fab'-S-40K PEG puro que comprende 40-kDa PEG ligado a un grupo -SH del Fab'.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 1: Identificación y análisis cuantitativo de los conjugados de proteína

<1-1> Identificación de los conjugados de proteína

Los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos anteriores fueron analizadas por SDS-PAGE no-reducida utilizando un gel de gradiente 4-20% y un gel al 12% y ELISA (R&D System).

5 Como resultado del análisis SDS-PAGE, como se muestra en la FIG. 3, una reacción de acoplamiento de un polipéptido fisiológico, un polímero no-peptídico, PEG, y un fragmento Fc de inmunoglobulina dando lugar a la producción exitosa de un conjugado IFN α -PEGFc (A), un conjugado ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y un conjugado EPO-PEG-Fc (C).

10 Además, el DG Fc preparado en el Ejemplo 10, se analizó por SDS-PAGE no-reducida al 12%. Como se muestra en la FIG. 6b, una banda de DG Fc se detectó en una posición, que corresponde al peso molecular del Fc nativo carente de las fracciones de azúcar.

<1-2> Análisis cuantitativo de los conjugados de proteína

15 Los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos anteriores fueron cuantificados por cromatografía de tamaño de exclusión utilizando una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 (Pharmacia) y solución reguladora de fosfato de potasio 10 mM (pH 6.0) como una solución reguladora de elución, en donde un área de pico de cada conjugado de proteína se comparó con aquella de un grupo control. Previamente los estándares analizados cuantitativamente, IFN α , hGH, G-CSF, 17S-G-CSF, EPO y Fc, individualmente fueron sometidos a cromatografía de tamaño de exclusión, y un factor de conversión entre una concentración y se determinó un pico. Una cantidad predeterminada de cada conjugado de proteína fue sometida a la misma cromatografía de tamaño de exclusión. Mediante la sustracción del área de pico correspondiente a un fragmento Fc de inmunoglobulina a partir del área de pico obtenida de esta manera, se determinó un valor cuantitativo de una proteína fisiológicamente activa presente en cada conjugado de proteína. La FIG. 4 muestra el resultado de cromatografía de tamaño de exclusión del conjugado IFN α -PEG-Fc purificado, en donde se observó un pico único. Este resultado indica que el conjugado de proteína purificado no contiene impurezas multiméricas tales como un dímero, un trímero o un número mayor de monómeros.

20 Cuando un polipéptido fisiológicamente activo conjugado para Fc, se analizó cuantitativamente utilizando un anticuerpo específico para el polipéptido fisiológicamente activo, al anticuerpo se le impidió unirse con el polipéptido, dando lugar a un valor inferior que un valor actual calculado por la cromatografía. En el caso del conjugado IFN α -PEG-Fc, un ELISA resultó en un valor de ELISA correspondiente a aproximadamente 30% de un valor actual.

<1-3> Evaluación de pureza y masa de los conjugados de proteína

30 Los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos anteriores fueron sometidos a cromatografía de tamaño de exclusión, y la absorbancia fue medida a 280 nm. Como resultado, los conjugados IFN α -PEG-Fc, hGH-PEG-Fc, G-CSF-PEG-Fc y ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc mostró un único pico en el tiempo de retención de una sustancia de 70 a 80-kDa.

35 Por otra parte, se llevó a cabo un HPLC de fase reversa para determinar los grados de pureza de los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos 1, 11 y 13, IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc y IFN α -PEG-recombinante derivado de AG Fc. Fue utilizado una columna de fase reversa (columna 259 VHP54, Vydac). La columna fue eluida con un gradiente de acetonitrilo 40-100% con 0.5% de TFA, y los grados de pureza fueron analizados midiendo la absorbancia a 280 nm. Como resultado, como se muestra en la FIG. 8, las muestras no contienen interferón sin unir o Fc de inmunoglobulina, y se encontró que todos los conjugados de proteína, IFN α -PEG-Fc (A), IFN α -PEGDG Fc (B) y IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante(C), tienen una pureza mayor de 96%.

40 Para determinar con exactitud los pesos moleculares de los conjugados de proteína purificados, la masa para cada conjugado se analizó utilizando un espectrofotómetro de masas MALDI-TOF de alto rendimiento (Voyager DE-STR, Applied Biosystems). El ácido sinapínico fue utilizado como una matriz de 0.5 μ l de cada muestra de prueba se aplicó sobre un porta objetos de muestra y se seca al aire, se mezcló de nuevo con un volumen igual de una solución de matriz y se seca al aire, y se introduce en una fuente de iones. La detección se llevó a cabo en un modo positivo utilizando un analizador TOF de modo lineal. Los iones se aceleraron con una fuente de extracción de división operada con extracción retardada (DE) utilizando un tiempo de extracción retardada de 750 nseg a 1500 nseg a un voltaje de aceleración total de aproximadamente 2.5 kV.

50 Los pesos moleculares observados por espectrometría de masas MALDI-TOF para los conjugados de proteína Fc preparados en los Ejemplos se dan en la Tabla 1, a continuación. La FIG. 5 muestra el resultado de espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado EPO-PEG-Fc, y la FIG. 7 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de los conjugados IFN α -PEG-Fc y IFN α -PEG-DG Fc. Como resultado, se encontró que el conjugado de proteína EPO-PEG-Fc tiene una pureza de más del 95% y un peso molecular muy cercano a un MW teórico. También, se encontró que EPO se acopla al fragmento Fc de inmunoglobulina a una relación de 1:1.

TABLA 1

| | MW Teórico (kDa) | MW Determinado (kDa) |
|--|------------------|----------------------|
| IFN α -PEG-Fc (E.1) | 75.4 | 75.9 |
| hGH-PEG-Fc (E.3) | 78.4 | 78.6 |
| G-CSF-PEG-Fc (E.4) | 75.3 | 75.9 |
| ¹⁷ S-G-CSF -PEG-Fc (E.4) derivado | 75.0 | 75.9 |
| EPO-PEG-Fc (E.5) | 91.4 | 91.0 |

Además, cuando el Fc y DG Fc preparados en el Ejemplo 10, se examinaron para sus pesos moleculares por espectrometría de masas MALDI-TOF, se encontró que el DG Fc tenía 50 kDa, que es aproximadamente 3-kDa menos del Fc nativo (FIG. 6a). Dado que el MW de 3-kDa corresponde al tamaño teórico de las fracciones de azúcar, los resultados demuestran que las fracciones de azúcar se eliminan completamente.

La Tabla 2, a continuación, muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado IFN α -PEG-DG Fc preparado en el Ejemplo 11 y el conjugado IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (I y II) preparado en el Ejemplo 13. Se encontró que el conjugado IFN α -PEG-DG Fc era 3 kDa más ligero, y que el conjugado IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (I) era aproximadamente 3-4 kDa más ligero, que el conjugado IFN α -PEG-Fc de 75.9 kDa. El conjugado IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (II) acoplado a un monómero Fc mostró un peso molecular disminuyó en 24.5 kDa correspondiente al peso molecular del monómero Fc.

TABLA 2

| | MW Teórico (kDa) | MW Determinado (kDa) |
|---|------------------|----------------------|
| IFN α -PEG-DG Fc (E.11) | 72.8 | 73.0 |
| IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante(I) (E.13) | 72.3 | 72.2 |
| IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante(II) (E.13) | 46.8 | 46.6 |

EJEMPLO EXPERIMENTAL 2: Análisis farmacocinético I

Las formas nativas de proteínas fisiológicamente activas (controles) y los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos, complejos -40K PEG, conjugados -PEG-albúmina, conjugados -PEG-Fc, -conjugados PEG-DG Fc y conjugados- PEG-derivado de AG Fc recombinante, fueron evaluados para estabilidad en suero y los parámetros farmacocinéticos en ratas SD (cinco ratas por grupo). Los controles, y los complejos -40K PEG, conjugados -PEG-albúmina, conjugados -PEG-Fc, conjugados - PEG-DG Fc y conjugados-PEG-derivado de AG Fc recombinante (grupos de prueba) se inyectaron individualmente subcutánea a una dosis de 100 μ g/kg. Después de la inyección subcutánea, las muestras de sangre fueron recolectadas a 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 y 96 hrs en los grupos control, y, en los grupos de prueba, a 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 y 288 hrs. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos con un anticoagulante, heparina, y se centrifugaron durante 5 min utilizando un micro centrífuga de alta velocidad Eppendorf para eliminar las células sanguíneas. Los niveles de proteína en suero se midieron por ELISA utilizando los anticuerpos específicos contra las proteínas fisiológicamente activas.

Los resultados de los análisis farmacocinéticos de las formas nativas de IFN α , hGH, G-CSF y EPO, y los complejos -40K PEG de estos, conjugados -PEG-albúmina de estos, conjugados -PEG-Fc de estos y conjugados -PEG-DG Fc de estos, se dan en las Tablas 3 a 7, a continuación. En las siguientes tablas, T_{max} indica el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima del fármaco en suero, T_{1/2} indica la vida media en suero de un fármaco, y MRT (tiempo de residencia medio) indica el tiempo medio que una molécula del fármaco reside en el cuerpo.

TABLA 3

| Farmacocinética del interferón alfa | | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| | IFN α Nativo | IFN α -40K PEG (C.E.1) | IFN α - PEG albúmina (C.E.2) | IFN α - PEG Fc (E.1) | IFN α - PEG-DG Fc (E.11) | derivado de IFN α - PEG - AGFc recombinante derivado (I) (E. 13) | IFN α -PEG - derivado de AG Fc recombinante (II) (E.13) |
| T _{max} (hr) | 1.0 | 30 | 12 | 30 | 48 | 24 | 24 |
| T _{1/2} (hr) | 1.7 | 35.8 | 17.1 | 90.4 | 71.0 | 61.2 | 31.2 |
| (hr) | 2.1 | 71.5 | 32.5 | 150.1 | 120.6 | 111.0 | 58.8 |

TABLA 4

| Farmacocinética del factor de crecimiento humano | | | | |
|--|--------|------------------------|-----------------------------|---------------------|
| | Nativo | hGH-40K PEG (C.E.1) | hGH-PEG-albúmina (C.E.2) | hGH-PEG-Fc (E.3) |
| | hGH | | | |
| T _{max} (hr) | 1.0 | 12 | 12 | 12 |
| T _{1/2} (hr) | 1.1 | 7.7 | 5.9 | 11.8 |
| MRT (hr) | 2.1 | 18.2 | 13.0 | 18.8 |

5

TABLA 5

| Farmacocinética del G-CSF | | | | |
|---------------------------|--------------|-----------------------|----------------------------|--------------------|
| | Nativo G-CSF | G-CSF-40K PEG (C.E.1) | G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2) | G-CSF-PEG-Fc (E.4) |
| T _{max} (hr) | 2.0 | 12 | 12 | 12 |
| T _{1/2} (hr) | 2.8 | 4.8 | 5.2 | 6.9 |
| MRT (hr) | 5.2 | 24.5 | 25.0 | 32.6 |

TABLA 6

| Farmacocinética del ¹²⁵ S-derivado de G-CSF | | | | |
|--|---|--|--|--|
| | Derivado ¹²⁵ S-G-CSF nativo | ¹²⁵ S-G-CSF-40K PEG (C.E.1) | ¹²⁵ S-G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2) | ¹²⁵ S-G-CSF-PEG-Fc (E.4) |
| T _{max} (hr) | 2.0 | 24 | 24 | 24 |

