

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 300**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04800089 .7**  
96 Fecha de presentación: **13.11.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1682581**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Fragmento Fc de IgG para un vehículo de fármacos y procedimiento para su preparación**

30 Prioridad:  
**13.11.2003 KR 2003080299**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.06.2012**

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

72 Inventor/es:  
**JUNG, Sung, Youb;**  
**KIM, Jin, Sun;**  
**YANG, Geun, Hee;**  
**KWON, Se, Chang y**  
**LEE, Gwan, Sun**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 383 300 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

Fragmento fc de igg para un vehículo de fármacos y procedimiento para su preparación

5 Campo técnico

**[0001]** La presente invención se refiere al uso de un fragmento Fc de IgG como un vehículo de fármacos.

10 Antecedentes de la técnica

**[0002]** En el pasado, un gran número de farmacólogos y químicos hicieron esfuerzos para alterar químicamente y/o modificar la actividad in vivo de moléculas fisiológicamente activas que existen en la naturaleza. Estos esfuerzos se centraron principalmente en el aumento o la prolongación de determinada actividad in vivo, reducción de la toxicidad, eliminación o reducción de efectos secundarios, o modificación de actividades fisiológicas específicas de las sustancias fisiológicamente activas. Cuando una sustancia fisiológicamente activa se modifica químicamente, en muchos casos pierde algo o la mayor parte de sus actividades fisiológicas. Sin embargo, en algunos casos, la modificación podía producir un aumento o cambio en la actividad fisiológica. En relación con esto, muchos estudios se han centrado en la modificación química capaz de lograr la actividad fisiológica deseada, y la mayoría de dichos estudios han implicado la unión covalente de una sustancia fisiológicamente activa (fármaco) a un vehículo fisiológicamente aceptable.

**[0003]** Por ejemplo, la publicación de patente internacional nº WO 01/93911 usa un polímero que tiene una pluralidad de restos ácidos como un vehículo de fármacos. La publicación de patente internacional nº WO 03/00778 describe copolímeros de bloques anfifílicos que contienen un grupo aniónico que, cuando se usan como un vehículo de fármacos para un fármaco catiónico, mejoran la estabilidad del fármaco. La patente europea nº 0681481 describe un procedimiento para mejorar las propiedades de fármacos básicos usando ciclodextrina y ácidos como vehículos. Por otra parte, los fármacos hidrófobos tienen una baja estabilidad in vivo debido principalmente a su baja solubilidad acuosa. Para mejorar la baja solubilidad acuosa de los fármacos hidrófobos, la publicación de patente internacional nº WO 04/064731 usa un lípido como vehículo. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito el uso de un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo de fármacos.

**[0004]** Típicamente, puesto que los polipéptidos son desnaturalizados de forma relativamente fácil debido a su baja estabilidad, degradados por enzimas proteolíticas en la sangre y eliminados fácilmente a través del riñón o el hígado, es necesario administrar con frecuencia a los pacientes los medicamentos proteínicos, que incluyen polipéptidos como componentes farmacéuticamente eficaces, para mantener el nivel, las concentraciones y valoraciones en sangre deseados. Sin embargo, esta administración frecuente de medicamentos proteínicos, en especial mediante inyección, puede producir dolor en los pacientes. Para resolver estos problemas, se han hecho muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad en el suero de los fármacos proteínicos y mantener los fármacos en la sangre en niveles altos durante un periodo de tiempo prolongado, y por lo tanto maximizar la eficacia farmacéutica de los fármacos. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas con actividad sostenida necesitan aumentar la estabilidad de los fármacos proteínicos y mantener las valoraciones en niveles suficientemente altos sin causar respuestas inmunitarias en los pacientes.

**[0005]** Para estabilizar las proteínas y prevenir la degradación enzimática y eliminación por los riñones, se usó convenientemente un polímero que tiene una alta solubilidad, tal como polietilenglicol (en lo sucesivo denominado simplemente como "PEG"), para modificar químicamente la superficie de un fármaco proteínico. Mediante la unión a regiones específicas o diferentes regiones de una proteína objetivo, el PEG estabiliza la proteína y previene la hidrólisis, sin causar efectos secundarios graves (Sada y col., *J. Fermentation Bioengineering* 71: 137 – 139, 1991). Sin embargo, a pesar de su capacidad para potenciar la estabilidad de proteínas, este acoplamiento con PEG tiene problemas tales como que reduce mucho las valoraciones de las proteínas fisiológicamente "activas". Además el rendimiento disminuye con el aumento del peso molecular del PEG, debido a la reducida reactividad con las proteínas.

**[0006]** Recientemente, se han sugerido los conjugados de polímero-fármaco proteínico. Por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.738.846, se puede preparar un conjugado mediante la unión de un fármaco proteínico idéntico a ambos extremos del PEG para mejorar la actividad del fármaco proteínico. También, como se describe en la publicación de patente internacional nº WO 92/16221, se pueden unir dos fármacos proteínicos diferentes a ambos extremos del PEG para proporcionar un conjugado que tiene dos actividades diferentes. Sin embargo, los procedimientos anteriores no eran muy satisfactorios para mantener la actividad de los fármacos proteínicos.

**[0007]** Por otra parte, Kinstler y col. describieron que una proteína de fusión preparada por acoplamiento del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) a albúmina humana, mostraba una estabilidad mejorada (Kinstler y col., *Pharmaceutical Research* 12(12): 1883 – 1888, 1995). Sin embargo, en esta publicación puesto que el fármaco modificado que tiene una estructura de G-CSF-PEG-albúmina sólo mostraban un aumento de aproximadamente 4 veces el tiempo de permanencia en el cuerpo y un ligero aumento de la semivida en el suero

comparado con la administración de solo el G-CSF, no se ha industrializado como una formulación de acción prolongada eficaz para fármacos proteínicos.

5 **[0008]** Un procedimiento alternativo para mejorar la estabilidad in vivo de proteínas fisiológicamente activas es mediante la unión de un gen de proteína fisiológicamente activa a un gen que codifica una proteína que tiene una alta estabilidad en el suero por tecnología de recombinación genética y cultivo de las células transfectadas con el gen recombinante para producir una proteína de fusión. Por ejemplo, se puede preparar una proteína de fusión conjugando albúmina, una proteína que se sabe que es la más eficaz para potenciar la estabilidad de las proteínas, 10 o su fragmento, a una proteína fisiológicamente activa de interés por recombinación genética (publicaciones de patentes internacionales nº WO 93/15199 y WO 93/15200, publicación de patente europea nº 413.622). Una proteína de fusión de interferón alfa y albúmina desarrollada por la Human Genome Science Company y comercializada con el nombre comercial de "Albuferon™", aumentaba la semivida de 5 h a 93 h en monos, pero se sabía que era problemática porque disminuía la actividad in vivo a menos de 5 % del interferón alfa no modificado (Osborn y col., *J. Phar. Exp. Ther.* 303(2): 540 – 548, 2002). No se ha descrito una buena tecnología que potencie 15 tanto la duración de la acción in vivo como la estabilidad de los fármacos proteínicos, así como que mantenga la actividad fisiológica de los fármacos in vivo.

20 **[0009]** Por otra parte, las inmunoglobulinas y sus fragmentos se han usado para potenciar la estabilidad de fármacos proteínicos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.045.312 describe un procedimiento de aumento de la actividad de una hormona de crecimiento comparada con una hormona de crecimiento no modificada, conjugando la hormona de crecimiento humana a albúmina del suero o inmunoglobulina de rata, usando un agente de reticulación. También se han hecho otros intentos de fusionar un fármaco proteínico a un fragmento Fc de inmunoglobulina. Por ejemplo, el interferón (publicación de patente coreana abierta a consulta por el público nº 2003-9464), y el receptor de interleuquina-4, receptor de interleuquina-7 o receptor de eritropoyetina (EPO) (Registro de patente coreana nº 249572) se expresaron previamente en mamíferos en una forma fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina. La publicación de patente internacional nº WO 01/03737 describe una proteína de fusión que comprende una citoquina o factor de crecimiento unido a un fragmento Fc de inmunoglobulina por enlace peptídico. Además la patente de EE.UU. nº 5.116.964 describe una proteína fusionada al extremo amino o carboxilo terminal de un fragmento Fc de inmunoglobulina por recombinación genética. La patente de EE.UU. nº 5.349.053 describe una 30 proteína de fusión que comprende la IL-2 fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina por un enlace peptídico.

35 **[0010]** Otros ejemplos de proteínas de fusión de Fc preparadas por recombinación genética incluyen una proteína de fusión de interferón beta o su derivado y un fragmento Fc de inmunoglobulina (publicación de patente internacional nº WO 00/23472), y una proteína de fusión del receptor de IL-5 y un fragmento Fc de inmunoglobulina (patente de EE.UU. nº 5.712.121). Sin embargo, las técnicas para mejorar la duración de la acción de los fármacos polipeptídicos fisiológicamente activos usando un fragmento Fc de inmunoglobulina se centran principalmente en el uso del fragmento Fc de inmunoglobulina solo como una pareja de fusión, y hasta la fecha, no se ha descrito la técnica de usar un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo.

40 **[0011]** También se conocen técnicas que implican la modificación de restos de aminoácidos de un fragmento Fc de inmunoglobulina. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.605.690 describe una proteína de fusión de TNFR-IgG1 Fc, que se prepara por recombinación genética usando el fragmento Fc de IgG1 que tiene alteraciones de aminoácidos en la región de unión al complemento o la región de unión al receptor.

45 **[0012]** El documento WO 02/46227 A enseña proteínas de fusión de GLP-1 para tratar la diabetes y otras afecciones que caracterizan una semivida in vivo prolongada. En particular, el documento WO 02/46227 A describe proteínas de fusión heterólogas que comprenden GLP-1 fusionado a la parte Fc de una inmunoglobulina por fusión C- y N-terminales, en la que la fusión puede ser mediante un conector peptídico (véase pág. 4, l. 12 – 25; reivindicaciones 27 y 28). El documento WO 02/46227 A no enseña o sugiere el uso de un conector no peptídico. 50

**[0013]** El documento WO 02/066514 A describe simplemente proteínas de fusión de polipéptidos farmacéuticamente activos y fragmentos Fc, en los que la unión entre ellos se forma por fusión recombinante. El documento WO 02/066514 A no dice nada sobre el conjugado de fragmento Fc de IgG-polipéptido de no fusión.

55 **[0014]** El documento WO 01/81415 A2 se refiere a un agente terapéutico que modula las actividades de PTH (paratiroide) y THrP (proteína relacionada con paratiroide), y describe un dominio Fc como un vehículo conveniente y que se puede usar un conector no peptídico. Sin embargo, el documento WO 01/81415 A2 describe solo conjugados PTH-Fc y PTHrP-Fc producidos como una proteína de fusión por un procedimiento recombinante, pero no enseña ni sugiere un conjugado de PTH-conector-Fc en el que se use un conector no peptídico. 60

65 **[0015]** Sin embargo, dichas proteínas de fusión de Fc producidas por recombinación genética tienen las siguientes desventajas: la fusión de proteínas se produce solo en una región específica de un fragmento Fc de inmunoglobulina, que es un extremo amino o carboxilo terminal; solo se producen formas homodímeras y no formas monómeras; y solo se puede producir una fusión entre las proteínas glicosiladas o entre las proteínas aglicosiladas, y no se puede hacer una proteína de fusión compuesta de una proteína glicosilada y una proteína aglicosilada. Además, una secuencia de aminoácidos nueva creada por la fusión puede producir respuestas inmunitarias, y una

región conectora puede convertirse en susceptible a la degradación proteolítica.

**[0016]** Para resolver estos problemas, los autores de la presente solicitud llevaron a cabo una investigación, y llegaron al conocimiento de que cuando un fragmento Fc de IgG, más en particular un fragmento Fc de IgG2 o IgG4, se une a un fármaco, podría mejorar la duración in vivo del fármaco y minimizar una reducción de la actividad in vivo.

#### Descripción de la invención

**[0017]** Por lo tanto, el objeto de la presente invención es el uso del fragmento Fc como un vehículo de fármacos, en el que el fragmento Fc es un Fc de IgG, en el que el fragmento Fc se une covalentemente a un fármaco por un conector no peptídico, en el que (i) el fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 8, (ii) el conector no peptídico es polietilenglicol, y (iii) el fármaco es un fármaco polipeptídico.

#### Breve descripción de los dibujos

**[0018]** Los objetos, características y otras ventajas anteriores y otros de la presente invención, se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos que acompañan, en los que:

La Fig. 1 muestra los resultados de la transferencia Western de fragmentos Fc de inmunoglobulina expresados en *E. coli* en condiciones no reductoras;

Las Figs. 2 y 3 muestran los resultados de SDS-PAGE de fragmentos Fc de inmunoglobulina en condiciones no reductoras y reductoras usando un gel Criterion al 15 % (Bio-Rad);

La fig. 4 muestra los resultados de la cromatografía de un fragmento Fc de inmunoglobulina, obtenido por escisión de una inmunoglobulina con papaína;

La Fig. 5 muestra los resultados de SDS-PAGE de un fragmento Fc de inmunoglobulina purificado (M: marcador de peso molecular, Banda 1: IgG, Banda 2: Fc);

La Fig. 6 muestra los resultados de SDS-PAGE de los conjugados IFN $\alpha$ -PEG-Fc (A), <sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y EPO-PEG-Fc (C), que se generan por una reacción de acoplamiento (M: marcador de peso molecular, Banda 1: Fc, Banda 2: proteína fisiológicamente activa, Banda 3: conjugado proteína fisiológicamente activa-PEG-Fc);

La Fig. 7 muestra los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaños de un conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc que se purifica después de una reacción de acoplamiento;

La Fig. 8 muestra los resultados de la espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado EPO-PEG-Fc;

Las Figs. 9a y 9b muestran los resultados de la espectrometría de masas MALDI-TOF y el análisis de SDS-PAGE, respectivamente, de un Fc de inmunoglobulina natural y un Fc de inmunoglobulina desglucosilada (DG Fc);

La Fig. 10 muestra los resultados de la espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc y un conjugado IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc;

Las Figs. 11a a 11c muestran los resultados del HPLC de fase inversa de los conjugados IFN $\alpha$ -PEG-Fc, IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc y IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante;

La Fig. 12 es una gráfica que muestra los resultados del análisis farmacocinético de un IFN $\alpha$  natural, un complejo IFN $\alpha$ -40 K PEG, un conjugado IFN $\alpha$ -PEG-albúmina y un conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc;

La Fig. 13 es una gráfica que muestra los resultados del análisis farmacocinético de una EPO natural, una EPO muy glicosilada, un conjugado EPO-PEG-Fc y un conjugado EPO-PEG-AG Fc;

La Fig. 14 es una gráfica que muestra los resultados del análisis farmacocinético de conjugados IFN $\alpha$ -PEG-Fc, IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc y IFN $\alpha$ -PEG-AG Fc recombinante;

La Fig. 15 es una gráfica que muestra la farmacocinética de un Fab', un complejo Fab'-S-40 K PEG, un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc;

La Fig. 16 es una gráfica que muestra las actividades in vitro de un Fab', un complejo Fab'-S-40 K PEG, un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc;

La Fig. 17 es una gráfica que muestra los resultados de la comparación de las subclases de IgG humana para la

afinidad de unión al complemento C1q; y

La Fig. 18 es una gráfica que muestra los resultados de la comparación de la afinidad de unión al complemento C1q de un Fc glicosilado, un DG Fc enzimáticamente desglicosilado y un conjugado interferón-PEG-vehículo, en el que el vehículo es AG Fc producido por *E. coli*.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

**[0019]** La presente invención se refiere al uso de un fragmento Fc de inmunoglobulina G útil como un vehículo de fármacos, y más preferiblemente fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4.

**[0020]** El término “vehículos”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia unida con un fármaco, que típicamente aumenta, disminuye o elimina la actividad fisiológica del fármaco por unión al fármaco. Sin embargo, con respecto a los objetos de la presente invención, un vehículo se usa en la presente invención para minimizar una disminución de la actividad fisiológica de un fármaco de interés, unido al vehículo, a la vez que se potencia la estabilidad in vivo del fármaco.

**[0021]** Se estudiaron un gran número de sustancias, tales como lípidos y polímeros, para determinar su estabilidad como vehículos de fármacos. Sin embargo, las técnicas que usan un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo de fármacos son desconocidas. Es decir, la presente invención se caracteriza por proporcionar en particular un fragmento Fc de IgG entre diferentes sustancias disponibles como vehículos, para mejorar la duración in vivo de la acción de un fármaco, al que se conjuga el vehículo, y minimizar una disminución de la actividad in vivo del fármaco, y más preferiblemente fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4.

**[0022]** La expresión “inmunoglobulina G (en lo sucesivo, se usa de forma intercambiable con “IgG”), como se usa en el presente documento, significa colectivamente proteínas que participan en la inmunidad protectora del cuerpo, actuando selectivamente contra antígenos, y se puede obtener de seres humanos y animales. Las inmunoglobulinas tienen la siguiente estructura general. Las inmunoglobulinas están compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Las cadenas ligera y pesada comprenden regiones variables y constantes. Hay cinco tipos distintos de cadenas pesadas basándose en las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: gamma ( $\gamma$ ), mu ( $\mu$ ), alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ), y las cadenas pesadas incluyen las siguientes subclases: gamma 1 ( $\gamma$ 1), gamma 2 ( $\gamma$ 2), gamma 3 ( $\gamma$ 3), gamma 4 ( $\gamma$ 4), alfa 1 ( $\alpha$ 1) y alfa 2 ( $\alpha$ 2). Además, hay dos tipos de cadenas ligeras basadas en diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: los tipos kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ). (Coleman y col., *Fundamental Immunology*, 2nd Ed., 1989, 55-73). De acuerdo con las características de las regiones constantes de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se clasifican en cinco isotipos: IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. La IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

**[0023]** Además, se sabe que las inmunoglobulinas generan varios fragmentos estructuralmente diferentes, que incluyen Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd y Fc. Entre los fragmentos de inmunoglobulina, el Fab contiene las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada, la región constante de la cadena ligera y la primera región constante (C<sub>H</sub>1) de la cadena pesada, y tiene un solo sitio de unión al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en términos de tener la región bisagra que contiene uno o más restos de cisteína en el extremo C (extremo carboxilo) del dominio de la cadena pesada C<sub>H</sub>1. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se producen como una pareja de fragmentos Fab' por enlace disulfuro formado entre los restos de cisteína de las regiones bisagra de los fragmentos Fab'. Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene solo la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Los fragmentos scFv (Fv de una sola cadena) comprenden tanto la región variable de la cadena pesada como la región variable de la cadena ligera que están unidas entre sí por un conector peptídico y por lo tanto están presentes en una sola cadena de polipéptido. Los fragmentos Fd comprenden solo la región variable y el dominio C<sub>H</sub>1 de la cadena pesada.

**[0024]** Entre los diferentes tipos conocidos de inmunoglobulinas y sus fragmentos funcionales y estructurales, como se ha descrito antes, la presente invención se caracteriza por proporcionar un fragmento Fc de IgG útil como un vehículo de fármacos, y más preferiblemente fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4.

**[0025]** La expresión “fragmento Fc de inmunoglobulina G (en lo sucesivo, se usa de forma intercambiable con “fragmento Fc de IgG” o “fragmento Fc de la presente invención”), como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que contiene la región constante 2 de la cadena pesada (C<sub>H</sub>2) y la región constante 3 de la cadena pesada (C<sub>H</sub>3) de una inmunoglobulina G, y no las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante 1 de la cadena pesada (C<sub>H</sub>1) y la región constante 1 de la cadena ligera (C<sub>L</sub>1) de la inmunoglobulina G. Puede incluir además la región bisagra en la región constante de la cadena pesada. Además, el fragmento Fc de IgG de la presente invención puede contener una parte o toda la región constante 1 de la cadena pesada (C<sub>H</sub>1) y/o la región constante 1 de la cadena ligera (C<sub>L</sub>1), excepto por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. Además, siempre que tenga una función fisiológica sustancialmente similar o mejor que la de la proteína natural, el fragmento Fc de IgG puede ser un fragmento que tenga una eliminación en una parte relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de C<sub>H</sub>2 y/o C<sub>H</sub>3.

**[0026]** El fragmento Fc de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos natural y derivados de secuencia de la misma (mutantes). Un derivado de secuencia de aminoácidos es una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos natural debido a una eliminación, una inserción, una sustitución no conservativa o conservativa, o combinaciones de los mismos, de uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo, en un Fc de IgG, los restos de aminoácidos que se sabe que son importantes en la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331, se pueden usar como un objetivo adecuado para la modificación. Además, son posibles otros derivados diferentes, incluyendo uno en el que se elimina una región capaz de formar un enlace disulfuro, o se eliminan determinados restos de aminoácidos en el extremo N-terminal de una forma de Fc natural o se añade al mismo un resto de metionina. Además, para eliminar las funciones efectoras, se puede producir una eliminación en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio ADCC. Las técnicas para preparar dichos derivados de secuencias del fragmento Fc de inmunoglobulina se describen en las publicaciones de patentes internacionales n° WO 97/34631 y WO 96/32478.

**[0027]** Los intercambios de proteínas y péptidos que en general no alteran la actividad de las proteínas o los péptidos, son conocidos en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Los intercambios que se producen más habitualmente 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.

**[0028]** Además, el fragmento Fc, si se desea se puede modificar por fosforilación, sulfación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares.

**[0029]** Los derivados de Fc mencionados antes son derivados que tienen una actividad biológica idéntica al fragmento Fc de la presente invención o mejor estabilidad estructural, por ejemplo, frente al calor, pH, o similares.

**[0030]** Además, estos fragmentos Fc se pueden obtener de formas naturales aisladas de seres humanos y otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos a partir de células animales transformadas o microorganismos. En el presente documento, se pueden obtener de una inmunoglobulina natural aislando las inmunoglobulinas enteras de organismos humanos o animales y tratándolas con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina natural en fragmentos Fab y Fc, y el tratamiento con pepsina da como resultado la producción de fragmentos pF'c y F(ab)2. Estos fragmentos se pueden someter, por ejemplo, a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c. Preferiblemente, un fragmento Fc derivado del humano es un fragmento Fc de IgG recombinante que se obtiene de un microorganismo. Es decir, se prefieren fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4 recombinantes derivados de humanos obtenidos a partir de un microorganismo.

**[0031]** Además, el fragmento Fc de la presente invención puede estar en la forma en la que tiene cadenas de azúcar naturales, mayor número de cadenas de azúcar comparado con una forma natural o menor número de cadenas de azúcar comparado con la forma natural, o puede estar en una forma desglucosilada. El mayor, menor número o la eliminación de cadenas de azúcar del fragmento Fc se puede lograr por procedimientos comunes en la materia, tal como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética usando un microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de un fragmento Fc da como resultado una disminución aguda de la afinidad de unión a la parte C1q del primer componente del complemento C1 y una disminución o pérdida de la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), de modo que no induce respuestas inmunitarias innecesarias in vivo. En relación con esto, un fragmento Fc de inmunoglobulina en una forma desglucosilada o aglicosilada puede ser más adecuado para el objeto de la presente invención como un vehículo de fármacos.

**[0032]** Como es evidente en la figura 18, un Fc glicosilado tiene actividad de CDC más fuerte que un Fc aglicosilado, y por lo tanto tiene un riesgo mayor de inducir respuestas inmunitarias. Por lo tanto, con los objetos de la presente invención, se prefiere un fragmento Fc aglicosilado o desglucosilado. Son más preferidos los fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4 aglicosilados, combinaciones de los mismos e híbridos de los mismos.

**[0033]** Como se usa en el presente documento, el término "desglucosilación" se refiere a que los restos de azúcar son eliminados enzimáticamente de un fragmento Fc, y el término "aglicosilación" significa que se produce un fragmento Fc en una forma sin glicosilar mediante un procarionota, preferiblemente *E. coli*.

**[0034]** Por otra parte, el término "combinación", como se usa en el presente documento, significa que los polipéptidos que codifican fragmentos Fc de inmunoglobulina de una cadena del mismo origen se unen a un polipéptido de una cadena de un origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, un dímero o multímero se puede formar a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4.

**[0035]** El término "híbrido", como se usa en el presente 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 una cadena. En la presente invención, son posibles diferentes tipos de híbridos. Es decir, los híbridos de domino pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4

de Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4, y pueden incluir la región bisagra.

**[0036]** Por otra parte, como se muestra en los dibujos que acompañan de la presente invención, figuras 17 y 18, entre las diferentes subclases de IgG, la IgG4 tiene la menor afinidad de unión al complemento C1q. La disminución de la afinidad de unión al complemento da como resultado una disminución o eliminación de la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), y por lo tanto, no se inducen respuestas inmunitarias innecesarias in vivo. Los fragmentos Fc de IgG2 e IgG4 tienen una afinidad de unión a C1q más débil que la IgG1, y el fragmento Fc de IgG4 tiene la actividad más baja. Por lo tanto, puesto que para ser usado como vehículo de fármacos el fragmento Fc unido a un fármaco preferiblemente tiene actividades de función efectora más débiles tales como ADCC y CDC, con respecto a los objetos de la presente invención, el fragmento Fc tiene las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID No. 8.

**[0037]** La presente invención se refiere al uso del fragmento Fc como un vehículo de fármacos, en el que el fragmento Fc es un Fc de IgG, en el que el fragmento Fc está unido covalentemente a un fármaco por un conector no peptídico, en el que (i) el fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No. 8, (ii) el conector no peptídico es polietilenglicol, y (iii) el fármaco es un fármaco polipeptídico, en el que el fragmento Fc se produce por expresión de un gen que codifica el fragmento Fc de IgG, preferiblemente genes que codifican las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID No. 8. Dicho gen que codifica el Fc de la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos natural y derivados de secuencia de la misma. Un derivado de secuencia de nucleótidos significa que tiene una secuencia diferente por una eliminación, una inserción, una sustitución no conservativa o conservativa en uno o más restos nucleótidos de una secuencia de nucleótidos natural, o combinaciones de las mismas.

**[0038]** En la presente invención, un gen que codifica un fragmento Fc que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 8 es preferiblemente un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 4. Las secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos Fc de la presente invención se pueden alterar por una sustitución, una eliminación o una inserción de una o más bases, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de nucleótidos pueden ser aisladas naturales o sintetizadas artificiales, o se pueden preparar por un procedimiento de recombinación genética.

**[0039]** Las secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos Fc de la presente invención se proporcionan mediante vectores que expresan las mismas.

**[0040]** La presente invención proporciona el uso del fragmento Fc como un vehículo de fármacos, en el que el fragmento Fc es un Fc de IgG, en el que el fragmento Fc está covalentemente unido a un fármaco por un conector no peptídico, en el que (i) el fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No. 8, (ii) el conector no peptídico es polietilenglicol, y (iii) el fármaco es un fármaco polipeptídico, en el que el fragmento Fc se produce por expresión de un gen que codifica el fragmento Fc, y en el que el gen es parte de un vector recombinante.

**[0041]** El término "vector", como se usa en el presente documento, significa un vehículo para introducir una molécula de ADN en una célula huésped para expresar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. El vector útil en la presente invención incluye vectores plasmídicos, vectores cósmidos, vectores bacteriófagos, y vectores víricos, tales como vectores adenovíricos, vectores de retrovirus, y vectores de virus adenoasociados. Es preferible el vector plasmídico. Con respecto a los objetos de la presente invención, un vector de expresión puede incluir elementos reguladores de la expresión, tales como un promotor, un codón de inicio, un codón de parada, una señal de poliadenilación y un potenciador, y una secuencia señal para dirigirse a la membrana o para la secreción.

**[0042]** La expresión "secuencia señal", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos específica que permite el transporte y la secreción de una proteína al exterior del citosol. Se conocen en la técnica diferentes tipos de estas secuencias señal, pero, puesto que la invención usa preferiblemente *E. coli* como célula huésped, la secuencia señal de la presente invención preferiblemente es una secuencia señal derivada de *E. coli*, que tiene una proteína secretora de *E. coli*. Los ejemplos de secuencias señal derivadas de *E. coli* incluyen fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, enterotoxina II termoestable, LamB, PhoE, PelB, OmpA y proteína de unión a maltosa. Es más preferida la enterotoxina II termoestable.

**[0043]** Por otra parte, los codones de inicio y parada en general se considera que son una parte de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína objetivo inmunogénica, necesarios para ser funcionales en un individuo al que se le ha administrado una construcción genética, y deben estar en el marco con la secuencia codificante. Los promotores en general pueden ser constitutivos o inducibles. Los ejemplos no limitantes de promotores disponibles en células procariontas incluyen promotores lac, tac, T3 y T7. Los ejemplos no limitantes de promotores disponibles en células eucariotas incluyen el promotor del virus del simio 40 (SV40), promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), promotor del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tal como promotor de repetición terminal larga (LTR) del VIH, promotor del virus Moloney, promotor del citomegalovirus (CMV), promotor del virus Epstein-Barr (EBV), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como  $\beta$ -actina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano y metalotioneína humana. Además, los vectores de

expresión incluyen un marcador seleccionable que permite la selección de células huésped que contienen el vector, y los vectores de expresión replicables incluyen un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos se usan en general como marcadores seleccionables. El gen de  $\beta$ -lactamasa (resistencia a la ampicilina) y gen Tet (resistencia a la tetraciclina) se pueden usar en células procariontas, y los genes de resistencia a neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina e higromicina, se pueden usar en células eucariotas. El gen marcador de la dihidrofolato reductasa se puede seleccionar mediante metotrexato en una variedad de huéspedes. Los genes que codifican productos génicos de marcadores auxotróficos de huéspedes, por ejemplo, LEU2, URA3 y HIS3, se usan a menudo como marcadores seleccionables en levaduras. También están disponibles los vectores víricos (p. ej., vaculovirus) o fagos, y vectores que se pueden integrar en el genoma de las células huésped, tales como vectores retrovíricos.

**[0044]** Para preparar un fragmento Fc de IgG que coincida con los objetos de la presente invención, se usa un vector, que lleva un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 8. En la presente invención, usando pT14S1SH-4T20V22Q (patente coreana n° 38061) como vector de partida, se construye el siguiente vector: pSTIIIdCG4Fc que lleva un gen designado como en la SEQ ID No. 4 que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 8.

**[0045]** La presente invención se refiere al uso del fragmento Fc como un vehículo de fármaco, en el que el fragmento Fc es un Fc de IgG, en el que el fragmento Fc está unido covalentemente a un fármaco por un conector no peptídico, en el que (i) el fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No. 8, (ii) el conector no peptídico es polietilenglicol, y (iii) el fármaco es un fármaco polipeptídico, en el que el fragmento Fc se produce por expresión de un gen que codifica el fragmento Fc, en el que el gen es parte de un vector recombinante, y en el que el fragmento Fc se expresa por un transformante transformado con el vector recombinante.

**[0046]** Puesto que los niveles de expresión y la modificación de las proteínas varían dependiendo de las células huésped, la célula huésped más adecuada se puede seleccionar de acuerdo con el uso pretendido. Las células huésped disponibles incluyen, pero sin limitar, células procariontas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis* o *Staphylococcus*. Además, son útiles como células huésped células eucariotas inferiores, tales como hongos (p. ej., *Aspergillus*) y levaduras (p. ej., *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Neurospora crassa*), células de insecto, células de plantas y células derivadas de eucariotas superiores incluyendo mamíferos. Sin embargo, puesto que el fragmento Fc de inmunoglobulina está ventajosamente en una forma aglicosada con respecto a los objetos de la presente invención, se prefieren las células huésped procariontas, y en particular, *E. coli* es la más preferida.

**[0047]** En la presente invención, “transformación” y/o “transfección” en células huésped incluye cualquier procedimiento mediante el cual se pueden introducir ácidos nucleicos en organismos, células, tejidos u órganos, y como se conoce en la materia, se puede llevar a cabo seleccionando técnicas estándar adecuadas de acuerdo con las células huésped. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitar, electroporación, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio ( $\text{CaPO}_4$ ), precipitación con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), y agitación con fibra de carburo de silicio, transformación mediada por agrobacterias, y transformación mediada por PEG, sulfato de dextrano, lipofectamina y desecación/inhibición. Por ejemplo, el tratamiento con calcio usando cloruro de calcio o la electroporación, se usan en general en células procariontas (Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)). La transfección usando *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de células de plantas específicas (Shaw y col., 1983, *Gene*, 23:315; publicación de patente internacional n° WO 89/05859). Para células de mamíferos que no tienen paredes celulares, se puede usar la precipitación con fosfato cálcico (Graham y col., 1978, *Virology*, 52:456 – 457). Los procedimientos y características generales de la transformación en células huésped de mamífero se describen en la patente de EE.UU. n° 4.399.216. La transformación en levaduras se lleva a cabo típicamente de acuerdo con los procedimientos descritos por Van Solingen y col., *J. Bact.*, 1977, 130:946, y Hsiao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, 76:3829.

**[0048]** Los vectores de expresión de acuerdo con la presente invención se transforman en células huésped, y los transformantes resultantes de la presente invención se designan como HM10932 (transformante introducido por pSTIIIdCG4Fc).

**[0049]** La presente invención proporciona el uso del fragmento Fc como un vehículo de fármaco, en el que el fragmento Fc es un Fc de IgG, en el que el fragmento Fc está unido covalentemente a un fármaco por un conector no peptídico, en el que (i) el fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No. 8, (ii) el conector no peptídico es polietilenglicol, y (iii) el fármaco es un fármaco polipeptídico, en el que el fragmento Fc se produce por expresión de un gen que codifica el fragmento Fc, en el que el gen es parte de un vector recombinante, y en el que el fragmento Fc se expresa por un transformante transformado con el vector recombinante y en el que el fragmento Fc se prepara por cultivo del transformante, en condiciones adecuadas.

**[0050]** En el procedimiento de preparación del fragmento de inmunoglobulina, el cultivo del transformante se puede llevar a cabo usando medios adecuados en condiciones de cultivo adecuadas, que son conocidas en la materia. Estos procedimientos de cultivo se pueden ajustar fácilmente de acuerdo con las cepas seleccionadas por



los expertos en la materia.

5 **[0051]** El fragmento de inmunoglobulina de la presente invención, obtenido por cultivo del transformante, se puede usar en una forma no purificada, o se puede usar después de purificar con purezas altas, usando diferentes procedimientos generales, por ejemplo, diálisis, precipitación salina y cromatografía. Entre ellos, la cromatografía es el usado más habitualmente. Puesto que no se puede aplicar una regla a cualquier caso para seleccionar el tipo y la secuencia de las columnas usadas, la cromatografía se puede seleccionar de acuerdo con las propiedades y con el procedimiento de cultivo de las proteínas objetivo de anticuerpos, por ejemplo, de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de afinidad y cromatografía de columna de afinidad de proteína A. En realizaciones preferidas de la presente invención, el fragmento de inmunoglobulina se purifica usando una columna de afinidad de proteína A, una columna de SP Sepharose FF, y similares.

15 **[0052]** Cuando el fragmento Fc así obtenido está en la forma libre, se puede convertir en una forma de sal por un procedimiento conocido o un procedimiento modificado. A diferencia de esto, cuando se obtiene en una forma de sal, se puede convertir en la forma libre o en otra sal por un procedimiento conocido o un procedimiento modificado. Además, cuando el fragmento Fc se produce por un transformante se puede tratar antes o después de la purificación con una enzima modificadora de proteínas adecuada para la modificación arbitraria o eliminación parcial de polipéptido. Los ejemplos de la enzima modificadora de proteínas útiles en la presente invención incluyen tripsina, quimotripsina, arginina endopeptidasa, proteína quinasa y glicosidasa.

20 **[0053]** El fragmento Fc de la presente invención, preparado como se ha descrito antes, actúa como un vehículo de fármacos y forma un conjugado con un fármaco.

25 **[0054]** La expresión “conjugado de fármaco” o “conjugado”, como se usa en el presente documento, significa que uno o más fármacos están unidos con uno o más fragmentos Fc de inmunoglobulina.

**[0055]** El término “fármaco”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que presenta actividad terapéutica cuando se administra a seres humanos o animales, y es un fármaco polipeptídico.

30 **[0056]** Las expresiones “polipéptido fisiológicamente activo”, “proteína fisiológicamente activa”, “polipéptido activo”, “fármaco polipeptídico” y “fármaco proteínico”, como se usan en el presente documento, tienen significados que son intercambiables, y se caracterizan porque están en una forma fisiológicamente activa que presenta diferentes funciones fisiológicas in vivo.

35 **[0057]** El fármaco polipeptídico tiene la ventaja de no ser capaz de mantener la acción fisiológica durante un periodo de tiempo largo debido a la propiedad de que es desnaturalizado o degradado fácilmente por enzimas proteolíticas presentes en el cuerpo. Sin embargo, cuando el fármaco polipeptídico se conjuga con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención para formar un conjugado, el fármaco tiene una mayor estabilidad estructural y semivida de degradación. Además, el polipéptido conjugado con el fragmento Fc tiene una disminución de la actividad fisiológica mucho menor que otras formulaciones conocidas de fármaco polipeptídico. Por lo tanto, comparado con la biodisponibilidad de fármacos polipeptídicos convencionales, el conjugado del polipéptido y el fragmento Fc de acuerdo con la presente invención se caracteriza por tener una biodisponibilidad in vivo notablemente mejorada. Esto también se describe claramente a lo largo de las realizaciones de la presente invención. Es decir, cuando se unen al fragmento Fc de la presente invención, el IFN $\alpha$ , G-CSF, hGH y otros fármacos proteínicos presentan una biodisponibilidad in vivo de aproximadamente 2 a 6 veces mayor comparado con sus formas convencionales conjugadas con PEG solo o tanto con PEG como con albúmina (tablas 8, 9 y 10).

45 **[0058]** Por otra parte, la unión de una proteína y el fragmento Fc de la presente invención se caracteriza porque no es una fusión por un procedimiento de recombinación convencional. Una forma de fusión del fragmento Fc de inmunoglobulina y un polipéptido activo usado como un fármaco por un procedimiento de recombinación, se obtiene de una forma que el polipéptido está unido al extremo N o el extremo C del fragmento Fc, y por lo tanto se expresa y se pliega como un solo polipéptido a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica la forma de fusión.

50 **[0059]** Esto conlleva una fuerte disminución de la actividad de la proteína de fusión resultante porque la actividad de una proteína como sustancia fisiológicamente funcional, está determinada por la conformación de la proteína. Por lo tanto, cuando un fármaco polipeptídico se fusiona con Fc por un procedimiento de recombinación, no hay efecto en relación con la biodisponibilidad in vivo, incluso cuando la proteína de fusión tiene una mayor estabilidad estructural. Además, puesto que una proteína de fusión con frecuencia se pliega mal y por lo tanto es expresada como cuerpos de inclusión, el procedimiento de fusión es poco rentable en la producción de proteínas y en el rendimiento del aislamiento. Además, cuando la forma activa de un polipéptido está en una forma glicosilada, el polipéptido debería expresarse en células eucariotas. En este caso, el Fc también está glicosilado, y esta glicosilación puede causar respuestas inmunitarias inadecuadas in vivo.

55 **[0060]** Por lo tanto, solo la presente invención permite producir un conjugado de un polipéptido activo glicosilado y un fragmento Fc de inmunoglobulina aglicosilado, y supera todos los problemas anteriores, incluyendo la mejora del rendimiento de producción de la proteína, porque los dos componentes del complejo se preparan individualmente y

se aíslan por los mejores sistemas.

**[0061]** Los ejemplos no limitantes de fármacos proteínicos capaces de ser conjugados con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, incluyen la hormona del crecimiento humana, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, péptido liberador de la hormona del crecimiento, interferones y receptores de interferón (p. ej., interferón- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , receptor de interferón de tipo I soluble en agua, etc.), factor estimulador de la colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de la colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), péptidos similares a glucagón (p. ej., GLP-1, etc.), receptor acoplado a proteína G, interleuquinas (p. ej., receptor de IL-1, receptor de IL-4, etc.), enzimas (p. ej., glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-galactosidasa-A, agalsidasa alfa y beta, alfa-L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato decarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleuquinas y citoquinas (p. ej., IL-18bp, proteína de unión al TNF, etc.), factor activador de macrófagos, péptido de macrófago, factor de linfocitos B, factor de linfocitos T, proteína A, inhibidor de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores de tumores, factor de crecimiento de metástasis, alfa-1 antitripsina, albúmina, alfa-lactoalbúmina, apolipoproteína E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombosmodulina, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activador de plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de 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 estimuladora ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador de tejido conjuntivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona estimuladora de folículos, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factor de crecimiento nervioso (p. ej., factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor-1 de axogénesis, péptido natriurético cerebral, factor neurotrófico derivado de células gliales, netrina, factor inhibidor de neutrófilos, factor neurotrófico, neurturina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento análogo a insulina, hormona suprarrenal, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimuladora de tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (p. ej., TNFR(P75), TNFR(P55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor del factor activador de linfocitos B, etc.), antagonistas de receptores (p. ej., IL1-Ra, etc.), antígenos de superficie celular (p. ej., 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 (p. ej., scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fd), y antígenos de vacuna derivados de virus. Un fragmento de anticuerpo puede ser Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd o scFv, que es capaz de unirse a un antígeno específico, y preferiblemente Fab'.

**[0062]** En particular, los polipéptidos fisiológicamente activos preferidos son aquellos que requieren la dosificación frecuente tras la administración al cuerpo para la terapia o la prevención de enfermedades, que incluyen la hormona del crecimiento humano, interferones (interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , etc.), factor estimulador de la colonia de granulocitos, eritropoyetina (EPO) y fragmentos de anticuerpos. Además, están incluidos algunos derivados en el alcance de los polipéptidos fisiológicamente activos de la presente invención con la condición de que tengan la función, estructura, actividad o estabilidad sustancialmente idénticas o mejores comparadas con las formas naturales de los polipéptidos fisiológicamente activos. En la presente invención, el fármaco polipeptídico más preferido es el interferón alfa.

**[0063]** El fragmento Fc de la presente invención puede formar un conjugado unido a un fármaco mediante un conector.

**[0064]** Este conector es un conector no peptídico, el conector no peptídico es un polímero no peptídico y es polietilenglicol (PEG).

**[0065]** El conjugado de la presente invención, fragmento Fc-conector-fármaco, se hace en diferentes relaciones molares. Es decir, el número de fragmentos Fc y/o conectores unidos a un solo fármaco polipeptídico no está limitado. Sin embargo, preferiblemente, en el conjugado del fármaco de la presente invención, el fármaco y el fragmento Fc están conjugados entre sí en una relación molar de 1:1 a 10:1, y preferiblemente de 1:1 a 2:1.

**[0066]** Además, la unión del fragmento Fc de la presente invención, un determinado conector y un determinado fármaco, incluyen todos enlaces covalentes excepto un enlace peptídico formado cuando el fragmento Fc y un fármaco polipeptídico son expresados como una proteína de fusión por recombinación genética.

**[0067]** Además, el fragmento Fc de la presente invención, un determinado conector y un determinado fármaco, se pueden unir entre sí en un determinado sitio del fármaco. Por otra parte, el fragmento Fc de la presente invención y un fármaco polipeptídico pueden unirse entre sí en un extremo N o extremo C, y preferiblemente en un grupo libre, y se forma fácilmente un enlace covalente entre el fragmento Fc y el fármaco, en especial en un extremo amino terminal, un grupo amino de un resto de lisina, un grupo amino de un resto de histidina, o un resto de cisteína libre.

**[0068]** Por otra parte, la unión del fragmento Fc de la presente invención, un determinado conector y un determinado fármaco, se puede hacer en una determinada dirección. Es decir, el conector se puede unir al extremo N, al extremo C o a un grupo libre del fragmento Fc de inmunoglobulina, y también se puede unir al extremo N, al

extremo C o a un grupo libre del fármaco proteínico. Cuando el conector es un conector peptídico, la unión puede tener lugar en un determinado sitio de unión.

5 **[0069]** Además, and el conjugado de la presente invención se puede preparar usando cualquiera de una serie de agentes de acoplamiento conocidos en la materia. Los ejemplos no limitantes de los agentes de acoplamiento incluyen 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida tales como ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano.

10 **[0070]** Por otra parte, el conjugado del nuevo fragmento Fc de la presente invención y un fármaco puede ofrecer un número diverso de composiciones farmacéuticas.

15 **[0071]** El término "administración", como se usa en el presente documento, significa la introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente mediante un determinado procedimiento adecuado. El conjugado de la presente invención se puede administrar por cualquiera de las vías comunes, siempre que pueda llegar al tejido deseado. Se contemplan una variedad de modos de administración, incluyendo la vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intratecal, pero la presente invención no está limitada a estos modos ilustrados de administración. Sin embargo, puesto que los péptidos son digeridos tras la administración oral, los principios activos de una composición para la administración oral deben estar recubiertos o deben formularse para la protección frente a 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 usando un determinado aparato capaz de transportar los principios activos a una célula objetivo.