(continuación)

| Farmacocinética del ¹²⁵ I-S-derivado de G-CSF | | | | | |
|--|--|--------------------------------------|-----|---|---------------------------------------|
| | Derivado ¹²⁵ I-S-G-CSF nativo | ¹²⁵ I-S-G-CSF-40K (C.E.1) | PEG | ¹²⁵ I-S-G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2) | ¹²⁵ I-S-G-CSF-PEG-Fc (E.4) |
| T _{1/2} (hr) | 2.9 | 4.3 | | 6.4 | 7.0 |
| MRT (hr) | 5.8 | 24.4 | | 25.1 | 33.2 |

TABLA 7

| Farmacocinética del EPO | | | | |
|-------------------------|------------|---------------------------|------------------|--|
| | Nativo EPO | EPO Altamente glicosilado | EPO-PEG-Fc (E.5) | EPO-PEG- derivado de AG Fc recombinante (E.13) |
| T _{max} (hr) | 6.0 | 12 | 30 | 48 |
| T _{1/2} (hr) | 9.4 | 18.4 | 61.5 | 87.9 |
| MRT (hr) | 21.7 | 26.8 | 117.6 | 141.6 |

5

Como puede deducirse de los datos de la Tabla 3 y la gráfica de farmacocinética de la FIG. 9, el conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc, tuvo una vida media en suero de 90.4 hrs, que fue aproximadamente 50 veces más alta que aquella del IFN α nativo y aproximadamente 2.5 veces más alta que aquellas del IFN α -40K PEG que tiene una vida media de 35.8 hrs, preparado en el Ejemplo Comparativo 1. También, se encontró que el conjugado de proteína IFN α -PEG-Fc de la presente invención era superior en la vida media en suero para IFN α -PEG-albúmina, que tiene una vida media de 17.1 hrs.

10

Por otra parte, como se muestra en la Tabla 3 y la FIG. 11, el conjugado IFN α -PEG-DG Fc tuvo una vida media en suero de 71.0 hrs, que era casi la misma como el conjugado IFN α -PEG-Fc, indicando que la desglicosilación de Fc no afecta en gran medida la estabilidad in vivo del conjugado IFN α -PEG-DG Fc. También, el conjugado preparado utilizando el derivado de AG Fc recombinante producido mediante un método recombinante se encontró que tiene un efecto idéntico a aquel de la forma de DG Fc nativa derivada. Sin embargo, la vida media en suero de un complejo acoplado a un Fc monómero fue aproximadamente la mitad de un complejo acoplado a un dímero Fc normal.

15

Como se muestra en la Tabla 4, la hormona humana de crecimiento también mostró una vida media en suero prolongada cuando se conjuga con el fragmento Fc de IgG de acuerdo con la presente invención. Es decir, en comparación con la forma nativa (1.1 hrs), el complejo hGH-40K PEG y conjugado hGH-PEG-albúmina ha incrementado ligeramente la vida media de 7.7 hrs y 5.9 hrs, respectivamente, mientras que el conjugado de proteína hGH-PEG-Fc de la presente invención mostró una vida media en suero muy prolongada de 11.8 hrs.

20

Como se desprende de los datos farmacocinéticos de G-CSF y su derivado en la Tabla 5 y 6, los conjugados G-CSF-PEG-Fc y ¹²⁵I-G-CSF-PEG-Fc mostraron una vida media en suero mucho mayor que el complejo -40K PEG y el conjugado -PEG-albúmina. Se encontró que el fragmento Fc de inmunoglobulina en el suero, prolonga la duración de acción de las proteínas fisiológicamente activas en formas nativas, así como en sus derivados que presentan alteraciones de ciertos residuos de aminoácidos en niveles similares a las formas nativas. A partir de estos resultados, es fácilmente predecible que el método de la presente invención tendrá un efecto similar sobre las otras proteínas y sus derivados.

25

Como se muestra en la Tabla 7 y FIG. 10, la conjugación de la EPO glicosilada nativa con el fragmento Fc también dio lugar a un incremento en la vida media en suero. Es decir, EPO tuvo una vida media en suero de 9.4 hrs en la forma nativa, y una vida media en suero prolongada de 18.4 hrs, cuando son altamente glicosiladas para mejorar la estabilidad en suero. El conjugado EPO-PEG-Fc, que comprende EPO acoplada al fragmento Fc de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención, mostró una vida media en suero muy prolongada de 61.5 hrs. También, cuando se conjuga con el derivado de Fc aglicosilado (AG) de *E. coli*-derivado recombinante, la vida

30

35

media de EPO aumentó a 87.9 hrs, indicando que la aglicosilación del fragmento Fc permite que la preparación de un conjugado de proteína no afecte la estabilidad en suero de la proteína sin funciones de anticuerpo.

5 Como se desprende de los resultados anteriores, los conjugados de proteína unidos covalentemente con el fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no-peptídico de acuerdo con la presente invención mostraron un incremento en la vida media en suero a varias decenas de aquella de la forma nativa. También, cuando el Fc de inmunoglobulina fue aglicosilado mediante la producción en *E. coli* o desglucosilado mediante un tratamiento enzimático, su efecto para incrementar la vida media en suero de su conjugado de proteína se mantuvo a un nivel similar.

10 En particular, en comparación con las proteínas modificadas con PEG de 40-kDa, que tienen la duración más prolongada entre las moléculas de PEG para incrementar la duración de acción de las proteínas en el suero, los conjugados de proteína del Fc de inmunoglobulina tuvieron una estabilidad en suero muy superior. Además, en comparación con los conjugados de proteína acoplados a la albúmina en lugar del Fc de inmunoglobulina, los conjugados de proteína de la presente invención mostraron excelente estabilidad en suero, lo que indica que los conjugados de proteína de la presente invención son eficaces en el desarrollo de formas de fármacos proteicos de acción prolongada. Estos resultados, que los presentes conjugados de proteína tienen excelentes efectos en la estabilidad en suero y MRT en un amplio rango de proteínas incluyendo derivados del factor estimulante de colonias por mutación puntual en comparación con proteínas convencionales PEG- o albúmina-conjugada, indican que la estabilidad y los efectos de duración prolongada de los presentes conjugados de proteína son aplicables a otros polipéptidos fisiológicamente activos.

20 Por otra parte, cuando el conjugado de proteína IFN α -10K PEG-Fc (Ejemplo 7), preparado utilizando un polímero no-peptídico, PEG 10-kDa, fue evaluado por su vida media en suero de acuerdo con el mismo método como se describe anteriormente, mostró una vida media en suero de 48.8 hrs, que fue algo más corta que la vida media en suero (79.7 hrs) de un conjugado de proteína preparado utilizando PEG 3.4-kDa.

25 Además, la vida media en suero de los conjugados de proteína disminuye con el incremento del peso molecular del polímero no-peptídico PEG. Estos resultados indican que el factor principal para el incremento de la estabilidad en suero y la duración de los conjugados de proteína es el conjugado del fragmento Fc de inmunoglobulina más que el polímero no-peptídico.

30 Incluso cuando el grupo reactivo de PEG se intercambiaba con un grupo reactivo diferente del grupo aldehído, los conjugados de proteína con el PEG mostraron patrones similares en el peso molecular aparente y la vida media en suero para aquellos acoplados a PEG que tienen un grupo reactivo aldehído.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 3: Análisis farmacocinético II

35 Para determinar la vida media en suero de los conjugados Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc preparados en el Ejemplo 8 y 9 y el complejo Fab'-S-40K PEG preparado en el Ejemplo Comparativo 3, un análisis farmacocinético del fármaco se llevó a cabo de acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo Experimental 2 utilizando Fab' como control, los conjugados y el complejo. Los resultados se muestran en la FIG. 12.

Como se muestra en la FIG. 12, los conjugados Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc mostraron una vida media en suero prolongada dos o tres veces en comparación con el Fab' o el complejo Fab'-S-40K PEG.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 4: Evaluación de actividad intracelular de los conjugados de proteína

<4-1> Comparación de los conjugados de proteína de IFN α para la actividad intracelular

40 Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteína de IFN α , el IFN α -PEG-Fc (Ejemplo 1), IFN α -PEGDG Fc (Ejemplo 11), IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (Ejemplo 13), IFN α -40K PEG (Ejemplo Comparativo 1) y IFN α -PEG-albúmina (Ejemplo Comparativo 2) fueron evaluados para actividad antiviral, mediante un bioensayo de cultivo celular utilizando las células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (ATCC CCL-22) infectadas con virus de la estomatitis vesicular. El interferón alfa-2b no-pegilado, disponible del National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC), fue utilizado como material estándar.

45 Las células MDBK se cultivaron en MEM (medio esencial mínimo, JBI) suplementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomycin al 1% a 37°C con una condición de 5% de CO₂. Las muestras que se analizan y el material estándar se diluyeron con el medio de cultivo a concentraciones predeterminadas, y las alícuotas de 100- μ l se colocaron en cada pozo de una placa de 96-pozos. Las células cultivadas fueron aisladas, se adicionaron a la placa que contiene las muestras en un volumen de 100 μ l, y se cultivaron durante aproximadamente 1 hr a 37°C con una condición de 5% de CO₂. A continuación, 50 μ l de virus de estomatitis vesicular (VSV) de 5-7X10³ PFU se adicionaron a cada pozo de la placa, y las células además fueron cultivadas durante aproximadamente 16 a 20 hrs a

37°C con una condición de 5% de CO₂. Un pozo que no contiene la muestra o material estándar pero que contiene solo el virus fue utilizado como un control negativo, y un pozo que contiene solo células fue utilizado como un control positivo.

5 Después de que el medio de cultivo se retiró, se le adicionaron 100 µl de una solución roja neutra, a la placa para teñir las células viables, seguido por la incubación de 2 hrs a 37°C con una condición de 5% de CO₂. Después los sobrenadantes fueron eliminados, 100 µl de una mezcla 1:1 de 100% de etanol y 1% de ácido acético se le adicionaron a cada pozo de la placa. Después una mezcla completa para disolver todos los cristales de color rojo neutro eluidos de las células teñidas, la absorbancia fue medida a 540 nm. El control negativo fue utilizado como un blanco, y se calcularon los valores de ED₅₀ (dosis que causan el 50% de inhibición del crecimiento celular), donde el crecimiento celular del control positivo se fijó en 100%.