25 **[0072]** La composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con la presente invención puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir aglutinantes, lubricantes, disgregantes, excipientes, solubilizantes, agentes de dispersión, estabilizantes, agentes de suspensión, agentes colorantes y perfumes. Para las preparaciones inyectables, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir agentes de tamponamiento, agentes conservantes, analgésicos, solubilizantes, agentes isotónicos y estabilizantes. Para preparaciones para la administración tópica, el vehículo 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 farmacéuticas en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados antes. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica se pueden formular en comprimidos, pastillas para chupar, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para las preparaciones inyectables, la composición farmacéutica se puede formular en una forma farmacéutica unitaria, tal como un envase de múltiples dosis, o una ampolla como una forma farmacéutica de una sola dosis. La composición farmacéutica también se puede formular en disoluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

40 **[0073]** Por otra parte, los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados para las formulaciones farmacéuticas incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir también cargas, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes, emulsionantes y antisépticos.

50 **[0074]** Una dosificación sustancial de un fármaco en combinación con el fragmento Fc de la presente invención como vehículo, se puede determinar por varios factores relacionados incluyendo los tipos de enfermedades que se van a tratar, las rutas de administración, la edad del paciente, sexo, peso y la gravedad de la enfermedad, así como por los tipos de fármaco como componente activo. Puesto que la composición farmacéutica de la presente invención tiene una duración de la acción muy larga in vivo, tiene la ventaja de reducir mucho la frecuencia de administración de los fármacos farmacéuticos.

55 **[0075]** Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención mediante los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no debe considerarse como límite de la presente invención.

## EJEMPLOS

### Preparación de fragmentos Fc de inmunoglobulina

60

#### **EJEMPLO 1: Construcción del vector de expresión de Fc de IgG4 de inmunoglobulina humana**

< 1-1 > Construcción del vector de expresión de Fc de IgG4 dímero

65 **[0076]** Para clonar un gen que codifica la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG4, se llevó a cabo la RT-PCR usando ARN aislado de células sanguíneas humanas como molde, como sigue. Primero se aisló el ARN total

de aproximadamente 6 ml de sangre usando el kit de ARN de sangre Qiamp (Qiagen), y se llevó a cabo la amplificación del gen usando el ARN total como molde y un kit de RT-PCR de un solo paso (Qiagen). Para obtener una secuencia génica deseada, se usó un par de cebadores representados por las SEQ ID No. 1 y 2. La SEQ ID No. 1 es una secuencia de nucleótidos que empieza a partir del resto 10<sup>o</sup>, serina, de 12 restos de aminoácidos de la región bisagra de la IgG4 (Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro: SEQ ID No. 3). La SEQ ID No. 2 se diseñó para tener un sitio de reconocimiento de BamHI que contiene un codón de parada. El gen amplificado usando el conjunto de cebadores se identificó para tener la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No. 4 y contiene un extremo amino terminal, que empieza con la secuencia Ser-Cys-Pro de la región bisagra de una secuencia génica de Fc de IgG4 de longitud completa, y los dominios CH2 y CH3. Para clonar el fragmento del gen de Fc de IgG4 amplificado en un vector de expresión que contenía una secuencia señal de *E. coli*, se usó como vector de partida un vector de expresión pT14S1SH-4T20V22Q (patente coreana n<sup>o</sup> 38061), desarrollado previamente por los autores de la presente invención. Este vector de expresión contiene un derivado de la secuencia señal de la enterotoxina termoestable de *E. coli* que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No. 5. Para facilitar la clonación, se insertó un sitio de reconocimiento Stul en un extremo del derivado de la secuencia señal de la enterotoxina termoestable de *E. coli* del plásmido pT14S1SH-4T20V22Q mediante mutagénesis dirigida al sitio específico usando una pareja de cebadores representados por las SEQ ID No. 6 y 7, para inducir la mutagénesis para introducir el sitio Stul en una secuencia de nucleótidos que codifica el último resto de aminoácido de la secuencia señal. Esta inserción del sitio Stul se identificó que era satisfactoria por la secuenciación del ADN. El plásmido pT14S1SH-4T20V22Q resultante que contenía un sitio Stul se designó "pmSTII". El plásmido pmSTII se trató con Stul y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un fragmento grande (4,7 kb), que contenía el derivado de la secuencia señal de la enterotoxina termoestable de *E. coli*. Después, el fragmento de gen de Fc de IgG4 amplificado se digirió con BamHI y se ligó con el vector de expresión linearizado, proporcionando así un plásmido pSTIIdCG4Fc. Este vector expresa una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 8 y está presente en una forma de dímero por los enlaces disulfuro entre los restos de cisteína en la región bisagra. El vector de expresión final se transformó en *E. coli* BL21 (DE3), y el transformante resultante se designó "BL21/pSTIIdCG4Fc (HM10932)", que se depositó en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM) el 15 de septiembre, 2004 y se le asignó un número de acceso KCCM-10597.

< 1-2 > Construcción del vector de expresión de Fc de IgG4 monómero

[0077] Para clonar un fragmento de Fc de IgG4 para ser expresado en forma de monómero, se llevó a cabo la PCR usando un par de cebadores representados por las SEQ ID No. 9 y 2, y el plásmido pSTIIdCG4Fc preparado en el apartado < 1-1 > anterior como molde. Para permitir que un gen amplificado sea expresado en forma de monómero, la PCR se diseñó para que el producto de la PCR tuviera una eliminación en la región bisagra, necesaria para la formación del dímero a partir de la secuencia de Fc de IgG4, y por lo tanto, solo se amplificaron los dominios CH2 y CH3 de Fc de IgG4. El producto de la PCR se clonó en un vector de expresión, pmSTII, de acuerdo con el mismo procedimiento que en el apartado < 1-1 > anterior, proporcionando así un plásmido pSTIIIG4Mo. Este vector de expresión se transformó en *E. coli* BL21 (DE3), y el transformante resultante se designó "BL21/pSTIIIG4Mo (HM10933)", que se depositó en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM) el 15 de septiembre, 2004 y se le asignó un número de acceso KCCM-10598. Una proteína expresada por el vector de expresión tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 10, y se expresa a partir del dominio CH2 y está presente en forma de monómero porque no tiene región bisagra.

#### **EJEMPLO DE REFERENCIA 2: Construcción del vector de expresión de Fc de IgG1 de inmunoglobulina humana**

< 2-1 > Construcción del vector de expresión de Fc de IgG1 dímero

[0078] Para clonar un gen que codifica la región Fc de la IgG1 humana, se llevó a cabo la RT-PCR de acuerdo con el mismo procedimiento que en el apartado < 1-1 > del ejemplo 1, usando ARN aislado de células sanguíneas humanas como molde, usando un kit de RT-PCR de un solo paso (Qiagen). Para obtener una secuencia génica deseada, se usó un par de cebadores representados por las SEQ ID No. 11 y 12.

[0079] La SEQ ID No. 11 es una secuencia de nucleótidos que empieza a partir del resto 13<sup>o</sup>, prolina, de 15 restos de aminoácidos de la región bisagra (Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro: SEQ ID No. 13).

[0080] Se encontró que el gen amplificado usando el par de cebadores representados por las SEQ ID No. 11 y 12 contenía un extremo amino terminal que empezaba con la secuencia Pro-Cys-Pro de la región bisagra y los dominios CH2 y CH3, en medio de una secuencia del gen de Fc de IgG1 de longitud completa, y tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 14

[0081] Para clonar el gen de Fc de IgG1 amplificado en un vector de expresión que contenía una secuencia señal de *E. coli*, se usó el vector pmSTII mencionado antes. De acuerdo con un procedimiento de clonación similar al del apartado < 1-1 > del ejemplo 1, el plásmido pmSTII se trató con Stul y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un fragmento grande (4,7 kb), que contenía el derivado de la secuencia señal de la

enterotoxina termoestable de *E. coli*. Después, el gen de Fc de IgG1 purificado se digirió con BamHI y se ligó con el vector de expresión linearizado, proporcionando así pSTIIIdCG1Fc. Este vector expresa en una célula huésped una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 15 y está presente en forma de dímero por enlaces disulfuro entre los restos de cisteína en la región bisagra. El vector de expresión final se transformó en *E. coli* BL21 (DE3), y el transformante resultante se designó "BL21/pSTIIIdCG1Fc (HM10927)", que se depositó en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM) el 15 de septiembre, 2004 y se le asignó un número de acceso KCCM-10588.

< 2-2 > Construcción del vector de expresión de Fc de IgG1 monómero

[0082] Para preparar un fragmento de Fc de IgG1 para ser expresado en forma de monómero, se llevó a cabo la PCR usando un par de cebadores representados por las SEQ ID No. 16 y 12, y el plásmido pSTIIIdCG1Fc preparado en el apartado < 2-1 > del ejemplo 2 como molde. El producto de la PCR se clonó en un vector de expresión, pmSTII, de acuerdo con el mismo procedimiento que en el apartado < 2-1 > del ejemplo 2, proporcionando así un plásmido pSTIIIG1Mo que contiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No. 17. Este vector de expresión se transformó en *E. coli* BL21 (DE3), y el transformante resultante se designó "BL21/pSTIIIG1Mo (HM10930)", que se depositó en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM) el 15 de septiembre, 2004 y se le asignó un número de acceso KCCM-10595. Una proteína expresada por el vector de expresión se expresa a partir del dominio CH2 y está presente en forma de monómero porque se eliminó la región bisagra que contenía restos de cisteína que permitían la formación del dímero, y tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 18.

### EJEMPLO DE REFERENCIA 3: Construcción del vector de expresión de Fc de IgG2 de inmunoglobulina humana

[0083] Para clonar un gen que codifica la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG2, se llevó a cabo la RT-PCR de acuerdo con el mismo procedimiento del apartado < 1-1 > del ejemplo 1, usando ARN aislado de células sanguíneas humanas como molde, usando un kit de RT-PCR de un solo paso (Qiagen). Para obtener una secuencia génica deseada, se usó un par de cebadores representados por las SEQ ID No. 19 y 20. La SEQ ID No. 19 es una secuencia de nucleótidos que empieza a partir del resto 10<sup>o</sup>, prolina, de 12 restos de aminoácidos de la región bisagra (Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro: SEQ ID No. 21). Se identificó que el gen amplificado usando el par de cebadores representados por las SEQ ID No. 19 y 20 contenía un extremo amino terminal que empezaba con la secuencia Pro-Cys-Pro de la región bisagra de una secuencia del gen de Fc de IgG2 de longitud completa, y los dominios CH2 y CH3, y tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 22. Para clonar el fragmento de gen de Fc de IgG2 amplificado en un vector de expresión que contenía una secuencia señal de *E. coli*, se usó el vector pmSTII mencionado antes. De acuerdo con un procedimiento de clonación similar al del apartado < 1-1 > del ejemplo 1, el plásmido pmSTII se trató con StuI y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un fragmento grande (4,7 kb), que contenía el derivado de la secuencia señal de la enterotoxina termoestable de *E. coli*. Después el gen de Fc de IgG1 amplificado se digirió con BamHI y se ligó con el fragmento del vector de expresión linearizado, proporcionando así pSTIIIdCG2Fc. Este vector expresa en una célula huésped una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 23 y está presente en forma de dímero por enlaces disulfuro entre los restos de cisteína de la región bisagra. El vector de expresión final se transformó en *E. coli* BL21 (DE3), y el transformante resultante se designó BL21/pSTIIIdCG2Fc (HM10936).

### EJEMPLO 4: Expresión y purificación de Fc de inmunoglobulina

< 4-1 > Evaluación de la expresión de Fc de inmunoglobulina

[0084] Los transformantes bacterianos preparados en los ejemplos 1, 2 y 3 se inocularon individualmente en un fermentador (Marubishi Company) y se dejaron fermentar, y se evaluaron para determinar si expresan fragmentos Fc de inmunoglobulina.

[0085] Primero, cada transformante se cultivó en 100 ml de medio LB con agitación durante la noche y se inoculó en un fermentador de cultivo a gran escala. El fermentador se mantuvo a 30 °C o 35 °C. Para prevenir la conversión de un entorno aeróbico a un entorno anaeróbico, los cultivos se airearon con 20 vvm de aire y se agitaron a 500 rpm. Para compensar los nutrientes insuficientes para el crecimiento bacteriano durante la fermentación, los cultivos se complementaron con glucosa y extractos de levadura de acuerdo con los estados fermentados de las bacterias. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO<sub>600</sub> de 80 – 100, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos en una cantidad de 20 μM a 4 mM para inducir la expresión de proteína. Los cultivos se cultivaron más durante 40 a 45 h hasta que el valor de DO a 600 nm aumentó hasta de 100 a 120.

[0086] La expresión del Fc de inmunoglobulina en los transformantes de *E. coli* y los sitios expresados, la solubilidad en agua y la formación de dímeros del Fc de Ig expresado, se examinaron como sigue. Para determinar si un producto expresado es secretado al líquido de fermentación en el espacio periplásmico de *E. coli* por la secuencia señal fusionada al vector de expresión, el líquido de fermentación se centrifugó para obtener un líquido de fermentación exento de células y las células recogidas. El líquido de fermentación exento de células y una disolución

del espacio periplásmico obtenida por choque osmótico de las células recogidas, se sometieron a análisis por transferencia Western. Como resultado, se detectó una cantidad muy pequeña de Fc de inmunoglobulina. Para investigar la expresión intracelular del Fc de Ig, las células se rompieron usando un dispositivo de ultrasonidos (Misonix Company). El lisato celular resultante se centrifugó para separar las sustancias solubles en agua de las sustancias insolubles en agua, y las sustancias solubles en agua se sometieron a análisis de transferencia Western, como sigue. Las sustancias solubles en agua se mezclaron con un tampón de muestra de proteína que no contenía un agente de reducción tal como DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol, y se separaron en un gel de SDS-PAGE al 15 % (Criterion Gel, Bio-Rad). Después, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron con un anticuerpo dirigido contra Fc humano conjugado con HRP (Sigma). Como se muestra en la figura 1, el Fc de inmunoglobulina se expresaba en exceso en una forma soluble en agua y se encontró en el citosol de *E. coli*. Además, los productos expresados por los transformantes transformados con vectores de expresión que expresan Fc de Ig que tiene una parte de una región bisagra, fueron expresados como dímeros. En la figura 1, las bandas 1, 2 y 3 muestran los productos expresados en HM10927, HM10932 y HM10936, respectivamente, y la banda 4 muestra el Fc generado por tratamiento con papaína de las inmunoglobulinas producidas en células animales, que mostraban un tamaño ligeramente mayor debido a sus restos de azúcar en el gel de SDS-PAGE que el producido en *E. coli*.

#### < 4-2 > Análisis N-terminal de la secuencia

**[0087]** Los fragmentos Fc de Ig dímeros solubles en agua, que se encuentran en el citosol de *E. coli* como se ha demostrado en el apartado < 4-1 > anterior, se diseñaron para ser traducidos en una forma fusionada a una secuencia señal. Por lo tanto, para determinar si los fragmentos Fc de Ig están situados en el citosol de *E. coli* en una forma fusionada a la secuencia señal cuando no son secretados sin el procesamiento de la secuencia señal, las secuencias de aminoácidos N-terminales de los fragmentos Fc de Ig fueron determinadas por el Basic Science Research Institute, Seoul, Corea. Las muestras usadas en el análisis de secuencia de aminoácidos N-terminales se prepararon como sigue.

**[0088]** Primero, se sumergió una membrana de PVDF (Bio-Rad) en metanol durante aproximadamente 2-3 s para activarla y se mojó suficientemente con un tampón de bloqueo (glicina 170 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), metanol al 20 %). Las muestras de proteína separadas en un gel de SDS-PAGE no reductor, preparadas en el apartado < 4-1 > anterior, se transfirieron a una membrana de PVDF durante aproximadamente 1 h usando un kit de transferencia (Hoefer Semi-Dry Transfer unit, Amersham). Las proteínas transferidas a la membrana de PVDF se tiñeron con un colorante de proteína, azul Coomassie R-250 (Amnesco), durante 3 - 4 s, y se lavaron con una disolución de decoloración (agua:ácido acético:metanol = 5:1:4). Después, las regiones de la membrana que contenían proteínas se cortaron con tijeras y se sometieron al análisis de secuencia N-terminal.

**[0089]** Como resultado, se encontró que la proteína Fc de IgG1 tenía una secuencia N-terminal de Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu- Leu-Gly-Gly, la proteína Fc de IgG4 tenía una secuencia N-terminal de Ser-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Phe-Leu-Gly-Gly, y la proteína Fc de IgG2 tenía una secuencia N-terminal de Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Pro-Val-Ala-Gly-Pro. Como es evidente a partir de estos resultados, se encontró que los fragmentos Fc expresados por transformantes de *E. coli* de la presente invención tenían una secuencia N-terminal exacta. Estos resultados indican que, cuando se expresan en una forma fusionada a la secuencia señal, los fragmentos Fc no son secretados a la membrana extracelular o al espacio periplásmico, son procesados exactamente en la secuencia señal incluso tras la expresión en exceso y están presentes en una forma soluble en agua en el citosol.

#### < 4-3 > Purificación de Fc de inmunoglobulina

**[0090]** El Fc de inmunoglobulina se purificó usando una columna de afinidad de proteína A que se sabe que tiene una afinidad fuerte por las inmunoglobulinas, como sigue.

**[0091]** Las células de *E. coli* recogidas por centrifugación de los líquidos de fermentación, se rompieron mediante un microfluidizador (Microfluidics) para dar lisatos celulares. Los lisatos celulares se sometieron a cromatografía en columna en dos pasos para purificar los fragmentos Fc de inmunoglobulina recombinante presentes en el citosol. Se equilibraron 5 ml de una columna de afinidad de proteína A (Pharmacia) con PBS, y los lisatos celulares se cargaron en la columna con un caudal de 5 ml/min. Las proteínas no unidas se separaron por lavado con PBS y las proteínas unidas se eluyeron con citrato 100 mM (pH 3,0). Las fracciones recogidas se desalaron usando una columna de desalación HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón de Tris 10 mM (pH 8,0). Después, se llevó a cabo la cromatografía de columna de intercambio aniónico secundaria usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia). Las fracciones de Fc de inmunoglobulina recombinante purificada principales se cargaron en una columna de Q-Sepharose HP 26/10, y la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,2 M en tampón de Tris 10 mM (pH 8,0), proporcionando así fracciones muy puras. Después de ser parcialmente purificados usando la columna de afinidad de proteína A, los niveles de expresión de los fragmentos Fc de Ig recombinante se determinaron como sigue.

Vectores de expresión	Transformantes	Niveles de expresión de proteínas después de purificación con proteína A (mg/ml)
pSTIIIdCG1Fc	HM10927	400
pSTIIG1Mo	HM10930	500
pSTIIIdCG4Fc	HM10932	400
pSTIIG4Mo	HM10933	600
pSTIIIdCG2Fc	HM10936	100

**[0092]** Puesto que las proteínas de Fc de inmunoglobulina así obtenidas están presentes en una forma de dímero o monómero de la cadena pesada, tienen diferentes patrones de migración en SDS-PAGE reductora y SDS-PAGE no reductora. Los resultados del análisis de SDS-PAGE llevados a cabo para determinar las purezas de las proteínas después de purificar los productos expresados, se dan en las figuras 2 y 3.

**[0093]** Las figuras 2 y 3 muestran los resultados de los análisis de SDS-PAGE de los fragmentos Fc de inmunoglobulina purificados en forma de dímero o monómero, en condiciones no reductoras y reductoras usando un gel Criterion (Bio-Rad), en el que se evaluó la migración diferencial de los fragmentos Fc en geles reductores frente a no reductores. En la figura 2, la región A muestra las proteínas separadas en un gel de SDS-PAGE no reductor, y la región B muestra las proteínas en un gel de SDS-PAGE reductor. La banda M indica un marcador de proteína de referencia de intervalo bajo previamente teñido (Bio-Rad), y las bandas 1 a 4 indican muestras de proteína para el Fc de inmunoglobulina producido por transformantes de *E. coli*, HM10927, HM10928 (depositado en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM) el 15 de septiembre, 2004 y con el número de acceso asignado KCCM-10589), HM10929 (depositado en el KCCM el 15 de septiembre, 2004 y con el número de acceso asignado KCCM-10594) y HM10932, respectivamente. Como se muestra en la figura 2, en la SDS-PAGE reductora, los fragmentos Fc de Ig estaban presentes en forma de monómero porque se redujeron los enlaces disulfuro formados entre los restos de cisteína de la región bisagra, y por lo tanto migraban a la distancia del monómero. A diferencia de estos, en la SDS-PAGE no reductora, los fragmentos Fc de Ig eran presentes en forma de dímeros por los enlaces disulfuro y por lo tanto tenían una distancia de migración de aproximadamente 42 kDa.

**[0094]** En la figura 3, la región A muestra las proteínas separadas en un gel de SDS-PAGE no reductor, y la región B muestra proteínas en un gel de SDS-PAGE reductor. La banda M indica el marcador de proteínas de referencia, y las bandas 1 y 2 indican las muestras de proteína para el Fc de inmunoglobulina producido por los transformantes de *E. coli* HM10930 y HM10933, respectivamente. Como se muestra en la figura 3, las proteínas no mostraban una gran diferencia en la migración en geles reductores frente a no reductores, y solo presentaban una migración ligeramente diferente debido a la reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares.

### Preparación del conjugado de Fc de inmunoglobulina y fármaco

#### **EJEMPLO 5: Preparación I del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-fragmento Fc de inmunoglobulina**

< Etapa 1 > Preparación del fragmento Fc de inmunoglobulina usando inmunoglobulina

**[0095]** Se preparó un fragmento Fc de inmunoglobulina como sigue. Se trataron 200 mg de inmunoglobulina G (IgG) de 150 kDa (Green Cross, Corea) disueltos en tampón de fosfato 10 mM, con 2 mg de una enzima proteolítica, la papaína (Sigma) a 37 °C durante 2 h con agitación suave. Después de la reacción enzimática, el fragmento Fc de inmunoglobulina así regenerado se sometió a cromatografía para la purificación usando secuencialmente una columna Superdex, una columna de proteína A y una columna de intercambio catiónico. En detalle, la disolución de la reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM (PBS, pH 7,3) y la columna se eluyó con el mismo tampón con un caudal de 1 ml/min. Las moléculas de inmunoglobulina sin reaccionar (IgG) y F(ab')<sub>2</sub> que tenían un peso molecular relativamente alto comparado con el fragmento Fc de inmunoglobulina, se separaron usando su propiedad de eluir antes que el fragmento Fc de Ig. Los fragmentos Fab que tenían un peso molecular similar al del fragmento Fc de Ig se eliminaron mediante cromatografía en columna de proteína A (FIG. 4). Las fracciones resultantes que contenían el fragmento Fc de Ig eluidas de la columna Superdex 200 se cargaron con un caudal de 5 ml/min en una columna de proteína A (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0), y la columna se lavó con el mismo tampón para separar las proteínas no unidas a la columna. Después, se eluyó la columna de proteína A con tampón de citrato sódico 100 mM (pH 3,0) para obtener el fragmento Fc de inmunoglobulina muy puro. Las fracciones de Fc recogidas de la columna de proteína A finalmente se purificaron usando una columna de intercambio catiónico (polyCAT, PolyLC Company), en la que esta columna cargada con las fracciones de Fc se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0,15-0,4 M en tampón de acetato 10 mM (pH 4,5), proporcionando así fracciones de Fc muy puras. Las fracciones de Fc muy puras se analizaron por SDS-PAGE al 12 % (banda 2 en la figura 5).