TABLA 8

| | Conc. (ng/ml) | Actividad específica (IU/mg) | Actividad relativa (%) para IFNα nativo |
|---|---------------|------------------------------|---|
| IFNα Nativo | 100 | 4.24E+08 | 100 |
| IFNα-40K PEG | 100 | 2.04E+07 | 4.8 |
| IFNα-PEG-albúmina | 100 | 2.21E+07 | 5.2 |
| IFNα-PEG-Fc | 100 | 1.19E+08 | 28.1 |
| IFNα-PEG-DG Fc | 100 | 1.09E+08 | 25.7 |
| IFNα-PEG-derivado de AG Fc recombinante | 100 | 9.58E+07 | 22.6 |

15 Como se muestra en la Tabla 8, el IFNα-40K PEG disminuyó en actividad al 4.8% del IFNα nativo. Especialmente, como el tamaño de las fracciones de PEG aumentó, un conjugado de proteína tiene una mejora en la estabilidad en suero pero disminuyó gradualmente la actividad. Se reportó que el interferón alfa tiene actividades in vitro de 25% cuando se modifica con PEG 12-kDa y aproximadamente 7% cuando se modifica con PEG 40-kDa (P. Bailon et al., Bioconjugate Chem. 12: 195-202, 2001). Es decir, dado que un conjugado de proteína tiene una vida media más larga pero disminuye bruscamente en actividad biológica como aumenta el peso molecular de las fracciones de PEG, existe una necesidad para el desarrollo de un conjugado de proteína que tiene una vida media más larga en suero y una actividad más fuerte. Además, el conjugado IFNα-PEG-albúmina mostró una actividad débil de aproximadamente 5.2% en comparación con el IFNα nativo. Por lo contrario, los conjugados IFNα-PEG-Fc e IFNα-PEG-DG Fc de la presente invención mostraron una actividad relativa notablemente mejorada de 28.1% y 25.7% en comparación con el IFNα nativo. También, la conjugación de IFNα con el derivado de AG Fc recombinante resultó en un aumento similar en la actividad. A partir de estos resultados, se espera que el interferón alfa conjugado con el fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una vida media en suero notablemente incrementada y una mejora en gran medida de la eficacia farmacéutica in vivo.

<4-2> Comparación de los conjugados de proteína de hormona humana de crecimiento para actividad intracelular

Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteína de hormona humana de crecimiento, fueron comparados el hGH-PEG-Fc, hGH-40K PEG y hGH-PEG-albúmina para la actividad intracelular.

30 Las actividades intracelulares de los conjugados hGH se midieron por un ensayo in vitro utilizando una línea celular de linfoma de nodo de rata, Nb2 (European Collection of Cell Cultures (ECACC) #97041101), que desarrolla mitogénesis dependiente de la hormona humana de crecimiento.

35 Las células Nb2 se cultivaron en medio de Fisher suplementado con FBS al 10 % (suero fetal bovino), 0.075% de NaCO₃, 2-mercaptoetanol 0.05 mM y glutamina 2 mM, y además fueron cultivadas en un medio similar que no contiene FBS al 10 %, durante 24 hrs. A continuación, las células cultivadas se contaron, y aproximadamente 2X10⁴ células fueron divididas en alícuotas en cada pozo de una placa de 96-pozos. El hGH-PEG-Fc, el hGH-40h PEG, el hGH-PEG-albúmina, un estándar disponible del National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC) como control, y hormona de crecimiento humana nativa (HM-hGH) se diluyeron y adicionaron a cada pozo a diferentes concentraciones, seguido por la incubación durante 48 hrs a 37°C, con una condición de 5% de CO₂. En

lo sucesivo, para medir la actividad de proliferación celular mediante la determinación del número de células en cada pozo, se adicionaron a cada pozo 25µl del Reactivo Cell Titer 96 Aqueous One Solution (Promega), y las células además fueron cultivadas durante 4 hrs. La absorbancia fue medida a 490 nm, y un título para cada muestra fue calculado. Los resultados se dan en la Tabla 9, a continuación.

5

TABLA 9

| | Conc. (ng/ml) | Actividad específica* (U/mg) | Actividad relativa (%) para HMhGH nativa |
|---|------------------|---------------------------------|---|
| hGH nativa | 100 | 2.71E+06 | 100 |
| hGH (estándar disponible de NIBSC) | 100 | 2.58E+06 | 95.2 |
| hGH-40K PEG | 100 | 0.206E+06 | 7.6 |
| hGH-PEG-albúmina | 100 | 0.141E+06 | 5.2 |
| hGH-PEG-Fc | 100 | 0.76E+06 | 28.1 |
| Actividad específica*=1/ED ₅₀ X10 ⁶ (ED ₅₀ : cantidad de proteína necesaria para el 50% de crecimiento celular máximo) | | | |

Como se muestra en la Tabla 9, también en el caso de hormona humana de crecimiento, la conjugación con PEG 40-kDa (hGH-40K PEG) resultó en una disminución en la actividad a aproximadamente 7.6% de la forma nativa, y el conjugado hGH-PEG-albúmina mostró una baja actividad in vitro que fue aproximadamente 5.2% de la hGH nativa. Sin embargo, el conjugado hGH-PEG-Fc de la presente invención notablemente aumentó en la actividad relativa a más del 28% en comparación con la hGH nativa. A partir de estos resultados, se espera que la hormona humana de crecimiento unida al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una vida media en suero notablemente incrementada y una eficacia farmacéutica in vivo, mejora en gran medida. Además, se cree que el incremento la actividad de los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina de la presente invención se debe al incremento de la estabilidad en suero y preservó la afinidad de enlace con los receptores debido al Fc de inmunoglobulina o debido al espacio formado por el polímero no-peptídico. Se prevé que estos efectos sean aplicables, a los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina acoplados a otras proteínas fisiológicamente activas.

<4-3> Comparación de los conjugados de proteína G-CSF para actividad intracelular

Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteína con un derivado de G-CSF, fueron comparados el G-CSF nativo (Filgrastim, Jeil Pharm. Co., Ltd.), ¹⁷Ser-derivado de G-CSF, 20K PEG-G-CSF (Neulasta), 40K PEG-¹⁷S-G-CSF, 17Ser- G-CSF-PEG-albúmina y 17S-G-CSF-PEG-Fc, para actividad intracelular.

En primer lugar, una línea celular mielóide humana, HL-60 (ATCC CCL-240, paciente con leucemia promielocítica/36 años Mujer caucásica), se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %. Las células cultivadas fueron suspendidas a una densidad de aproximadamente 2.2 x 10⁵ células/ml, y se le adicionó DMSO (dimetilsulfóxido, grado de cultivo, Sigma) para una concentración final de 1.25%(v/v). A continuación, 90µl de la suspensión celular se sembraron en cada pozo de una placa de 96-pozos (placa de 96 pozos baja evaporación/Corning), proporcionando así una densidad de aproximadamente 2 x 10⁴ células por pozo, y se cultivaron en un incubador a 37°C con 5% de CO₂ por aproximadamente 72 hrs.

Cada muestra, cuya concentración de proteína se determinó utilizando un kit de ELISA G-CSF (sistemas R&D), se diluyó con RPMI 1640 a una concentración idéntica de 10 µg/ml, y además se diluye dos-veces con RPMI 1640 diecinueve veces. Las diluciones dos veces en serie se adicionaron individualmente a cada pozo que contiene células HL-60 a un volumen de 10 µl, de modo que la concentración de cada muestra inició a 1 µg/ml. A continuación, las células se cultivaron en un incubador a 37°C durante 72 hrs.

La proliferación de células HL-60 fue ensayada utilizando Cell Titer 96™ (Cat. NO. G4100, Promega), y el incremento de número de células se determinó midiendo la absorbancia a 670 nm.

TABLA 10

| | ED ₅₀ (IU/mg) | Actividad relativa (%) para G-CSF nativo |
|--------------------------------------|--------------------------|--|
| G-CSF Nativo | 0.30 | 100 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF | 0.26 | 115 |
| G-CSF-20K PEG (Neulasta) | 1.20 | 25 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF-40K PEG | 10.0 | <10.0 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF-PEG-albúmina | 1.30 | 23.0 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF-PEG-Fc | 0.58 | 51.7 |

Como se muestra en la Tabla 10, los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina acoplados a un derivado de G-CSF que tiene una sustitución de aminoácido, ¹⁷Ser-G-CSF, también mostró efectos similares a los conjugados de proteína G-CSF nativo-acoplados. Previamente se reportó que el ¹⁷Ser-G-CSF-PEG tiene una vida media en suero relativamente mayor pero una actividad disminuida en comparación con ¹⁷Ser-G-CSF no-pegilado (Korean Pat. Laid-open Publication No. 2004-83268). Especialmente, como el tamaño de las fracciones de PEG se incrementó, un conjugado de proteína tuvo un incremento de estabilidad en suero pero la actividad disminuyó gradualmente. El ¹⁷Ser-G-CSF-40K PEG mostró una actividad muy baja de menos de aproximadamente 10% en comparación con la forma nativa. Es decir, dado que un conjugado de proteína tiene una vida media en suero prolongada pero la actividad disminuyó considerablemente, según incrementa el peso molecular de la fracciones de PEG, existe la necesidad de desarrollo de un conjugado de proteína que tenga una larga vida media en suero y una actividad fuerte. El ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-albúmina también mostró una baja actividad de aproximadamente 23% en comparación con el G-CSF nativo. Por lo contrario, el ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc se mejoró en gran medida en la actividad relativa a más del 51% en comparación con el G-CSF nativo. A partir de estos resultados, se espera que ¹⁷Ser-G-CSF unido al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una vida media en suero notablemente incrementada y una eficacia farmacéutica in vivo mejorada en gran medida.

<4-4> Ensayo de neutralización de la citotoxicidad para los conjugados Fab'

Un ensayo de actividad in vitro se llevó a cabo utilizando los conjugados Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc preparados en los Ejemplos 8 y 9 y el complejo Fab'-S-40K PEG preparado en el Ejemplo Comparativo 3. A través de un ensayo de citotoxicidad basado en la medición de la citotoxicidad TNF α -mediada, los conjugados de Fab' fueron evaluados para determinar si neutralizan la apoptosis inducida por TNF α en una línea celular de fibroblastos de ratón, L929 (ATCC CRL-2148).

El conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc y el complejo Fab'-S-40K PEG fueron diluidos en serie dos veces, y se colocaron alícuotas de 100- μ l en los pozos de una placa de 96-pozos. El rhTNF- α (sistemas R&D) y actinomicina D (Sigma) utilizados como un inhibidor de la síntesis de ARN se adicionaron a cada pozo a concentraciones finales de 10 ng/ml y 1 μ g/ml, respectivamente, se incuban durante 30 min en un incubador a 37°C con 5% de CO₂, y se transfieren a una microplaca para el ensayo. Las células L929 se adicionaron a cada pozo a una densidad de 5 x 10⁴ células/50 μ l de medio y se cultivaron durante 24 hrs en un incubador a 37°C con 5% de CO₂. Después de que el medio de cultivo se retiró, se le adicionaron a cada pozo, 50 μ l de MTT (Sigma) disueltos en PBS a una concentración de 5 mg/ml y las células además fueron cultivadas durante aproximadamente 4 hrs en un incubador a 37°C con 5% de CO₂. Se le adicionaron a cada pozo 150 μ l de DMSO, y el grado de neutralización de la citotoxicidad se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm. Como control, fue utilizado el Fab' purificado en la etapa 1 del Ejemplo 8.

Como se muestra en la FIG. 13, todos los conjugados de proteína utilizados en esta prueba tuvieron un título similar al de Fab'. Estos resultados indican que, cuando un conjugado de proteína se prepara mediante el enlace de un Fc de inmunoglobulina con un residuo de cisteína libre cerca al terminal-N o terminal-C de un Fab' a través de PEG, el Fab' muestra una vida media en suero notablemente incrementada y una alta actividad in vivo.

<4-5> Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Para determinar si los derivados preparados en los Ejemplos y las proteínas correspondientes a las regiones constantes de inmunoglobulinas, se expresan en los transformantes de *E. coli* y se purifican, unidos a Clq humana,

se llevó a cabo un ensayo inmunoabsorbente de enzima ligado (ELISA), de la siguiente manera. Como grupos de prueba fueron utilizados, las regiones constantes de inmunoglobulina producidas por los transformantes HM10932 y HM10927, depositados en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 15 de Sep, 2004, y números de acceso asignados KCCM-10597, KCCM-10588, y los derivados preparados en los Ejemplos anteriores. Como estándares fueron utilizados, una inmunoglobulina glicosilada (IVIG-globulina S, Green Cross PBM) y varios anticuerpos disponibles comercialmente utilizados como anticuerpos terapéuticos. Las muestras de prueba y estándar se prepararon en solución reguladora de carbonato 10 mM (pH 9.6) a una concentración de 1 µg/ml. Las muestras fueron divididas en alícuotas en una placa de 96-pozos (Nunc) en una cantidad de 200 ng por pozo, y la placa se cubrió durante la noche a 4°C. A continuación, cada pozo se lavó tres veces con PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, 0.05% de Tween 20), se bloqueó con 250 µl de una solución reguladora de bloqueo (1% de albúmina de suero de bovino en PBS-T) a temperatura ambiente por 1 hr, y se lavó de nuevo tres veces con el mismo PBS-T. El estándar y la muestra de pruebas se diluyeron en PBS-T a una concentración predeterminada y se adicionaron a pozos recubiertos con anticuerpo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hr y se lavaron con PBST tres veces. En lo sucesivo, 2 µg/ml de C1q (R&D Systems) se le adicionaron a la placa y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 hrs, y la placa se lavó con PBS-T seis veces. 200 µl de una dilución 1:1000 de un conjugado humano de peroxidasa- anticuerpo C1q anti-humano (Biogenesis, USA) en la solución reguladora de bloqueo se le adicionaron a cada pozo y se hace reaccionar a temperatura ambiente por 1 hr. Después cada pozo se lavó con PBS-T tres veces, los volúmenes iguales de reactivos de color A y B (Color A: peróxido estabilizado y Color B: cromógeno estabilizado; DY 999, R&D Systems) se mezclaron, y 200 µl de la mezcla se adicionaron a cada pozo, seguido por la incubación durante 30 min. A continuación, se le adicionaron a cada pozo, 50 µl de una solución de terminación de la reacción, ácido sulfúrico 2 M. La placa se leyó utilizando un lector de microplaca (Molecular Device). La absorbancia del estándar y muestras de prueba fue medida a 450 nm, y los resultados se muestran en las FIGS. 14 y 15, respectivamente.

Cuando las subclases de inmunoglobulina se compararon la uno con la otro para la actividad complemento en su fragmento Fc de inmunoglobulina, la más alta afinidad de enlace con C1q se encontró en IgG1 de inmunoglobulina humana (Fitzgerald), la siguiente en IgG2 (Fitzgerald) y luego IgG4 (Fitzgerald), indicando que existe una diferencia entre las subclases en la actividad complemento. El IVIG utilizado en esta prueba, que es una mezcla de las subclases de IgG, mostró una afinidad de enlace C1q casi igual que la del purificado IgG1, debido a que IgG1 asciende a más del IVIG. En comparación con estos estándares, en relación con los cambios en afinidad de enlace con C1q por aglicosilación, Fc de IgG1 que tiene la actividad de complemento más fuerte, disminuyó notablemente cuando es aglicosilado. No se conoce que Fc de IgG4, induce la activación del complemento, rara vez tuvo afinidad de enlace con C1q, indicando que el Fc de IgG4 se utiliza como un excelente portador recombinante con ninguna actividad del complemento (FIG. 14).

Para determinar si el portador mantiene su propiedad de no tener afinidad de enlace con C1q, incluso después de ser conjugado con un péptido fisiológicamente activo, los conjugados IFN alfa-Fc se prepararon utilizando Fc glicosilado, Fc enzimáticamente deglicosilado y Fc recombinante aglicosilado como portadores para IFN alfa y fueron evaluados por su afinidad de enlace con C1q. Un conjugado Fc glicosilado- IFN alfa acoplado (IFNα-PEG-Fc: IgG1Fc Glicosilado) mantuvo una alta afinidad de enlace con C1q. Por lo contrario, cuando el interferón alfa se acopló con un Fc deglicosilado utilizando PNGase F y otras enzimas, el conjugado resultante (IFNα-PEG-DGFc: IgG1Fc Deglicosilado) mostró una afinidad de enlace notablemente disminuida con C1q, que fue similar a aquella del conjugado Fc aglicosilado derivado de *E. coli*: Además, cuando la fracción de IgG1 del conjugado Fc IgG1 aglicosilado- interferón alfa acoplado (IFNα-PEG-AGFcG1: IgG1Fc Aglicosilado) se intercambió con la fracción IgG4, el conjugado del interferón resultante (IFNα-PEG-FcG4 derivado 1: gG4FcAglicosilado I) se encontró que pierde completamente su afinidad de enlace con C1q. Cuando la fracción Fc de IgG1 se intercambió con el monómero Fc de IgG4, el conjugado resultante (IFNα-PEG-FcG4 derivado 2: Aglicosilado IgG4Fc). Estos resultados indican que tales formas del fragmento Fc de IgG4 son útiles como excelentes portadores que no tienen las funciones efectoras de los fragmentos de anticuerpos (FIG. 15).

Aplicabilidad Industrial

Como se describe anteriormente, el conjugado de proteína de la presente invención incrementa enormemente la vida media en plasma del fármaco de polipéptidos a niveles superiores que cualquiera de las proteínas modificadas convencionalmente. Por otra parte, los conjugados de proteína superan la desventaja más significativa de convencionales formulaciones de acción prolongada, disminuyendo los títulos del fármaco, teniendo así el tiempo de circulación sanguínea y la actividad in vivo superior a la albúmina, previamente conocida por ser más efectiva. Además, los conjugados de proteína no tienen riesgo de inducir las respuestas inmunes. Debido a estas ventajas, los conjugados de proteína son útiles para desarrollar las formulaciones de acción prolongada de fármacos proteicos. Las formulaciones de acción prolongada de fármacos proteicos de acuerdo con la presente invención son capaces de reducir el dolor del paciente de inyecciones frecuentes, y de mantener las concentraciones en suero de polipéptidos activos durante un periodo de tiempo prolongado, proporcionando así, una eficacia farmacéutica estable.

Además, el presente método de preparación de un conjugado de proteína supera las desventajas de la producción de proteína de fusión por manipulación genética, incluyendo la dificultad de establecimiento de sistemas de expresión, glicosilación diferente de una forma nativa, inducción de respuesta inmune y orientación limitada de la fusión de la proteína, bajos rendimientos debido a las reacciones no-específicas, y los problemas de acoplamiento químico tales como toxicidad de los compuestos químicos utilizados como aglutinantes, proporcionando fácilmente, los fármacos proteicos de forma económica, con una vida media en suero prolongada y una alta actividad.

- 5 <110> Hanmi Pharm. Co., Ltd.
- <120> COMPLEJO DE PROTEÍNA QUE UTILIZA UN FRAGMENTO DE INMUNOGLOBULINA Y EL MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE ESTE
- 10 <150> KR10-2003-0080299
- <151> 2003=11-13
- <160> 6
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- 15 <211> 35
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador
- 20 <400> 1
- cgtcacgccc agcacctgag ttctggggg gacca 35
- <210> 2
- <211> 42
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador
- <400> 2
- gggggatcct catttaccca gagacagga gaggctcttc tg 42
- 30 <210> 3
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>

ES 2 378 167 T3

<223> cebador
<400> 3
cggcacctga gttcctgggg ggaccatca 29
<210> 4
5 <211> 69
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 4
atgaaaaaga caatcgcat tcttcttgca tctatgtcg tttttctat tgctacaaat 60 gccaggcg 69
10 <210> 5
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
15 <223> cebador
<400> 5
tctattgcta caaatgccca ggccttccca accattccct tatcc 45
<210> 6
<211> 45
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 6
25 agataacgat gtttacgggt ccggaagggt tgtaaggga atagg 45

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un conjugado de proteína que comprende un polipéptido fisiológicamente activo, un polímero no-peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina, en donde el polímero no-peptídico se liga de forma lineal en ambos extremos con el polipéptido fisiológicamente activo y el fragmento Fc de inmunoglobulina mediante un enlace covalente, y en donde el polímero no-peptídico es el polietileno glicol.
- 2.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más complejos del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no-peptídico se unen de forma covalente a una molécula única del fragmento Fc de inmunoglobulina.
- 10 **3.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina es no-glicosilado.
- 4.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina se compone de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste de los dominios C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}.
- 5.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina además incluye una región bisagra.
- 15 **6.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste de los fragmentos Fc IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, y las combinaciones e híbridos de estos.
- 7.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste de los fragmentos Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y las combinaciones e híbridos de estos.
- 20 **8.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4.
- 9.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4 aglicosilado humano.
- 25 **10.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polímero no-peptídico tiene un grupo reactivo seleccionado a partir del grupo que consiste de un grupo aldehído, un grupo aldehído propione, un grupo butil aldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida.
- 11.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el derivado de succinimida es el succinimidil propionato, el succinimidil carboximetilo, el hidroxil succinimidil o el succinimidil carbonato.
- 30 **12.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el polímero no-peptídico tiene un grupo reactivo aldehído como un grupo reactivo en ambos extremos de estos.
- 13.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polímero no-peptídico se une en cada extremo de este, a un grupo reactivo libre en un extremo terminal amino, un residuo de lisina, un residuo de histidina o un residuo de cisteína del fragmento Fc de inmunoglobulina y el polipéptido fisiológicamente activo.
- 35 **14.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona a partir del grupo que consiste de hormonas, citoquinas, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores reguladores de la transcripción, factores de coagulación, vacunas, proteínas estructurales, proteínas ligandos y los receptores.
- 40 **15.** El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona a partir del grupo que consiste de la hormona humana de crecimiento, hormona de liberación de la hormona de crecimiento, péptido de liberación de la hormona de crecimiento, interferones, receptores del interferón, factores de estimulación de colonias, receptor acoplado a la proteína-G, similar al glucagón, interleucinas, receptores de la interleucina, enzimas, proteínas de enlace de la interleucina, proteínas de enlace de la citoquina, factor de activación del macrófago, péptido macrófago, factor de célula B, factor de célula T, proteína A, inhibidor de alergias, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotóxina, linfotóxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento de metástasis, alfa-1 antitripsina, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, reitropoyetina, reitropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activador del plasminogeno,
- 45

5 péptido de enlace de la fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína reactiva C, inhibidor de la renina, inhibidor de la colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína de estimulación ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor
 10 activador del tejido conectivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona estimuladora del folículo, hormona luteinizante, hormona de liberación de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroide, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido de liberación de gastrina, factor de liberación de la corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores, antagonistas del receptor, antígenos de superficie celular, antígenos de vacuna derivados de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpos.

16. El conjugado de proteína de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el polipéptido fisiológicamente activo es la hormona humana de crecimiento, el interferón alfa, el factor estimulante de colonias de granulocitos, la reitropoyetina o un fragmento de anticuerpo Fab'.