< Etapa 2 > Preparación del complejo IFN $\alpha$ -PEG

**[0096]** Se mezcló polietilenglicol de 3,4 kDa que tenía un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-

ALD (Shearwater), con interferón alfa-2b humano (hIFN $\alpha$ -2b, PM: 20 kDa) disuelto en tampón de fosfato 100 mM en una cantidad de 5 mg/ml, con una relación molar de IFN $\alpha$ :PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. A esta mezcla se añadió un agente de reducción, el cianoborohidruro sódico (NaCNBH<sub>3</sub>, Sigma), en una concentración final 20 mM y se dejó reaccionar a 4 °C durante 3 h con agitación suave para dejar que el PEG se uniera al extremo amino terminal del interferón alfa. Para obtener un complejo de PEG e interferón alfa 1:1, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex® (Pharmacia). El complejo IFN $\alpha$ -PEG se eluyó de la columna usando tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se separaron el interferón alfa no unido al PEG, el PEG sin reaccionar y los subproductos de dímeros en los que el PEG estaba unido a dos moléculas de interferón alfa. El complejo IFN $\alpha$ -PEG se concentró hasta 5 mg/ml. Mediante este experimento, se encontró que la relación molar de reacción óptima para el IFN $\alpha$  y el PEG, que proporcionaba la mayor reactividad y generaba la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5.

< Etapa 3 > Preparación del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc

**[0097]** Para unir el complejo IFN $\alpha$ -PEG purificado en la etapa 2 anterior al extremo N de un fragmento Fc de inmunoglobulina, el fragmento Fc de inmunoglobulina (aproximadamente 53 kDa) preparado en la etapa 1 anterior, se disolvió en tampón de fosfato 10 mM y se mezcló con el complejo IFN $\alpha$ -PEG, con una relación molar de complejo IFN $\alpha$ -PEG:Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de ajustar la concentración del tampón de fosfato en la disolución de la reacción a 100 mM, se añadió un agente de reducción, NaCNBH<sub>3</sub>, a la disolución de la reacción en una concentración final 20 mM, y se dejó reaccionar a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Mediante este experimento, se encontró que la relación molar de reacción óptima de complejo IFN $\alpha$ -PEG a Fc, que proporcionaba la mayor reactividad y generaba la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era 1:2.

< Etapa 3 > Aislamiento y purificación del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc

**[0098]** Después de la reacción de la etapa anterior 3, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño con Superdex para así eliminar las sustancias sin reaccionar y los subproductos, y purificar el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc producido. Después de concentrar la mezcla de reacción y cargarla en una columna Superdex, se pasó tampón de fosfato 10 mM (pH 7,3) a través de la columna con un caudal de 2,5 ml/min para separar el Fc no unido y las sustancias sin reaccionar, seguido de elución de la columna para recoger las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc. Puesto que las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc recogidas contenían una pequeña cantidad de impurezas, Fc sin reaccionar y dímeros de interferón alfa, se llevó a cabo la cromatografía de intercambio catiónico para separar las impurezas. Las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc se cargaron en una columna PolyCAT LP (PolyLC) equilibrada con acetato sódico 10 mM (pH 4,5) y la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M. Finalmente, el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc se purificó usando una columna de intercambio aniónico. Las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc se cargaron en una columna PolyWAX LP (PolyLC) equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), y después la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,3 M en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) usando NaCl 1 M, aislando así el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc en una forma muy pura.

## EJEMPLO 6: Preparación II del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc

< Etapa 1 > Preparación del complejo Fc-PEG

**[0099]** Se mezcló polietilenglicol de 3,4 kDa que tenía un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), con el fragmento Fc de inmunoglobulina preparado en la etapa 1 del ejemplo 5, con una relación molar de Fc:PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20, en la que el fragmento Fc se había disuelto en tampón de fosfato 100 mM en una cantidad de 15 mg/ml. A esta mezcla se añadió un agente de reducción, NaCNBH<sub>3</sub> (Sigma), en una concentración final 20 mM y se dejó reaccionar a 4 °C durante 3 h con agitación suave. Para obtener un complejo de PEG y Fc 1:1, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex® (Pharmacia). El complejo Fc-PEG se eluyó de la columna usando tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se separaron el fragmento Fc de inmunoglobulina no unido al PEG, el PEG sin reaccionar y los subproductos de dímeros en los que el PEG estaba unido a dos moléculas de fragmento Fc de inmunoglobulina. El complejo Fc-PEG se concentró hasta aproximadamente 15 mg/ml. Mediante este experimento, se encontró que la relación molar de reacción óptima de Fc a PEG, que proporcionaba la mayor reactividad y generaba la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:3 a 1:10.

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

**[0100]** Para unir el complejo Fc-PEG purificado en la etapa 1 anterior al extremo N del IFN $\alpha$ , el complejo Fc-PEG se mezcló con IFN $\alpha$  disuelto en tampón de fosfato 10 mM, con una relación molar de complejo Fc-PEG:IFN $\alpha$  de 1:1, 1:1,5, 1:3 y 1:6. Después de ajustar la concentración del tampón de fosfato de la disolución de la reacción a 100 mM, se añadió un agente de reducción, NaCNBH<sub>3</sub>, a la disolución de la reacción, en una concentración final 20 mM, y se



dejó reaccionar a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Después de completarse la reacción, las sustancias sin reaccionar y los subproductos se separaron de acuerdo con el mismo procedimiento de purificación que en la etapa 4 del ejemplo 5, aislando así el conjugado de proteínas Fc-PEG-IFN $\alpha$  en una forma muy pura.

#### 5 EJEMPLO 7: Preparación del conjugado hGH-PEG-Fc

[0101] Se preparó y purificó un conjugado hGH-PEG-Fc de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 5, excepto que se usó un fármaco diferente del interferón alfa, la hormona del crecimiento humana (hGH, PM: 22 kDa) y la relación molar de hGH:PEG era 1:5.

10

#### EJEMPLO 8: Preparación del conjugado (G-CSF)-PEG-Fc

[0102] Se preparó y purificó un conjugado (G-CSF)-PEG-Fc de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 5, excepto que se usó un fármaco diferente del interferón alfa, el factor estimulador de colonias de granulocitos humano (G-CSF) y la relación molar de G-CSF:PEG era 1:5.

15

[0103] Por otra parte, se preparó y purificó un conjugado de proteínas <sup>17</sup>S-G-CSF-PEG-Fc de acuerdo con el mismo procedimiento descrito antes, usando un derivado del G-CSF, <sup>17</sup>S-G-CSF, que tiene una sustitución de serina en el resto de aminoácido decimoséptimo del G-CSF natural.

20

#### EJEMPLO 9: Preparación del conjugado EPO-PEG-Fc

[0104] Se preparó y purificó un conjugado EPO-PEG-Fc de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 5, excepto que se usó un fármaco diferente del interferón alfa, la eritropoyetina humana (EPO) y la relación molar de EPO:PEG era 1:5.

25

#### EJEMPLO 10: Preparación del conjugado de proteínas usando PEG con diferente grupo reactivo

[0105] Se preparó un conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc usando PEG que tenía un grupo reactivo propionato de succinimidilo (SPA) en ambos extremos, como sigue. Se mezcló polietilenglicol de 3,4 kDa, SPA-PEG-SPA (Shearwater), con 10 mg de interferón alfa disuelto en tampón de fosfato 100 mM, con una relación molar de IFN $\alpha$ :PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. Después la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 h. Para obtener un complejo de PEG e interferón alfa (complejo IFN $\alpha$ -PEG) 1:1, en el que el PEG estaba unido selectivamente al grupo amino de un resto de lisina del interferón alfa, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño con Superdex. El complejo IFN $\alpha$ -PEG se eluyó de la columna usando tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se separaron el interferón alfa no unido al PEG, el PEG sin reaccionar y los subproductos de dímeros en los que había dos moléculas de interferón alfa unidas a ambos extremos del PEG. Para unir el complejo IFN $\alpha$ -PEG al grupo amino de un resto de lisina del Fc de inmunoglobulina, el complejo IFN $\alpha$ -PEG purificado se concentró hasta aproximadamente 5 mg/ml, y se preparó y purificó un conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc de acuerdo con los mismos procedimientos que en las etapas 3 y 4 del ejemplo 5. Mediante este experimento, se encontró que la relación molar de reacción óptima de IFN $\alpha$  a PEG, que proporcionaba la mayor reactividad y generaba la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5.

30

35

40

45

[0106] Por otra parte, se preparó otro conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc de acuerdo con el mismo procedimiento descrito antes usando PEG que tenía un grupo reactivo N-hidroxisuccinimidilo (NHS) en ambos extremos. NHS-PEG-NHS (Shearwater), o PEG que tenía un grupo reactivo butilaldehído en ambos extremos, BUA-PEG-BUA (Shearwater).

#### EJEMPLO 11: Preparación del conjugado de proteínas usando PEG con peso molecular diferente

50

[0107] Se preparó un complejo IFN $\alpha$ -10K PEG usando polietilenglicol de 10 kDa que tenía un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ADL-PEG-ALD (Shearwater). Este complejo se preparó y se purificó de acuerdo con el mismo procedimiento que en la etapa 2 del ejemplo 5. Mediante este experimento, se encontró que la relación molar de reacción óptima de IFN $\alpha$  a PEG de 10 kDa, que proporcionaba la mayor reactividad y generaba la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5. El complejo IFN $\alpha$ -10K PEG se concentró hasta aproximadamente 5 mg/ml, y usando este concentrado, se preparó un conjugado IFN $\alpha$ -10K PEG-Fc y se purificó de acuerdo con los mismos procedimientos que en las etapas 3 y 4 del ejemplo 5.

55

#### EJEMPLO 12: Preparación del conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc (grupo -SH)

60

< Etapa 1 > Expresión y purificación de Fab'

[0108] Un transformante de *E. coli*, BL21/poDLHF (número de acceso: KCCM-10511), que expresaba el Fab' dirigido contra el factor de necrosis tumoral, se cultivó en 100 ml de medio LB durante la noche con agitación, y se inoculó en un fermentador de 5 litros (Marubishi) y se cultivó a 30 °C y 500 rpm con un caudal de aire de 20 vvm.

65

Para compensar los nutrientes insuficientes para el crecimiento bacteriano durante la fermentación, los cultivos se complementaron con glucosa y extractos de levadura de acuerdo con los estados fermentados de las bacterias. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO<sub>600</sub> de 80-100, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir la expresión de proteínas. Los cultivos se cultivaron más durante 40 a 45 h hasta que el valor de DO a 600 nm aumentó hasta de 120 a 140. El líquido de fermentación así obtenido se centrifugó a 20.000 x g durante 30 min. Se recogió el líquido sobrenadante y se descartó el sedimento.

**[0109]** El líquido sobrenadante se sometió a la siguiente cromatografía en columna de 3 etapas para purificar el Fab' dirigido contra el factor de necrosis tumoral alfa. El líquido sobrenadante se cargó en una columna de proteína G HiTrap (5 ml, Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0), y la columna se eluyó con glicina 100 mM (pH 3,0). Las fracciones de Fab' recogidas después se cargaron en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM (PBS, pH 7,3), y esta columna se eluyó con el mismo tampón. Finalmente, las segundas fracciones de Fab' se cargaron en una columna PolyCAT 21x250 (PolyLC), y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,4 M en tampón de acetato 10 mM (pH 4,5), proporcionando así fracciones de Fab' dirigido contra el factor de necrosis tumoral alfa.

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

**[0110]** Para unir un conector PEG al extremo N de un Fc de inmunoglobulina, el Fc de inmunoglobulina preparado de acuerdo con el mismo procedimiento que en la etapa 1 del ejemplo 5, se disolvió en tampón de fosfato 100 mM (pH 6,0), en una concentración de 5 mg/ml, y se mezcló con NHS-PEG-MAL (3,4 kDa, Shearwater), con una relación molar de Fc:PEG de 1:10, seguido de incubación a 4 °C durante 12 h con agitación suave.

**[0111]** Después de completarse la reacción, el tampón de reacción se intercambiò por tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 6,0) para separar el NHS-PEG-MAL no unido. Después, la mezcla de reacción se cargó en una columna polyCAT (Poly LC). La columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 6,0). Durante esta elución, el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG eluyó antes que el Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, y el Fc de Ig sin reaccionar eluyó más tarde, eliminando de esta forma las moléculas de Fc de Ig sin reaccionar.

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

**[0112]** Para unir el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG a un grupo cisteína del Fab', el Fab' purificado en la etapa 1 anterior se disolvió en tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 7,3) en una concentración de 2 mg/ml, y se mezcló con complejo Fc de inmunoglobulina-PEG preparado en la etapa 2 anterior, con una relación molar de Fab':complejo de 1:5. La mezcla de reacción se concentró hasta una concentración final de proteína de 50 mg/ml y se incubó a 4 °C durante 24 h con agitación suave.

**[0113]** Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM (pH 7,3), y la columna se eluyó con el mismo tampón con un caudal de 1 ml/min. El conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc acoplado eluyó relativamente pronto debido a su alto peso molecular, y el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG y Fab' sin reaccionar eluyeron más tarde, eliminando de esta forma las moléculas sin reaccionar. Para eliminar completamente el Fc de inmunoglobulina-PEG sin reaccionar, las fracciones del conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc recogidas se cargaron otra vez en una columna polyCAT 21x250 (Poly LC), y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 6,0), proporcionando así un conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc puro que comprende el complejo Fc-PEG unido a un grupo -SH cerca del extremo C del Fab'.

### EJEMPLO 13: Preparación del conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc (extremo N)

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

**[0114]** Se disolvieron 40 mg de Fab' purificado en la etapa 1 del ejemplo 12 en tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 6,0) en una concentración de 5 mg/ml, y se mezcló con butilALD-PEG-butilALD (3,4 kDa, Nektar) con una relación molar de Fab':PEG de 1:5. Se añadió un agente de reducción, NaCNBH<sub>3</sub>, a la mezcla de reacción en una concentración final 20 mM, y la mezcla de reacción se dejó reaccionar a 4 °C durante 2 h con agitación suave.

**[0115]** Después de completarse la reacción, el tampón de reacción se intercambiò por tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 6,0). Después, la mezcla de reacción se cargó en una columna polyCAT (Poly LC). La columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,4 M en tampón de acetato 20 mM (pH 4,5). Durante esta elución de la columna, el complejo de Fab'-PEG que comprendía el conector PEG unido al extremo N del Fab' eluyó antes que el Fab' sin reaccionar, y el Fab' sin reaccionar eluyó más tarde, eliminando así las moléculas de Fab' sin reaccionar.

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

**[0116]** Para unir el complejo Fab'-PEG purificado en la etapa 1 anterior al extremo N de un Fc de inmunoglobulina,

el complejo Fab'-PEG se disolvió en tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 6,0) en una concentración de 10 mg/ml, y se mezcló con Fc de inmunoglobulina disuelto en el mismo tampón con una relación molar de complejo Fab'-PEG:Fc de 1:5. Después de concentrar la mezcla de reacción hasta una concentración final de proteínas de 50 mg/ml, se añadió un agente de reducción, NaCNBH<sub>3</sub>, a la mezcla de reacción en una concentración final de 20 mM, y después la mezcla de reacción se hizo reaccionar a 4 °C durante 24 h con agitación suave.

[0117] Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM (pH 7,3), y la columna se eluyó con el mismo tampón con un caudal de 1 ml/min. El conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc acoplado eluyó relativamente pronto debido a su alto peso molecular, y el Fc de inmunoglobulina y complejo Fab'-PEG sin reaccionar eluyeron más tarde, eliminando de esta forma las moléculas sin reaccionar. Para eliminar completamente las moléculas de Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, las fracciones del conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc recogidas se cargaron otra vez en una columna polyCAT 21x250 (Poly LC), y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 6,0), proporcionando así un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc puro que comprende el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG unido al extremo N del Fab'.

#### EJEMPLO 14: Preparación y purificación de Fc de inmunoglobulina desglicosilado

[0118] Se disolvieron 200 mg de un Fc de inmunoglobulina preparado de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 5, en tampón de fosfato 100 mM (pH 7,5) en una concentración de 2 mg/ml, y se mezcló con una desglicosilasa 300 U/mg PNGasa (NEB). La mezcla de reacción se dejó reaccionar a 37 °C durante 24 h con agitación suave. Después, para purificar el Fc de inmunoglobulina desglicosilado, la mezcla de reacción se cargó en una columna SP Sepharose FF (Pharmacia), y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,1-0,6 M en tampón de acetato 10 mM (pH 4,5), usando NaCl 1 M. El Fc de inmunoglobulina natural eluyó antes y el Fc de inmunoglobulina desglicosilado (DG Fc) eluyó más tarde.

#### EJEMPLO 15: Preparación del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc

[0119] Para unir el Fc de inmunoglobulina desglicosilado preparado en el ejemplo 14 al complejo IFN $\alpha$ -PEG purificado en la etapa 2 del ejemplo 5, el complejo IFN $\alpha$ -PEG se mezcló con el DG Fc disuelto en tampón de fosfato 10 mM con una relación de complejo IFN $\alpha$ -PEG:DG Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de ajustar la concentración del tampón de fosfato de la disolución de reacción a 100 mM, se añadió un agente de reducción, NaCNBH<sub>3</sub>, a la disolución de la reacción en una concentración final 20 mM y se dejó reaccionar a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Mediante este experimento, se encontró que la relación molar de reacción óptima del complejo IFN $\alpha$ -PEG y al DG Fc, que proporcionaba la mayor reactividad y generaba la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era 1:2.

[0120] Después de la reacción de acoplamiento, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex® (Pharmacia) para así eliminar las sustancias sin reaccionar y los subproductos y purificar el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc. Después de cargar la mezcla de reacción en la columna, se pasó un tampón de fosfato (pH 7,3) por la columna con un caudal de 2,5 ml/min para separar el DG Fc no unido y las sustancias sin reaccionar, seguido de elución de la columna para recoger las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc. Puesto que las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc recogidas contenían una pequeña cantidad de impurezas, DG Fc sin reaccionar y complejo IFN $\alpha$ -PEG, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico para separar las impurezas. Las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc se cargaron en una columna PolyCAT LP (PolyLC) equilibrada con acetato sódico 10 mM (pH 4,5) y la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-0,6 M en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M. Finalmente, el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc se purificó usando una columna de intercambio aniónico. Las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc se cargaron en una columna PolyWAX LP (PolyLC) equilibrada con Tris-HCl (pH 7,5), y la columna después se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-0,3 M en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) usando NaCl 1 M, aislando así el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc en una forma muy pura.

#### EJEMPLO 16: Preparación del conjugado del complejo IFN $\alpha$ -PEG y el derivado AG Fc recombinante

[0121] De acuerdo con los mismos procedimientos de los ejemplos 5 y 15, el complejo IFN $\alpha$ -PEG se unió al extremo N de la IgG4 delta-Cys como un derivado de AG Fc preparado en el ejemplo 1. Después de la reacción de acoplamiento, las sustancias sin reaccionar y los subproductos se separaron de la mezcla de reacción, y el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-AG Fc así producido (I) se purificó principalmente usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) y se purificó más mediante un ensayo de cromatografía de líquidos de alta presión usando una columna polyCAT 21,5x250 (polyLC), purificando así el conjugado en un alto grado. La disolución de la reacción de acoplamiento se desaló usando una columna de desalación HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). Después, la disolución de la reacción se cargó en 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) con un caudal de 8 ml/min, y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-0,2 M para obtener las fracciones deseadas. Las fracciones recogidas se volvieron a cargar en una columna polyCAT 21,5x250 equilibrada con

tampón de acetato 10 mM (pH 5,2) con un caudal de 15 ml/min, y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,1-0,3 M, proporcionando así fracciones muy puras. De acuerdo con el mismo procedimiento descrito antes, se preparó otro conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-AG Fc (II) usando otro derivado de AG Fc preparado en el ejemplo 12, el monómero de la IgG4.

#### 5 EJEMPLO 17: Preparación del conjugado EPO-PEG-derivado de AG Fc recombinante

[0122] De acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, se preparó un conjugado EPO-PEG-derivado de AG Fc recombinante uniendo un derivado de AG Fc, IgG4 delta Cys, al complejo EPO-PEG.

#### 10 EJEMPLO COMPARATIVO 1: Preparación del complejo IFN $\alpha$ -40 K PEG

[0123] Se disolvieron 5 mg de interferón alfa en tampón de fosfato 100 mM para obtener un volumen final de 5 ml, y se mezcló con metoxi-PEG-aldehído activado de 40 kDa (Shearwater), con una relación molar de IFN $\alpha$ :PEG de 40 kDa de 1:4. A esta mezcla, se añadió un agente de reducción, NaCNBH<sub>3</sub>, en una concentración final 20 mM y se dejó reaccionar a 4 °C durante 18 h con agitación suave. Para inactivar el PEG, que no había reaccionado con el IFN $\alpha$ , se añadió etanolamina a la mezcla de reacción en una concentración final 50 mM.

[0124] Se usó una columna Sephadex G-25 (Pharmacia) para separar el PEG sin reaccionar e intercambiar el tampón por otro tampón. Primero, esta columna se equilibró con dos volúmenes de columna (VC) de tampón de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y se cargó con la mezcla de reacción. Los flujos a través de la columna se detectaron midiendo la absorbancia a 260 nm usando un espectrofotómetro de UV. Cuando la columna se eluyó con el mismo tampón, el interferón alfa modificado por la adición a su extremo N de PEG que tenía un peso molecular mayor, eluyó antes y el PEG sin reaccionar eluyó después, permitiendo así aislar solo el IFN $\alpha$ -40 K PEG.