15 **17.** Un método de preparación del conjugado de proteína de la reivindicación 1, que comprende:

(a) el enlace de forma covalente de uno o más polímeros no-peptídicos que tienen un grupo reactivo en ambos extremos de estos, uno o más polipéptidos fisiológicamente activos y uno o más fragmentos Fc de inmunoglobulina; y

20 (b) aislamiento del citado conjugado de proteína, que comprende el polipéptido fisiológicamente activo, polímero no-peptídico y fragmento Fc de inmunoglobulina ligados de forma covalente, en donde el polímero no-peptídico es el polietileno glicol.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la etapa (a) comprende:

(a1) el enlace de forma covalente de un fragmento Fc de inmunoglobulina o polipéptido fisiológicamente activo con un extremo de un polímero no-peptídico activo;

25 (a2) aislamiento de un complejo que comprende el fragmento Fc de inmunoglobulina o polipéptido fisiológicamente activo unido al polímero no-peptídico de una mezcla de reacción resultante; y

30 (a3) el enlace de forma covalente de un fragmento Fc de inmunoglobulina o polipéptido fisiológicamente activo con el otro extremo del polímero no-peptídico del complejo aislado para proporcionar un conjugado de proteína que comprende el fragmento Fc de inmunoglobulina y el polipéptido fisiológicamente activo, que se unen a cada extremo del polímero no-peptídico.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde, en la etapa (a1), se utilizan el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no-peptídico a una relación molar de reacción de 1:1.25 a 1:5.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde, en la etapa (a1), se utilizan el fragmento Fc de inmunoglobulina y el polímero no-peptídico a una relación molar de reacción de 1:5 a 1:10.

35 **21.** El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde, en la etapa (a3), se utilizan el complejo obtenido en la etapa (a2) y el fragmento Fc de inmunoglobulina o polipéptido fisiológicamente activo a una relación molar de reacción de 1:0.5 a 1:20.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde las etapas (a1) y (a3) se llevan a cabo en la presencia de un agente reductor.

40 **23.** El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el agente reductor se selecciona a partir del grupo que consiste de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃), borohidruro de sodio, dimetilamina borato y pirdina borato.

24. Una composición farmacéutica para proporcionar un polipéptido fisiológicamente activo que ha mejorado la estabilidad y la duración in vivo, que comprende el conjugado de proteína de las reivindicaciones 1 a 16 como un componente efectivo y un portador farmacéuticamente aceptable de estos.

45

FIG. 1

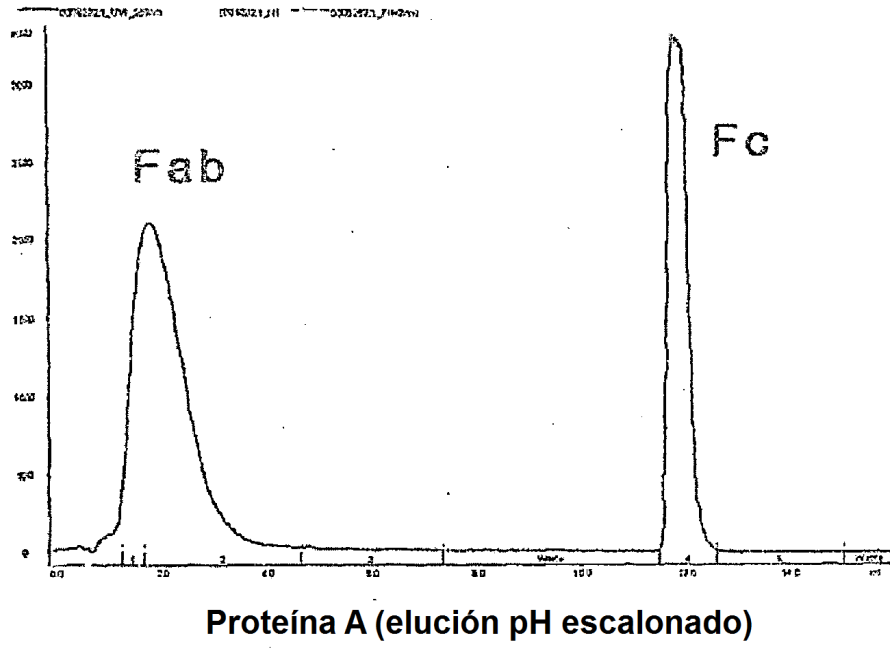


FIG. 2

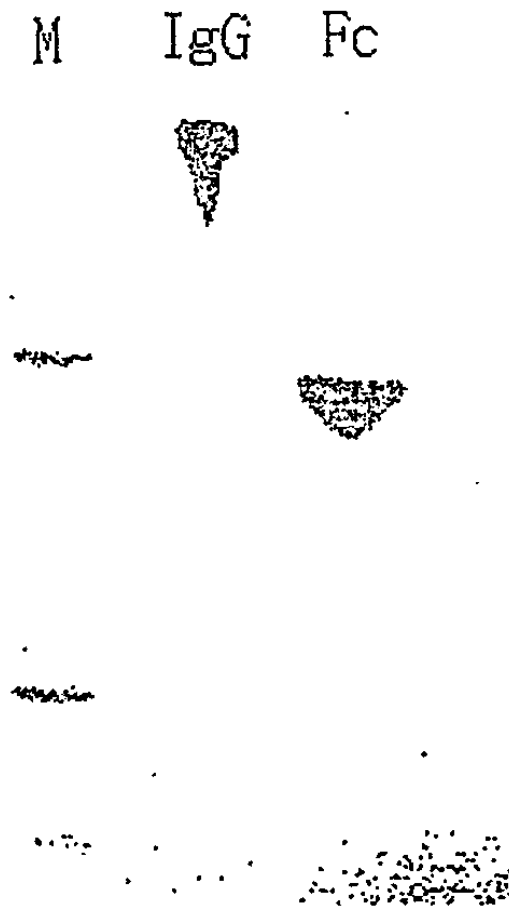
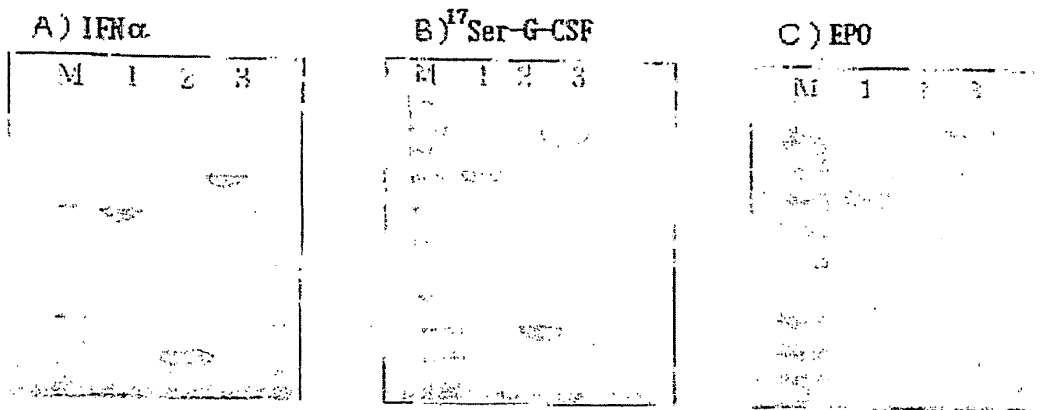