[0125] Se llevó a cabo la siguiente cromatografía para purificar más el complejo IFN $\alpha$ -40K PEG de las fracciones recogidas. Se equilibraron 3 ml de una columna PolyWAX LP (PolyLC) con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Las fracciones recogidas que contenían el complejo IFN $\alpha$ -40K PEG se cargaron en la columna con un caudal de 1 ml/min, y la columna se lavó con 15 ml de tampón de equilibrio. Después, la columna se eluyó con un gradiente de NaCl lineal de 0-100 % usando 30 ml de NaCl 1 M, eluyendo así el interferón alfa conjugado con tri-, di- y mono-PEG, secuencialmente. Para purificar más el interferón alfa conjugado con mono-PEG, las fracciones recogidas que contenían el interferón alfa conjugado con mono-PEG se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño. Las fracciones se concentraron y se cargaron en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM (pH 7,0) y la columna se eluyó con el mismo tampón con un caudal de 1 ml/min. Las moléculas de interferón alfa conjugado con tri- y di-PEG se separaron basándose en su propiedad de eluir antes que el interferón alfa conjugado con mono-PEG, aislando así el interferón alfa conjugado con mono-PEG en una forma muy pura.

[0126] De acuerdo con el mismo procedimiento descrito antes, el PEG de 40 kDa se conjugó con el extremo N de la hormona del crecimiento humana, el factor estimulador 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-derivado de <sup>17</sup>S-G-CSF.

#### 45 EJEMPLO COMPARATIVO 2: Preparación del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-albúmina

[0127] Para unir el complejo IFN $\alpha$ -PEG purificado en la etapa 2 del ejemplo 1 al extremo N de la albúmina, el complejo IFN $\alpha$ -PEG se mezcló con albúmina de suero humana (HSA, aproximadamente 67 kDa, Green Cross) disuelta en tampón de fosfato 10 mM, con una relación molar de complejo IFN $\alpha$ -PEG:albúmina de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de ajustar la concentración del tampón de fosfato de la disolución de la reacción a 100 mM, se añadió un agente de reducción, NaCNBH<sub>3</sub>, a la disolución de la reacción en una concentración final 20 mM y se dejó reaccionar a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Mediante este experimento, se encontró que la relación molar de reacción óptima del complejo IFN $\alpha$ -PEG a la albúmina, que proporcionaba la mayor reactividad y generaba la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era 1:2.

[0128] Después de la reacción de acoplamiento, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex® (Pharmacia) para así eliminar las sustancias sin reaccionar y los subproductos y purificar el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-albúmina producido. Después de concentrar la mezcla de reacción y cargarla en la columna, se pasó un tampón de acetato sódico 10 mM a través de la columna con un caudal de 2,5 ml/min para separar la albúmina no unida y las sustancias sin reaccionar, seguido de elución de la columna para purificar solo el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-albúmina. Puesto que las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-albúmina recogidas contenían una pequeña cantidad de impurezas, albúmina sin reaccionar y dímeros de interferón alfa, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico para separar las impurezas. Las fracciones del conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-albúmina se cargaron en una columna SP5PW (Waters) equilibrada con acetato sódico 10 mM (pH 4,5) y la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-0,5 M en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M, aislando así el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-albúmina en una forma muy pura.

[0129] De acuerdo con el mismo procedimiento descrito antes, la albúmina se conjugó con la hormona del crecimiento humana, G-CSF y un derivado de G-CSF, proporcionando así los conjugados hGH-PEG-albúmina, G-CSF-PEG-albúmina y <sup>17</sup>S-G-CSF-PEG-albúmina.

5

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

[0130] El resto de cisteína del Fab' purificado en la etapa 1 del ejemplo 8, se activó por incubación en un tampón de activación (acetato sódico 20 mM (pH 4,0), DTT 0,2 mM) durante 1 h. Después de intercambiar el tampón por un tampón de modificación de PEG, se le añadieron fosfato potásico 50 mM (pH 6,5), maleimida-PEG (PM: 40 kDa, Shearwater) con una relación molar de Fab'-PEG de 40 kDa de 1:10 y se hizo reaccionar a 4 °C durante 24 h con agitación suave.

10

[0131] Después de completarse la reacción, la disolución de la reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM (pH 7,3) y la columna se eluyó con el mismo tampón con un caudal de 1 ml/min. El PEG de 40 kDa conjugado con Fab' (Fab'-40K PEG) eluyó relativamente pronto debido a su alto peso molecular, y el Fab' sin reaccionar eluyó más tarde, eliminando así el Fab' sin reaccionar. Para eliminar completamente el Fab' sin reaccionar, las fracciones del complejo Fab'-40K PEG recogidas se cargaron otra vez en una columna PolyCAT 21x250 (PolyLC), y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 4,5), proporcionando así un complejo Fab'-40K PEG puro que comprende PEG de 40 kDa unido a un grupo -SH del Fab'.

15

20

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

< 1-1 > Identificación de los conjugados de proteínas

25

[0132] Los conjugados de proteínas preparados en los ejemplos anteriores se analizaron por SDS-PAGE no reductora usando un gel de gradiente al 4-20 % y un gel al 12 % y ELISA (R&D System). Como resultado del análisis de SDS-PAGE, como se muestra en la figura 6, una reacción de acoplamiento de un polipéptido fisiológico, un polímero no peptídico, PEG, y un fragmento Fc de inmunoglobulina, dio como resultado la producción satisfactoria de un conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc (A), un conjugado <sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y un conjugado EPO-PEG-Fc (C).

30

[0133] Además, el DG Fc preparado en el ejemplo 10 se analizó por SDS-PAGE al 12 % no reductora. Como se muestra en la figura 9b, se detectó una banda de DG Fc en una posición que corresponde al peso molecular del Fc natural que carece de restos azúcar.

35

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

[0134] Los conjugados de proteínas preparados en los ejemplos anteriores se cuantificaron por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 (Pharmacia) y tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, en la que se comparó el área del pico de cada conjugado de proteínas con la de un grupo de control. Las referencias analizadas cuantitativamente previamente, IFN $\alpha$ , hGH, G-CSF, <sup>17</sup>S-G-CSF, EPO y Fc, se sometieron individualmente a la cromatografía de exclusión por tamaño, y se determinó un factor de conversión entre una concentración y un pico. Se sometió una cantidad predeterminada de cada conjugado de proteínas a la misma cromatografía de exclusión por tamaño. Al restar un área del pico correspondiente a un fragmento Fc de inmunoglobulina del área del pico así obtenido, se determinó un valor cuantitativo para una proteína fisiológicamente activa presente en cada conjugado de proteínas. La figura 7 muestra el resultado de la cromatografía de exclusión por tamaño del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc purificado, en el que se observó un solo pico. Este resultado indica que el conjugado de proteínas purificado no contiene impurezas de multímeros tales como un dímero, un trímero o mayor número de monómeros.

40

45

50

[0135] Cuando se hizo el análisis cuantitativo de un polipéptido fisiológicamente activo conjugado a Fc usando un anticuerpo específico para el polipéptido fisiológicamente activo, se evitó que el anticuerpo se uniera al polipéptido, dando como resultado un valor inferior que el valor real calculado por cromatografía. En el caso del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc, un análisis por ELISA dio como resultado un valor de ELISA que correspondía a aproximadamente 30 % del valor real.

55

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

[0136] Los conjugados de proteínas preparados en los ejemplos anteriores, se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño y se midió la absorbancia a 280 nm. Como resultado, los conjugados IFN $\alpha$ -PEG-Fc, hGH-PEG-Fc, G-CSF-PEG-Fc y <sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-Fc presentaron un solo pico al tiempo de retención de una sustancia de 70 a 80 kDa.

60

[0137] Por otra parte, se llevó a cabo la HPLC de fase inversa para determinar las purezas de los conjugados de

65

proteínas preparados en los ejemplos 5, 15 y 16, IFN $\alpha$ -PEG-Fc, IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc y IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante. Se usó una columna de fase inversa (columna 259 VHP54, Vydac). La columna se eluyó con un gradiente de acetonitrilo al 40-100 % con TFA al 0,5 %, y las purezas se analizaron midiendo la absorbancia a 280 nm. Como resultado, como se muestra en la figura 11, las muestras no contienen interferón o Fc de inmunoglobulina no unidos, y se encontró que todos los conjugados de proteínas, IFN $\alpha$ -PEG-Fc (A), IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc (B) y IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante (C) tenían una pureza mayor que 96 %.

**[0138]** Para determinar la precisión de los pesos moleculares de los conjugados de proteínas purificados, se analizó la masa de cada conjugado usando un espectrofotómetro de masas MALDI-TOF de alto rendimiento (Voyager DE-STR, Applied Biosystems). Se usó ácido sinapínico como matriz. Se aplicaron 0,5  $\mu$ l como recubrimiento de cada muestra de ensayo sobre un portaobjetos de muestras y se secaron al aire, se mezclaron otra vez con un volumen igual de una disolución de matriz y se secaron al aire, y se introdujeron en una fuente de iones. La detección se llevó a cabo en una forma positiva usando un analizador de TOF en modo lineal. Los iones se aceleraron con una fuente de extracción dividida que funcionaba con extracción retardada (DE) usando un tiempo de extracción retardada de 750 ns a 1500 ns a un voltaje de aceleración total de aproximadamente 2,5 kV.

**[0139]** Los pesos moleculares observados por la espectrometría de masas MALDI-TOF para los conjugados de proteínas de Fc preparados en los ejemplos, se dan en la siguiente tabla 1. La figura 8 muestra los resultados de la espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado EPO-PEG-Fc, y la figura 10 muestra los resultados de la espectrometría de masas MALDI-TOF de los conjugados IFN $\alpha$ -PEG-Fc y IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc. Como resultado, se encontró que el conjugado de proteínas EPO-PEG-Fc tenía una pureza mayor de 95 % y un peso molecular muy cercano a un PM teórico. Además, se encontró que la EPO se acoplaba al fragmento Fc de inmunoglobulina en una relación 1:1.

TABLA 1

	PM teórico (kDa)	PM medido (KDa)
IFN $\alpha$ -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
derivado de <sup>35</sup> S-G-CSF-PEG-Fc (E.4)	75,0	75,9
EPO-PEG-Fc (E.5)	91,4	91,0

**[0140]** Además, cuando se examinaron los pesos moleculares de Fc y DG Fc preparados en el ejemplo 14 por espectrometría de masas MALDI-TOF, se encontró que DG Fc tenía 50 kDa, que es aproximadamente 3 kDa menos que el Fc natural (FIG. 9a). Puesto que el PM de 3 kDa corresponde al tamaño teórico de los restos de azúcar, los resultados demuestran que se han eliminado completamente los restos de azúcar.

**[0141]** La tabla 2, a continuación, muestra los resultados de la espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc preparado en el ejemplo 11 y los conjugados IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante (I y II) preparados en el ejemplo 16. Se encontró que el conjugado IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc era 3 kDa más ligero, y el conjugado IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante (I) era aproximadamente 3-4 kDa más ligero que el conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc de 75,9 kDa. El conjugado IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante (II) acoplado con un monómero de Fc mostró un peso molecular 24,5 kDa menor que el correspondiente al peso molecular del monómero de Fc.

TABLA 2

	PM teórico (kDa)	PM medido (KDa)
IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc (E.11)	72,8	73,0
IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante (I) (E.13)	72,3	72,2
IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante (II) (E.14)	46,8	46,6

## EJEMPLO EXPERIMENTAL 2: Análisis farmacocinético I

**[0142]** Se evaluó en las formas naturales de las proteínas fisiológicamente activas (controles) y los complejos de proteínas preparados en los ejemplos y los ejemplos comparativos, complejos de -40K PEG, conjugados de -PEG-albúmina, conjugados de -PEG-Fc, conjugados de -PEG-DG Fc y conjugados de -PEG-derivado de AG Fc recombinante, la estabilidad en el suero y los parámetros farmacocinéticos en ratas SD (5 ratas por grupo). Los controles, y los complejos de -40K PEG, conjugados de -PEG-albúmina, conjugados de -PEG-Fc, conjugados de -PEG-DG Fc y conjugados de -PEG-derivado de AG Fc recombinante (grupos de ensayo) se inyectaron individualmente por vía subcutánea con una dosis de 100  $\mu$ g/kg. Después de la inyección subcutánea, se recogieron muestras de sangre a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 y 96 h en los grupos de control, y en los grupos de ensayo a las 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 y 288 h. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con un

anticoagulante, heparina y se centrifugaron durante 5 min usando un microcentrifugador Eppendorf de alta velocidad para separar las células sanguíneas. Se midieron los niveles de proteína en el suero por ELISA usando anticuerpos específicos para las proteínas fisiológicamente activas.

5 **[0143]** Los resultados de los análisis farmacocinéticos de las formas naturales de IFN $\alpha$ , hGH, G-CSF y EPO, y de sus complejos de -40K PEG, sus conjugados con -PEG-albúmina, sus conjugados de -PEG-Fc y sus conjugados de -PEG-DG Fc, se dan en las tablas 3 a 7, a continuación. En las siguientes tablas T<sub>máx</sub> indica el tiempo que tarda en alcanzarse la concentración máxima de fármaco en el suero, T<sub>1/2</sub> indica la semivida en el suero de un fármaco, y MRT (tiempo medio de permanencia) indica el tiempo medio que permanece una molécula de fármaco en el cuerpo.

10 TABLA 3

Farmacocinética del interferón alfa

	IFN $\alpha$ natural	IFN $\alpha$ -40K PEG (C.E.1)	IFN $\alpha$ -PEG-albúmina (C.E.2)	IFN $\alpha$ -PEG-Fc (E.5)	IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc (E.15)	IFN $\alpha$ -PEG-derivado AG Fc recombinante (I) (E.16)	IFN $\alpha$ -PEG-derivado AG Fc recombinante (II) (E.16)
T <sub>máx</sub> (h)	1,0	30	12	30	48	24	24
T <sub>1/2</sub> (h)	1,7	35,8	17,1	90,4	71,0	61,2	31,2
MRT (h)	2,1	71,5	32,5	150,1	120,6	111,0	58,8

15 TABLA 4

Farmacocinética del factor de crecimiento humano

	hGH natural	hGH-40K PEG (C.E.1)	hGH-PEG-albúmina (C.E.2)	hGH-PEG-Fc (E.7)
T <sub>máx</sub> (h)	1,0	12	12	12
T <sub>1/2</sub> (h)	1,1	7,7	5,9	11,8
MRT (h)	2,1	18,2	13,0	18,8

20 TABLA 5

Farmacocinética del G-CSF

	G-CSF natural	G-CSF-40K PEG (C.E.1)	G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2)	G-CSF-PEG-Fc (E.8)
T <sub>máx</sub> (h)	2,0	12	12	12
T <sub>1/2</sub> (h)	2,8	4,8	5,2	6,9
MRT (h)	5,2	24,5	25,0	32,6

25 TABLA 6

Farmacocinética del derivado <sup>17</sup>S-G-CSF

	derivado <sup>17</sup> S-G-CSF natural	<sup>17</sup> S-G-CSF-40K PEG (C.E.1)	<sup>17</sup> S-G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2)	<sup>17</sup> S-G-CSF-PEG-Fc (E.8)
T <sub>máx</sub> (h)	2,0	24	24	24
T <sub>1/2</sub> (h)	2,9	4,3	6,4	7,0
MRT (h)	5,8	24,4	25,1	33,2

30 TABLA 7

Farmacocinética de la EPO

	EPO natural	EPO muy glicosilada	EPO-PEG-Fc (E.9)	EPO-PBB- derivado AC Fc recombinante (E.17)
T <sub>máx</sub> (h)	6,0	12	30	48
T <sub>1/2</sub> (h)	9,4	18,4	61,5	87,9
MRT (h)	21,7	26,8	117,6	141,6

35 **[0144]** Como se muestra a partir de los datos de la tabla 13 y la gráfica de farmacocinética de la figura 12, el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -PEG-Fc tenía una semivida en el suero de 90,4 h, que era aproximadamente 50 veces mayor que la del IFN $\alpha$  natural y aproximadamente 2,5 veces mayor que la del IFN $\alpha$ -40K PEG que tenía una semivida de 35,8 h, preparado en el ejemplo comparativo 1. Además, se encontró que el conjugado de proteínas

IFN $\alpha$ -PEG-Fc de la presente invención era superior en la semivida en el suero al IFN $\alpha$ -PEG-albúmina, que tenía una semivida de 17,1 h.

5 [0145] Por otra parte, como se muestra en la tabla 3 y la figura 14, el conjugado IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc tenía una semivida en el suero de 71,0 h, que era casi la misma que la del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-Fc, indicando que la  
desglicosilación del Fc no afecta mucho a la estabilidad in vivo del conjugado IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc. Además, se  
encontró que el conjugado preparado usando el derivado de AG Fc recombinante producido por un procedimiento  
recombinante, tenía un efecto idéntico al de DG Fc derivado de la forma natural. Sin embargo, la semivida en el  
10 acoplado con el dímero de Fc normal.

15 [0146] Como se muestra en la tabla 4, la hormona del crecimiento humana también mostraba una semivida en el suero prolongada cuando se conjugaba con el fragmento Fc de IgG de acuerdo con la presente invención. Es decir, comparado con la forma natural (1,1 h), el complejo hGH-40K PEG y el conjugado hGH-PEG-albúmina tenían semividas ligeramente mayores 7,7 h y 5,9 h, respectivamente, mientras que el conjugado de proteínas hGH-PEG-Fc de la presente invención, presentaba una semivida en el suero muy prolongada de 11,8 h.

20 [0147] Como es evidente a partir de los datos farmacocinéticos de G-CSF y su derivado en la tabla 5 y 6, los conjugados G-CSF-PEG-Fc y <sup>17</sup>S-G-CSF-PEG-Fc presentaban una semivida en el suero mucho más larga que la del complejo de -40K PEG y el conjugado de -PEG-albúmina. Se encontró que el fragmento Fc de inmunoglobulina en el suero prolongaba la duración de la acción de proteínas fisiológicamente activas en formas naturales, así como en sus derivados que tenían alteraciones de algunos restos de aminoácidos en niveles similares a las formas naturales. A partir de esos resultados, se puede predecir fácilmente que el procedimiento de la presente invención tendrá un efecto similar en otras proteínas y sus derivados.

25 [0148] Como se muestra en la tabla 7 y la figura 13, la conjugación de la EPO glicosilada natural al fragmento Fc también da como resultado un aumento de la semivida en el suero. Es decir, la EPO tiene una semivida en el suero de 9,4 h en la forma natural, y una semivida en el suero prolongada de 18,4 h en Darbepoetina  $\alpha$  (Aranesp, Amgen), que está muy glicosilada para mejorar la estabilidad en el suero. El conjugado EPO-PEG-Fc, que comprende EPO acoplada al fragmento Fc de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención, presentaba una semivida en el suero notablemente prolongada de 61,5 h. Además, cuando se conjugaba con el derivado de Fc aglicosilado (AG) recombinante derivado de *E. coli*, la semivida de la EPO aumentaba a 87,9 h, indicando que la aglicosilación del fragmento Fc permite preparar un conjugado de proteínas que no afecta a la estabilidad en el suero de la proteína sin funciones de anticuerpo.

30 [0149] Como es evidente a partir de los resultados anteriores, los conjugados de proteínas con unión covalente con el fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico, de acuerdo con la presente invención, presentan semividas en el suero de varias a varias decenas mayores que las de la forma natural. Además, cuando el Fc de inmunoglobulina era aglicosilado por producción en *E. coli* o desglicosilado por tratamiento enzimático, su efecto de aumentar la semivida en el suero de su conjugado de proteínas se mantenía a un nivel similar.

35 [0150] En particular, comparado con las proteínas modificadas por el PEG de 40 kDa, que tiene la duración de la acción más larga entre las moléculas de PEG, para aumentar la duración de la acción de proteínas en el suero, los conjugados de proteínas de Fc de inmunoglobulina tenían una estabilidad en el suero muy superior. Además, comparado con los conjugados de proteínas acoplados a albúmina en lugar de Fc de inmunoglobulina, los conjugados de proteínas de la presente invención presentaban una excelente estabilidad en el suero, indicando que los conjugados de proteínas de la presente invención son eficaces para desarrollar formas de acción prolongada de los fármacos proteínicos. Estos resultados, que los presentes conjugados de proteínas tienen excelentes efectos en la estabilidad en el suero y el MRT en una amplia variedad de proteínas, incluyendo los derivados del factor estimulador de colonias por mutación puntual, comparado con las proteínas conjugadas con PEG o albúmina convencionales, indican que la estabilidad y los efectos de duración prolongada de los presentes conjugados de proteínas se pueden aplicar a otros polipéptidos fisiológicamente activos.

40 [0151] Por otra parte, cuando se evaluó en el conjugado de proteínas IFN $\alpha$ -10K PEG-Fc (ejemplo 11) preparado usando un polímero no peptídico, el PEG de 10 kDa, su semivida en el suero de acuerdo con el mismo procedimiento descrito antes, mostró una semivida en el suero de 48,8 h, que era algo más corta que la semivida en el suero (79,7 h) de un conjugado de proteínas preparado usando el PEG de 3,4 kDa.

45 [0152] Además, las semividas en el suero de los conjugados de proteínas disminuyen con el aumento del peso molecular del polímero no peptídico de PEG. Estos resultados indican que el factor principal que aumenta la estabilidad en el suero y la duración de los conjugados de proteínas, es el conjugado del fragmento Fc de inmunoglobulina más que el polímero no peptídico.

50 [0153] Incluso cuando el grupo reactivo del PEG se intercambió por un grupo reactivo distinto del grupo aldehído, los conjugados de proteínas con el PEG mostraron patrones similares en los pesos moleculares aparentes y la



semivida en el suero a los acoplados al PEG que tiene un grupo un reactivo aldehído.

### EJEMPLO EXPERIMENTAL 3: Análisis farmacocinético II

5 **[0154]** Para determinar las semividas en el suero de los conjugados Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc preparados en los ejemplos 12 y 13 y el complejo Fab'-S-40K PEG preparado en el ejemplo comparativo 3, se llevó a cabo el análisis farmacocinético de los fármacos de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo que experimental 2 usando Fab' como control, los conjugados y el complejo. Los resultados se dan en la figura 15.

10 **[0155]** Como se muestra en la figura 15 los conjugados Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc presentaban una semivida en el suero dos o tres veces más prolongada comparada con el Fab' o el complejo Fab'-S-40K PEG.

### EJEMPLO EXPERIMENTAL 4: evaluación de la actividad intracelular de los conjugados de proteínas

15 < 4-1 > Comparación de la actividad intracelular de los conjugados de proteínas del IFN $\alpha$ .