FIG. 3



M: Marcador de Tamaño Molecular

Carril 1: Fc

Carril 2: Proteína fisiológicamente activa

Carril 3: Conjugado de Proteína fisiológicamente activa-PEG-Fc

FIG. 4

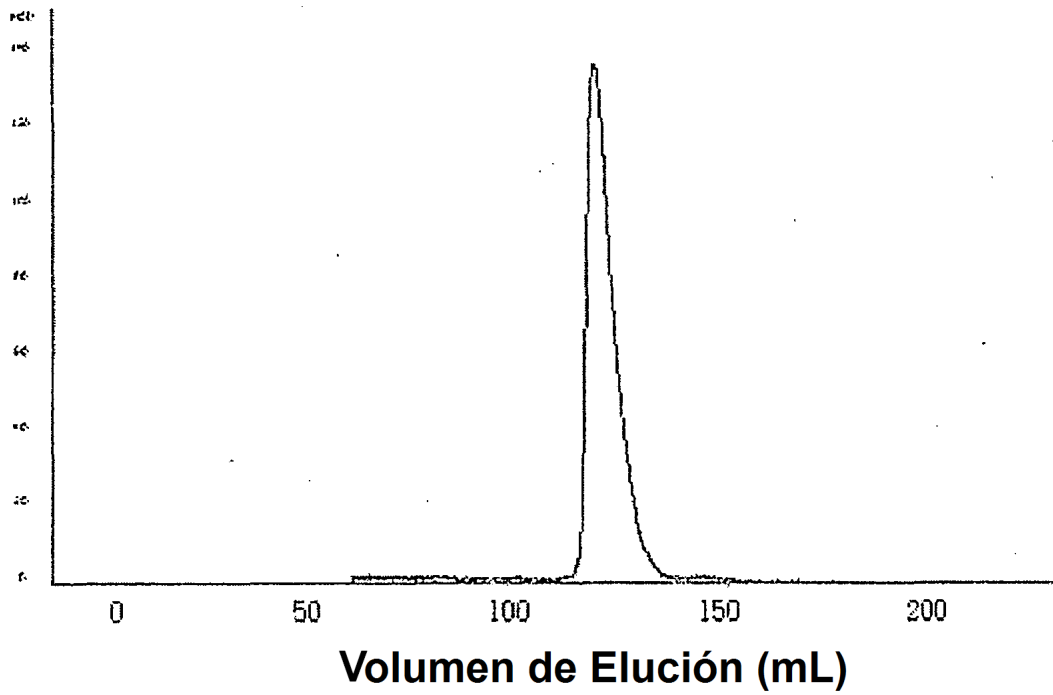


FIG. 5

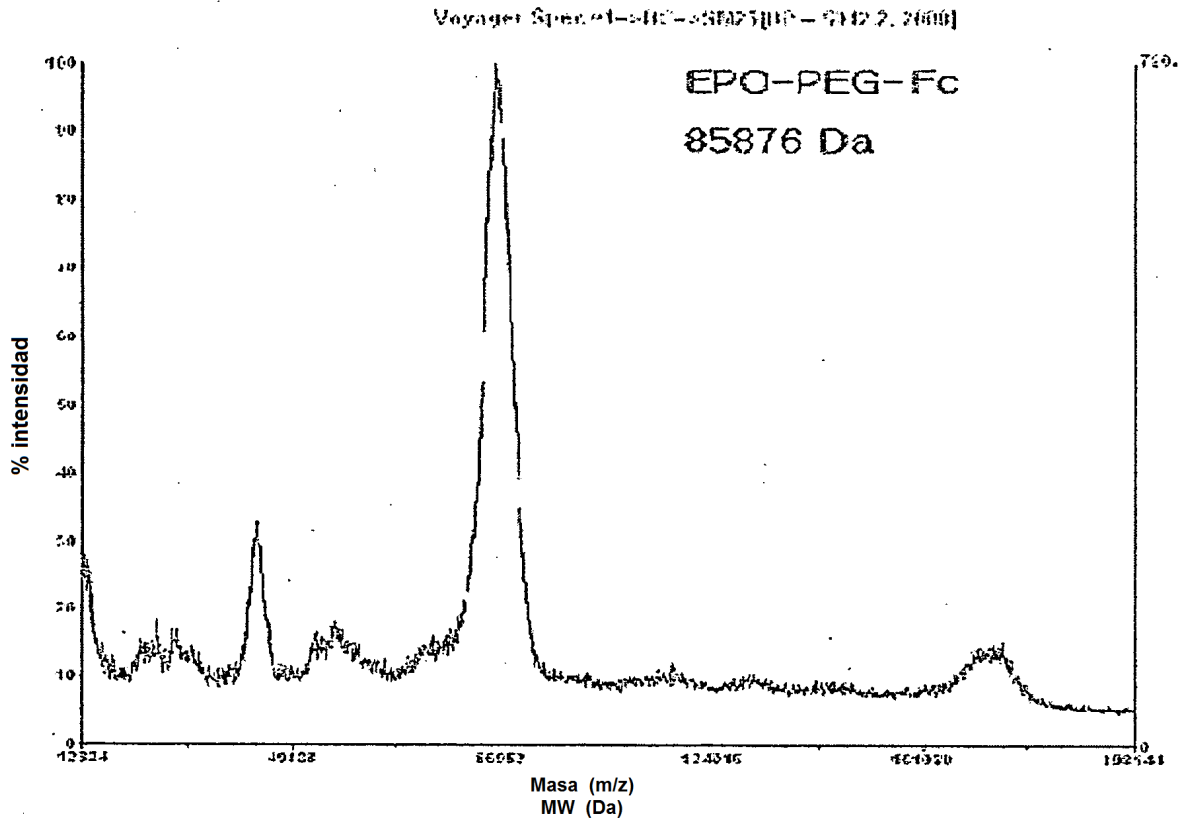


FIG. 6a

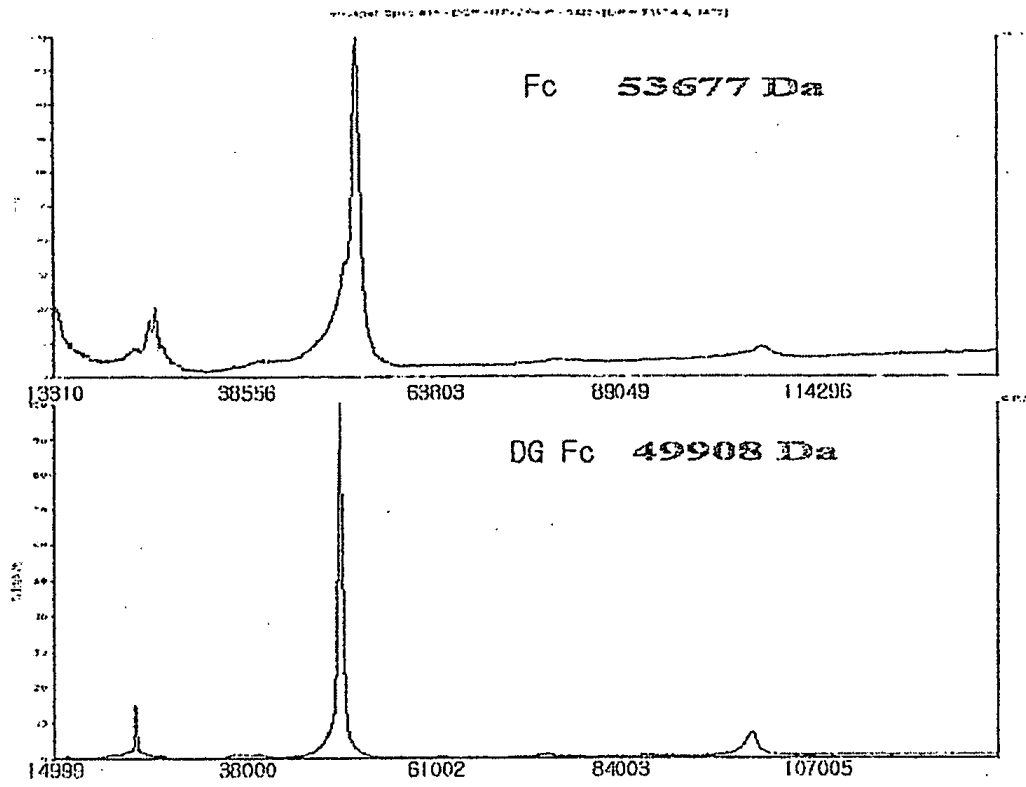


FIG. 6b

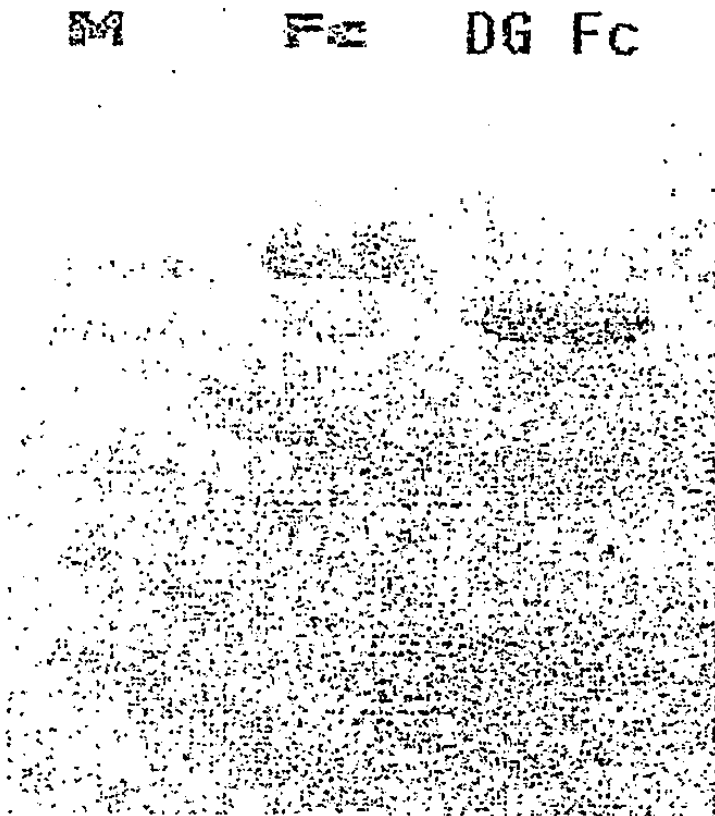


FIG. 7

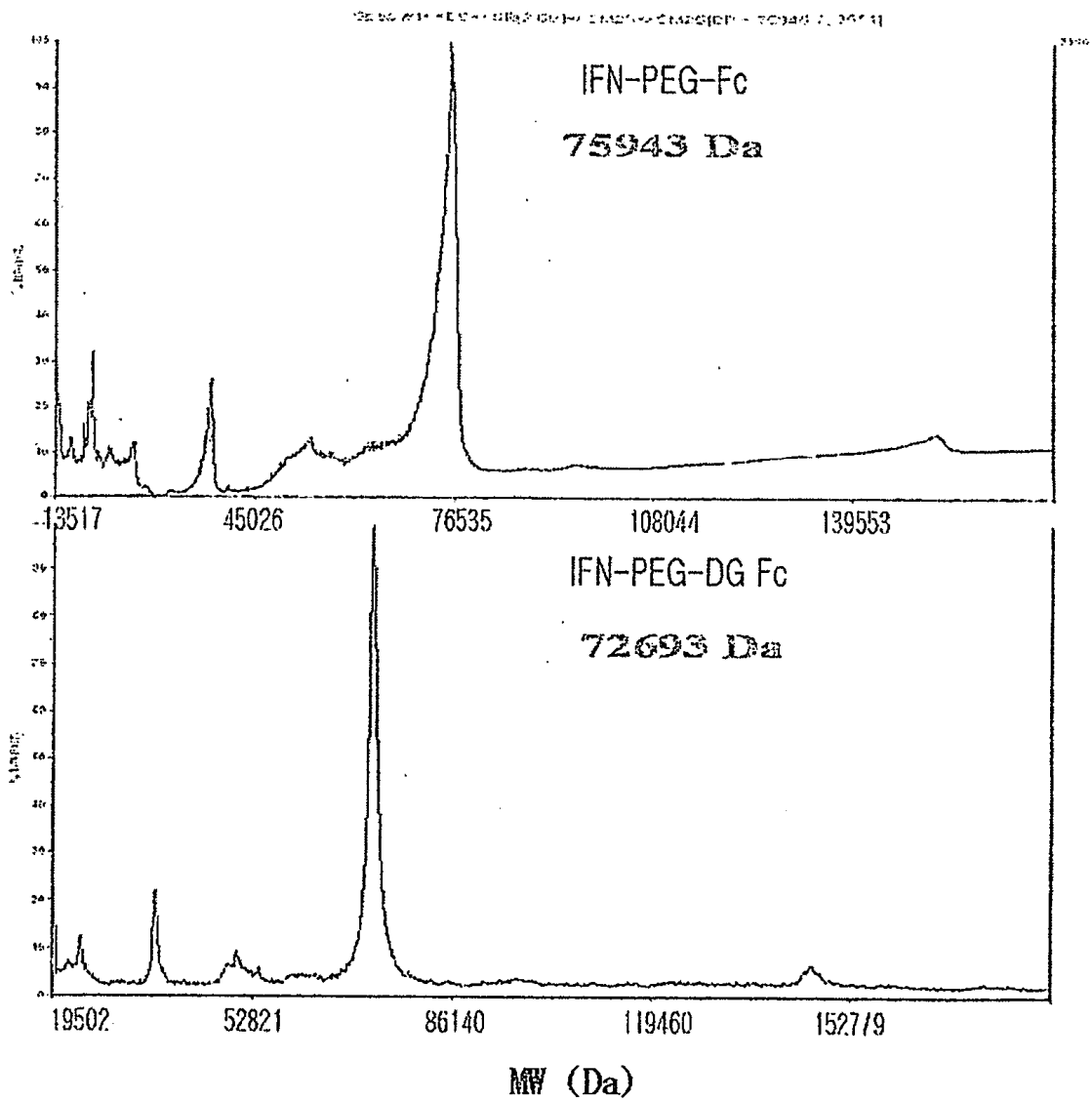
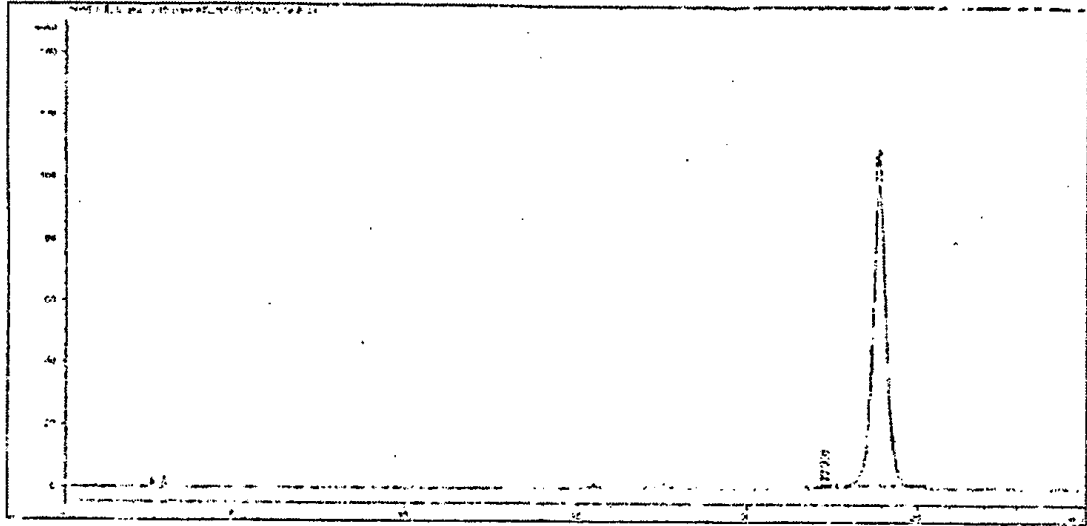
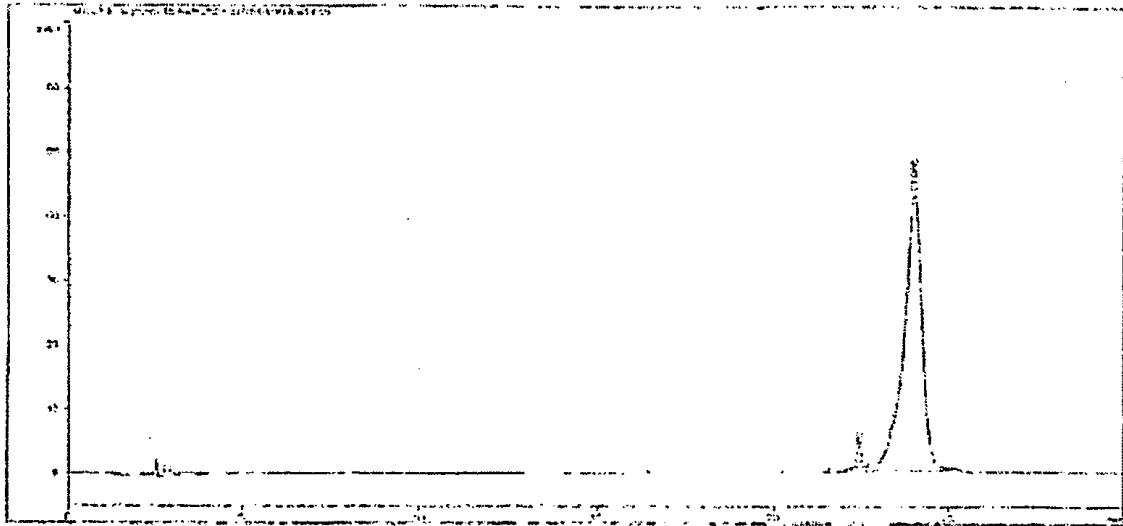