20 **[0156]** Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteínas del IFN $\alpha$ , se evaluó la actividad antivírica de IFN $\alpha$ -PEG-Fc (Ejemplo 5), IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc (Ejemplo 15), IFN $\alpha$ -PEG-derivado de AG Fc recombinante (Ejemplo 16), IFN $\alpha$ -40K PEG (Ejemplo comparativo 1) y IFN $\alpha$ -PEG-albúmina (Ejemplo comparativo 2), mediante un bioensayo de cultivo celular usando células de riñón bovino Madin Darby (MDBK) (ATCC CCL-22) infectadas con virus de estomatitis vesicular. El interferón alfa-2b no pegilado, disponible en el Instituto Nacional de Patrones y Controles Biológicos (NIBSC), se usó como material de referencia.

25 **[0157]** Se cultivaron células MDBK en MEM (medio esencial mínimo, JBI) complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomycin a 1 % a 37 °C en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 %. Las muestras que se iban a analizar y el material de referencia se diluyeron con el medio de cultivo a concentraciones predeterminadas, y se pusieron partes alícuotas de 100  $\mu$ l en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las células cultivadas se dependieron, se añadieron a la placa que contenía las muestras en un volumen de 100  $\mu$ l, y se cultivaron durante aproximadamente 1 h a 37 °C en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después, se añadieron 50  $\mu$ l de virus de estomatitis vesicular (VSV) de 5-7x10<sup>3</sup> UFP a cada pocillo de la placa, y las células se cultivaron más durante aproximadamente 16 a 20 h a 37 °C en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 %. Se usó un pocillo que no contenía la muestra o el material de referencia pero que contenía solo el virus, como un control negativo, y un pocillo que contenía solo células se usó como un control positivo.

35 **[0158]** Después de separar el medio de cultivo, se añadieron 100  $\mu$ l de disolución de rojo neutro a la placa para teñir las células viables, seguido de incubación durante 2 h a 37 °C en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después se separaron los líquidos sobrenadantes, se añadieron 100  $\mu$ l de una mezcla 1:1 de etanol al 100 % y ácido acético al 1 % a cada pocillo de la placa. Después de mezclar bien para disolver todos los cristales de rojo neutro eluidos de las células teñidas, se midió la absorbancia a 540 nm. El control negativo se usó como un blanco, y se calcularon los valores de DE<sub>50</sub> (dosis que produce 50 % de inhibición del crecimiento celular), en el que el crecimiento celular del control positivo se fijó en 100 %.

TABLA 8

	Conc. (ng/ml)	Actividad específica (UI/mg)	Actividad relativa ( %) al IFN $\alpha$ natural
IFN $\alpha$ natural	100	4,24E + 08	100
IFN $\alpha$ -40K PEG	100	2,04E + 07	4,8
IFN $\alpha$ -PEG-albúmina	100	2,21E + 07	5,2
IFN $\alpha$ -PEG-Fc	100	1,19E + 08	28,1
IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc	100	1,09E + 08	25,7
IFN $\alpha$ -PEG-derivado AG Fc recombinante	100	9,58E + 07	22,6

45 **[0159]** Como se muestra en la tabla 8, el IFN $\alpha$ -40K PEG disminuyó la actividad a 4,8 % del IFN $\alpha$  natural. En especial, cuando el tamaño de los restos de PEG aumentaba, el conjugado de proteínas tenía una mejor estabilidad en el suero pero disminuía la actividad gradualmente. Se ha descrito que el interferón alfa tenía actividades in vitro de 25 % cuando se modificaba con PEG de 12 kDa y aproximadamente 7 % cuando se modificaba con PEG de 40 kDa (P. Bailon y col., *Bioconjugate Chem.* 12: 195-202, 2001). Es decir, puesto que un conjugado de proteínas tiene una semivida más larga pero disminuye mucho la actividad biológica al aumentar el peso molecular de los restos de PEG, es necesario desarrollar un conjugado de proteínas que tenga una semivida en el suero más larga y una actividad más fuerte. Además, el conjugado de IFN $\alpha$ -PEG-albúmina presentaba una actividad débil de aproximadamente 5,2 % comparado con el IFN $\alpha$  natural. A diferencia de esto, los conjugados IFN $\alpha$ -PEG-Fc y IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc de la presente invención, presentaban una actividad relativa notablemente mejorada de 28,1 % y 25,7 % comparado con el IFN $\alpha$  natural. Además, la conjugación del IFN $\alpha$  con el derivado de AG Fc recombinante dio

como resultado un aumento similar de la actividad. A partir de estos resultados, se espera que el interferón alfa conjugado con el fragmento Fc de inmunoglobulina tenga un aumento notable de la semivida en el suero y mejore mucho la eficacia farmacéutica in vivo.

5 < 4-2 > Comparación de la actividad intracelular de los conjugados de proteínas de la hormona de crecimiento humana

[0160] Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteínas de la hormona de crecimiento humana, se comparó la actividad intracelular de hGH-PEG-Fc, hGH-40K PEG y hGH-PEG-albúmina.

10 [0161] Las actividades intracelulares de los conjugados de hGH se midieron en un ensayo in vitro usando una línea celular de linfoma de nódulos de rata, Nb2 (Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) n° 97041101), que desarrolla mitogénesis dependiente de la hormona del crecimiento humana.

15 [0162] Las células Nb2 se cultivaron en medio de Fisher complementado con FBS al 10 % (suero bovino fetal), NaCO<sub>3</sub> al 0,075 %, 2-mercaptoetanol 0,05 mM y glutamina 2 mM, y se cultivaron más en un medio similar que no contenía FBS al 10 % durante 24 h. Después, se contaron las células cultivadas, y aproximadamente 2x10<sup>4</sup> células se dividieron en partes alícuotas en cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos. El hGH-PEG-Fc, hGH-40K PEG, hGH-PEG-albúmina, una referencia disponible del Instituto Nacional de Patrones y Controles Biológicos (NIBSC) como control, y hormona del crecimiento humana natural (HM-hGH), se diluyeron y se añadieron a cada pocillo en diferentes concentraciones, seguido de incubación durante 48 h a 37 °C en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después, para medir la actividad de proliferación celular determinando el número de células en cada pocillo, se añadieron 25 µl del reactivo Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega), y las células se cultivaron otras 4 h. Se midió la absorbancia a 490 nm, y se calculó una valoración para cada muestra. Los resultados se dan en la tabla 9, a continuación.

TABLA 9

	Conc. (ng/ml)	Actividad específica* (UI/mg)	Actividad relativa ( %) a la HM-hGH natural
hGH natural	100	2,71E + 06	100
hGH (referencia disponible en el 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/DE <sub>50</sub> x 10 <sup>6</sup> (DE <sub>50</sub> : cantidad de proteína necesaria para 50 % del crecimiento celular máximo)			

30 [0163] Como se muestra en la tabla 9, también en el caso de la hormona del crecimiento humana, la conjugación con PEG de 40 kDa (hGH-40K PEG) produjo una disminución de la actividad a aproximadamente 7,6 % de la forma natural, y el conjugado hGH-PEG-albúmina presentó una actividad in vitro baja que era aproximadamente 5,2 % de la hGH natural. Sin embargo, el conjugado hGH-PEG-Fc de la presente invención aumentó notablemente la actividad relativa a más de 28 % comparado con la hGH natural. A partir de estos resultados, se espera que la hormona del crecimiento humana unida al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una semivida en el suero notablemente mayor y una eficacia farmacéutica in vivo muy mejorada. Además, se cree que la mayor actividad de los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina de la presente invención, se debe a la mayor estabilidad en el suero y la afinidad de unión a los receptores conservada 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 proteínas de Fc de inmunoglobulina acoplados a otras proteínas fisiológicamente activas.

< 4-3 > Comparación de la actividad intracelular de los conjugados de proteínas de G-CSF

45 [0164] Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteínas con un derivado de G-CSF, se comparó la actividad de G-CSF natural (Filgrastim, Jeil Pharm. Co., Ltd.), derivado <sup>17</sup>Ser-G-CSF, 20K PEG-G-CSF (Neulasta), 40K PEG-<sup>17</sup>S-G-CSF, <sup>17</sup>Ser- G-CSF-PEG-albúmina y <sup>17</sup>S-G-CSF-PEG-Fc.

50 [0165] Primero, se cultivó una línea celular mieloide humana HL-60 (ATCC CCL-240, paciente de leucemia promielocítica/mujer caucásica de 36 años), en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 %. Las células cultivadas se suspendieron a una densidad de aproximadamente 2,2x10<sup>5</sup> células/ml, y se añadió DMSO (dimetilsulfóxido, calidad cultivo, Sigma) a las mismas a una concentración final de 1,25 % (v/v). Después, se sembraron 90 µl de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Corning/placa de 96 pocillos de evaporación baja), proporcionando así una densidad de aproximadamente 2x10<sup>4</sup> células por pocillo, y se cultivaron en un incubador a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante aproximadamente 72 h.

55 [0166] Cada muestra, cuya concentración de proteínas se determinó usando un kit de ELISA para G-CSF R&D

systems), se diluyó con RPMI 1640 hasta una concentración idéntica de 10 µg/ml, y después se diluyó otra vez dos veces con RPMI 1640 19 veces. Se añadieron las diluciones seriadas de dos veces individualmente a cada pocillo que contenía células HL-60 en un volumen de 10 µl, de modo que la concentración de cada muestra empezaba en 1 µg/ml. Después, las células se cultivaron en un incubador a 37 °C durante 72 h.

**[0167]** La proliferación de las células HL-60 se ensayó usando Cell Titer 96™ (nº cat. G4100, Promega), y el mayor número de células se determinó midiendo la absorbancia a 670 nm.

TABLA 10

	DE <sub>50</sub> (UI/mg)	Actividad relativa (%) al G-CSF natural
G-CSF natural	0,30	100
<sup>17</sup> Ser-G-CSF	0,26	115
G-CSF-20K PEG (Neulasta)	1,20	25
<sup>17</sup> Ser-G-CSF-40K PEG	10,0	< 10,0
<sup>17</sup> Ser-G-CSF-PEG-albúmina	1,30	23,0
<sup>17</sup> Ser-G-CSF-PEG-Fc	0,58	51,7

**[0168]** Como se muestra en la tabla 10, los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina acoplados a un derivado de G-CSF que tenían una sustitución de aminoácido, <sup>17</sup>Ser-G-CSF, también presentaban efectos similares a los conjugados de proteínas acoplados a G-CSF natural. Se ha descrito previamente que el <sup>17</sup>Ser-G-CSF tenía una semivida en el suero relativamente mayor pero menor actividad comparado con el <sup>17</sup>Ser-G-CSF no pegilado (publicación de patente coreana abierta a consulta por el público nº 2004-83268). En especial, al aumentar el tamaño de los restos de PEG, el conjugado de proteínas tenía mayor estabilidad en el suero pero disminuía gradualmente la actividad. El <sup>17</sup>Ser-G-CSF-40K PEG mostró una actividad muy baja menor de aproximadamente 10 % comparado con la forma natural. Es decir, puesto que un conjugado de proteínas tiene una semivida en el suero prolongada pero una actividad considerablemente menor al aumentar el peso molecular de los restos de PEG, es necesario desarrollar un conjugado de proteínas que tenga una semivida en el suero larga y actividad fuerte. El <sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-albúmina también mostró una actividad baja de aproximadamente 23 % comparado con el G-CSF natural. A diferencia de esto, el <sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-Fc tenía una actividad relativa mucho mejor, de más de 51 % comparado con el G-CSF natural. A partir de estos resultados, se espera que el <sup>17</sup>Ser-G-CSF unido al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una semivida en el suero notablemente mayor y una eficacia farmacéutica in vivo muy mejorada.

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

**[0169]** Se llevó a cabo un ensayo de actividad in vitro usando 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. Se evaluaron los conjugados de Fab' mediante un ensayo de citotoxicidad basado en la medición de la citotoxicidad mediada por el TNF $\alpha$ , para determinar si neutralizaban la apoptosis inducida por el TNF $\alpha$  en una línea celular de fibroblastos de ratón, L929 (ATCC CRL-2148).

**[0170]** Los conjugados Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc y el complejo Fab'-S-40K PEG se diluyeron dos veces de forma seriada, y se pusieron partes alícuotas de 100 µl en pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadieron rhTNF- $\alpha$  (R&D systems) y actinomicina D (Sigma) usados como un inhibidor de la síntesis de ARN a cada pocillo en concentraciones finales de 10 ng/ml y 1 µg/ml, respectivamente, se incubaron durante 30 min en un incubador a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % y se transfirieron a una microplaca para el ensayo. Se añadieron células L929 a cada pocillo con una densidad de 5x10<sup>4</sup> células/50 µl de medio y se cultivaron durante 24 h en un incubador a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de separar el medio de cultivo, se añadieron a cada pocillo 50 µl de MTT (Sigma) disueltos en PBS en una concentración de 5 mg/ml, y las células se cultivaron más durante aproximadamente 4 h en un incubador a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se añadieron 150 µl de DMSO a cada pocillo y el grado de neutralización de la citotoxicidad se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm. Como control se usó el Fab' purificado en la etapa 1 del ejemplo 8.

**[0171]** Como se muestra en la figura 16, todos los conjugados de proteína usados en este ensayo tenían una valoración similar del Fab'. Estos resultados indican que, cuando se prepara un conjugado de proteínas uniendo un Fc de inmunoglobulina a un resto de cisteína libre cerca del extremo N o el extremo C de un Fab' mediante PEG, el Fab' presenta una semivida en el suero notablemente mayor y una actividad in vivo alta.

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

**[0172]** Para determinar si los derivados preparados en los ejemplos y las proteínas correspondientes a las regiones constantes de inmunoglobulinas, expresadas en los transformantes de *E. coli* y purificadas, se unen a C1q humano, se llevó a cabo un ensayo de inmunoadsorción (ELISA) como sigue. Como grupos de ensayo, se usaron regiones constantes de inmunoglobulina producidas por los transformantes HM10932 y HM10927 y los

derivados preparados en los ejemplos anteriores. Como referencias, se usaron una inmunoglobulina glicosilada (IVIG-globulin S, Green Cross PBM) y varios anticuerpos disponibles en el comercio usados como anticuerpos terapéuticos. Las muestras de ensayo y de referencia se prepararon en tampón de carbonato 10 mM (pH 9,6) en una concentración de 1 µg/ml. Las muestras se repartieron en partes alícuotas en una placa de 96 pocillos (Nunc) en una cantidad de 200 ng por pocillo y la placa se recubrió durante la noche a 4 °C. Después, cada pocillo se lavó con PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, Tween 20 al 0,05 %) 3 veces, se bloqueó con 250 µl de tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino al 1 % en PBS-T) a temperatura ambiente durante 1 h y se lavó otra vez con el mismo PBS-T 3 veces. Las muestras de referencia y de ensayo se diluyeron en PBS-T a una concentración predeterminada y se añadieron a pocillos recubiertos con anticuerpo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y se lavó con PBS-T 3 veces. Después, se añadieron 2 µg/ml de C1q (R&D Systems) a la placa y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h, y la placa se lavó con PBS-T 6 veces. Se añadieron a cada pocillo 200 µl de una dilución 1:1000 de conjugado de anticuerpo humano dirigido contra C1q humano-peroxidasa (Biogenesis, EE.UU.) en el tampón de bloqueo y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar cada pocillo 3 veces con PBS-T, se mezclaron volúmenes iguales de los reactivos de color A y B (Color A: peróxido estabilizado y Color B: cromógeno estabilizado; DY 999, R&D Systems), y se añadieron 200 µl de la mezcla a cada pocillo, seguido de incubación durante 30 min. Después, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una disolución de terminación de la reacción, ácido sulfúrico 2 M. La placa se leyó usando un lector de microplaca (Molecular Device). Se midió la absorbancia de las muestras de referencia y de ensayo a 450 nm, y los resultados se dan en las figuras 17 y 18, respectivamente.

**[0173]** Cuando se comparó la actividad del complemento de las subclases de inmunoglobulina entre sí en su fragmento Fc de inmunoglobulina, la mayor afinidad de unión a C1q se encontró en la inmunoglobulina humana IgG1 (Fitzgerald), la siguiente en IgG2 (Fitzgerald) y después en IgG4 (Fitzgerald), indicando que hay una diferencia entre las subclases en la actividad del complemento. La IVIG usada en este ensayo, que es una mezcla de subclases de IgG, presentaba una afinidad de unión a C1q casi igual que la IgG1 purificada, porque la IgG1 da cuenta de la mayor parte de IVIG. Comparado con estas referencias, con respecto a los cambios en la afinidad de unión a C1q por aglicosilación, el Fc de IgG1 que tiene la actividad del complemento más fuerte, disminuyó notablemente cuando estaba aglicosilado. El Fc de IgG4 que se sabía que no inducía actividad del complemento, raramente tenía afinidad de unión a C1q, indicando que el Fc de IgG4 se usa como un vehículo recombinante excelente sin actividad del complemento (Fig. 17).

**[0174]** Para determinar si el vehículo mantiene su propiedad de no tener afinidad de unión a C1q incluso después de ser conjugado a un péptido fisiológicamente activo, se prepararon conjugados de IFN alfa-Fc usando Fc glicosilado, Fc enzimáticamente desglicosilado y Fc recombinante aglicosilado como vehículos para el IFN alfa, y se evaluó su afinidad de unión a C1q. Un conjugado de IFN alfa acoplado a Fc glicosilado (IFN $\alpha$ -PEG-Fc:IgG1Fc glicosilado) mantenía una alta afinidad de unión a C1q. A diferencia de esto, cuando el interferón alfa se acopló a un Fc desglicosilado usando PNGasa F y otras enzimas, el conjugado resultante (IFN $\alpha$ -PEG-DGFC:IgG1Fc desglicosilado) presentaba una afinidad de unión a C1q notablemente menor, que era similar a la del conjugado de Fc aglicosilado derivado de *E. coli*. Además, cuando el resto de IgG1 del conjugado de interferón alfa acoplado a Fc de IgG1 aglicosilado (IFN $\alpha$ -PEG-AGFCG1:IgG1Fc aglicosilado) se intercambiaba por el resto de IgG4, se encontró que el conjugado de interferón resultante (IFN $\alpha$ -PEG-FcG4 derivado 1:IgG4Fc aglicosilado) perdía completamente su afinidad de unión a C1q. Cuando el resto Fc de IgG1 se intercambiaba por el monómero de Fc de IgG4, el conjugado resultante era (IFN $\alpha$ -PEG-FcG4 derivado 2:IgG4Fc aglicosilado). Estos resultados indican que dichas formas del fragmento Fc de IgG4 son útiles como vehículos excelentes que no tienen funciones efectoras de los fragmentos de anticuerpos (fig. 18).

#### Aplicabilidad industrial

**[0175]** Como se ha descrito en lo que antecede, los fragmentos Fc de IgG de la presente invención aumentan las semividas en el suero de los fármacos y mantienen la actividad in vivo de los fármacos, cuando se usan como vehículos. En particular, los presentes fragmentos Fc de IgG aumentan las semividas en el suero de fármacos polipeptídicos a niveles mayores que cualquier proteína modificada convencional, y superan la desventaja más significativa de formulaciones convencionales de acción prolongada, valoraciones disminuidas, teniendo por lo tanto un tiempo en la circulación sanguínea y actividad in vivo superiores a la albúmina, que previamente se sabía que era la más eficaz. Además, los presentes fragmentos Fc de IgG no tienen riesgo de inducir respuestas inmunitarias. Debido a estas ventajas, los presentes fragmentos Fc de IgG son útiles para desarrollar formulaciones de acción prolongada de fármacos proteínicos. Además, las formulaciones de acción prolongada de los fármacos proteínicos de acuerdo con la presente invención, son capaces de reducir el dolor del paciente por las frecuentes inyecciones, y mantener concentraciones en el suero de polipéptidos activos durante un periodo de tiempo prolongado, proporcionando así establemente eficacia farmacéutica.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES  
MODELO INTERNACIONAL

5 Para Kyung-yoon Min  
Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd  
893-3, Hajeo-ri, Paltan myeon, Hwaseong si;  
Gyeonggi do, Corea

10 RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página

<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10927	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM-10588
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: una descripción científica una designación taxonómica propuesta (Marque con una x en su caso)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este el 15 de Septiembre de 2004 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b>	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 República de Corea	Firma(s) de persona(s) que tiene(n) la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados:  Fecha: 21 de Sep., 2004.

15 1 En donde se aplica la Regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estatuto de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estatuto de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibe el microorganismo.  
Modelo BP/4  
Página única

20 TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES  
MODELO INTERNACIONAL

25 Para Kyung-yoon Min  
Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd  
893-3, Hajeo-ri, Paltan myeon, Hwaseong si;  
Gyeonggi do, Corea

30 RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página

<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10928	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM-10589
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: una descripción científica una designación taxonómica propuesta (Marque con una x en su caso)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este el 15 de Septiembre de 2004 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b>	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong,	Firma(s) de persona(s) que tiene(n) la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados:

Seodaemun-gu SEOUL 120-091 República de Corea	Fecha: 21 de Sep., 2004.
---	--------------------------

1 En donde se aplica la Regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estatuto de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estatuto de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibe el microorganismo.

Modelo BP/4  
Página única

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES  
MODELO INTERNACIONAL

Para Kyung-yoon Min  
Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd  
893-3, Hajeo-ri, Paltan myeon, Hwaseong si;  
Gyeonggi do, Corea

RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10929	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM-10594
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: una descripción científica una designación taxonómica propuesta (Marque con una x en su caso)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este el 15 de Septiembre de 2004 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 República de Corea	Firma(s) de persona(s) que tiene(n) la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados:  Fecha: 21 de Sep., 2004.

1 En donde se aplica la Regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estatuto de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estatuto de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibe el microorganismo.

Modelo BP/4  
Página única

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES  
MODELO INTERNACIONAL

Para Kyung-yoon Min  
Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd  
893-3, Hajeo-ri, Paltan myeon, Hwaseong si;  
Gyeonggi do, Corea

RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página

<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10930	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM-10595
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: una descripción científica una designación taxonómica propuesta (Marque con una x en su caso)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este el 15 de Septiembre de 2004 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b>	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 República de Corea	Firma(s) de persona(s) que tiene(n) la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados:  Fecha: 21 de Sep., 2004.

- 5 1 En donde se aplica la Regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estatuto de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estatuto de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibe el microorganismo.