FIG. 8a



Tiempo (min)

FIG. 8b



Tiempo (min)

FIG. 8c

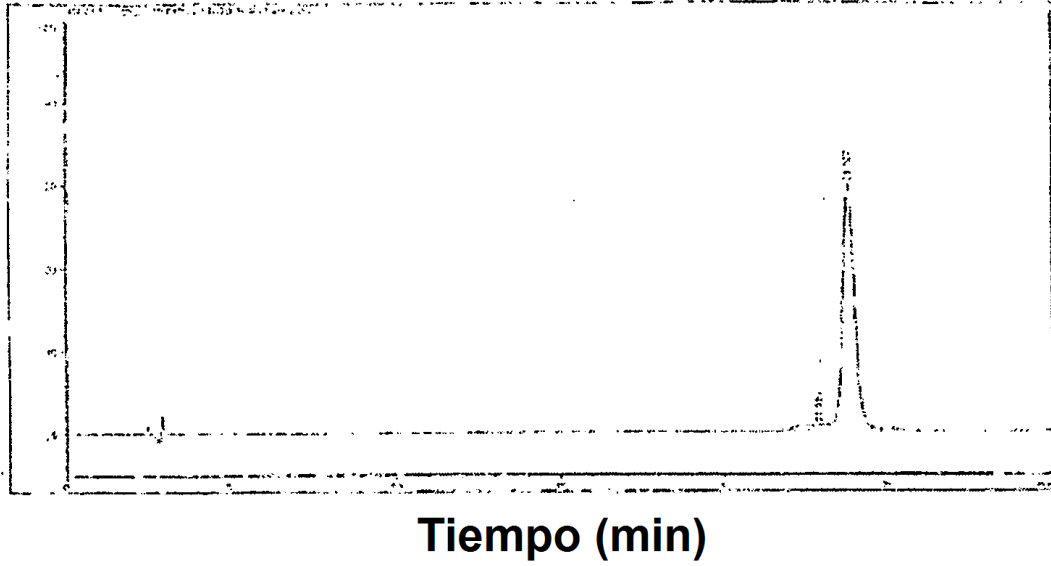


FIG. 9

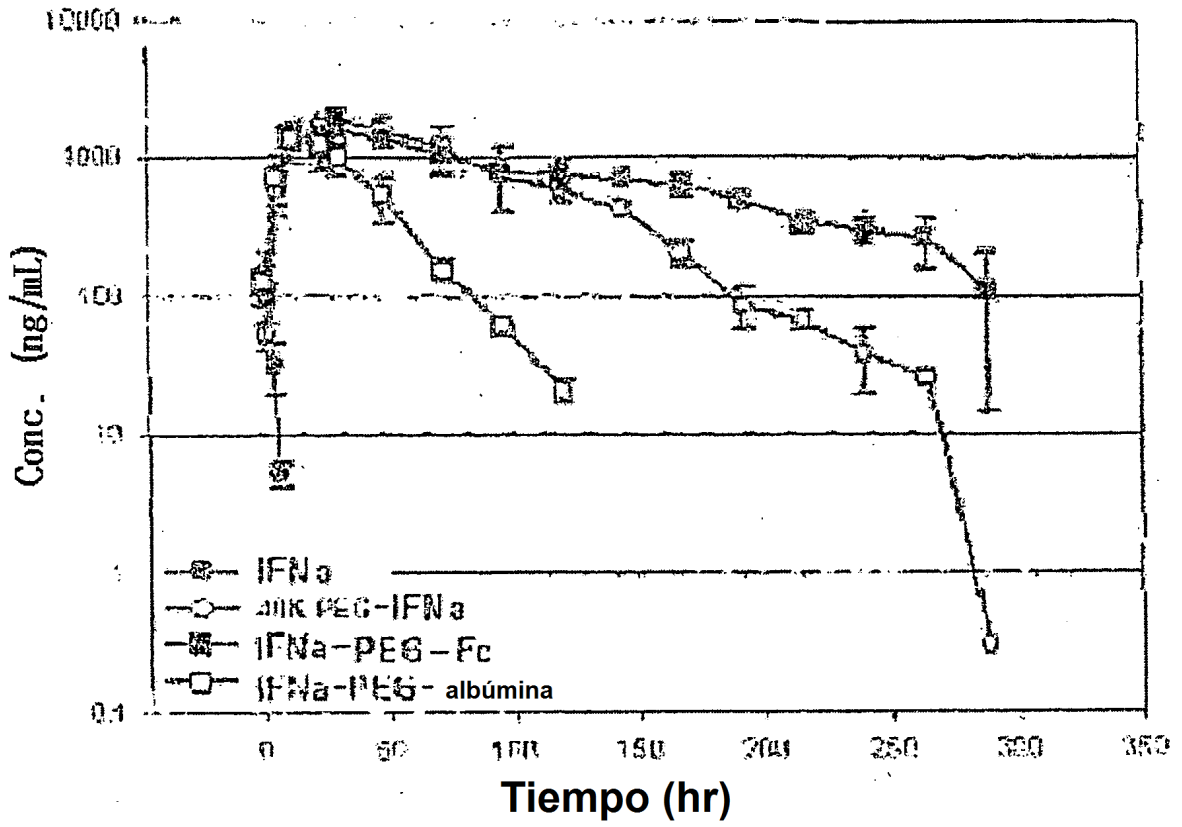


FIG. 10

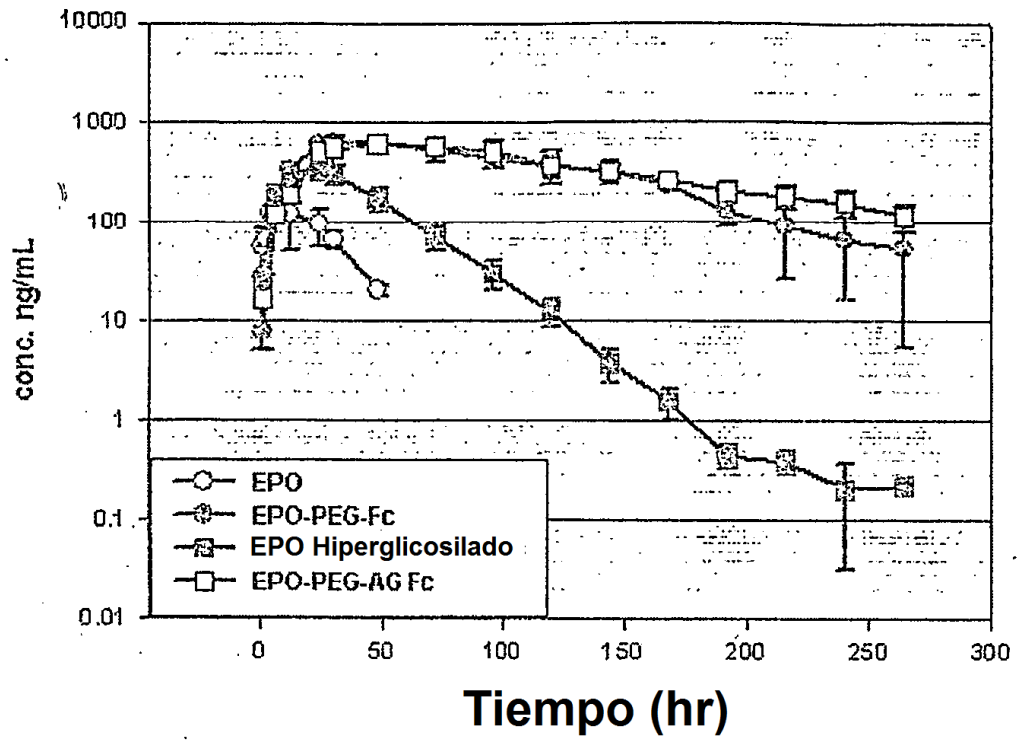


FIG. 11