Modelo BP/4  
Página única

- 10 TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES  
MODELO INTERNACIONAL

- 15 Para Kyung-yoon Min  
Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd  
893-3, Hajeo-ri, Paltan myeon, Hwaseong si;  
Gyeonggi do, Corea

- 20 RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página

<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10932	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM-10597
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: una descripción científica una designación taxonómica propuesta (Marque con una x en su caso)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este el 15 de Septiembre de 2004 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b>	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 República de Corea	Firma(s) de persona(s) que tiene(n) la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados:  Fecha: 21 de Sep., 2004.

- 25 1 En donde se aplica la Regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estatuto de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estatuto de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibe el microorganismo.

Modelo BP/4  
Página única

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES  
MODELO INTERNACIONAL

5 Para Kyung-yoon Min  
Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd  
893-3, Hajeo-ri, Paltan myeon, Hwaseong si;  
Gyeonggi do, Corea

10 RECIBA EN EL CASO DE UN ORIGINAL emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada al final de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: HM10933	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KCCM-10598
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompaña por: una descripción científica una designación taxonómica propuesta (Marque con una x en su caso)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que se recibe por este el 15 de Septiembre de 2004 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 República de Corea	Firma(s) de persona(s) que tiene(n) la facultad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de los Funcionarios autorizados:  Fecha: 21 de Sep., 2004.

15 1 En donde se aplica la Regla 6.4(d), tal fecha es la fecha en la que se adquiere el estatuto de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito hecho por fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estatuto de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, tal fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibe el microorganismo.  
Modelo BP/4  
Página única

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- < 110 > HANMI PHARM. IND. CO., LTD.
- < 120 > FRAGMENTO Fc DE IgG PARA UN VEHÍCULO DE FÁRMACO Y PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN
- < 150 > KR 10-2003-0080299
- < 151 > 2003-11-13
- < 160 > 23
- < 170 > KopatentIn 1.71
- < 210 > 1
- < 211 > 35
- < 212 > ADN
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > cebador
- < 400 > 1

cgctatgcc agcacctgag ttctggggg gacca 35

- < 210 > 2
- < 211 > 42
- < 212 > ADN
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > cebador
- < 400 > 2



ES 2 383 300 T3

gggggatcct cattfaccca gagacagga gaggctcttc tg 42

- < 210 > 3
- < 211 > 12
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > Homo sapiens
- < 400 > 3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
1 5 10

- 10 < 210 > 4
- < 211 > 663
- < 212 > ADN
- < 213 > homo sapiens
- 15 < 400 > 4

```

tcatgccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tcctgttccc cccaaaaccc 60
aaggacactc tcatgatctc ccggaccctt gaggtaacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc 120
caggaagacc ccgaggcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc 180
aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacglacc gtgtggtcag cgtcctcacc 240
gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaaaggc 300
ctcccgctct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaag ggcagccccg agagccacag 360
gtglacacc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 420
ctgttcaag gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 480
gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt cttcctctac 540
agcaggctaa ccgtggacaa gacaggtgg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg 600
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa 660

tga 663

```

- 20 < 210 > 5
- < 211 > 69
- < 212 > ADN
- < 213 > homo sapiens
- < 400 > 5

```

atgaaaaaga caatcgcaat tcttcttga tctatgttcc tttttctat tgctacaaat 60
gcccaggcg 69

```

- 30 < 210 > 6
- < 211 > 45
- < 212 > ADN
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > cebador
- < 400 > 6

35 tctattgcta caaatgccca ggccttccca accattccct tatcc 45

- < 210 > 7
- < 211 > 45
- < 212 > ADN



ES 2 383 300 T3

```

gcacctgagt tccctggggg accatcagtc ttccctgttcc ccccaaaacc caaggacact      60
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac      120
cccgaggctc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag      180
ccgctggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggta cgcctctcac cgtcctgcac      240
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc      300
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc      360
ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccaggta ccttgacctg cctggtaaaa      420
ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac      480
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctc cagcaggcta      540
accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtctct catgctccgt gatgatgag      600
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa atga          654
    
```

- < 210 > 10
- < 211 > 217
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > homo sapiens
- < 400 > 10

```

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1          5          10          15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
          20          25          30
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
          35          40          45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
          50          55          60
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
          65          70          75          80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
          85          90          95
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
          100          105          110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
          115          120          125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
          130          135          140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
          145          150          155          160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
          165          170          175
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
          180          185          190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
          195          200          205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
          210          215
    
```

ES 2 383 300 T3

5 < 210 > 11  
 < 211 > 33  
 < 212 > ADN  
 < 213 > Secuencia artificial  
 < 220 >  
 < 223 > cebador  
 < 400 > 11

10 cgccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gac 33

< 210 > 12  
 < 211 > 33  
 < 212 > ADN  
 < 213 > Secuencia artificial  
 < 220 >  
 < 223 > cebador  
 < 400 > 12

20 ggggatcct catttaccg gagacagga gag 33

< 210 > 13  
 < 211 > 15  
 < 212 > PRT  
 < 213 > homo sapiens  
 < 400 > 13

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10 15

30 < 210 > 14  
 < 211 > 660  
 < 212 > ADN  
 < 213 > homo sapiens  
 < 400 > 14

ccgtgccag cacctgaact cctggggga ccgtcagtct tcctttccc cccaaaacc 60  
 aaggacacce tcatgatctc cggaccct gaggtacat gcgtggtgt ggacgtgagc 120  
 cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 180  
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc 240  
 gtctgcacc aggactggt gaatggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc 300  
 ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc aaagccaaag ggcagcccc agagccacag 360  
 gtgtacacce tgccccatc cgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 420  
 ctactcaaaa acttctatcc caaccatc accgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 480  
 gagaacaact acaagaccac gctcccgtg ctggactccg acggtcctt ctctcttac 540  
 agcaagctca ccgiggaaa gagcaggtgg cagcagggga acgtctctc atgctccgtg 600  
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 660  
 660

35 < 210 > 15  
 < 211 > 220  
 < 212 > PRT  
 < 213 > homo sapiens  
 < 400 > 15

ES 2 383 300 T3

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 20 25 30  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 35 40 45  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 50 55 60  
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 85 90 95  
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 100 105 110  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 115 120 125  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 130 135 140  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 165 170 175  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 180 185 190  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 195 200 205  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215 220

- 5 < 210 > 16
- < 211 > 26
- < 212 > ADN
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > cebador
- 10 < 400 > 16

cggcacctga actcctgggg ggaccg 26

- 15 < 210 > 17
- < 211 > 651
- < 212 > ADN
- < 213 > homo sapiens
- < 400 > 17

ES 2 383 300 T3

```

gcaccigaac tccigggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc      60
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac      120
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag      180
ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac      240
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc      300
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc      360
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa      420
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac      480
tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc      540
accgtggaca agagcaggig gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag      600
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a                651

```

- < 210 > 18
- < 211 > 217
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > homo sapiens
- < 400 > 18

```

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
  1          5          10
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
          20          25          30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
          35          40          45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
  50          55          60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
  65          70          75          80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
          85          90          95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100          105          110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 115          120          125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130          135          140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145          150          155          160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165          170          175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180          185          190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195          200          205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210          215

```

ES 2 383 300 T3

5 < 210 > 19  
< 211 > 29  
< 212 > ADN  
< 213 > Secuencia artificial  
< 220 >  
< 223 > cebador  
< 400 > 19

10 cgccgtgcc agcacctccg gtggcggga 29

15 < 210 > 20  
< 211 > 33  
< 212 > ADN  
< 213 > Secuencia artificial  
< 220 >  
< 223 > cebador  
< 400 > 20

20 ggggatcct cattaccg gagacagga gag 33

25 < 210 > 21  
< 211 > 12  
< 212 > PRT  
< 213 > homo sapiens  
< 400 > 21

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

30 < 210 > 22  
< 211 > 657  
< 212 > PRT  
< 213 > homo sapiens  
< 400 > 22

ES 2 383 300 T3

Cys<sub>1</sub> Cys Gly Thr Gly<sub>5</sub> Cys Cys Cys Ala Gly<sub>10</sub> Cys Ala Cys Cys Thr<sub>15</sub> Cys  
 Cys Gly Gly Thr<sub>20</sub> Gly Gly Cys Gly Gly<sub>25</sub> Gly Ala Cys Cys Gly<sub>30</sub> Thr Cys  
 Ala Gly Thr<sub>35</sub> Cys Thr Thr Cys Cys<sub>40</sub> Thr Cys Thr Thr Cys<sub>45</sub> Cys Cys Cys  
 Cys Cys<sub>50</sub> Ala Ala Ala Ala Cys<sub>55</sub> Cys Cys Ala Ala Gly<sub>60</sub> Gly Ala Cys Ala  
 Cys<sub>65</sub> Cys Cys Thr Cys Ala<sub>70</sub> Thr Gly Ala Thr Cys<sub>75</sub> Thr Cys Cys Cys Gly<sub>80</sub>  
 Gly Ala Cys Cys Cys<sub>85</sub> Cys Thr Gly Ala Gly<sub>90</sub> Gly Thr Cys Ala Cys<sub>95</sub> Ala  
 Thr Gly Cys Gly<sub>100</sub> Thr Gly Gly Thr Gly<sub>105</sub> Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly  
 Thr Gly Ala<sub>115</sub> Gly Cys Cys Ala Cys<sub>120</sub> Gly Ala Ala Gly<sub>125</sub> Ala Cys Cys Cys  
 Thr Gly<sub>130</sub> Ala Gly Gly Thr Cys<sub>135</sub> Cys Ala Gly Thr Thr<sub>140</sub> Cys Ala Ala Cys  
 Thr<sub>145</sub> Gly Gly Thr Ala Cys<sub>150</sub> Gly Thr Gly Gly Ala<sub>155</sub> Cys Gly Gly Cys Gly<sub>160</sub>  
 Thr Gly Gly Ala Gly<sub>165</sub> Gly Thr Gly Cys Ala<sub>170</sub> Thr Ala Ala Thr Gly<sub>175</sub> Cys



ES 2 383 300 T3

Cys Ala Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys Gly Cys Gly Gly  
 180 185 190  
 Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr Ala Ala Cys Ala  
 195 200 205  
 Gly Cys Ala Cys Gly Thr Thr Thr Cys Gly Thr Gly Thr Gly Gly Thr  
 210 215 220  
 Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys  
 225 230 235 240  
 Gly Thr Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys  
 245 250 255  
 Thr Gly Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Ala  
 260 265 270  
 Cys Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys  
 275 280 285  
 Ala Ala Cys Ala Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly  
 290 295 300  
 Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys  
 305 310 315 320  
 Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys Cys Ala Ala Ala  
 325 330 335  
 Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Gly Cys  
 340 345 350  
 Cys Ala Cys Ala Gly Gly Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr  
 355 360 365  
 Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala Ala  
 370 375 380  
 Gly Ala Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys  
 385 390 395 400  
 Ala Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly  
 405 410 415  
 Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys  
 420 425 430  
 Thr Ala Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly  
 435 440 445  
 Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly  
 450 455 460  
 Cys Ala Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala  
 485 490 495  
 Cys Gly Cys Cys Thr Cys Cys Cys Ala Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala  
 500 505 510  
 Cys Thr Cys Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys  
 515 520 525  
 Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly Cys  
 530 535 540  
 Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly  
 545 550 555 560  
 Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Gly Gly  
 565 570 575

ES 2 383 300 T3

Ala Ala Cys Gly Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Ala Thr Gly Cys Thr  
 580 585 590  
 Cys Cys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Cys Ala Thr Gly Ala Gly Gly Cys  
 595 600 605  
 Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Cys Thr Ala Cys  
 610 615 620  
 Ala Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr  
 625 630 635 640  
 Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Gly Gly Gly Thr Ala Ala  
 645 650 655  
 Ala

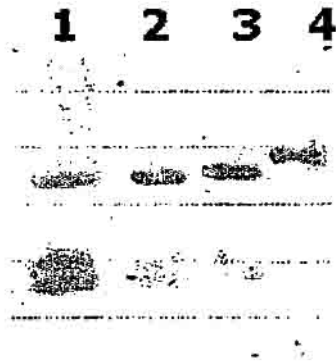
- < 210 > 23
- < 211 > 219
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > homo sapiens
- < 400 > 23

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 20 25 30  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn  
 35 40 45  
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 50 55 60  
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 65 70 75 80  
 Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 85 90 95  
 Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys  
 100 105 110  
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu  
 115 120 125  
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 165 170 175  
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 180 185 190  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 195 200 205  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso del fragmento Fc como un vehículo de fármacos, en el que el fragmento Fc es un Fc de IgG, en el que el fragmento Fc está unido covalentemente a un fármaco por un conector no peptídico, en el que
- (i) el fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 8,  
(ii) el conector no peptídico es polietilenglicol, y  
(iii) el fármaco es un fármaco polipeptídico.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc se produce por expresión de un gen que codifica el fragmento Fc.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el gen tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO. 4.
- 15 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el que el gen es parte de un vector recombinante.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc se expresa por un transformante transformado con el vector recombinante definido en la reivindicación 4.
- 20 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc se prepara por cultivo del transformante definido en la reivindicación 5.

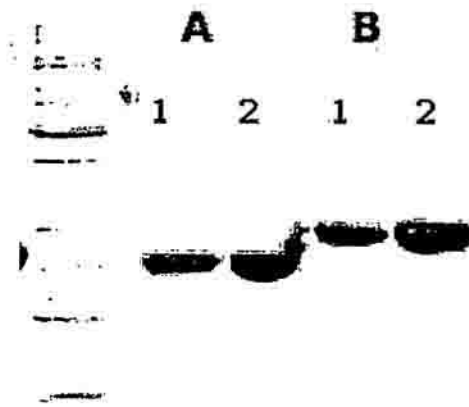
**FIG. 1**



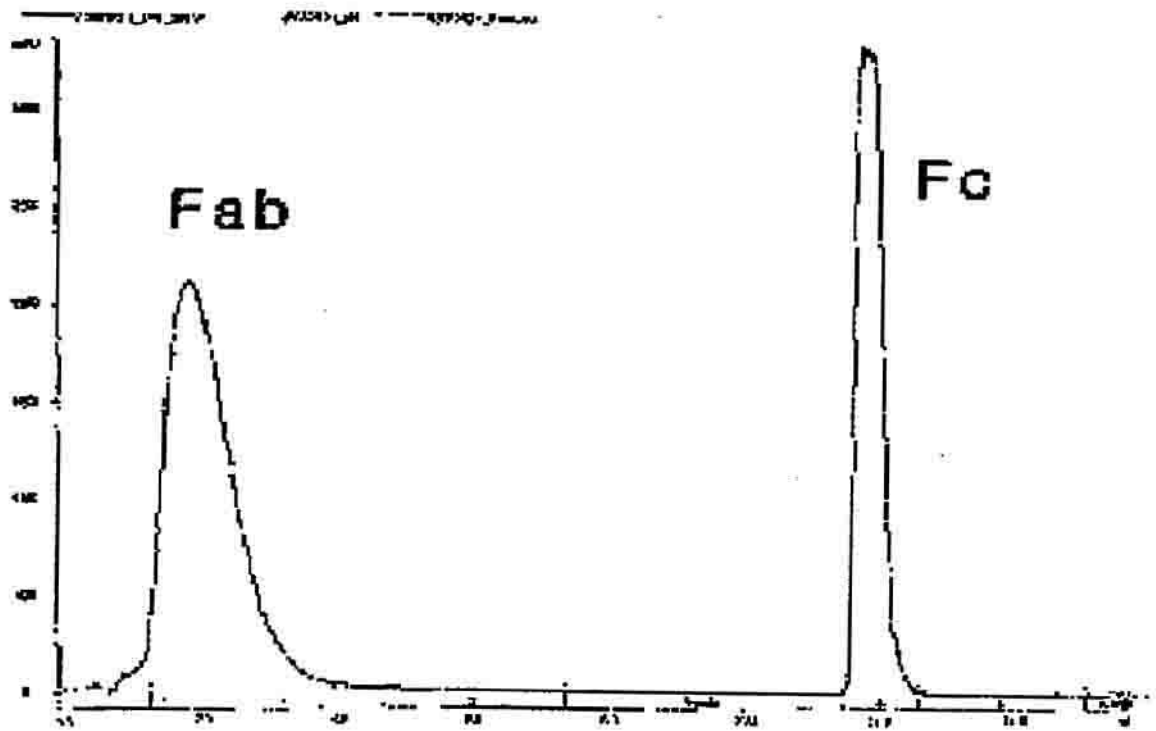
**FIG. 2**



**FIG. 3**

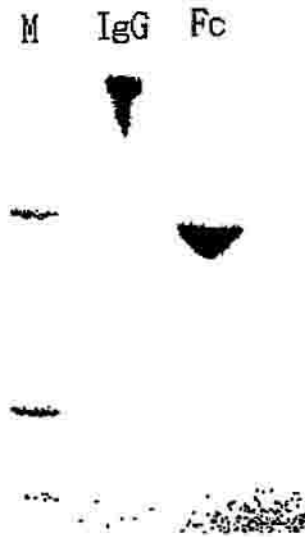


**FIG. 4**

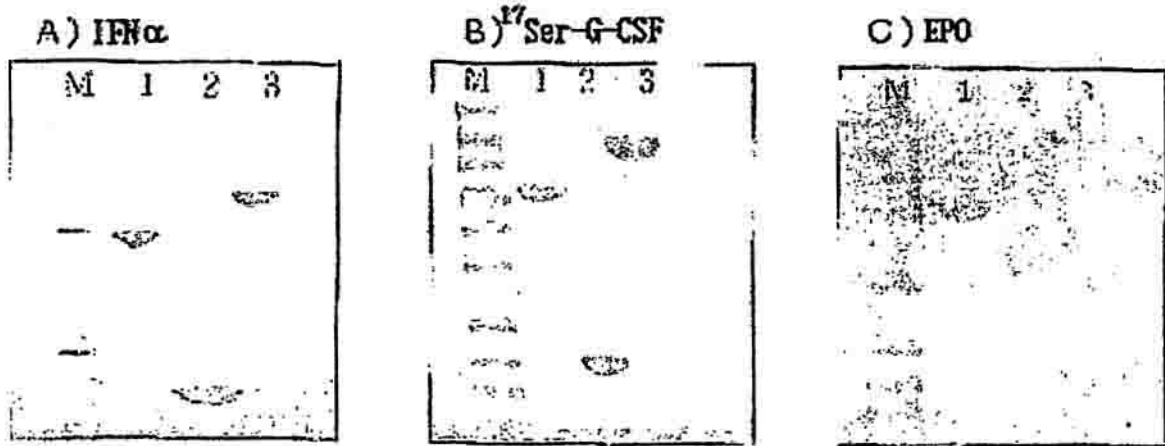


Proteína A (elución por pH gradual)

**FIG. 5**



**FIG. 6**



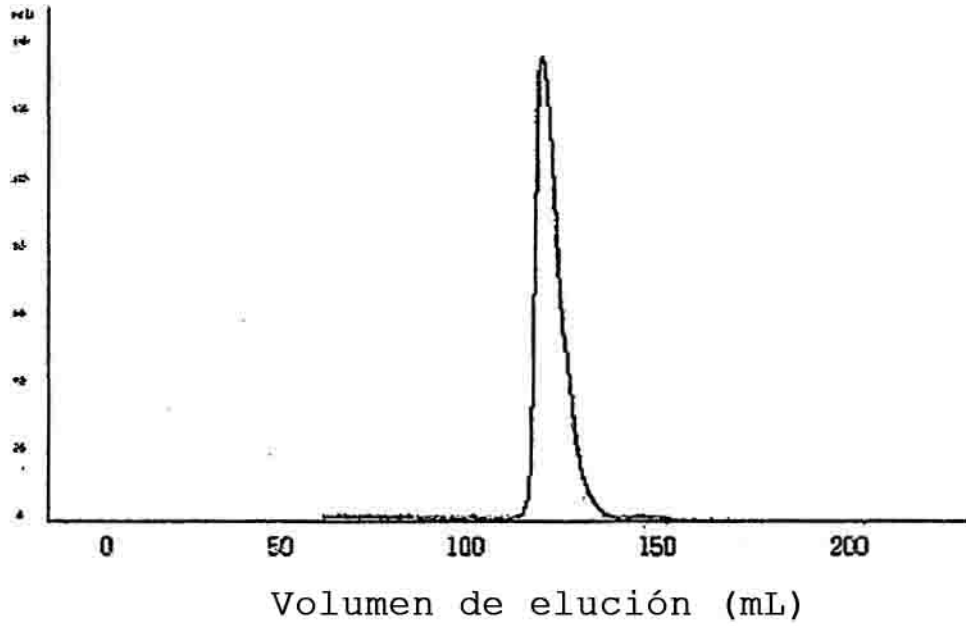
M: Marcador de peso molecular

Banda 1: Fc

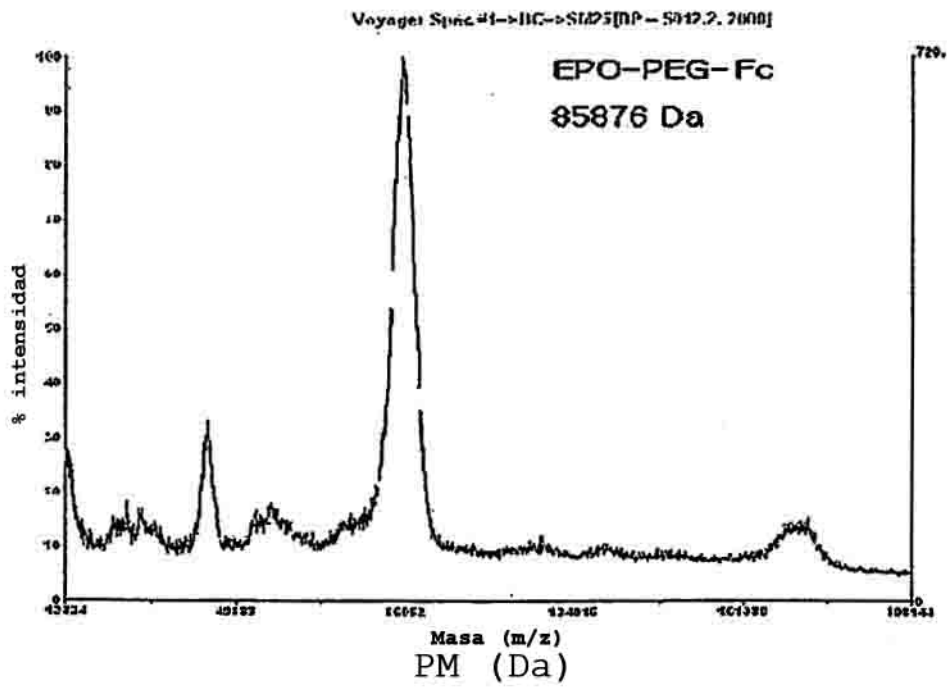
Banda 2: Proteína fisiológicamente activa