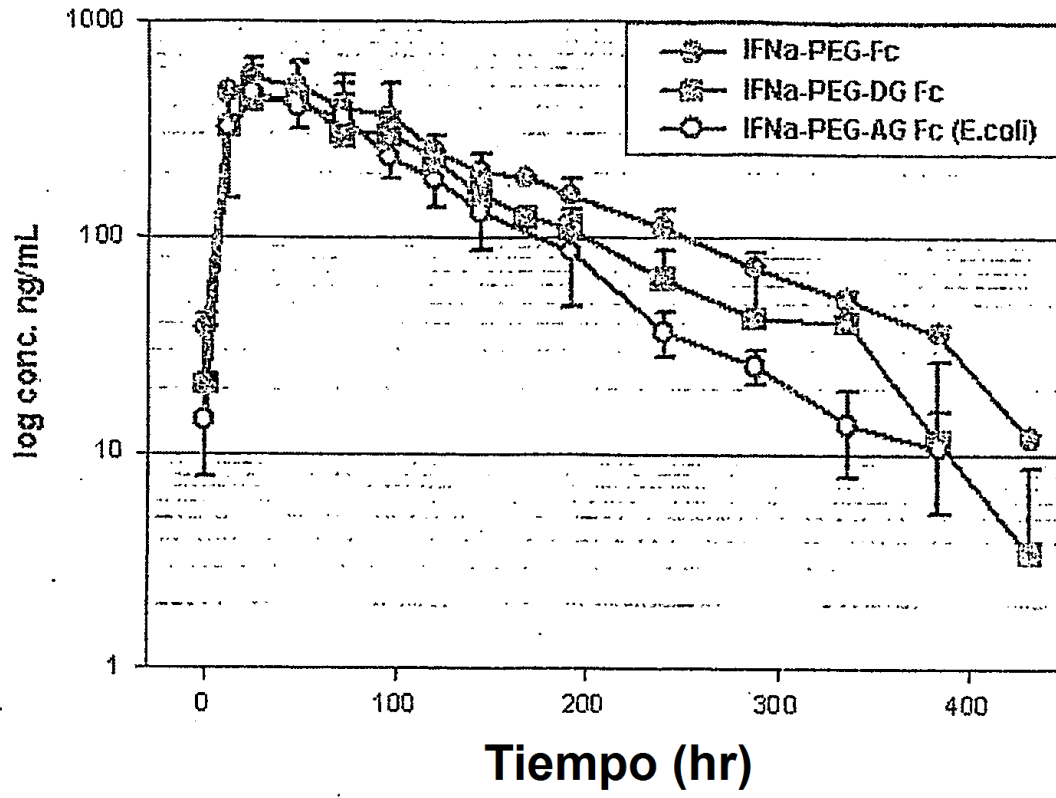


FIG. 12

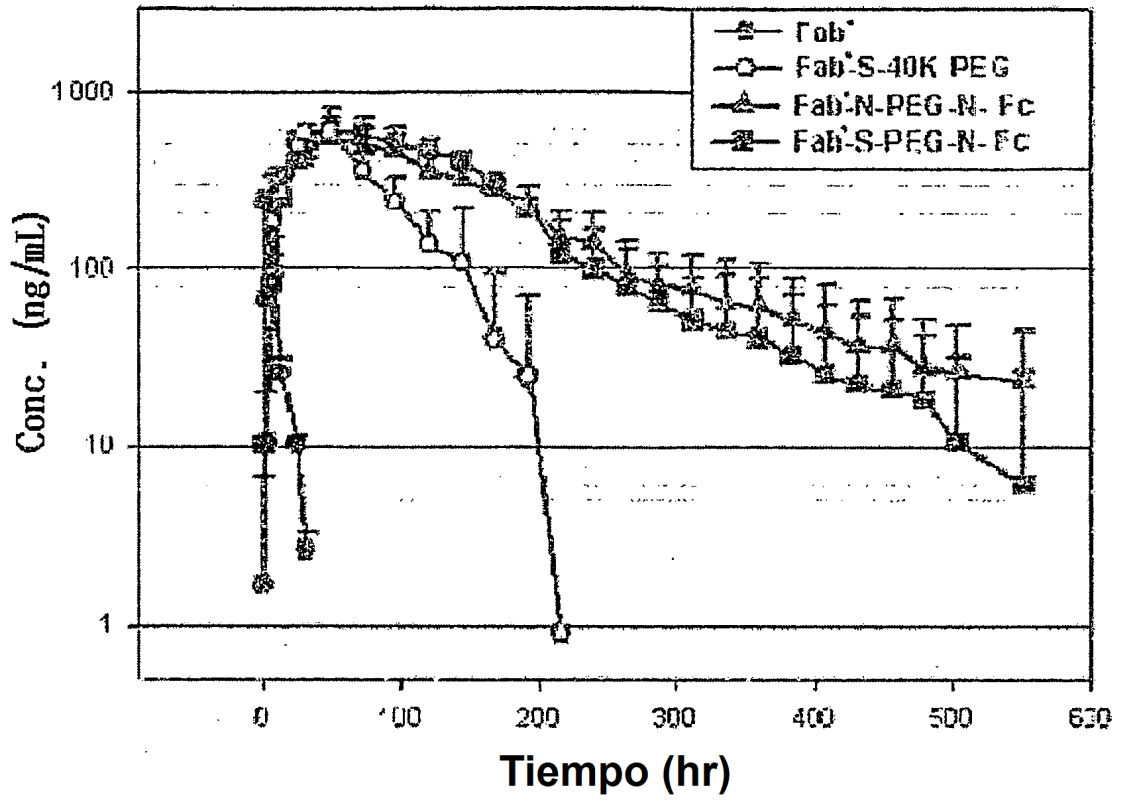


FIG. 13

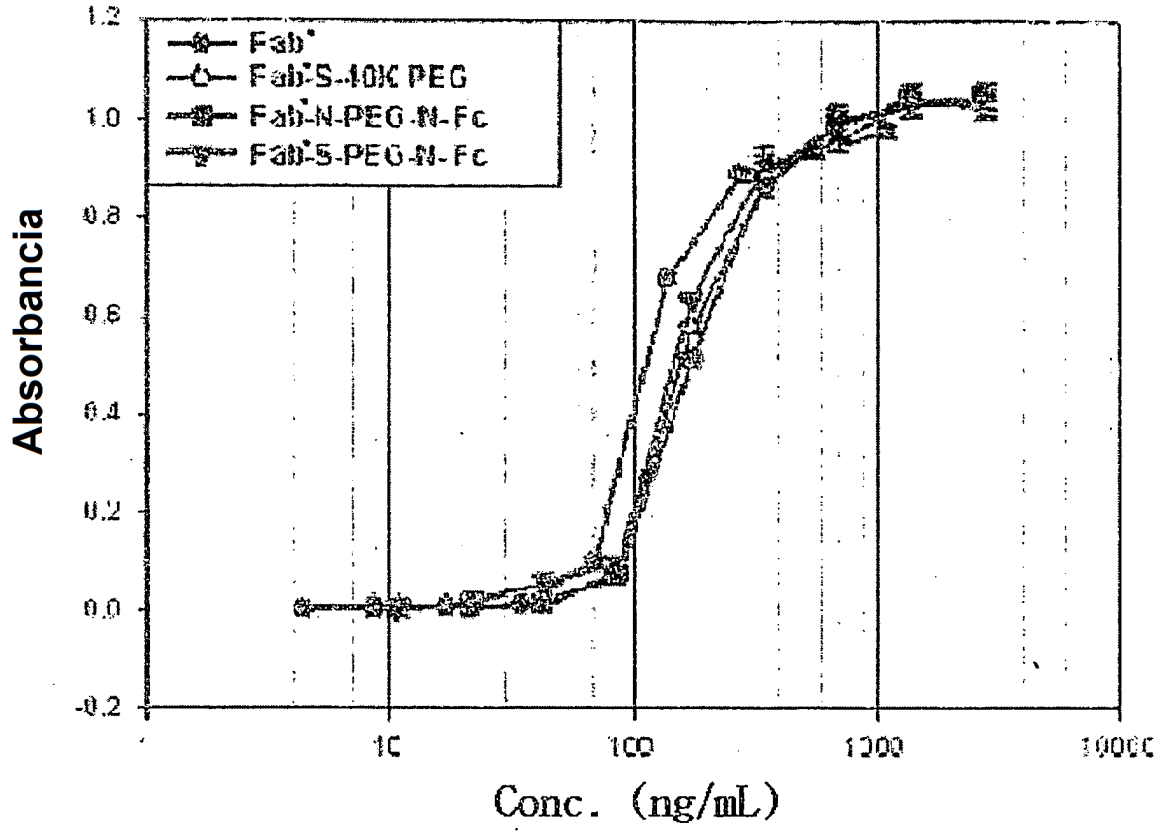


FIG. 14

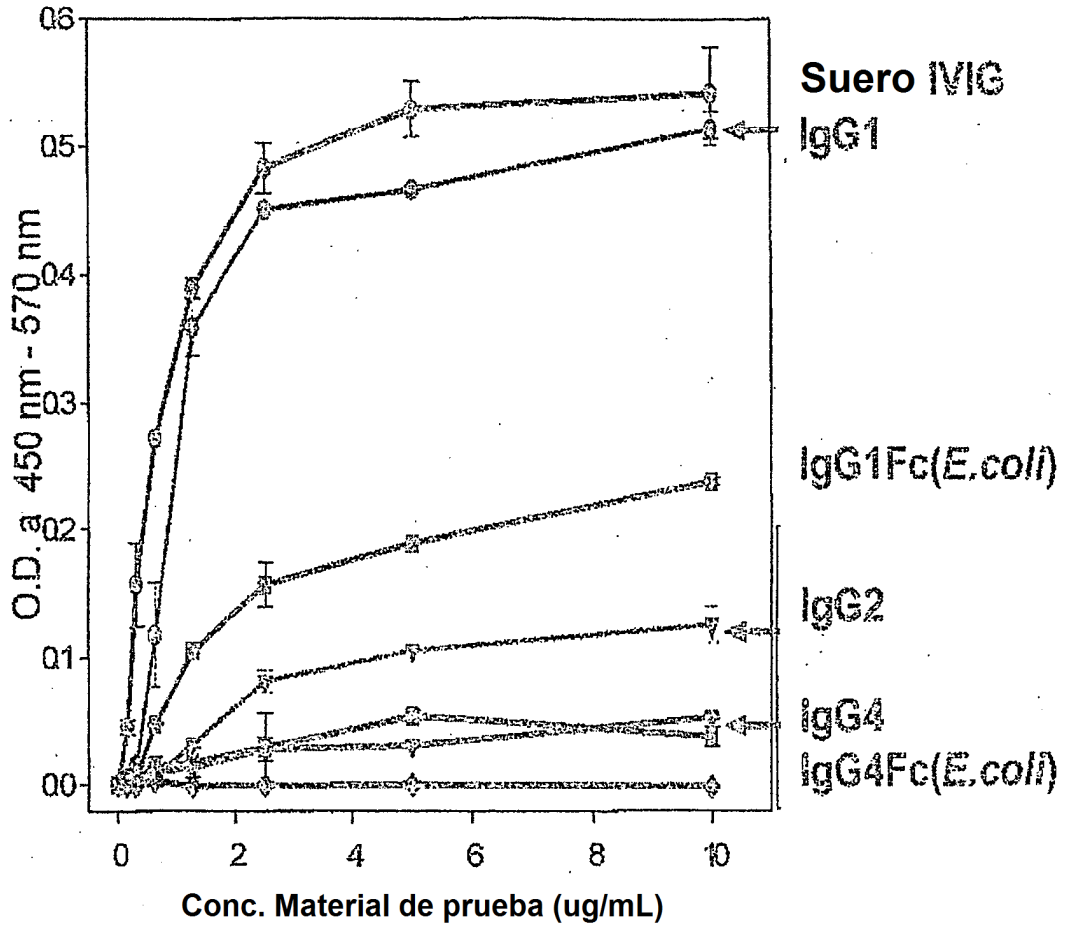


FIG. 15