Banda 3: Conjugado proteína fisiológicamente activa-PEG-Fc

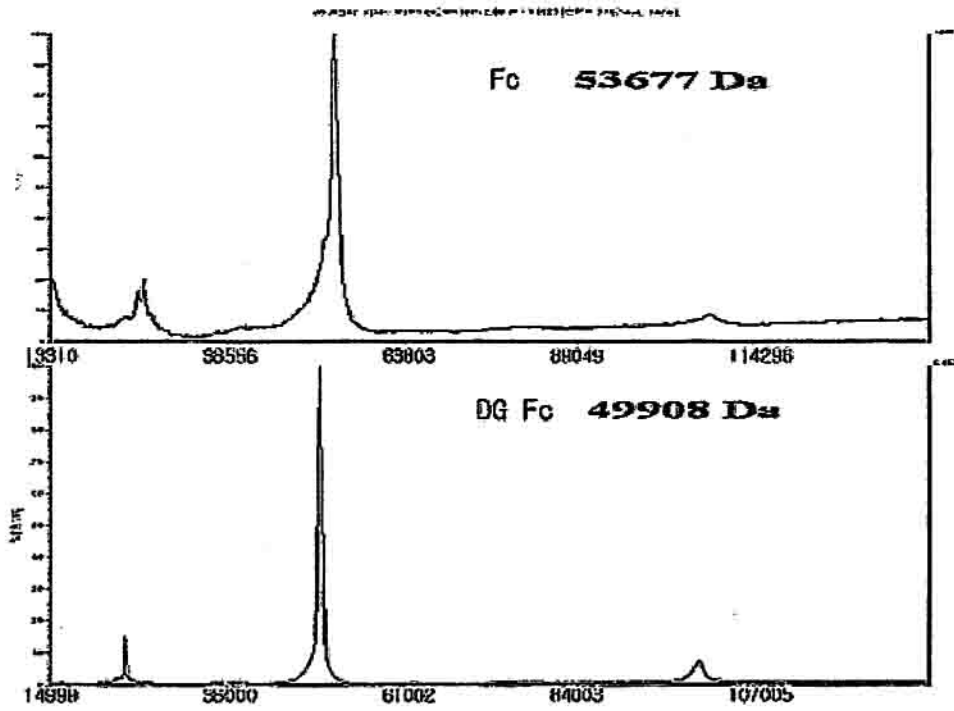
**FIG. 7**



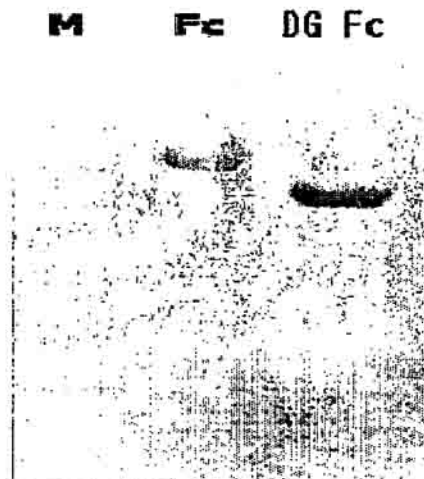
**FIG. 8**



**FIG. 9a**

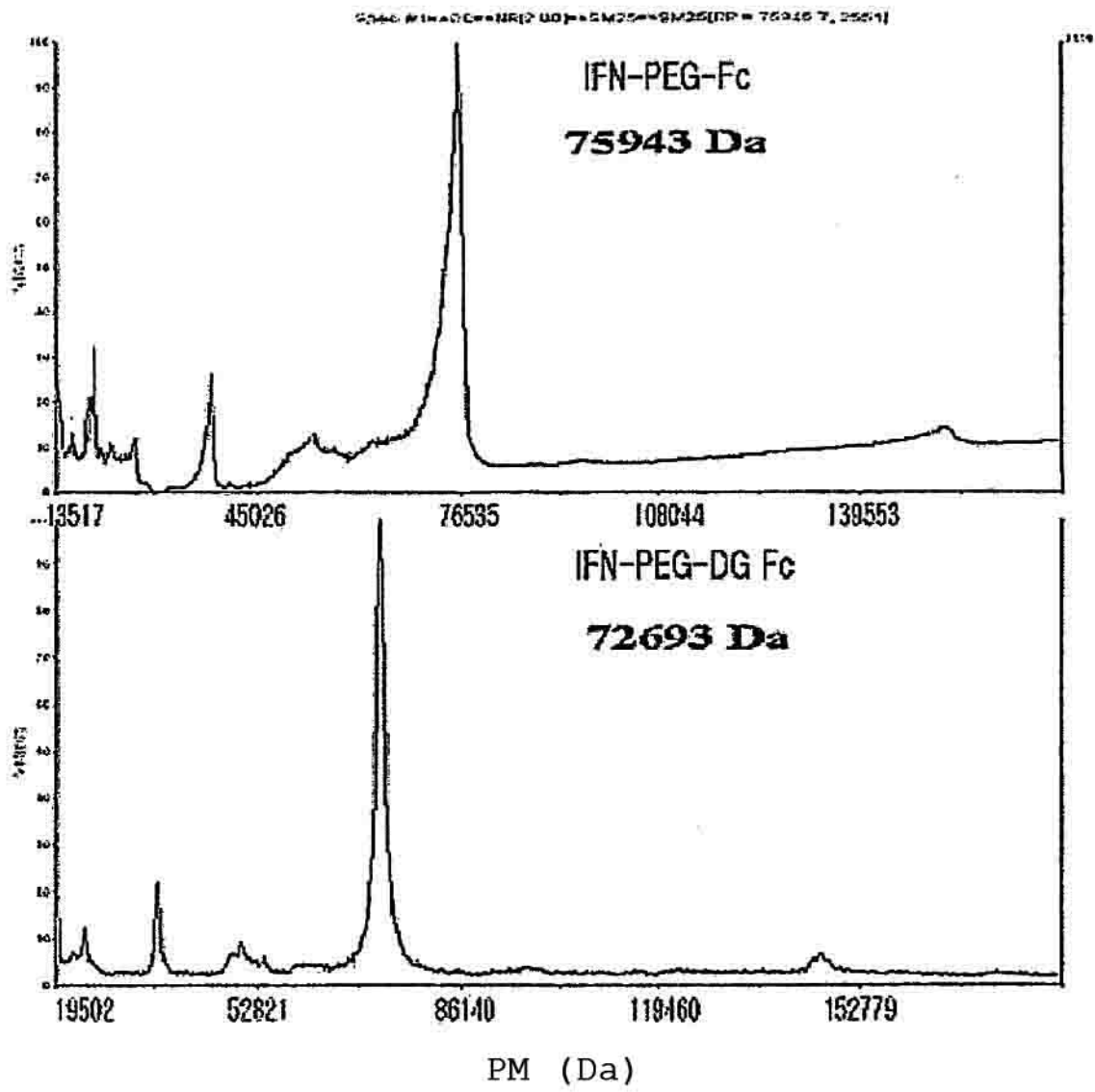


**FIG. 9b**

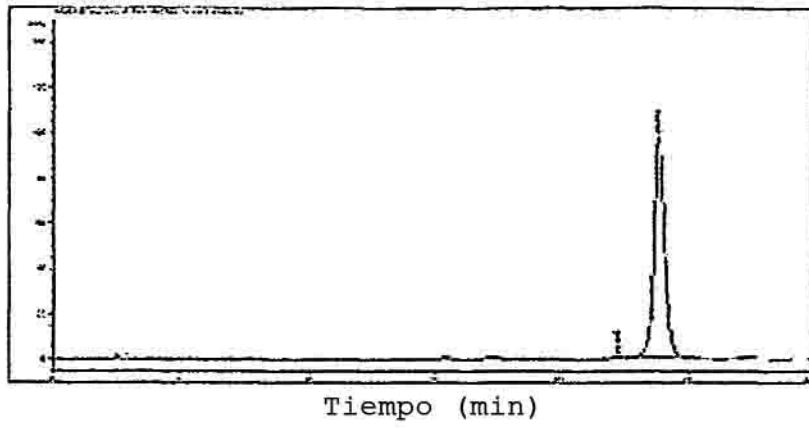




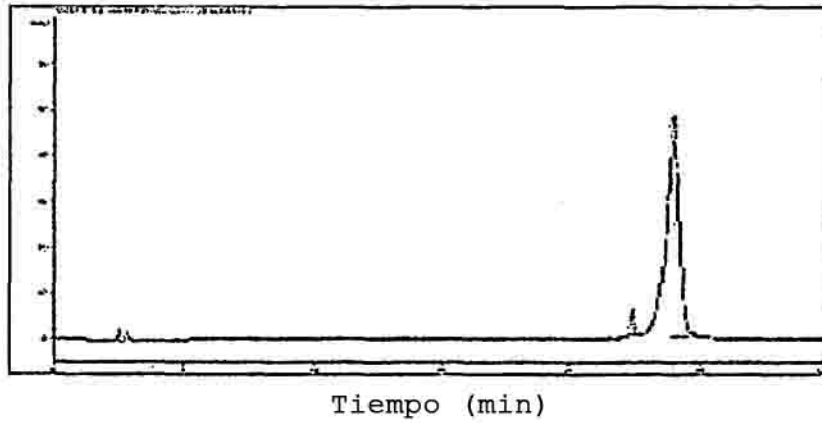
**FIG. 10**



**FIG. 11a**



**FIG. 11b**



**FIG. 11c**

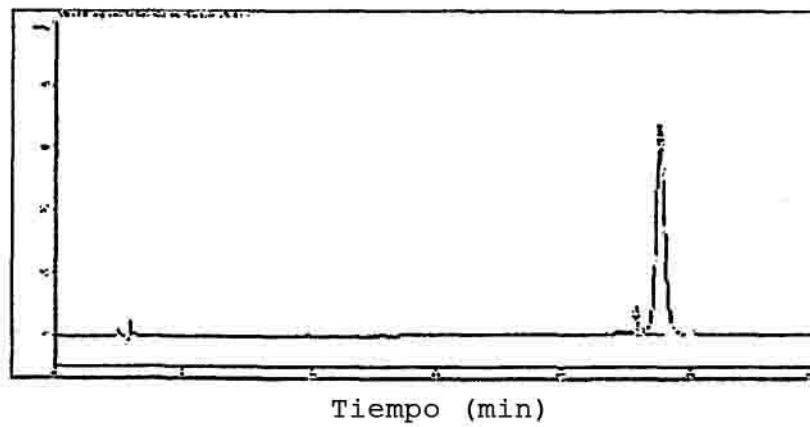


FIG. 12

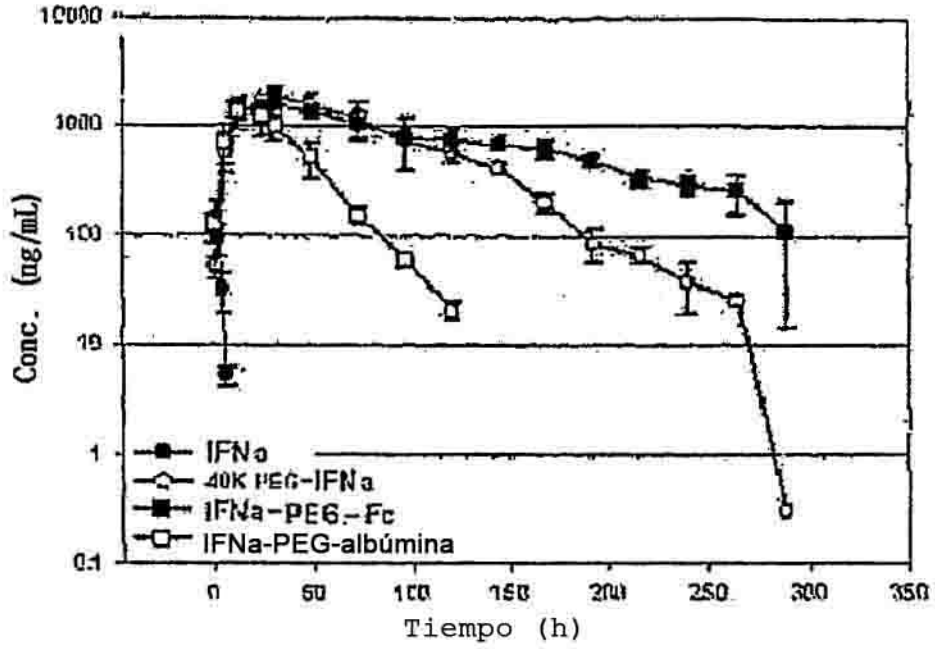


FIG. 13

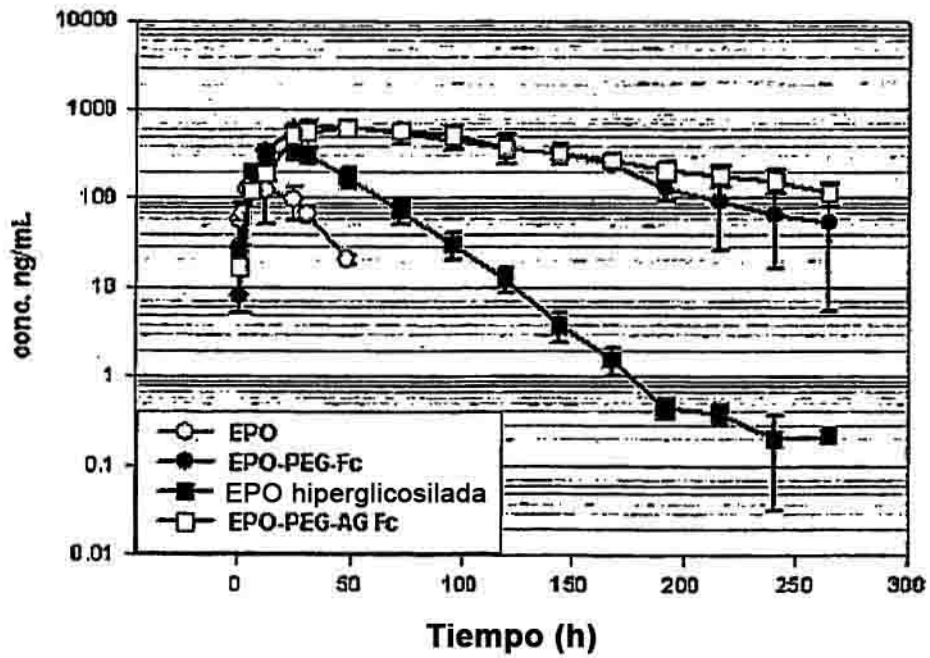


FIG. 14

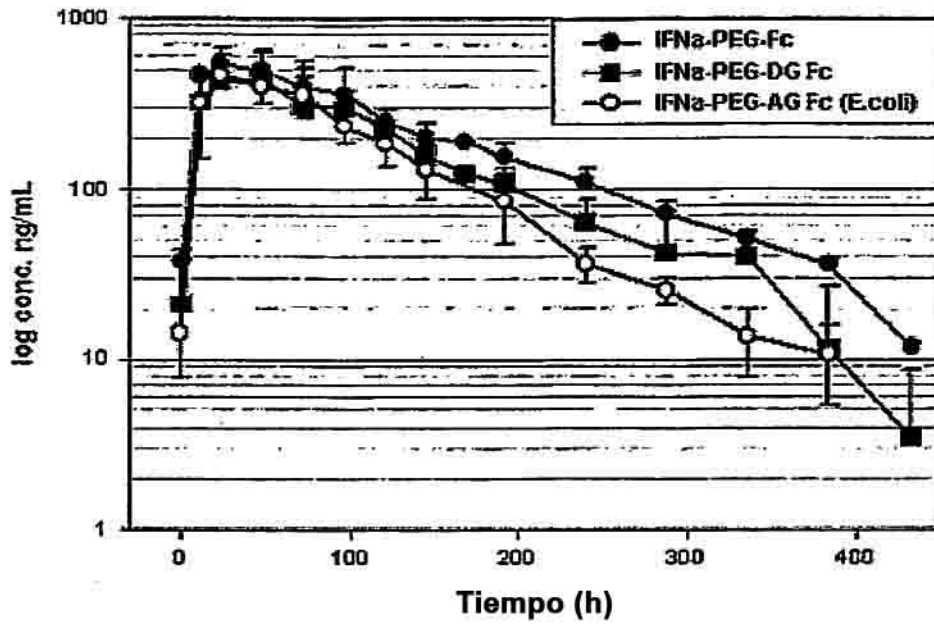


FIG. 15

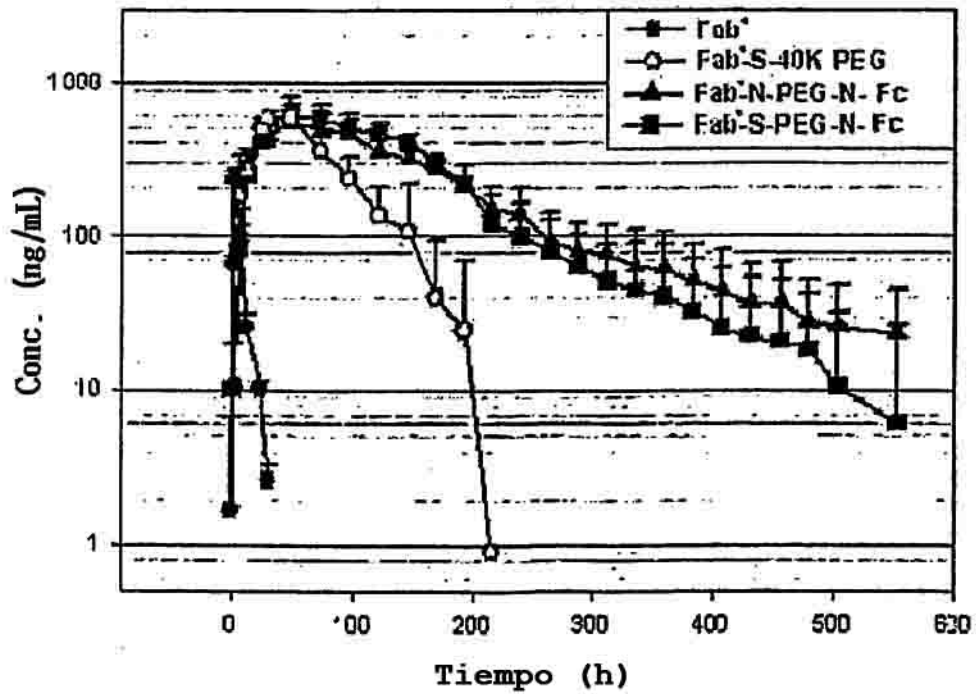


FIG. 16

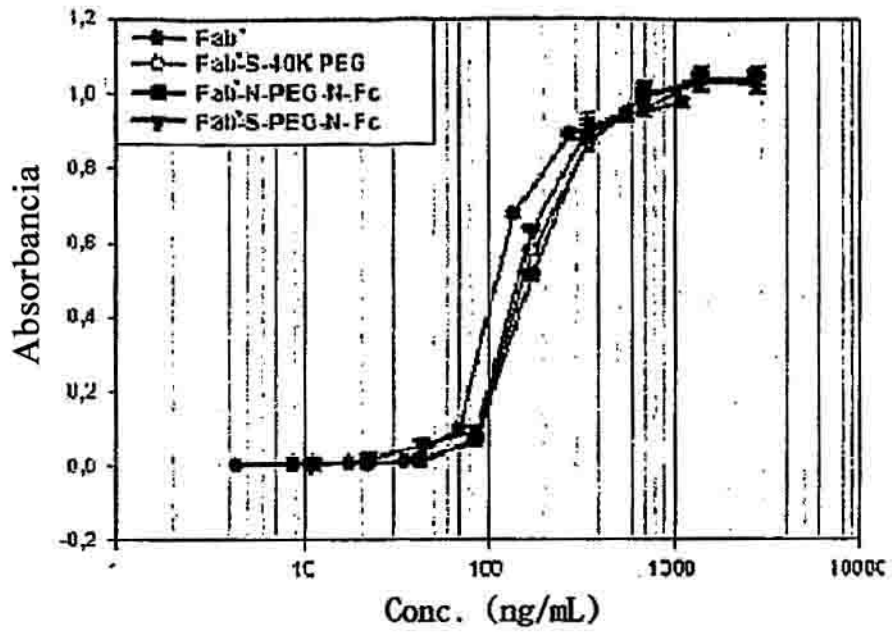
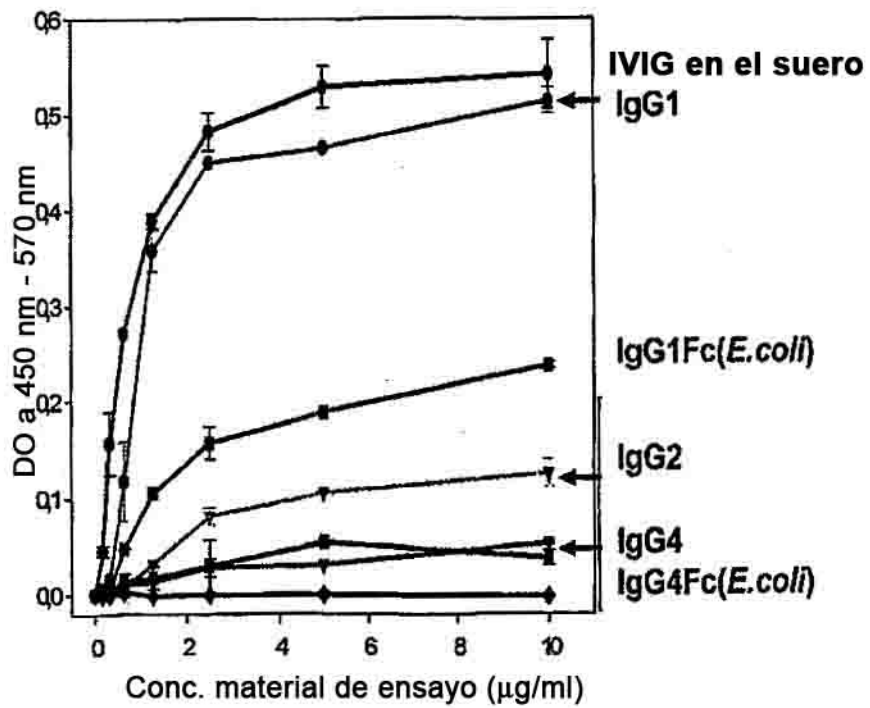


FIG. 17



**FIG. 18**

